بررسی سطح سیتوکاین های سلول های T helper نوع ۱ و۲ در بیماران آلوده به نقص ایمنی انسانی

صفیه صوفیان[۱]،مینو محرز[۲]،آرزو آقاخانی[۳] ،محمد بنی فضل[۴]،مریم فروغی[۵]، علی اسلامی فر[۶]،زهرا بلند قامت[۷]، اکبر خادم صادق[۸] و آمیتیس رمضانی[۹*]

۱. دکترای تخصصی بیوفیزیک، استادیار، دانشگاه پیام نور
۲. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران
۴. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۵. پزشک عمومی ، مرکز تحقیقات ایدز ایران
۶. پاتولوژیست، دانشیار انستیتو پاستور ایران
۷. فوق لیسانس میکروبشناسی، دانشگاه الزهرا
۸. لیسانس، کارشناس انستیتو پاستور ایران
۹. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشیار انستیتو پاستور ایران
* **نشانی برای مکاتبه:** تهران ،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران،گروه تحقیقات بالینی، تلفن: ۰۲۱۶۶۹۶۸۸۵۲ ، نمابر: ۰۲۱۶۶۴۶۵۱۴۷ ، amitisramezani@hotmail.com

دریافت مقاله: آبان نود پذیرش برای چاپ: دی نود

چکیده

سابقه و هدف: *ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)عامل اتیولوژیک بیماری ایدز در انسان می باشد.این عفونت معمولا با تغییر در تولید چندین سیتوکاین همراه بوده و این اختلال سیتوکاین ها نقش مهمی در پاتوژنز ایدز در بیماران HIV مثبت بازی می کند. به نظر می رسد تبدیل سیتوکاین های T helper 1 (Th1) به Th2 از عوامل موثر در پیشرفت بیماری ایدز باشد.هدف از این مطالعه بررسی سطوح سرمی سیتوکاین های سلول های Th1 و Th2 و تعیین تبدیل این سیتوکاینها از Th1 به Th2 در بیماران مبتلا به عفونت HIV می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه ۱۴۰ بیمار مبتلا به عفونت HIV و ۳۵ نفر کنترل سالم بررسی شدند.سطوح سرمی سیتوکاین های مربوط به سلول های Th1 (اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما) و Th2 (اینترلوکین ۴ و۱۰) با روش الیزا تعیین گردید.*

یافته ها: *سطوح سرمی کلیه سیتوکاین ها در بیماران الوده به HIV پایین تراز گروه کنترل بود.اینترلوکین ۲ در بیمارانیکه تا به حال درمان دریافت نکرده بودند، بالاتر از گروه تحت درمان بود در حالیکه اینترلوکین ۴ و ۱۰ و اینترفرون گاما در گروه naive پایین تر از گروه تحت درمان بود.به جز اینترلوکین ۲ سایر سیتوکاین ها، همبستگی منفی با سلول های CD4 نشان دادند که در این میان،اینترفرون گاما قوی ترین، همبستگی منفی را نشان داد.*

نتیجه گیری: *این مطالعه سوییچ سیتوکاین های Th1 به Th2 را در بیماران HIV مثبت نشان نداد. به نظر می رسد تغییرات پیچیده تری درالگوی ترشحات سیتوکاین های Th1 و Th2 در عفونت HIV دخیل باشد.*

واژگان کلیدی:ویروس نقص ایمنی انسانی(HIV)، سیتوکاین ، T helper1 (Th1)، T helper2 (Th2)

مقدمه

سیتوکاین ها پروتئین های با وزن مولکولی پایین و طیف وسیع فعالیت هستند که توسط سلولهای T (CD8،CD4) و منوسیت ها ترشح می شوند و در تنظیم پاسخ ایمنی، مهار تکثیر ویروس، تنظیم عمل کرد هپاتوسیت ها نقش دارند(۱). لنفوسیت های T فعال شده به ۲ گروه سلول های T helper 1 (Th1) و Th2 بر اساس نوع سیتوکاین هایی که تولید می کنند تقسیم می شوند(۲،۳). سیتوکاین های Th1 شامل اینترلوکین ۲،اینترفرون گاما و TNF بتا، پاسخ ایمنی سلولی را تسریع می کنند در حالی که سلول های Th2 که اینترلوکین های ۴، ۵،۱۰ و ۱۳ را تولید می کنند در ایجاد ایمنی با واسطه انتی بادی نقش دارند. به نظر می رسد که در پاتوژنز و تداوم عفونت های ویروسی، تبدیل سیتوکاین های Th1 به Th2 نقش قابل توجهی داشته باشد(۲،۳).

ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)عامل اتیولوژیک بیماری ایدز در انسان است. این عفونت معمولا با تغییر در تولید چندین سیتوکاین مانند اینترلوکین ۱۵، Tumor Necrotizing Factor (TNF) الفا ،اینترلوکین ۴، ۱۲،۱۰، ۱۸ و TGF بتا همراه است(۴). تولید تعدادی از این سیتوکاین ها در افراد HIV مثبت مختل شده و این اختلال سیتوکاین ها نقش مهمی در پاتوژنز ایدز در بیماران HIV مثبت بازی می کند. مطالعات نشان داده اند سلول های $T\ CD4^+$ هدف اصلی در عفونت HIV می باشند و ویروس به طور اولیه در سلول های T بیماران الوده به HIV تکثیر می یابد و سبب تخریب و حتی مرگ سلول ها در مراحل زودرس بدون علامت عفونت می گردد. تخلیه سلول های $T\ CD4^+$ در گردش خون بیماران HIV مثبت مشخصه اصلی ایدز می باشد (۵،۶).

عوامل خطر مرتبط با پیشرفت عفونت HIV به خوبی توصیف نشده اند و در حال حاضر بیومارکر مفیدی برای پی گیری پیشرفت بیماری ثابت نشده است. علت اینکه چرا برخی عفونت های HIV سریع تر به سمت ایدز پیش می روند به خوبی روشن نیست ولی به نظر می رسد پاسخ های ایمنی شامل تغییر سطح سیتوکاین ها می تواند شدت بیماری و پیشرفت ان به سمت بیماری ایدز را تعیین نماید(۷-۵).

مطالعات مختلفی در مورد نقش سیتوکاین ها در پاتوژنز عفونت HIV صورت گرفته است. برخی از این مطالعات نشان دهنده تبدیل سیتوکاین های Th1 به Th2 در این بیماران می باشد(۸،۹).در حالیکه سایر بررسی ها این فرضیه را تایید نمی نماید(۲،۱۰).

با توجه به نظرات متناقضی که در مورد نقش سیتوکاین های Th1 و Th2 در پاتوژنز عفونت HIV وجود دارد و اینکه تا به حال در ایران مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته بر ان شدیم تا سطح سرمی سیتوکاین های مربوط به سلول های Th1 (اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما) و Th2 (اینترلوکین ۴ و ۱۰)و تبدیل سلول های Th1 به Th2 را در ۲ گروه بیماران مبتلا به عفونت HIV و گروه کنترل سالم تعیین نماییم.

روش کار

این تحقیق به صورت تحلیلی از نوع مورد- شاهدی بر روی ۱۴۰ بیمار مبتلا به عفونت HIV و ۴۰ نفر گروه کنترل سالم صورت گرفت.پس از اخذ رضایت نامه و پر کردن پرسشنامه، ۱ سی سی خون از افراد گرفته شد و سطح سرمی سیتوکاین های مربوط به سلول های Th1 (اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما) و Th2 (اینترلوکین ۴ و ۱۰) با روش الیزا توسط کیت (Boster biological human IL) بررسی گردید. anti-HIV با روش الایزا (MP Biomedicals, Illkirch, France) بررسی گردید و نمونه های مثبت با روش وسترن بلات (Diaplus, San Francisco, USA) تایید شد.

تعداد سلول های CD4 توسط روش فلوسیتومتری تعیین گردید.

HBsAgو anti-HCV توسط روش الایزا به ترتیب با استفاده از کیت های (Hepanostika bioMerieux, Boxtel, Netherlands) و (Biorad, Segrate, Italy) بررسی شد.

یافته ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ و آزمونهای اماری t و تست دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری اختلافات روی $P<0.05$ قرار داده شد. Multiple comparisons با استفاده از ANOVA test انجام شد. همبستگی متغیرها با استفاده از Spearman rank test بررسی گردید.

یافته ها

صد و چهل بیمار HIV مثبت با میانگین سنی ۸/۸± ۳۶/۹ سال (۱۱۹ بیمار تحت درمان و ۲۱ بیمار Native) و ۳۵ کنترل سالم با میانگین سنی ۷/۳ ± ۳۵/۲ سال در این مطالعه وارد شدند .۷۰٪ بیماران مرد و ۳۰٪ انها زن بودند. میانگین تعداد سلول های CD4، ۱۷۶/۸ ± ۲۷۷/۲ (حداقل ۱۷ و حداکثر ۸۰۰) سلول در میلی متر مکعب بود. میزان عفونت هم زمان HIV با ویروس هپاتیت C ۵۲/۹٪ و با ویروس هپاتیت B ۵٪ بود.

تزریق مواد مخدر در ۵۲/۹٪ ، هتروسکسوال ۳۰٪، خون و محصولات ان ۲/۹٪،خالکوبی ۱/۴٪، تزریق مواد مخدر و هتروسکسوال ۵/۷٪ ، خالکوبی و تزریق مواد مخدر ۰/۷٪، هتروسکسوال و خون الوده ۰/۷٪ و ناشناخته ۵/۷٪ راه های احتمالی انتقال HIV بود.

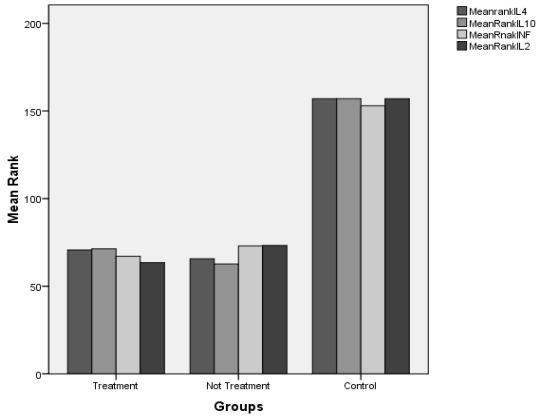
سطوح سرمی کلیه سیتوکاین ها در بیماران الوده به HIV پایین تراز گروه کنترل بود(نمودار ۱). اینترلوکین ۲ در گروه naive (۵/۷±۸/۷pg/ml)، بالاتر از گروه تحت درمان(pg/ml ۹/۹±۴/۷)بود. اینترلوکین ۴ و ۱۰ و اینترفرون گاما در گروه naive (۸/۰۲±۵/۸pg/ml، pg/ml ۲/۶ ± ۳/۹ ، ۱/۵ pg/ml ± ۳/۸)، پایین تر از گروه تحت درمان(۱۰/۸±۶/۱۴pg/ml، ۲/۹ pg/ml ±۴/۰۵ pg/ml ۲/۸ ± ۳/۹) بود.

برای بررسی ارتباط سطوح سیتوکاین ها با پیشرفت عفونت HIV بیماران بر اساس CD4 به ۳ گروه CD4 [پایین (200>)، متوسط (۲۰۰-۳۵۰)و بالا (۳۵۰ <)] تقسیم شدند و بااستفاده از ازمون Spearman rank test مشخص شد که به جز اینترلوکین ۲ سایر سیتوکاین ها همبستگی منفی با تعداد سلول های CD4 دارند و اینترفرون گاما بیشترین همبستگی منفی با تعداد سلول های CD4 را نشان داد (Spearman's r=-0.18).

با استفاده از ازمون Kruskal-Wallisمشخص شد که سطوح اینترلوکین ۴ و ۱۰ واینترفرون گاما در CD4 پایین (200>)، در بالاترین میزان بود در حالیکه سطح اینترلوکین ۲ در CD4 بالا (۳۵۰ <)در بالاترین میزان قرار داشت.

سطوح اینترلوکین ۴ و ۲ واینترفرون گاما در بیمارانی که الودگی هم زمان با HCV داشتند پایین تر از بیماران مبتلا به عفونت HIV به تنهایی بود در حالیکه اینترلوکین ۱۰ در بیماران HIV/HCV co-infected بالاتر بود.الگوی مشابهی در بیماران مبتلا به عفونت هم زمان HBV و HIV مشاهده گردید(نمودار ۱).

نمودار ۱ . سطوح سرمی سیتوکاین های Th1 و Th2 در بیماران الوده به HIV و گروه کنترل



بحث

در این مطالعه سطوح سیتوکاین های Th1 و Th2 در بیماران HIV مثبت جهت تعیین تغییر سیتوکاین های Th1 به Th2 بررسی گردید. نتایج ما نشان داد که سطوح اینترلوکین های ۴ ،۱۰ و اینترفرون گاما با پیشرفت بیماری افزایش می یابد در حالیکه سطوح اینترلوکین ۲ در بیماری پیشرفته کاهش می یابد. در بیمارانی که درمان دریافت نکرده بودند،اینترلوکین ۲ بالاتر و اینترلوکین های ۴ ،۱۰ و اینترفرون گاما پایین تر از گروه تحت درمان بود. بنابراین، این مطالعه نشان داد که گرچه سطوح اینترلوکین ۲ در بیماری پیشرفته کاهش می یابد ولی تغییر سیتوکاین های Th1 به Th2 مشاهده نمی گردد.همچنین سطوح اینترلوکین های ۴ ،۱۰ و اینترفرون گاما در طی بیماری افزایش یافته و حتی در بیماران تحت درمان نیز بالا باقی می ماند.

سیتوکاین ها پروتئین های با وزن مولکولی پایین و طیف وسیع فعالیت می باشند که توسط سلولهای T (CD8،CD4) و منوسیت ها ترشح می شوند و در تنظیم پاسخ ایمنی، مهار تکثیر ویروس نقش دارند(۱). لنفوسیتهای T فعال شده به ۲ گروه سلول های Th1 و Th2 بر اساس نوع سیتوکاین هایی که تولید می کنند تقسیم می شوند (۲،۳). سیتوکاین های Th1 شامل اینترلوکین ۲،اینترفرون گاما و TNF بتا، پاسخ ایمنی سلولی را تسریع می کنند در حالی که Th2 که اینترلوکین های ۴، ۵، ۱۰ و ۱۳ را می سازد در ایجاد ایمنی با واسطه انتی بادی نقش دارند(۱۱).

در سال ۱۹۹۳ Clerici وهمکارانش برای اولین بار گزارش کردند که اختلالات سیستم ایمنی مانند کاهش تکثیر وابسته به انتی ژن سلول های T و نقایص سیگنالی داخل سلولی که در بیماری پیشرفته HIV دیده می شوند به دلیل تبدیل پروفایل سیتوکاین هااز Th1 به Th2 می باشد و این تبدیل سیتوکاینی موجب اختلال در پاک سازی ویروس می گردد (۲).

از ان زمان مطالعات مختلفی در مورد نقش سیتوکاین ها در پاتوژنز عفونت HIV صورت گرفته است. برخی از این مطالعات نشان دهنده تبدیل سیتوکاین های Th1 به Th2 در این بیماران می باشد(۹،۸).در حالیکه سایر بررسی ها این فرضیه را تایید نمی نماید(۲،۹،۱۰،۱۲،۱۳).

Graziosi و همکارانش به بررسی سطوح سیتوکاین ها در مراحل مختلف بیماری در بیماران HIV مثبت پرداختند و نشان دادند که تغییر Th1 به Th2 در بیماری پیشرفته مشاهده نمی گردد (۱۲). Westby و همکاران نیز به نتیجه مشابهی در مطالعه خود رسیدند (۱۴).

Klein وهمکاران شیفت سیتوکاین های Th1 به Th2 را نشان دادند و این تغییرات را به صورت نشانگری برای نارسایی پیشرونده سیستم ایمنی سلولی معرفی کردند(۱۵).در مطالعه Becker نیز تبدیل سیتوکاین های Th1 به Th2 مشاهده گردید (۱۶).

مطالعه ما نشان دهنده تغییرات متفاوتی در تولید والگوی ترشح سیتوکاینها در بیماران آلوده به HIV بود. نتایج ما تبدیل سیتوکاین های Th1 به Th2 را در مراحل پیشرفته بیماری ایدز نشان نداد.این نتایج با نتایج مطالعات Graziosi (۱۲)، Westby(۱۴) ، Fakoya (۱۰)و Tanaka (۱۳)هم خوانی داشته ولی با مطالعات Klein (۱۵)و Becker (۱۶) تطابق ندارد.

نتیجه گیری

این مطالعه سوییچ سیتوکاین های Th1 به Th2 را در بیماران HIV مثبت نشان نداد. به نظر می رسد تغییرات پیچیده تری درالگوی ترشحات سیتوکاین های Th1 و Th2 در عفونت HIV دخیل باشد. مطالعات بیشتر شامل مطالعات longitudinal بر روی تعداد بیشتر بیماران پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه پیام نور مرکز اراک به جهت حمایت مالی از طرح فوق قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, et al. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. J Hepatol 1998; 28:84–90.

2. Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. Immunol Today 1994; 15:575–581.

3. Watanabe D, Uehira T, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Shirasaka T. Sustained high levels of serum interferon-γ during HIV-1 infection: a specific trend different from other cytokines. Viral Immunol. 2010;23(6):619-25.

4. Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, Toma E, Routy JP, Ahmad A. Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. J Immunol. 2010; 184(1):114-26.

5. Shearer GM. HIV-induced immunopathogenesis. Immunity. 1998;9(5):587-93

6. Sirskyj D, Thèze J, Kumar A, Kryworuchko M. Disruption of the gamma c cytokine network in T cells during HIV infection. Cytokine. 2008;43(1):1-14

7. Pahwa S. Role of common gamma chain utilizing cytokines for immune reconstitution in HIV infection. Immunol Res. 2007; 38(1-3):373-86.

8. Notermans DW, Jurriaans S, de Wolf F, et al. Decrease of HIV-1 RNA levels in lymphoid tissue and peripheral blood during treatment with ritonavir, lamivudine and zidovudine. Ritonavir/3TC/ZDV Study Group. AIDS 1998;12:167–73.

9. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. Clin Microbiol Rev 1996;9:532–62.

10. Fakoya A, Matear PM, Filley E, et al. HIV infection alters the production of both type 1 and 2 cytokines but does not induce a polarized type 1 or 2 state. AIDS 1997; 11:1445–52.

11. Abayli B, Canataroğlu A, Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. Turk J Gastroenterol. 2003; 14(1):7-11.

12. Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, Fortin JP, Demarest JF, Cohen OJ, et al. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. Science 1994; 265:248–52.

13. Tanaka M, Hirabayashi Y, Gatanaga H, Aizawa S, Hachiya A, Takahashi Y, et al. Reduction in interleukin-2-producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection: direct analysis of intracellular cytokine concentrations in CD4+CD8_ T cells. Scand J Immunol 1999; 50:550–4.

14. Westby M, Marriott JB, Guckian M, Cookson S, Hay P, Dalgleish AG. Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN-g) production as HIV-1-associated markers of immune dysfunction. Clin Exp Immunol 1998; 111:257–63.

15. Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, Helm EB, et al. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. AIDS. 1997; 11(9):1111-8.

16. Becker Y. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers—a review and hypothesis. Virus Genes 2004; 28:5–18.