

## بررسی سیتوکینهای Th1-Th2 در سطح سلولی در بیماران مبتلا به سپسیس و سپسیس شدید

### چکیده

زهره احمدی نژاد<sup>۱\*</sup>

احمد رضامبین<sup>۱</sup>

آمینا کریمی نیا<sup>۲</sup>

شیرین افهمی<sup>۱</sup>

زینت نادیا حتمی<sup>۳</sup>

ابراهیم ترک آبادی<sup>۲</sup>

علیرضایلدا<sup>۱</sup>

۱- گروه عفونی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه ایمنولوژی، انستیتو باستور ایران

۳- گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی

تهران

**زمینه و هدف:** سپسیس از علل عمده مرگ بیماران بوده و پیامد بیماری، بستگی به پاسخ Th1 و Th2 دارد به طوری که در پاسخ غالب Th2، شدت بیماری افزایش می‌یابد. هدف این مطالعه ارزیابی ارتباط بین سطوح سایتوکین‌ها و شدت بیماری می‌باشد.

**روش بررسی:** یک مطالعه مقطعی جهت بررسی سطوح سلولی سایتوکین‌ها در بیماران دچار سپسیس و سپسیس شدید در به بیمارستان امام خمینی طی سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ انجام شد. این مطالعه شامل ۳۷ بیمار (۲۴ مرد و ۱۳ زن) بود. بیست و شش بیمار دچار سپسیس و ۱۱ نفر دچار سپسیس شدید بودند. ۳۷ داوطلب سالم به عنوان کنترل بود. میانگین سنی بیماران  $57 \pm 23/3$  (محدوده ۲۱ تا ۹۲ سال) بود. بعد از سانتیفریژ کردن نمونه خون کامل بیماران و گروه کنترل، مونوسیت و لوکوسیت را جدا و سپس کشت داده و مقدار IL-4، IFN- $\gamma$ ، IL-12 و IL-10 را با و بدون تحریک سلولی، به روش الیزا اندازه‌گیری کردیم.

**یافته‌ها:** ارتباط معنی‌داری در تولید IFN- $\gamma$  در بیماران سپسیسی با سپسیس شدید و حتی در آنها که فوت کردند با افراد زنده، پیدا نشد، اما سطوح IL-12 در بیماران دچار سپسیس شدید در مقایسه با بیماران دچار سپسیس، کاهش معنی‌دار داشت ( $p=0/048$ ) و نیز در افراد فوت شده در مقایسه با زنده مانده‌ها ( $p=0/028$ ). همچنین سطوح IFN- $\gamma$ ، IL-10 و IL-4 در بیماران در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌دار داشت، اختلاف معنی‌داری در تولید IL-12 بین دو گروه ذکر شده وجود نداشت. از نظر جنس و سن (بالای ۵۵ و کمتر)، اختلاف معنی‌داری در تولید سایتوکین‌ها وجود نداشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج ما نشان داد که سلول T کمک کننده غالب در بیماران دچار سپسیس شدید و بیماران فوت شده Th2 است و ارتباط معنی‌داری در تولید سایتوکین‌های Th1 و پیشرفت سپسیس وجود دارد و به احتمال قوی، سطوح IL-12 بطور مشخص در بیماران فوت شده و سپسیس شدید، کاهش می‌یابد.

**کلمات کلیدی:** سپسیس، سپسیس شدید، سایتوکین، سلول T کمک کننده نوع ۱ و ۲

\*نویسنده مسئول، نشانی: تهران، انتهای بلوار کشاورز،

بیمارستان امام خمینی، گروه عفونی

تلفن: ۴۳۳۰۵۴۸۱ و ۶۶۹۲۹۲۱۶

email: ahmadiz@tums.ac.ir

### مقدمه

سپسیس یک علت عمده عوارض و مرگ و میر است و همچنان پاتولوژی آن روشن نیست. تعریف تظاهرات بالینی سپسیس هنوز

کامل نشده و هر روز تعاریف تازه‌تر و دقیق‌تر برای بیماری ارائه می‌شود. بنا به گزارشات اخیر علی‌رغم پیشرفت تکنیکی در بخش‌های مراقبت ویژه و درمان‌های محافظتی پیشرفته انسیدانس بیماری هر سال بین ۱/۵٪ تا ۸٪ در حال افزایش بوده و اقامت

و سرانجام بیماری را متاثر می‌سازند. به عنوان مثال،  $\gamma$ -IFN تولید شده در سلول‌های Th1، جلوی تولید سلول‌های Th2 را می‌گیرد و IL-4 و IL-10 تولید شده در سلول‌های Th2، مانع تولید سلول‌های Th1 می‌شوند.<sup>۹</sup> در این مطالعه میزان تولید  $\gamma$ -IFN، IL-10 و IL-12 در بیماران دچار سپسیس و سپسیس شدید در سطح سلولی بررسی شد. سطح سیتوکین‌های Th1 و Th2 در بیماران با گروه کنترل نیز مقایسه گردید.

### روش بررسی

این مطالعه مقطعی بر روی بیماران مبتلا به سپسیس که از شهریور ۱۳۸۳ لغایت اسفند ۱۳۸۴ به بیمارستان امام خمینی در شهر تهران مراجعه کرده بودند انجام شد. ۳۷ بیمار (۱۳ نفر زن، ۲۴ نفر مرد) که وضعیت سپسیس آنها توسط معیارهای توافق‌نامه انجمن مراقبت‌های حیاتی پزشکی و کالج امریکایی پزشکان قفسه سینه در سال ۱۹۹۲ تأیید شد، وارد مطالعه شدند. بیمارانی که بیش از دو نوبت آنتی‌بیوتیک دریافت کرده بودند، بیماران مبتلا به نقص ایمنی اولیه یا اکتسابی و نیز مبتلایان به دیابت و نارسایی مزمن کلیه از مطالعه خارج شدند. گروه کنترل شامل ۳۷ نفر (۱۰ نفر زن، ۲۷ نفر مرد) با میانگین سنی  $۳۳ \pm ۸/۴$  سال) بود. از پرسنل پزشکی و همراهان بیماران برای انتخاب گروه کنترل استفاده شد. این افراد علاوه بر معیارهای خروج ذکر شده برای بیماران، سابقه ابتلاء به بیماری عفونی در دو هفته قبل از نمونه‌گیری نداشتند. انجام آزمایشات و گرفتن خون با رضایت افراد صورت گرفت. هیچگونه مداخلات درمانی خارج از روال معمول، صورت نگرفت و هزینه آزمایشات بر افراد تحمیل نشد. مشخصات و اطلاعات بیماران کاملاً محفوظ ماند. پنج میلی‌لیتر خون بیمار و شاهد با استفاده از لوله استریل دارای ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (۱۰ IU/ml) تهیه و به سرعت (در کمتر از سه ساعت) به آزمایشگاه ایمونولوژی انستیتو پاستور منتقل می‌شد. آزمایشگاه خون با PHYCOL (دانسیته ۱/۰۷۷) مخلوط شده و سپس با سرعت ۵۰۰ ز به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق، سانتریفوژ می‌شد. سپس از قسمت میانی نمونه سانتریفوژ شده (محل تجمع لنفوسیت و مونوسیت‌ها) سرم برداشته و با غلظت دو میلیون سلول در میلی‌لیتر، کشت سلولی انجام شد. به دنبال آن، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> برای ۱۲ ساعت انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها

طولانی این بیماران در بخش و ICU هزینه سنگینی را به سازمانهای بهداشتی تحمیل می‌کنند.<sup>۱</sup> لنفوسیت‌های T<sub>CD4</sub><sup>+</sup> از نظر عملکرد به حداقل سه نوع Th0، Th1، Th2، تقسیم می‌شوند که بر اساس پاسخ به آنتی ژن، تمایز می‌یابند.<sup>۲</sup> لنفوسیت‌های Th0 منبع عملکرد سلول‌های کمک کننده T Helper برای Th1، Th2 است. پاسخ Th1 با تولید اینترفرون گاما، اینترلوکین ۱۲ و سیتوکین‌های دیگر مشخص می‌شود مشخصه پاسخ اختصاصی Th2 تولید اینترلوکین‌های IL4، IL5، IL10 و سیتوکین‌های دیگر است.<sup>۳</sup> سیتوکین‌ها، هورمون‌های پلی‌پپتیدی هستند که در تنظیم رشد، تمایز و عملکرد سلول‌های خون‌ساز و غیرخون‌ساز دخالت دارند. سیتوکین‌ها به عنوان پیامبر شیمیایی در داخل دستگاه ایمنی عمل می‌کنند. ندرتاً در بدن به تنهایی عمل می‌کنند. عملکرد آنها موقتی است و معمولاً محدوده کوچکی دارد. سیتوکین‌ها نقش مهمی در تقویت پاسخ ایمنی دارند زیرا رها سازی سیتوکین‌ها از تعداد کمی سلول فعال شده توسط آنتی ژن، موجب فعال شدن انواع گوناگون سلول‌ها که لزوماً در ناحیه مجاور محل رها سازی سیتوکین‌ها قرار ندارند، می‌شوند.<sup>۲</sup> ارزیابی سیتوکین‌ها در سطح سلولی اهمیت به سزایی در بدست آوردن اطلاعات صحیح در مورد نوع و نسبت سلول‌های T پاسخگو در مقابل آنتی ژن‌های اختصاصی دارد.<sup>۴</sup> بررسی تولید داخل سلولی سیتوکین‌ها با استفاده از فلوسیتومتری امکان شناسایی همزمان دستجات مختلف سلولی و تولید سیتوکین‌ها را در آنها فراهم می‌آورد.<sup>۵</sup> با این روش امکان اندازه‌گیری سریع تولید سیتوکین‌ها در هزاران سلول مجزا فراهم می‌گردد. به لحاظ این که پاسخ‌های ایمنی در اکثر بیماری‌ها دارای اساس Th1 و Th2 می‌باشد، این تکنیک برای بررسی روند بیماری‌زایی و تعقیب پیشرفت بیماری نیز سودمند است.<sup>۶</sup> در مطالعات، نشان داده شده که استعداد ابتلا به سپسیس و پیشرفت وضعیت عمومی بدن بیمار به سمت سپسیس، در ارتباط با کاهش تولید سیتوکین‌های Th1 (اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما) در حضور افزایش یافته سیتوکین‌های Th2 (IL4- IL10) است.<sup>۷</sup> همچنین سیتوکین‌های تولید شده در سپسیس ممکن است روی برتری زیر گروه‌های T-helper تاثیر گذاشته و متعاقباً روی پاسخ ایمنی مؤثر باشند<sup>۸</sup> به طوری که ممکن است وضعیت بیمار را به سمت وخیم شدن حال عمومی برده و منجر به افزایش مرگ و میر شوند. به عبارت دیگر سیتوکین‌ها نقش هدایتگر سیستم ایمنی را به عهده داشته

آرتریت روماتوئید و یک مورد به دلیل عدم پاسخ نمونه به محرک‌های اضافه شده در آزمایشگاه). میانگین سنی بیماران  $57 \pm 23/3$  بود با محدوده ۹۲ - ۲۱ سال. علل سپسیس عبارت بودند از: پنومونی ۱۲ مورد (۳۰٪)، عفونت ادراری ۱۰ مورد (۲۵٪)، عفونت بافت نرم و استخوان پنج مورد (۱۲/۵٪)، آندوکاردیت سه بیمار (۷/۵٪) و سپسیس با منشأ ناشناخته هشت بیمار (۲۰٪). ۲۷ بیمار (۷۳٪) در مرحله سپسیس و ۱۰ بیمار (۲۷٪) مبتلا به سپسیس شدید بودند. پنج بیمار (۱۳/۵٪) فوت کردند که همه آنها در گروه سپسیس شدید قرار داشتند. میانگین تولید اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) در بیماران تحت مطالعه به دنبال تحریک سلولی با PMA و Ionomycine  $30/7 \pm 37$  ng/ml و در گروه کنترل،  $50/8 \pm 73/1$  ng/ml بود. ( $p=0/000$  و t test) میانگین تولید IL-4 و IL-10 در بیماران به دنبال تحریک سلولی، به ترتیب  $643/4 \pm 654/4$  pg/ml و  $1843/4 \pm 1549$  pg/ml بود در حالیکه در گروه کنترل به ترتیب برابر  $1327/8 \pm 1052/2$  pg/ml ( $p=0/004$  و t test) و  $3438/9 \pm 1780$  pg/ml بود. ( $p=0/000$  و t test). میانگین تولید اینترلوکین ۱۲ در بیماران تحت مطالعه به دنبال تحریک سلولی مساوی  $3/9 \pm 1/9$  pg/ml و در گروه کنترل  $3/7 \pm 0/8$  pg/ml بود. ( $p=0/43$  و t test) مقدار تولید سیتوکین‌ها برحسب وضعیت بیماری (سپسیس و سپسیس شدید) و پیامد بیماری (زنده ماندن و فوت) در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

را به دو دسته تقسیم کرده: به دسته اول ۵۰ ng/ml Phorbol Myristate Acetate و Inomycin برای تحریک سلولی، در محیط کشت اضافه کردیم و به دسته دوم هیچ تحریکی وارد نکردیم. سپس سوپ سلولی حاصله را جمع‌آوری کرده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات نگهداری کردیم.

میزان سیتوکین‌های IL-4, IL-10, TH2 برای IL-12 و  $\gamma$ -INF برای TH1 مورد آزمایش قرار گرفت. مقدار سیتوکین‌های تولیدی را با دانسیتومتری نوری بدست آورده و بنا به فرمول خطی هر کیت غلظت سیتوکین را محاسبه کردیم. کلیه کیت‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری سیتوکین‌های  $\gamma$ -IFN, IL-10, IL-12, IL-4 از شرکت Bender Med system، اتریش خریداری شد. معیارهای توصیفی بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار و فراوانی مطلق و نسبی نمایش داده شد. برای مقایسه بین گروه‌ها و بررسی معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری، از t-test استفاده شد. اختلاف بیشتر از ۹۵٪ دامنه اطمینان در تمام آزمایشات با مقدار  $P \leq 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS ویراست ۱۱/۵ استفاده شد.

## یافته‌ها

در مجموع از ۴۰ بیمار با تشخیص سپسیس نمونه خون تهیه شد ولی سه بیمار از مطالعه خارج شدند. (یک بیمار به علت مثبت شدن آزمایش HIV، یک مورد به علت رد تشخیص سپسیس و ابتلاء به

جدول ۱- مقدار سیتوکین‌ها در بیماران تحت مطالعه براساس شدت سپسیس و پیامد بیماری

سایتوکین	سپسیس	سپسیس شدید	فوت شده	زنده
اینترفرون گاما با تحریک سلولی	$35/8 \pm 33$	$40/6 \pm 24/1$	$25/8 \pm 16/3$	$38/3 \pm 31/9$
اینترفرون گاما بدون تحریک سلولی (ng/ml)	$-1/3 \pm 0/7$	$-1/5 \pm 0/4$	$-1/7 \pm 0/6$	$-1/3 \pm 0/6$
اینترلوکین ۲ با تحریک سلولی	$4/2 \pm 2/1$	$3/3 \pm 0/3$	$3/2 \pm 0/3$	$4 \pm 1/9$
اینترلوکین ۱۲ بدون تحریک سلولی (Pg/ml)	$3/3 \pm 0/4$	$3/3 \pm 0/5$	$3/2 \pm 0/2$	$3/4 \pm 0/4$
اینترلوکین ۴ با تحریک سلولی	$656/4 \pm 591/7$	$751/3 \pm 802/7$	$255/5 \pm 242/5$	$731/5 \pm 659$
اینترلوکین ۴ بدون تحریک سلولی (Pg/ml)	$6/2 \pm 7/3$	$5/9 \pm 4/6$	$3/4 \pm 4/4$	$6/7 \pm 6/9$
اینترلوکین ۱۰ با تحریک سلولی	$1820/5 \pm 1590/7$	$1907/5 \pm 1505/9$	$1510/3 \pm 1788/1$	$1882/6 \pm 1544/2$
اینترلوکین ۱۰ بدون تحریک سلولی (Pg/ml)	$\pm 32/1 \ 53/8$	$37/6 \pm 56/4$	$25/6 \pm 20$	$35/2 \pm 57/3$

جدول-۲: میزان تولید سایتوکین ها بر حسب سن و جنس

سایتوکین	مرد	زن	سن کمتر از ۵۵	سن بیشتر از ۵۵
اینترفرون گاما با تحریک سلولی	۳۲۳۵ ± ۲۸	۳۷/۷ ± ۳۵/۸	۳۶/۵ ± ۲۶/۷	۴۶/۸ ± ۳/۴
اینترفرون گاما بدون تحریک سلولی (ng/ml)	-۱/۴ ± ۳/۴	-۱/۱ ± ۰/۸	-۱/۵ ± ۰/۳۴	-۱/۳ ± ۰/۹
اینترلوکین ۱۲ با تحریک سلولی	۳/۴ ± ۰/۴	۴ ± ۱/۳	۳/۸ ± ۲/۲	۴/۹ ± ۳
اینترلوکین ۱۲ بدون تحریک سلولی (Pg/ml)	۳/۴ ± ۰/۴	۳/۵ ± ۰/۴	۳/۳ ± ۰/۳	۳/۳ ± ۰/۵
اینترلوکین ۴ با تحریک سلولی	۶۷۶/۱ ± ۷۲۹/۵	۶۳۰/۵ ± ۶۷۳/۶	۷۲۰/۸ ± ۶۲۳/۳	۶۹۱/۵ ± ۴۶۰/۳
اینترلوکین ۴ بدون تحریک سلولی (Pg/ml)	۵/۱ ± ۵/۸	۷/۵ ± ۷/۶	۵/۷ ± ۵/۹	۸/۸ ± ۷/۸
اینترلوکین ۱۰ با تحریک سلولی	۱۶۰۱ ± ۱۶۲۴/۶	۲۲۲۶/۳ ± ۱۷۶۹/۳	۱۵۳۳/۵ ± ۱۳۰۷/۴	۲۳۰۸/۴ ± ۱۳۲۸
اینترلوکین ۱۰ بدون تحریک سلولی (Pg/ml)	۳۱/۹ ± ۵۵/۷	۲۴/۱ ± ۱۹/۳	۴۱/۴ ± ۶۹/۱	۳۸/۷ ± ۵۳/۶

به سپسیس منتشر شده است. اندازه گیری سایتوکین ها در سطح سلولی روشی پیچیده تر و پرهزینه تر از اندازه گیری مقادیر سرمی سایتوکین ها است ولی باید توجه داشت نیمه عمر کوتاه سایتوکین های در گردش، وجود مهار کننده های سایتوکینی در سرم و به دام انداخته شدن سایتوکین ها از طریق رسپتورهای سلول های خون محیطی مثل اریتروسیت ها و لکوسیت ها، ممکن است موجب حصول نتایج غیر واقعی شود. (پدیده کوه یخ که قله آن سطح سرمی سایتوکین ها است). لذا در این مطالعه نیز ما از روش اندازه گیری در سطح سلولی (اینتراسیتوپلاسمی) استفاده کردیم. بر اساس نتایج حاصل از اکثر مطالعات آنچه که در سپسیس (بویژه سپسیس شدید) رخ می دهد حرکت سیستم ایمنی به سمت غلبه فنوتیپ Th2 است. Ono و همکاران<sup>۱۱</sup> گزارش کردند که در سپسیس شدید با کاهش در سایتوکین های Th1 و افزایش در سایتوکین های Th2 روبرو هستیم. در یک مطالعه که در دانشکده پزشکی Otia در ژاپن انجام شد، نیز دیده شد که بیماران دچار سپسیس، هرچه به سمت مرحله پیشرفته تر سپسیس بروند، Th2 در آنها غالب می شود.<sup>۱۲</sup> نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که میزان تولید IL-12 در بیماران دچار سپسیس شدید کمتر از بیماران دچار سپسیس بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. (p=۰/۰۴۸ و t test) اگرچه در مطالعه ما سطح سایتوکین های Th2 دو گروه بیماران با سپسیس و سپسیس شدید اختلاف معنی داری نداشت. در مطالعه حاضر، اختلاف آماری معنی داری در میزان تولید IL-12 بین بیماران فوت شده در مقایسه با بیماران زنده مانده، وجود داشت (p=۰/۰۲۸ و t test). چنانکه میزان تولید IL-12 در افراد فوت

در آنالیز انجام شده بین دو گروه بیماران مبتلا به سپسیس و سپسیس شدید هیچ گونه اختلاف معنی داری در سایتوکین های IFN-IL-10, IL-4, و  $\gamma$  دیده نشد. میزان تولید IL-12 در بیماران دچار سپسیس به طور معنی داری بالاتر از بیماران با سپسیس شدید بود. (p=۰/۰۴۸ و t test). میزان تولید سایتوکین های IFN- $\gamma$ , IL-4 و IL-10 در بیماران فوت شده و بیماران زنده تفاوت معنی داری نداشت در حالی که IL-12 در بیماران فوت شده پایین تر از بیماران زنده بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. (p=۰/۰۲۸ و t test). تولید سایتوکین ها به دنبال تحریک سلولی با PMA و Ionomycine و بدون تحریک در مردان و زنان و نیز در افراد مسن (بالاتر از ۵۵ سال) و بیماران جوان تر یکسان بود و سطح سایتوکین ها بر حسب جنس و سن اختلاف آماری معنی داری نداشت. (جدول شماره ۲)

## بحث

فعال شدن راه های التهابی شامل شبکه سایتوکینی به عنوان یک عامل مهم در پاتوژنز سپسیس مورد توجه است. نوع پاسخ ایمنی با تبدیل سلول Th0 به Th1, Th2, مشخص می شود. بطوری که در معرض IL-12 قرار گرفتن، باعث تبدیل شدن به فنوتیپ Th1 و آزاد شدن IL-4 موجب تبدیل شدن به فنوتیپ Th2 می شود. هر دو نوع سلول Th، پاسخ ایمنی را توسط این سایتوکین های متنوع با اثر آنتاگونیست در بیماران دچار سپسیس، تنظیم می کنند.<sup>۱۰</sup> بررسی های متعددی در مورد غلظت سرمی و سلولی سایتوکین ها در بیماران مبتلا

مطالعه به شدت سرکوب نشده بود که شاید این یافته توجیه‌کننده میزان بالای بقاء در این بیماران و تاییدکننده نقش محافظتی IL-12 باشد.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پیشرفت هر دو نوع پاسخ سلول Th با بروز سیتوکین‌های غالب پیش‌التهابی، نقش اساسی در بهبودی و سلامت بیماران دچار سپسیس شدید دارند، اگرچه نقش حفاظتی سیستم ایمنی Th1 باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

توصیه نویسندگان این مقاله، بررسی تعادل Th1 و Th2 (با تأکید بر میزان تولید IL-12) در بیماران دچار سپسیس برای تعیین میزان احتمال بروز پیامد مرگ در هر بیمار می‌باشد. زیرا حتی در صورت عدم امکان اصلاح این اختلال ایمنولوژیک با عامل ایمنومدولاتوری مانند اینترلوکین ۱۲، با اعمال مراقبت ویژه از این بیماران می‌توان میزان مرگ آنها را کاهش داد.

سپاسگزاری: این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۷۳۷ مورخ ۸۳/۳/۲۷ می‌باشد.

## References

- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
- Benjamini E, Coico R, Sunshine G. Immunology: a short course. 5th ed. New York, NY: Wiley-Liss: 2003.
- Germann T, Rude E. Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108: 103-12.
- Ferry B, Antrobus P, Huzicka I, Farrell A, Lane A, Chapel H. Intracellular cytokine expression in whole blood preparations from normals and patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 410-7.
- Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995; 188: 117-28.
- Maino VC. Rapid assessment of antigen induced cytokine expression in memory T cells by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63: 199-207.
- Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Anti-interleukin-10 antibody restores burn-induced defects in T-cell function. *Surgery* 1997; 122: 146-52.
- Ferguson NR, Galley HF, Webster NR. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1999; 25: 106-9.
- Roitt IM, Delves PJ. Roitt's Essential Immunology. 10th ed. London: Black-well: 2001.
- Hassing A, Keremer H, Liang WX, Stampfl K. The role of the Th1 to Th2 shift of the cytokine profiles of CD4 helper cells in the pathogenesis of autoimmune and hypercatabolic disease. *Med Hypotheses* 1998; 51: 59-63.
- Ono S, Ueno C, Aosasa S, Tsujimoto H, Seki S, Mochizuki H. Severe sepsis induces deficient interferon-gamma and interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy improves survival in peritonitis. *Am J Surg* 2001; 182: 491-7.
- Iwasaka H, Noguchi T. Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2237-43.
- Yu YH, Cui NQ, Fu Q, Li J. Change of TH1/TH2 cytokine equilibrium in rats with severe sepsis and therapeutic effect of recombinant interleukin-12 and Shenmai injection. *Chin J Integr Med* 2005; 11: 136-41.

شده بطور قابل توجهی کمتر از بیماران زنده مانده بود. به عبارتی در بیماران فوت شده فنوتیپ غالب Th2 بود. مطالعه فرگوسن و همکاران<sup>۸</sup> نیز نشان داد که برتری سیتوکین‌های Th2، بیمار را به سمت وخیم شدن حال عمومی برده و باعث افزایش مرگ و میر می‌شود. نکته حائز اهمیت نقش مثبت سیتوکین‌های Th1 به ویژه IL-12 در پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سپسیس است. Yu Yong<sup>۱۳</sup> در بررسی‌هایی که در سال ۲۰۰۵ انجام داد، سطح سرمی Th1/Th2 را در موش‌هایی که دچار سپسیس شدید (با منشاء پرتونیت شدید) بودند، قبل و بعد از تزریق (rIL-12) Recombinant Interleukin-12 اندازه‌گیری کرد و نشان داد که در موش‌هایی که rIL-12 دریافت کرده بودند، میزان بقا (Survival rate) بیشتر می‌شود. اگرچه در مطالعه حاضر چنین مداخله‌ای انجام نشد ولی در مقایسه سطح سیتوکین‌ها در گروه سالم و بیمار دیده شد که سیتوکین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL10، در بیماران تحت مطالعه کمتر از گروه کنترل بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. در حالی که اختلاف معنی‌داری بین میزان تولید سیتوکین‌های Th1 در دو گروه بیمار و سالم وجود نداشت و به عبارت دیگر در مجموع سیستم ایمنی Th1 در بیماران تحت

## Detection of intracytoplasmic Th1/Th2 cytokine profiles in patients with sepsis and severe sepsis

Ahmadinejad Z<sup>\*1</sup>  
Mobaen A.R<sup>1</sup>  
Kariminia A<sup>2</sup>  
Afhami SH<sup>1</sup>  
Hatmi ZN<sup>3</sup>  
Torkabadi E<sup>2</sup>  
Yalda A<sup>1</sup>

1-Department of Infectious Diseases, Tehran University of Medical Sciences

2- Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran

3- Department of Social Medicine, Tehran University of Medical Sciences

\*Corresponding author Department of Infectious Diseases, Imam Khomeini Hospital, Keshavarz Blvd., Tehran.  
Tel: +98-21-66929216, 44305481  
email: ahmadiz@tums.ac.ir

### Abstract

**Background:** Sepsis is the leading cause of death in critically ill patients throughout the world. The incidence is increasing despite the major advances in the development of antimicrobial agents and other supportive treatments. Based on multiple studies, it has been shown that patient outcome depends on Th1 and Th2 cytokine response. Moreover, whenever the Th2 response is predominant, the sepsis is more severe. The aim of this study was to evaluate the correlation between cytokine levels and the severity of sepsis in patients.

**Methods:** A cross-sectional study on the cellular levels of several pro-inflammatory cytokines was carried out in patients with sepsis and severe sepsis. The study included 37 patients (24 men and 13 women), 26 of them had sepsis and 11 had the severe form of sepsis. Thirty-seven healthy volunteers served as controls. The average age of the patients was 57 years ( $\pm 23.3$  years), with a range of 21 to 92 years. From the whole blood of the subjects, we separated the monocytes and leukocytes, which were then cultured. Using an ELISA method, we measured levels of IFN- $\gamma$  and IL-12 (associated with Th1), and IL-4 and IL-10 (associated with Th2) in the cultured cells with and without cell stimulation.

**Results:** No correlation was found for IFN- $\gamma$  production in the cells of patients with sepsis and severe sepsis, regardless of whether the patients had died or survived. However, IL-12 levels were significantly decreased in severe sepsis compared with those of sepsis patients ( $P=0.048$ ). Furthermore, the cells of expired patients also had significantly decreased IL-12 levels compared with those of surviving patients ( $P=0.028$ ). We also found that the levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 were decreased in patients compared with those of controls, which correlated to their production. However, there was no correlation for IL-12 production between the cells of the patients compared with those of the controls. There was also no correlation for cytokine production between men and women with sepsis and in adults compared with that of elderly patients ( $>55$  years old).

**Conclusion:** We have shown that the predominating T helper cell subset in patients with severe sepsis, as well as expired patients, is Th2. In conclusion, the correlation of Th1 cytokine production and progression of sepsis was demonstrated. Most probably IL-12 levels would be significantly lower in patients with severe sepsis and those who expired.

**Keywords:** Sepsis, Severe sepsis, Cytokine, Th1, Th2.