Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(107): 19-25

Lymphocyte Proliferation Response in Patients with Acute and Chronic Brucellosis

Khadijeh Khosravi[1], Nader Zarinfar[2], Ehsanollah Ghaznavi-Rad[3], Ghasem Mosayebi[4*]

1- MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2- Associate Professor, Department of Infection Diseases, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4- Professor of Immunology, Department of Microbiology and Immunology, Molecular and Medicine Research Center (MMRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 17 Nov 2015, Accepted: 8 Dec 2015

Abstract

Background: Brucella is an intracellular bacterium that causes chronic infection in humans and domestic animals. The underlying mechanisms that cause prolonged illness are complex and not fully understood. Immune responses may have an important role in the chronicity of infection. Here, we evaluated the lymphocyte proliferation responses in patients with chronic and acute brucellosis.

Materials and Methods: This descriptive - analytical study was performed on 22 patients with acute brucellosis, 21 patients with chronic brucellosis and 21 healthy people with the similar age, sex and genetic background as control group. Peripheral lymphocytes were isolated using Ficoll and the cellular proliferation was quantified in presence of antigen and phytohemaglutinin-A by MTT method.

Results: The brucella antigen-specific stimulation index in patients with chronic brucellosis was significantly lower than the acute brucellosis patients ($p=0.001$). Also, stimulating the lymphocytes with phytohemaglutinin-A has shown that proliferative response in patients with chronic brucellosis was lower than the other groups ($p=0.04$).

Conclusion: The results indicated that chronic brucellosis inhibits lymphocyte proliferation. This inhibition of lymphocyte proliferation may be due to the induction of anergy.

Keywords: Brucella, Proliferation response, Acute, Chronic.

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology and Immunology, Molecular and Medicine Research Center (MMRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Email: ghasemmosayebi@arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۲ (شماره پیاپی ۱۰۷)، اردیبهشت ۱۳۹۵، ۲۵-۱۹

بررسی پاسخ تکثیر لنفوسیتی در مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن

خدیجه خسروی[۱]، نادر زرین فر[۲]، احسان اله غزنوی راد[۳]، قاسم مسیبی[۴]*

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۲- دانشیار، گروه عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروب و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۴- استاد ایمنی شناسی، گروه میکروب و ایمنی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یک باکتری داخل سلولی است که سبب عفونت مزمن در انسان و حیوانات اهلی می‌شود. مکانیسم‌های مزمن شدن این بیماری پیچیده و ناشناخته هستند. پاسخ های ایمنی ممکن است در مزمن شدن این بیماری نقش داشته باشند. در این مطالعه پاسخ تکثیر لنفوسیتی در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی-تحلیلی، بر روی ۲۲ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد، ۲۱ بیمار مبتلا به بروسلوز مزمن و ۲۱ فرد سالم که از نظر سن، جنس و زمینه ژنتیکی با بیماران انطباق داشتند، انجام گرفت. لنفوسیت‌های خون محیطی با محیط گرادیان فایکول جدا شدند و میزان تکثیر سلولی در حضور آنتی ژن و فیتوهماگلوتنین-آ در شرایط کشت با روش MTT اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: اندیکس تحریک اختصاصی آنتی ژن‌های بروسلا در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن به طور معنی‌داری در مقایسه با بیماران مبتلا به فرم حاد بیماری کمتر بود($p=۰/۰۰۱$). هم‌چنین در تحریک لنفوسیتی با فیتوهماگلوتنین-آ نشان داده شد که پاسخ تکثیری در بیماران مزمن نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد($p=۰/۰۴$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کاهش پاسخ تکثیر لنفوسیتی در بیماران مبتلا به برسلوز مزمن ممکن است به دلیل القاء پدیده آنرژی در این بیماران باشد.

واژگان کلیدی: برسلوز، پاسخ تکثیری، حاد، مزمن

* **نویسنده مسئول:** ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات و سلولی و مولکولی، گروه میکروب و ایمنی

Email: ghasemmosayebi@arakmu.ac.ir

مقدمه

گونه‌های بروسلا باکتری‌های گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و درون سلولی هستند که عامل بیماری بروسلوز(تب مالت) در انسان و حیوان می‌باشند. بیماری بروسلوز در بسیاری از کشورهای در حال توسعه بومی است و خسارات زیادی به دام‌ها و محصولات آن‌ها وارد می‌سازد(۱). این بیماری شایع‌ترین عفونت باکتریایی مشترک بین دام و انسان است و سالانه بیش از نیم میلیون نفر را مبتلا می‌سازد. گونه‌های بروسلا اغلب به سلول‌های سیستم رتیکولواندوتلیال هجوم می‌برند و می‌توانند در ماکروفاژهای آلوده مستقر در نقاط مختلف بدن از جمله طحال، مغز، قلب،کبد و مغز استخوان باقی بمانند. بیشتر بیماران بعد از ابتلا وارد فاز حاد بیماری همراه با تب مواج می‌شوند و کم کم به سمت بهبودی پیش می‌روند، اما متاسفانه در ۱۰ تا ۳۰ درصد موارد بیماری مزمن می‌شود(۱، ۲).

علی‌رغم اهمیت بیماری بروسلوز اطلاعات بسیار محدودی در زمینه کنترل ایمونولوژیک این بیماری در انسان وجود دارد. اغلب اطلاعات موجود در زمینه ایمنی علیه بروسلوز از مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی به دست آمده است و چنین بررسی‌هایی روی مبتلایان به بروسلوز بسیار محدود می‌باشد(۶-۳). مطالعات نشان می‌دهد اگرچه به هنگام ابتلا به بیماری بروسلوز برضد عامل این بیماری در بدن آنتی‌بادی تولید می‌شود، ولی ایمنی سلولی نقش اساسی را در دفاع و بهبودی از عفونت دارد(۷).

با توجه به اهمیت لنفوسیت‌های T در القا پاسخ‌های ایمنی، لازم است مطالعات ایمونولوژیکی در خصوص عملکرد لنفوسیتی در بیماران مبتلا به بروسلوزیس به ویژه فرم مزمن این بیماری به منظور روشن شدن علت مزمن شدن این بیماری در برخی افراد صورت گیرد. از این رو، در این مطالعه پاسخ‌های بلاستوژنیک لنفوسیت‌های خون محیطی دو دسته بیمار حاد و مزمن در مقایسه با گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه توصیفی-تحلیلی بر روی ۲۲ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد (۱۳ بیمار مذکر و ۹ بیمار مونث با میانگین سنی ۱۷±۳۸ سال) و ۲۱ بیمار مبتلا به بروسلوز مزمن (۱۱ بیمار مذکر و ۱۰ بیمار مونث با میانگین سنی ۱۰±۴۳/۴ سال) است که ابتلای آن‌ها به بروسلوز حاد یا مزمن از نظر آزمایشگاهی و بالینی زیر نظر متخصصان محرز گردید. ابتلا به بروسلوز بر اساس علائم و نشانه‌های بالینی و آزمایشات سرولوژی و باکتری شناسی تعیین گردید. تشخیص بروسلوز حاد بر اساس دوره بیماری (کمتر از شش ماه)، علایم و نشانه‌های بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی (کشت خون مثبت و یا تیتر آنتی بادی برابر یا بیشتر از ۱/۳۲۰ در آزمایش رایت (STA) و یا افزایش دوبرابر در تیتر STA یا ME-2) به فاصله دو هفته انجام شد(۱۱-۸). مرحله مزمن شدن بیماری به واسطه تب پایین، علایم موضعی بیماری و خستگی و ضعف مفرط و دوره بیماری (بیشتر از شش ماه) و عدم پاسخ مناسب به درمان‌های رایج و یافته‌های آزمایشگاهی مشخص گردید(۱). بیمارانی که قبل یا طی مطالعه به سایر بیماری‌های عفونی غیر از بروسلوز یا بیماری‌های التهابی مبتلا بودند و هم‌چنین بیمارانی که قبل از ورود به مطالعه تحت درمان با داروهای ضد التهاب مثل کورتیکواستروئیدها یا سایر آنتی‌بیوتیک‌ها غیر از داروهای انتخابی در درمان تب مالت قرار داشتند از مطالعه خارج شدند. علاوه بر این، ۲۱ نفر از داوطلبان سالم (۱۳ نفر مرد و ۸ نفر زن با میانگین سنی ۸±۳۵/۸ سال) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. از تمام افراد بعد از اطلاع یافتن از ماهیت و اهداف طرح، فرم رضایت نامه اخذ گردید. این پژوهش با تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک (کد: ۱۶-۱۵۲-۹۲) انجام شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

پس ازانتقال نمونه خون افراد به اتاق کشت، مراحل جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بدین صورت انجام گرفت: ۵ سی‌سی از خون به فالکون ۱۵

میلی لیتر استریل دیگری انتقال داده شد. ۵ سی سی بافر فسفات (PBS) نیز که برای رقیق کردن خون مورد نیاز است اضافه گردید و به خوبی هموژن شد. در یک فالکون استریل، ۴ سی سی فایکول (شرکت Gibco) ریخته شد و سپس مخلوط هموژن خون وPBS را با پیپت پاستور استریل آرام آرام به روی فایکول انتقال داده و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰g سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفوژ سلول‌های تک هسته‌ای از روی فایکول جدا و با بافر فسفات شست و شوی داده شد.

کشت سلول‌های تک هسته‌ای

یک سوسپانسیون ۱تا ۲ میلیون سلول در میلی‌لیتر با استفاده از محیط کشت RPMI-1640 (شرکت گیبکو) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق در هر حفره از پلیت کشت ۹۶ حفره‌ای (شرکت NUNC) ریخته شد. برای هر نمونه سه حفره در نظرگرفته شد. جهت تحریک سلولی از فیتوهماگلوتنین-آ (شرکت سیگما) با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و کوکتل آنتی ژن بروسلا با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاد شد.

جهت تهیه کوکتل آنتی ژنی، دو سویه تایید شده بروسلا آبرتوس و ملتنسیس مخلوط گردید و دیواره سلولی باکتری با کمک دستگاه سونیکیت تخریب شد و پس از دیالیز در محیط بافر فسفات با کمک کیسه دیالیز و تعیین غلظت پروتیین با اسپکترفتومتر به عنوان کوکتل آنتی ژن استفاده گردید.

بررسی تکثیر سلولی به روش MTT

پس از اضافه نمودن آنتی‌ژن به حفره‌های مورد نظر، پلیت کشت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO_2 (شرکت ممرت آلمان) انکوبه شد. پس از ۷۲ ساعت، ۱۰ لاندا محلول MTT (۴-۳و۵ دی متیل تیازول – ۲و۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید، شرکت سیگما) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ الی ۶ ساعت مجدداً در انکوباتور قرار گرفت شد و سپس ۲۰۰ لاندا DMSO (دی متیل سولفوکساید، شرکت سیگما) به هر حفره اضافه گردید. سپس با دستگاه الایزا ریدر (Fax2000 ، ایالات متحده امریکا) میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. جهت تعیین ضریب تحریکی از فرمول زیر استفاده شد:

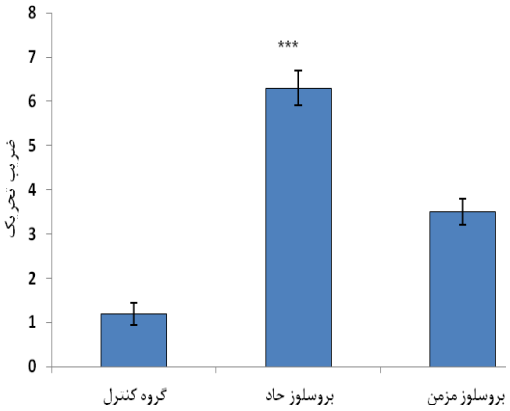
(ضریب تحریکی)(SI)=OD نمونه/OD کنترل × ۱۰۰

تحلیل آماری

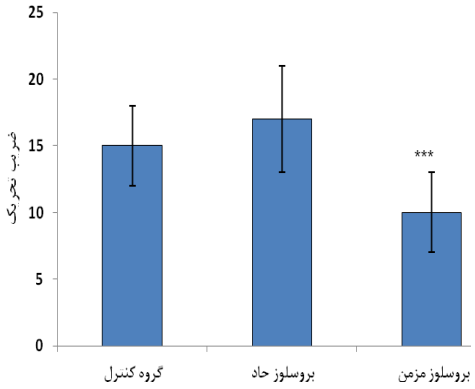
جهت مقایسه میانگین پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها از روش غیر پارامتریک و آزمون من- ویتنی استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج نشان می‌دهد که میزان تکثیر لنفوسیتی در حضور اختصاصی آنتی ژن‌های بروسلا در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در مقایسه با گروه مزمن به طور معنی‌داری بیشتر است(نمودار ۱، p=۰/۰۰۱). پاسخ تکثیر سلولی در تحریک با فعال کننده پلی کلونال فیتوهماگلوتنین-آ در گروه کنترل و بیماران مبتلا به بروسلوز حاد نیز در مقایسه با بیماران مبتلا به فرم مزمن بیماری بیشتر بود(نمودار ۲، p=۰/۰۴).



نمودار ۱. پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های خون محیطی درمقابل آنتی ژن اختصاصی بروسلا در گروه‌های مورد مطالعه(p=۰/۰۰۱ :*)**



نمودار ۲. میزان تکثیر سلولی لنفوسیت‌های خون محیطی در تحریک با میتوژن فیتوهماگلوتنین-آ

***: p=۰/ ۰۴

بحث

گونه‌های بروسلا معمولاً در سلول‌های رتیکولواندوتلیال تکثیر می‌یابند و پیدایش ایمنی بستگی به پاسخ مناسب سلول‌های میزبان و تولید سایتوکین‌های Th_1 دارد(۲). به خوبی مشخص شده است که اجزای ایمنی ذاتی نقش به سزایی در مراحل اولیه ورود عامل عفونی به بدن دارند(۱۲).

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، پاسخ بلاستوژنیک سلول‌های بیماران مزمن در برابر آنتی ژن بروسلا در مقایسه با گروه حاد کمتراست. علت این امر ممکن است این باشد که در بیماران مزمن، به دلیل طولانی شدن دوره بیماری، پاسخ‌های اختصاصی سیستم ایمنی علیه آنتی ژن‌های اختصاصی بروسلا منجر به ایجاد یک فرآیند تولراس یا آنرژی می‌گردد. هم‌چنین نتایج نشان داد که در پاسخ به محرک پلی کلونال نیز میزان تکثیر لنفوسیتی در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن کمتر از گروه‌های دیگر می‌باشد. کاهش تکثیر سلولی ممکن است به دلیل نقش طولانی مدت باکتری در مهار پاسخ ایمنی باشد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط کینیکلی و همکاران در زمینه بررسی پاسخ غیر اختصاصی لنفوسیت‌های T در مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن انجام گرفت، نتایج حاکی از افزایش سطح لنفوسیت‌های TCD_4^+ و TCD_8^+ در افراد سالم و بیماران حاد نسبت به بیماران مزمن بود(۱۳).

پانگویتسیس و همکاران نیز طی مطالعه‌ای در سال۲۰۱۱ اذعان داشتند که سرکوب مکانیسم‌های ایمنی ذاتی از طریق بروسلا منجر به نقص پاسخ Th_1 آنرژی لنفوسیت‌های T در مبتلایان به بروسلوز مزمن می‌گردد(۲).

هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شده که تعداد سلول‌های Tregدر مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است(۱۴). شاید افزایش سلول‌های تنظیمی در بیماران باعث مهار پاسخ ایمنی در افراد مبتلا به عفونت مزمن گردد.

نقش لنفوسیت‌های TCD_4 و TCD_8در مبتلایان به بیماری بروسلوز طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از افزایش فعالیت و تکثیر این سلول‌ها در مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن نسبت به گروه کنترل بود. این امر نشان دهنده اهمیت حیاتی پاسخ ایمنی سلولی در مبتلایان به بروسلوز می‌باشد(۱۵).

هم‌چنین در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۳ برروی کودکان آلوده به بروسلا ملیتنسیس انجام گرفت، مشخص شد که سطح لنفوسیت‌های $T\gamma\delta$ در این بیماران افزایش یافته است(۱۶).

جرود و همکاران نیز طی یک مطالعه تکمیلی در سال۲۰۱۱ نشان دادند که لنفوسیت‌های $T\gamma\delta$ بیماران مبتلا به بروسلوز حاد، در پاسخ به آنتی ژن‌های بروسلا به شدت افزایش می‌یابند و به مقدار زیاد IFN-γ تولید می‌نمایند، ولی این پاسخ‌ها طی مرحله مزمن بیماری شدیداً کاهش پیدا می‌کنند(۱۷).

در هر حال لازم است مطالعات بیشتری در خصوص مکانیسم‌های مزمن شدن بیماری و نقش سیستم ایمنی به خصوص ایمنی سلولی و سیتوکاین‌ها در ایمونوپاتوژنز این بیماری صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان تکثیر لنفوسیتی در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در مقایسه با بیماران مبتلا به فرم حاد کمتر می‌باشد. احتمال دارد که

وجود طولانی مدت پاتوژن در بدن باعث القای آنرژی در لنفوسیت‌ها گردد.

تشکر و قدردانی

نتایج این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجوی ارشد میکروب شناسی است بدین وسیله نویسندگان از همکاری شورای پژوهشی دانشگاه و دانشکده پزشکی اراک و هم‌چنین بیماران و افراد شرکت کننده در این مطالعه نهایت سپاس را به عمل می‌آورند.

منابع

1. Giambartolomei GH, Delpino MV, Cahanovich ME, Wallach JC, Baldi PC, Velikovsky CA, et al. Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. Journal of Infectious Diseases. 2002; 186(2):252-9.
2. Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. Microbes and infection. 2011; 13(2):134-42.
3. Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, Zou B, Baldwin CL. Interferon-γ is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology. 2001; 103(4):511-8.
4. Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against Brucella abortus: what the mouse model has revealed about control of infection. Veterinary microbiology. 2002; 90(1): 367-82.
5. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, Samartino CG, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against B. abortus mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS ONE. 2011; 6(1):e16203-4.
6. Afley P, Dohre SK, Prasad G, Kumar S. Prediction of T cell epitopes of Brucella abortus and evaluation of their protective role in mice. Applied microbiology and biotechnology. 2015; 99(18):7625-37.
7. Elfaki MG, Al-Hokail AA. Transforming growth factor β production correlates with depressed lymphocytes function in humans with chronic brucellosis. Microbes and infection. 2009; 11(14): 1089-96.
8. Moreno-Lafont MC, Lopez-Merino A, Lopez-Santiago R. Cell response to a salt-extractable and sonicated Brucella melitensis 16M antigen in human brucellosis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 1995; 2(3): 377-80.
9. Salmeron I, Rodriguez-Zapata M, Salmeron O, Manzano L, Vaquer S, Alvarez-Mon M. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. Clinical infectious diseases. 1992; 15(5):764-70.
10. 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. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1999; 61(3):425-7.
11. Karaoglan I, Pehlivan S, Namiduru M, Pehlivan M, Kilinçarslan C, Balkan Y, et al. TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6 and IFN-gamma gene polymorphisms as risk factors for brucellosis. New Microbiol. 2009; 32(2):173-8.
12. Kariminia A, Kavoossy 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 immunology, microbiology and infectious diseases. 2002; 25(2):85-93.
13. Kinikli S, Turkcapar N, Kucukay MB, Keskin G, Kinikli G. In vitro nonspecific mitogenic response of T-cell subsets in acute and chronic brucellosis. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2005; 52(3):229-33.
14. Bahador A, Hadjati J, Hassannejad N, Ghazanfari H, Maracy M, Jafari S, et al. Frequencies of CD4+ T Regulatory Cells and their CD25 high and FoxP3 high Subsets Augment in Peripheral Blood of Patients with Acute and Chronic Brucellosis. Osong public health and research perspectives. 2014; 5(3):161-8.
15. Moreno-Lafont MC, López-Santiago R, Zumarán-Cuéllar E, Paredes-Cervantes V, López-Merino A, Estrada-Aguilera A, et al. Antigen-specific activation and proliferation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from

brucellosis patients. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2002; 96(3):340-7.
16. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, Muscat C, Scalise F, Castellueei G, et al. Lymphocytes bearing the γδ T cell receptor in acute Brucella melitensis infection. European journal of immunology. 1993; 23(5):1177-80.
17. Skyberg JA, Thornburg T, Rollins M, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW. Murine and bovine γδ T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections. PLoS ONE. 2011; 6(7):e21978.