



بررسی میزان تولید سایتوکینهای التهابی IL-6 و TNF به وسیلهٔ سلولهای تک هسته‌ی خون محیطی تحریک شده با مایکولاکتون

پرویز مهاجری^{*}, بابک ایزدی^۱, علی شمس^۲

۱- استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲- استادیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۳- استادیار گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۵/۵

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم اولسرانس عامل زخم برولی است. این بیماری پس از سل و جذام، سومین عفونت شایع مایکوباکتریومی در انسان محسوب می‌شود. در حال حاضر، سازمان بهداشت جهانی بیماری برولی را عنوان یک عفونت مهم می‌شناسد. مایکوباکتریوم اولسرانس، سیمی بنام مایکولاکتون تولید می‌کند که در بیماری‌ای نقش مهمی دارد. مایکولاکتون می‌تواند منجر به تحریب بافت گردد و همچنین پاسخ‌های ایمنی میزان را سرکوب نماید.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی توصیفی-تحلیلی، از سلولهای تک هسته‌ای خون سه نفر از افرادی که سابقه ابتلا به بیماری برولی را نداشتند استفاده شد. میزان تولید سایتوکاین های IL-6 و TNF این سلولها پس از تحریک با LPS و در حضور مایکولاکتون و زمانهای مختلف پیش انکوباسیون، با کیت‌های ELISA تعیین شد.

نتایج: این مطالعه نشان می‌دهد که وجود توکسین مایکولاکتون تا حدود زیادی تولید سایتوکاین های TNF و IL-6 را مهار می‌نماید. میزان سایتوکاین TNF در لوله‌های شاهد (حاوی LPS) در مدت ۴ ساعت به حد اکثر مقدار خود رسیده و سپس کاهش می‌یابد. در حالیکه، تولید IL-6 در لوله‌های حاوی سلول‌های تازه (زمان صفر) بیشترین مقدار را داراست و تا ۱۶ ساعت به حداقل مقدار می‌رسد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که TNF و IL-6 از سایتوکینهای التهابی مهم ایمنی هستند، می‌توان تصور کرد که کاهش تولید TNF به وسیله این باکتری در تضعیف پاسخهای التهابی نقش دارد. بنابراین مایکوباکتریوم اولسرانس، از یک طرف سبب نابودی سلولهای ماکروفازی و از طرف دیگر جلوگیری از تولید TNF به وسیله مهمترین سلول ایمنی ذاتی می‌گردد و به نوعی، نقش این سلولها را در عفونت حذف می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مایکولاکتون- TNF- IL-6- PBMC

مقدمه

مطالعه ما قصد داریم تأثیر یک جزء آنتی‌ژنی مهم باکتری یعنی مایکولاکتون را بر سلول‌های منوسیتی/ماکروفازی و تولید TNF- α و IL-6 از این سلولها را در خون محیطی بررسی نماییم تا نقش این آنتی‌ژن در بیماری‌بازی باکتری بهتر مشخص گردد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی، ۳ داوطلب سالم مرد با میانگین سن ۳۰ سال انتخاب شدند. با کسب رضایت از آنها ۲۵ میلی لیتر خون هپارینه از هر فرد گرفته شد. این افراد سابقه‌ای از عفونت با مایکوباکتریوم اولسرانس را نداشتند. با استفاده از شب غلظتی فایکول، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) جدا سازی شد. بدین منظور ابتدا خون کامل هر فرد با مقدار مساوی از PBS استریل رقیق شد. سپس نصف حجم نهایی خون و PBS، فایکول (شرکت Pharmacia) در لوله دیگری ریخته و خون رقیق شده، به آرامی روی فایکول تخلیه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در ۲۴۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. لایه PBMC با پیپ استریل پلاستیکی جدا و سه بار با PBS استریل شستشو گردید. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه، رسوب حاصل با ۲ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 با ۵% FCS مخلوط شد و برای شمارش سلول‌های زنده از لام نوبار و تریپان بلو (SIGMA 21k2376) استفاده شد. با افزودن مقادیر کافی محیط کشت به لوله فوق تراکم یک میلیون سلول PBMC در میلی لیتر تهیه شد.

تحریک PBMC با مایکولاکتون: مایکولاکتون از دکتر Grant Jenkin از دانشگاه موناش استرالیا با غلظت اولیه ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه گردید. جهت انجام آزمایشات مربوط به تولید سایتوکین از لوله‌های استریل پلی استری مخصوص فلوسایتمتری استفاده شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون PBMC با تراکم یک میلیون سلول در میلی لیتر با مایکولاکتون در غلظت نهایی ۱۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر تحریک شدند و پس از مخلوط نمودن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵% CO₂ از یک روتاتور برای مخلوط

اولسر برولی (BU: Buruli Ulcer) بعد از سل و جذام سومین بیماری فراوان مایکوباکتریایی انسانی محسوب می‌شود(۱). عامل این بیماری محیطی، مایکوباکتریوم اولسرانس است. این باکتری اولین بار در سال ۱۹۴۸ توسط محققین استرالیایی در زخم‌های پوستی غیرمعمول کشف شد. عفونت با مایکوباکتریوم اولسرانس کشنده نیست ولی بعضی مواقع زخم‌های بد شکل ایجاد می‌کند که درمان آن پرهزینه است. معمولاً زخم‌ها به صورت تک، بدون درد و همراه با نودول زیر جلدی است که به مرور بزرگ می‌شود(۲). تاکنون در بیش از ۳۰ کشور جهان این بیماری گزارش شده است و سازمان بهداشت جهانی آن را در زمرة بیماری‌های نیازمند به توجه فوری معرفی کرده است(۳). خوشبختانه تاکنون مورد مستندی از بیماری در ایران گزارش نشده است.

مایکوباکتریوم اولسرانس به واسطه تولید یک اگزوتوكسین لیپیدی نکروتیک بنام مایکولاکتون از سایر مایکوباکتریوم‌ها متمایز است. مایکولاکتون در بیماری‌بازی باکتری نقش دارد. پلاسمید حلقوی بزرگی به نام pMUM کد کننده این توکسین است(۴). مطالعات نشان داده اند که مایکولاکتون اثرات سرکوب کننده‌گی بروی پاسخهای ایمنی را دارد. این آنتی‌ژن لیپیدی از تولید IL-2 به وسیله لنفوسيتها T جلوگیری می‌کند و نوعی تولرانس و بی‌پاسخی را همراه با آپوپتوزیس در این سلول‌ها القاء می‌کند(۵). تحقیقات نشان داده اند که عصاره‌ی برولین مشتق از باکتری مایکوباکتریوم اولسرانس در افراد آلوده به این باکتری می‌تواند مانند ترکیبات پروتئینی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (PPD) پاسخهای تأخیری ایمنی را ایجاد نماید. شاید این پاسخ‌ها به علت تشابه آنتی‌ژنی بین برولین و PPD باشد. آنتی‌ژنهای لیپیدی می‌توانند از طریق گیرنده‌هایی مانند گیرنده‌های شبه Toll پاسخهای ایمنی ذاتی را فعال نمایند(۶).

بر اساس یافته‌های اخیر، مایکوباکتریوم اولسرانس می‌تواند پاسخهای ایمنی را مهار نماید و بیماری‌بازی داشته باشد، اما سازوکارهای این سرکوب کننده‌گی مشخص نشده است. در این

طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت‌ها عمل شد.

Human IL-6 ELISA Set (BD 555220)

Human TNF ELISA Set (BD 555212)

TMB microwell peroxidase substrate (KPL 060736)

نتایج الیزا با Bio-Rad Microplate Reader و در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

نتایج

همانطور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود میزان سایتوکاین TNF در لوله‌های شاهد (حاوی LPS) در مدت ۴ ساعت به حداقل مقدار خود رسیده (۲۶۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) و سپس کاهش می‌یابد. در حالیکه طبق جدول (۲)، تولید IL-6 در لوله‌های حاوی سلول‌های تازه (زمان صفر) بیشترین مقدار را دارد (۴۸۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و به مرور از مقدار آن کاسته می‌شود تا اینکه در ۱۶ ساعت به حداقل مقدار می‌رسد (۸۷۹ میکروگرم در میلی‌لیتر).

جدول (۳)، نشان‌دهنده نسبت میزان تولید سایتوکاین‌های TNF و IL-6 در لوله‌های حاوی LPS و مایکولاکتون به لوله‌ای است که تنها دارای LPS هستند. همانطور که در این جداول مشاهده می‌شود سایتوکاین‌های فوق در ۴ ساعت اول پیش انکوباسیون کاهش می‌یابند (به ترتیب نسبت‌های ۰/۰۲۰۹ و ۰/۰۲۷۷ برای سایتوکاین‌های TNF و IL-6) و پس از یک افزایش نسبی، مجددًا میزان سایتوکاین‌ها پس از ۱۶ ساعت به پایین‌ترین مقدار خود می‌رسد.

کردن دائم سلول‌ها در طول مدت انکوباسیون استفاده گردید.

در زمانهای ۰، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون و تحریک سلولها، مایع رویی سلولها برداشت شد و غلظت سایتوکین‌های TNF و IL-6 و به روش الیزا تعیین گردید. از LPS E.coli O55:B5 CalBiochem B34179 (با غلظت نهایی ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به عنوان یک تحریک کننده قوی و کنترل مثبت و یک لوله بدون هیچ آنتی‌ژنی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. لوله کنترل مثبت پس از ۶ ساعت انکوبه از نظر میزان سایتوکین بررسی شد.

به طور کلی به ازای هر فرد، چهار لوله برای هر یک از زمان‌های ذکر شده در نظر گرفته شد (کلاً ۲۰ لوله برای هر نفر). لوله‌ی اول به عنوان کنترل منفی تنها حاوی سوسپانسیون سلولی، لوله‌ی دوم سلول‌های تک هسته ای با مایکولاکتون با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و لوله سوم دارای مایکولاکتون با غلظت ۱۰۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و ۱۰۰ نانوگرم LPS و لوله چهارم حاوی سلولهایی بودند که فقط با LPS با غلظت ۱۰۰ نانوگرم تحریک شدند. پس از ۶ ساعت انکوباسیون، مایع رویی لوله‌های سوم و چهارم که با LPS تحریک شده بودند از نظر میزان سایتوکین بررسی شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی جمع‌آوری گردید. این مایع پس از جمع‌آوری در فریزر با دمای -۲۰ تا زمان تعیین مقدار سایتوکاین‌ها نگهداری شد.

اندازه‌گیری سایتوکاین‌های TNF و IL-6 با استفاده از الیزا:

از دو کیت و سوبسترای زیر جهت انجام الیزا استفاده و

جدول ۱- میانگین تغییرات غلظت TNF تولید شده از مونوکیت‌های خون محیطی در زمان‌های مختلف پیش انکوباسیون با مایکولاکتون

| LPS | M1000+LPS | M 1000 | C-ve | لوله |
|-------------|-----------|----------|-------------|------|
| زمان | | | | |
| ۱۱۶۸±۷۶۹/۸ | ۴۱/۳±۵۴/۴ | ۷/۸ | ۳۳±۲۸/۶ | ۰ |
| ۱۹۲۷±۷۲۲/۴ | ۵۶/۷±۶۷/۹ | ۷/۸ | ۳۱/۷±۱۹/۸ | ۲ |
| ۲۲۶۶±۱۰۵۴/۳ | ۴۷/۳±۵۴/۹ | ۱۲/۷±۷/۲ | ۳۸/۷±۳۰/۹ | ۴ |
| ۱۸۴۲±۸۰۹ | ۵۲/۷±۵۱/۵ | ۸/۷±۱/۵ | ۳۰±۱۶/۶ | ۸ |
| ۸۵۲±۳۸۶/۲ | ۲۰/۴±۱۳ | ۹/۲±۲/۴ | ۱۲۲/۷±۱۱۴/۷ | ۱۶ |

جدول ۲- میانگین تغییرات غلظت IL-6 تولید شده از مونوپسیت های خون محیطی در زمان های مختلف پیش انکوباسیون با مایکولاکتون

| LPS | M1000+LPS | M 1000 | C-ve | لوله |
|---------------|-------------|-----------|-----------|------|
| زمان | | | | |
| ۴۸۴۸/۵±۳۴۱۱ | ۱۵۶/۶±۲۰۴/۹ | ۸/۸±۷/۱ | ۶۵/۷±۸۰/۵ | ۰ |
| ۴۲۳۷/۷±۲۳۷۳/۷ | ۱۳۰/۳±۱۲۶/۴ | ۷/۱±۴/۲ | ۵۳/۳±۵۴/۴ | ۲ |
| ۲۶۹۸/۷±۸۵۸/۲ | ۷۴/۹±۷۸/۷ | ۲۳/۱±۲۳/۵ | ۶۹/۳±۶۸/۶ | ۴ |
| ۱۳۶۱±۳۹۸/۹ | ۱۰۳/۸±۴۷ | ۹/۸±۷/۶ | ۸۰/۲±۷۰/۸ | ۸ |
| ۸۷۸/۸±۲۵۶/۵ | ۹/۳±۵/۸ | ۴/۷ | ۱۲±۴/۶ | ۱۸ |

جدول ۳- تغییرات نسبت LPS به M1000+LPS بروای سایتوکاین های TNF و IL-6 تولید شده از مونوپسیت های خون محیطی در زمان های مختلف پیش انکوباسیون با مایکولاکتون

| IL-6 | TNF | زمان |
|--------|--------|------|
| ۰/۰۳۲۳ | ۰/۰۳۵۴ | ۰ |
| ۰/۰۳۰۷ | ۰/۰۲۹۴ | ۲ |
| ۰/۰۲۷۷ | ۰/۰۲۰۹ | ۴ |
| ۰/۰۷۶۲ | ۰/۰۲۸۶ | ۸ |
| ۰/۰۱۰۶ | ۰/۰۲۳۹ | ۱۶ |

بحث

و ماکروفازها جلوگیری می کند که نتایج این مطالعه مشابه مطالعه ما است(۷). در تحقیقات دیگر مشخص شد که باکتری مایکوباکتریوم اولسرانس نیز سبب القاء آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفازی می گردد(۸). در این مطالعه دریافتیم که مایکولاکتون سبب کاهش تولید TNF از سلولهای تک هسته ای خون محیطی می شود. اما برخی مطالعات دیگر مانند مطالعه Torrado و همکاران نشان می دهد که کاهش تولید TNF به علت مایکولاکتون نیست(۹). از سوی دیگر Gooding و همکاران در مطالعه خود نشان داند که سلولهای TH1 و سایتوکین γ-IFN در ایجاد پاسخ های ایمنی مخصوصیت بخش به مایکوباکتریوم اولسرانس نقش دارند(۱۰). از آنجاییکه γ-IFN از سایتوکینهای التهابی مهم ایمنی هستند می توان تصور کرد که کاهش تولید TNF بوسیله سیم این باکتری، در تضعیف پاسخهای التهابی نقش دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که

در این مطالعه سلولهای تک هسته ای خون محیطی در افراد سالم با مایکولاکتون تحریک و سطح سایتوکاین های TNF و IL-6 اندازه گیری شدند، که بر این اساس مشخص گردید که مایکولاکتون، از تولید این دو سایتوکین توسط سلولهای تک هسته ای خون محیطی جلوگیری می کند. مطالعات نشان داده اند که TNF از مهمترین سایتوکین های التهابی است که به وسیله سلولهای سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد و با تأثیر روی سلول های آندوتیال عروق و لکوسیت های خون، سبب جذب و فراخوانی سلول های ایمنی به موضع التهاب می گردد. پاسخهای ایمنی ذاتی، کلید ایجاد و توسعه پاسخ های ایمن اختصاصی هستند(۷).

در مطالعه George و همکاران مشخص شد که در شرایط invitro مایکوباکتریوم اولسرانس از تولید TNF توسط منوپسیتها

TNF توسط سلولهای تک هسته می‌گردد. مکانسیم کاهش تولید TNF در ماکروفازهای تحیریک شده با این آنتی ژن لیپیدی مشخص نیست. بررسی دقیق فاکتورهای رونویسی از ژن TNF و بیان گیرنده‌های آنتی ژنهای لیپیدی مانند گیرنده‌های شبه Toll بر سطح سلولهای ماکروفازی و منوستی برای روشن تر شدن موضوع توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

Grant Kumar Visvanathan بدينوسيله از آقای دکتر Jenkin و سرکار خانم Vesna Markovska که در خصوص تهیه سویه مایکوباكتریوم اولسرانس، مایکولاکتون و نیز راهنمایی تکنیکی متفق شده‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

مانند سایر گونه‌های مایکوباكتریوم، سلول هدف مایکوباكتریوم اولسرانس سلولهای ماکروفازی است. بنابراین، باکتری مذکور از یک طرف سبب نابودی سلولهای ماکروفازی و از طرف دیگر جلوگیری از تولید TNF به وسیله مهمترین سلول ایمنی ذاتی می‌گردد و به نوعی نقش این سلولها را در غفونت حذف می‌کند. در تحقیقات دیگری مشخص شد که تولید IL-6 تحت تأثیر TNF است، بنابراین کاهش تولید IL-6 می‌تواند یک فرآیند ثانویه‌ی ناشی از کاهش تولید TNF باشد (۱۱، ۱۲).

از مطالعه حاضر و سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که مایکوباكتریوم اولسرانس، با هدف قرار دادن سلولهای منوستی و ماکروفازی از بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی جلوگیری می‌نماید و آنتی ژن لیپیدی مایکولاکتون بطور مشخص سبب کاهش تولید

منابع:

- 1- Portaels F, Meyers WM, Ablorodey A, Castro AG, Chemlal K, de Rijk P, et al. *First cultivation and characterization of mycobacterium ulcerans from the environment*. PLOS Neglected Tropical Disease. 2008;2(3):1-12.
- 2- Coutanceau E, Marsollier L, Brosch R, Perret E, Goossens P, Tanguy M, et al. *Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of mycobacterium ulcerans*. Cellular Microbiology. 2005;7(8):1187-96.
- 3- Johnson P, Hayman HA, Quek TY, Fyfe JA, Jenkin G, Buntine JA, et al. *Consensus recommandations for the diagnosis, treatment and control of mycobacterium ulcerans infection*. MJA. 2007;186(2):64- 8.
- 4- Yip MJ, Porter JL, Fyfe JA, Lavender CJ, Portaels F, Rhodes M, et al. *Evolution of mycobacterium ulcerans and other mycolactone-producing mycobacteria from a common mycobacterium marinum progenitor*. Journal of Bacteriology. 2007;189(5):2021-9.
- 5- Adusunilli S, Mve-Obiang A, Sparer T, Meyers W, Hayman J, Small P. *Mycobacterium ulcerans toxic macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of M. ulcerans in vitro and in vivo*. Cellular Microbiology. 2005;7(9):1295-304.
- 6- Dobos KM, Spotts EA, Marston BJ, Horsburgh CR, King CH. *Serologic response to culture filtrate antigens of Mycobacterium ulcerans during Buruli ulcer disease*. Emerg Infect Dis. 2000;6(2):158-64.

- 7- George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, et al. *Mycolactone: a polycetide toxin from mycobacterium ulcerans required for virulence*. Infection immunity. 1999; 283(5403):854-7.
- 8- George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL. *A mycobacterium ulcerans toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells*. Infect Immun. 2000;68(2):877-83.
- 9- Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PL. *Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of mycobacterium ulcerans: implications for virulence*. Infect Immun. 2003;71(2):774-83.
- 10- Gooding TM, Johnson PD, Campbell DE, Hayman JA, Hartland EL, Kemp AS, et al. *Immune response to infection with mycobacterium ulcerance*. Infect immune. 2001;69(3):1704-7.
- 11- Coutanceau E, Marsollier L, Brosch R, Perret E, Goossens P, Tanguy M, et al. *Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of mycobacterium ulcerans: the contribution of endogenous mycolactone toxin*. Cell Microbiol. 2005;7(8):1187-96.
- 12- Pahlevan AA, Wright DJ, Andrews C, George KM, Small PL, Foxwell BM. *The inhibitory action of mycobacterium ulcerans soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function*. Journal of Immunology. 1999;163(7):3928-35.