مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۸، شماره ٤، مرداد و شهریور ۱۳۸۹
صفحه: ۲۷۶-۲۷۱

Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 18, No. 4, Aug/Sep 2010
Pages: 271-276

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی
شهید صدوقی یزد

بررسی میزان تولید سایتوکین‌های التهابیTNFو IL-6 به وسیله‌ی سلولهای تک هسته‌ی خون محیطی تحریک شده با مایکولاکتون

پرویز مهاجری*[1]، بابک ایزدی[2]، علی شمس[3]

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 دریافت:۱۳۸۸/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۲

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 بعنوان یک عفونت مهم می‌شناسد. مایکوباکتریوم اولسرانس، سمی بنام مایکولاکتون تولید می کند که در بیماریزایی نقش مهمی دارد. مایکولاکتون می تواند منجر به تخریب بافت گردد و همچنین پاسخ های ایمنی میزبان 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 کیت های ELISA تعیین شد.

نتایج: این مطالعه نشان می دهد 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 حداکثر 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 ماکروفاژی و از طرف دیگر جلوگیری از تولید TNF به وسیله مهمترین سلول ایمنی ذاتی می گردد و به نوعی، نقش این سلولها را در عفونت حذف می کند.

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

---

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن:۲۱- ۴۲۷۴۶۱۸ -۰۸۳۱، پست الکترونیکی: p_mohajeri@yahoo.com

مقدمه

اولسر برولی (BU: Buruli Uleer) 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 زمره‌ی 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 اگزوتوکسین لیپیدی نکروتیک بنام مایکولاکتون از سایر مایکوباکتریوم ها متمایز است. مایکولاکتون در بیماریزایی باکتری نقش دارد. پلاسمید حلقوی بزرگی به نام pMUM کد کننده این توکسین است(۴). مطالعات نشان داده اند که مایکولاکتون اثرات سرکوب کنندگی بروی پاسخهای ایمنی را دارد. این آنتی ژن لیپیدی از تولید IL-2 به وسیله لنفوسیتهای 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 آنتی ژنی 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، مایکوباکترم اولسرانس می‌تواند پاسخهای ایمنی را مهار نماید و بیماریزایی داشته باشد، اما سازوکارهای این سرکوب کنندگی مشخص نشده است. در این مطالعه ما قصد داریم تأثیر یک جزء آنتی‌ژنی مهم باکتری یعنی مایکولاکتون را بر سلول‌های منوسیتی/ماکروفاژی و تولید TNF-α وIL-6 از این سلولها را در خون محیطی بررسی نماییم تا نقش این آنتی‌ژن در بیماریزایی 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 میلی‌لیتر خون هپارینه از هر فردگرفته شد. این افراد سابقه‌ای از عفونت با مایکوباکتریوم اولسرانس را نداشتند. با استفاده از شیب 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 پیپت 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 5%FCS مخلوط شد و برای شمارش سلول های زنده از لام نئوبار 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 میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. جهت انجام آزمایشات مربوط به تولید سایتوکاین از لوله‌های استریل پلی استری مخصوص فلوسایتومتری استفاده شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون PBMC با تراکم یک میلیون سلول در میلی‌لیتر با مایکولاکتون در غلظت نهایی ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تحریک شدند و پس از مخلوط نمودن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با 5% C02 انکوبه شد. از یک روتاتور برای مخلوط

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 سایتوکین‌هایTNF و IL-6 و به روش الایزا 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 آنتی ژنی 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 ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر 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 سانتریفوژ 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 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 الایزا 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 حداکثر مقدار خود رسیده (۲۲۶۶ 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 داراست (۴۸۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و به مرور از مقدار آن کاسته می‌شود تا اینکه در ۱۶ ساعت به حداقل مقدار می‌رسد (۸۷۹ میکروگرم در میلی لیتر).

جدول (۳)، نشان دهنده نسبت میزان تولید سایتوکاین‌های TNF و IL-6 در لوله‌های حاوی LPS و مایکولاکتون به لوله‌هایی 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، مجدداً میزان سایتوکاین‌ها پس از ۱۶ ساعت به پایین‌ترین مقدار خود می‌رسد.

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

لوله زمان	C-ve	M 1000	M1000+LPS	LPS
۰	۳۳±۲۸/۶	۷/۸	۴۱/۳±۵۴/۴	۱۱۶۸±۷۶۹/۸
۲	۳۱/۷±۱۹/۸	۷/۸	۵۶/۷±۶۷/۹	۱۹۲۷±۷۲۲/۴
٤	۳۸/۷±۳۰/۹	۱۲/۷±۷/۲	۴۷/۳±۵۴/۹	۲۲۶۶±۱۰۵۴/۳
۸	۳۰±۱۶/۶	۸/۷±۱/۵	۵۲/۷±۵۱/۵	۱۸۴۲±۸۰۹
١٦	۱۲۲/۷±۱۱۴/۷	۹/۲±۲/۴	۲۰/۴±۱۳	۸۵۲±۳۸۶/۲

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

لوله زمان	C-ve	M 1000	M1000+LPS	LPS
۰	۶۵/۷±۸۰/۵	۸/۸±۷/۱	۱۵۶/۶±۲۰۴/۹	۴۸۴۸/۵±۳۴۱۱
۲	۵۳/۳±۵۴/۴	۷/۱±۴/۲	۱۳۰/۳±۱۲۶/۴	۴۲۳۷/۷±۲۳۷۳/۷
٤	۶۹/۳±۶۸/۶	۲۳/۱±۲۳/۵	۷۴/۹±۷۸/۷	۲۶۹۸/۷±۸۵۸/۲
۸	۸۰/۲±۷۰/۸	۹/۸±۷/۶	۱۰۳/۸±۴۷	۱۳۶۱±۳۹۸/۹
۱۸	۱۲±۴/۶	۴/۷	۹/۳±۵/۸	۸۷۸/۸±۲۵۶/۵

جدول ۳- تغییرات نسبت M1000+LPS به LPS برای سایتوکاین‌های TNFو IL-6 تولید شده از مونوسیت‌های خون محیطی در زمان‌های مختلف پیش انکوباسیون با مایکولاکتون

زمان	TNF	IL-6
۰	۰/۰۳۵۴	۰/۰۳۲۳
۲	۰/۰۲۹۴	۰/۰۳۰۷
٤	۰/۰۲۰۹	۰/۰۲۷۷
۸	۰/۰۲۸۶	۰/۰۷۶۲
١٦	۰/۰۲۳۹	۰/۰۱۰۶

بحث

در این مطالعه سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی در افراد سالم با مایکولاکتون تحریک و سطح سایتوکاین‌های TNF و IL-6 اندازه‌گیری شدند، که بر این اساس مشخص گردید که مایکولاکتون، از تولید این دو سایتوکین توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی جلوگیری می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که TNF از مهمترین سایتوکین‌های التهابی است که به وسیله سلولهای سیستم ایمنی ذاتی تولید می‌گردد. این سایتوکین نقش میانجی بین پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد و با تأثیر روی سلول‌های آندوتلیال عروق و لکوسیت‌های خون، سبب جذب و فراخوانی سلول‌های ایمنی به موضع التهاب می‌گردد. پاسخهای ایمنی ذاتی، کلید ایجاد و توسعه‌ی پاسخ‌های ایمن اختصاصی هستند(۷).

در مطالعه‌ی George و همکاران مشخص شد که در شرایط Invitro مایکوباکتریوم اولسرانس از تولید TNF توسط منوسیتها و ماکروفاژها جلوگیری می‌کند که نتایج این مطالعه مشابه مطالعه ما است(۷). در تحقیقات دیگر مشخص شد که باکتری مایکوباکتریوم اولسرانس نیز سبب القاء آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاژی می‌گردد(۸). در این مطالعه دریافتیم که مایکولاکتون سبب کاهش تولید TNF از سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی می‌شود. اما برخی مطالعات دیگر مانند مطالعه Torrado و همکاران نشان می‌دهد که کاهش تولید TNF به علت مایکولاکتون نیست(۹). از سوی دیگر Gooding وهمکاران در مطالعه خود نشان داند که سلولهای TH1 و سایتوکین IFN-γ در ایجاد پاسخ‌های ایمنی مصونیت بخش به مایکوباکتریوم اولسرانس نقش دارند(۱۰). از آنجاییکه IFN-γ و TNF از سایتوکینهای التهابی مهم ایمنی هستند می‌توان تصور کرد که کاهش تولید TNF بوسیله سم این باکتری، در تضعیف پاسخهای التهابی نقش دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که

مانند سایر گونه‌های مایکوباکتریوم، سلول هدف مایکوباکتریوم اولسرانس سلولهای ماکروفاژی است. بنابراین، باکتری مذکور از یک طرف سبب نابودی سلولهای ماکروفاژی 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. 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(۱۲،۱۱).

از مطالعه حاضر و سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که مایکوباکتریوم اولسرانس، با هدف قرار دادن سلولهای منوسیتی و ماکروفاژی از بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی جلوگیری می‌نماید و آنتی‌ژن لیپیدی مایکولاکتون بطور مشخص سبب کاهش تولید TNF توسط سلولهای تک هسته می‌گردد. مکانیسم کاهش تولید TNF در ماکروفاژهای تحریک 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 ماکروفاژی و منوسیتی برای روشن‌تر شدن موضوع توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای دکتر Kumar Visvanathan، Grant Jenkin و سرکار خانم Vesna Markovska به واسطه زحماتی که در خصوص تهیه سویه مایکوباکتریوم اولسرانس، مایکولاکتون و نیز راهنمایی تکنیکی متقبل شده‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

منابع:

1- Portaels F, Meyers WM, Ablordey 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 intracelluar 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.