



## بررسی میزان تولید سایتوکین‌های التهابی TNF و IL-6 به وسیله سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با میکولاکتون

پرویز مهاجری<sup>۱\*</sup>، بابک ایزدی<sup>۲</sup>، علی شمس<sup>۳</sup>

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 بعنوان یک عفونت مهم می‌شناسد. مایکوباکتریوم اولسرانس، سمی بنام مایکولاکتون تولید می‌کند که در بیماری‌زایی نقش مهمی دارد. مایکولاکتون می‌تواند منجر به تخریب بافت گردد و همچنین پاسخ‌های 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 سایتوکاین‌های 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 سایتوکاین‌های TNF و IL-6 را مهار می‌نماید. میزان سایتوکاین TNF در لوله‌های حاوی 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 می‌گردد و به نوعی، نقش این سلولها را در عفونت حذف می‌کند.

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

## مقدمه

اولسر برولی (BU: Buruli Uleer) بعد از سل و جذام سومین بیماری فراوان مایکوباکتریایی انسانی محسوب می شود (۱). عامل این بیماری محیطی، مایکوباکتریوم اولسرانس است. این باکتری اولین بار در سال ۱۹۴۸ توسط محققین استرالیایی در زخم های پوستی غیر معمول کشف شد. عفونت با مایکوباکتریوم اولسرانس کشنده نیست ولی بعضی مواقع زخم های بد شکل ایجاد می کند که درمان آن پرهزینه است. معمولاً زخم ها به صورت تک، بدون درد و همراه با نودول زیر جلدی است که به مرور بزرگ می شود (۲). تاکنون در بیش از ۳۰ کشور جهان این بیماری گزارش شده است و سازمان بهداشت جهانی آن را در زمره ی بیماری های 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 آگزوتوکسین لپیدی 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 لپیدی از تولید IL-2 به وسیله لنفوسیت های T جلوگیری می کند و نوعی تولرانس و بی پاسخی را همراه با آپوپتوزیس در این سلولها القاء می کند (۵). تحقیقات نشان داده اند که عصاره ی برولین مشتق از باکتری مایکوباکتریوم اولسرانس در افراد آلوده به این باکتری می تواند مانند ترکیبات پروتئینی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (PPD) پاسخهای تأخیری ایمنی را ایجاد نماید. شاید این پاسخ ها به علت تشابه آنتی ژنی بین برولین و PPD باشد. آنتی ژنهای لپیدی می توانند از طریق گیرنده هایی مانند گیرنده های شبه Toll پاسخهای ایمنی ذاتی را فعال نمایند (۶).

بر اساس یافته های اخیر، مایکوباکترم اولسرانس می تواند 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 آنتی ژنی مهم باکتری یعنی مایکولاکتون را بر سلول های منوسیتی/ماکروفاژی و تولید TNF- $\alpha$  و IL-6 از این سلولها را در خون محیطی بررسی نماییم تا نقش این آنتی ژن در بیماریزایی باکتری بهتر مشخص گردد.

## روش بررسی

در این مطالعه ی 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 سابقه ای از عفونت با مایکوباکتریوم اولسرانس را نداشتند. با استفاده از شیب غلظتی فایکول، سلول های تک هسته ای 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 میلی لیتر تهیه گردید. جهت انجام آزمایشات مربوط به تولید سایتوکاین از لوله های استریل پلی استری مخصوص فلوسایتومتری استفاده شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون PBMC با تراکم یک میلیون سلول در میلی لیتر با مایکولاکتون در غلظت نهایی ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر تحریک شدند و پس از مخلوط نمودن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با 5% CO<sub>2</sub> انکوبه شد. از یک روتاتور برای مخلوط

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 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 میلی‌لیتر).

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 آنکوباسیون 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.

کردن دائم سلول‌ها در طول مدت آنکوباسیون استفاده گردید. در زمانهای ۰، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ ساعت پس از آنکوباسیون و تحریک سلولها، مایع رویی سلولها برداشت شد و غلظت سایتوکاین‌های 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 آنتی ژنی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. لوله کنترل مثبت پس از ۶ ساعت آنکوبه از نظر میزان سایتوکاین 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 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 آنکوباسیون، مایع رویی لوله‌های سوم و چهارم که با LPS تحریک شده بودند از نظر میزان سایتوکاین 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

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

لوله	C-ve	M 1000	M1000+LPS	LPS
زمان				
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
۴	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 سایتوکین های TNF و IL-6 تولید شده از مونوسیت های خون محیطی در زمان های مختلف پیش انکوباسیون با مایکولاکتون

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

## بحث

در این مطالعه سلولهای تک هسته‌ای 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 سلول های تک هسته‌ای خون محیطی جلوگیری می کند. مطالعات نشان داده‌اند که TNF از مهمترین سایتوکین های التهابی است که به وسیله سلولهای سیستم ایمنی ذاتی تولید می گردد. این سایتوکین نقش میانجی بین پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد و با تأثیر روی سلول های آندوتلیال عروق و لکوسیت های خون، سبب جذب و فراخوانی سلول های ایمنی به موضع التهاب می گردد. پاسخهای ایمنی ذاتی، کلید ایجاد و توسعه‌ی پاسخ های 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 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 ماکروفاژی می گردد (۸). در این مطالعه دریافتیم که مایکولاکتون سبب کاهش تولید TNF از سلولهای تک هسته‌ای 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  $\gamma$ -IFN در ایجاد پاسخ های ایمنی مصنوعی بخش به مایکوباکتریوم اولسرانس نقش دارند (۱۰). از آنجاییکه  $\gamma$ -IFN و TNF از سایتوکینهای التهابی مهم ایمنی هستند می توان تصور کرد که کاهش تولید TNF بوسیله سم این باکتری، در تضعیف پاسخهای التهابی نقش دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که

TNF توسط سلولهای تک هسته می گردد. مکانسیم 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 روشن تر شدن موضوع توصیه می گردد.

### 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 می گردد.

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 می گردد و به نوعی نقش این سلولها را در عفونت حذف می کند. در تحقیقات دیگری مشخص شد که تولید IL-6 تحت تأثیر TNF است، بنابراین کاهش تولید IL-6 می تواند یک فرآیند ثانویه ناشی از کاهش تولید TNF باشد (۱۲، ۱۱).

از مطالعه حاضر و سایر مطالعات می توان نتیجه گرفت که مایکوباکتریوم اولسرانس، با هدف قرار دادن سلولهای منوسیتی و ماکروفاژی از بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی جلوگیری می نماید و آنتی ژن لیپیدی مایکولاکتون بطور مشخص سبب کاهش تولید

### 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 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 recommendations 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.