

## بررسی غلظت اینترفرون-گاما، فاکتور نکروز تومور-آلفا، اینترلوکین-۱۳ و اینترلوکین-۴ در شیر مادر و ارتباط آن‌ها با درماتیت آتوپیک

### چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۷/۱۲

سپیده مرادخانی<sup>۱\*</sup>

محمد مهدی محمدی<sup>۱\*</sup>

حمید دانشور<sup>۲</sup>

نسرتین بازرگان هرندی<sup>۳</sup>

محمد رضا بانسی<sup>۴</sup>

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان، کرمان، ایران.

۲- گروه ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۳- گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۴- مرکز تحقیقات مدل‌سازی در سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

\* نویسنده مسئول: کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، مجتمع دانشگاهی شهید باهنر، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی  
تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۴۶۱۷  
E-mail: mmmohamadi@razi.tums.ac.ir

### مقدمه

درماتیت آتوپیک (Atopic dermatitis) یک بیماری التهابی مزمن و خارش‌دار پوست می‌باشد و مجموعه‌ای از فاکتورها در ایجاد بیماری نقش دارند که برخی از آن‌ها عبارتند از زمینه ژنتیکی، اختلال در عملکرد سد پوستی، عوامل محیطی (مثل تغذیه)، عوامل عفونی و گاهی بدخیمی‌های ایمنولوژیک.<sup>۱</sup> این بیماری رایج‌ترین اختلال

زمینه و هدف: درماتیت آتوپیک یکی از رایج‌ترین بیماری‌های پوستی مزمن، التهابی و خارش‌دار بین اطفال می‌باشد. تاثیر قطعی مواد موجود در شیر مادر در پیش‌گیری از انواع بیماری‌های التهابی (هم‌چون درماتیت آتوپیک) مورد بحث است. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری غلظت سایتوکین‌های اینترفرون-گاما، فاکتور نکروز تومور-آلفا، اینترلوکین-۱۳ و اینترلوکین-۴ در شیر مادر و رابطه‌ی آن‌ها با درماتیت آتوپیک در شیرخواران بود.

روش بررسی: نمونه‌های مورد از شیر مادران دارای شیرخوار مبتلا به درماتیت آتوپیک انتخاب گردیدند. هم‌زمان با آن نمونه‌های کنترل از شیر مادران دارای شیرخوار غیر مبتلا به درماتیت آتوپیک (یا هرگونه بیماری آلرژیک دیگر) انتخاب شدند. غلظت سایتوکین‌های التهابی و ضدالتهابی ذکر شده موجود در شیر مادر با تکنیک الایزا اندازه‌گیری شد. اطلاعات دموگرافیک با استفاده از یک فرم جمع‌آوری اطلاعات اخذ گردید. هم‌چنین، شدت بیماری بر اساس شاخص اطلاعات دموگرافیک با استفاده از یک فرم جمع‌آوری اطلاعات اخذ گردید. هم‌چنین، شدت بیماری بر اساس شاخص اطلاعات دموگرافیک با استفاده از یک فرم جمع‌آوری اطلاعات اخذ گردید. هم‌چنین، شدت بیماری بر اساس شاخص

یافته‌ها: بر اساس نتایج آزمون Unpaired t-test، غلظت سایتوکین‌های IFN- $\gamma$  و IL-13 به‌طور معنی‌داری در گروه مورد افزایش داشت (به ترتیب  $P=0/04$  و  $P=0/02$ ). اما، در آزمون رگرسیون لجستیک، تنها اثر IFN- $\gamma$  روی افزایش شانس ابتلا به بیماری در گروه مورد، از نظر آماری معنی‌دار شد ( $P=0/02$ ).

نتیجه‌گیری: غلظت سایتوکین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-13 و IL-4 در شیر مادران دارای شیرخوار مبتلا به درماتیت آتوپیک افزایش می‌یابد و در مقابل، غلظت سایتوکین TNF- $\alpha$  در شیر مادران دو گروه یکسان است. البته، شانس ابتلا به درماتیت آتوپیک، با افزایش ۱۰ واحد در غلظت IFN- $\gamma$  (برحسب pg/mL)، به‌میزان ۴۹٪ افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: درماتیت آتوپیک، تغذیه با شیر مادر، سایتوکین، اینترفرون-گاما، فاکتور نکروز تومور-آلفا، اینترلوکین-۱۳، اینترلوکین-۴، الایزا.

پوستی در شیرخواران می‌باشد، به‌طوری‌که ۴۵٪ از کل موارد بیماری در شش ماه اول زندگی آغاز می‌شوند.<sup>۲</sup> بنا بر مطالعات به‌عمل آمده مشخص شده است که درماتیت آتوپیک با افزایش در شیوع آسم، رینوکونژونکتیویت آلرژیک و گاستروانتریت همراه می‌باشد.<sup>۳</sup> در بین عوامل غیر ژنتیکی برای پیدایش درماتیت آتوپیک، نقش تغذیه نوزاد بیش از سایرین مورد بررسی قرار گرفته است.<sup>۴</sup> به‌دلایل متعدد، تغذیه با شیر مادر به‌عنوان روش برتر تغذیه نوزاد در نظر گرفته می‌شود.

IL-13 و IL-4 در شیر مادر و رابطه آن‌ها با درماتیت آتوپیک در شیرخواران بود. نگارندگان معتقدند که چنانچه در پژوهش حاضر که به قصد ارزیابی سایتوکین‌های التهاب‌زا و ضدالتهابی موجود در شیر مادر به‌عنوان تنها ماده تغذیه‌ای نوزادان (و یا اصلی‌ترین آن‌ها) انجام شده است و با انجام مطالعات مکرر، ثابت شود که به‌هم خوردن توازن الگوی سایتوکین‌های التهابی و ضد التهابی شیر، در بیماری‌های درماتیت آتوپیک نقش برجسته‌ای دارد، آن‌گاه می‌توان شیرهای التهاب‌آفرین را با یک آزمایش ساده ایمونولوژی شناسایی نموده و آن‌ها را از رژیم غذایی کودکان مبتلا به درماتیت حذف نمود.

### روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع توصیفی-تحلیلی و به صورت مورد-شاهدی است که در جمعیت شهری کرمان در بازه زمانی یک‌سال از دی ماه ۱۳۸۹ تا دی ماه ۱۳۹۰ انجام گرفت. نمونه‌های مورد (۵۰ نفر) از شیر مادران دارای شیرخوار مبتلا به درماتیت آتوپیک با محدوده سنی یک تا ۲۴ ماه مراجعه‌کننده به درمانگاه آسم و آلرژی بیمارستان افضل‌پور کرمان و کلینیک بعثت کرمان و بر اساس معیارهای تشخیص بالینی توسط متخصص اطفال و فوق تخصص آسم و آلرژی، وارد مطالعه شدند. هم‌چنین شدت بیماری بر اساس شاخص اسکوراد (Scoring Atopic Dermatitis, SCORAD) تعیین شد. این شاخص بر اساس شدت به چهار گروه تقسیم می‌شود: درجه صفر (۰)، خفیف (<۲۵)، متوسط (۲۵ تا ۵۰) و شدید (>۵۰) و بر طبق معیار قراردادی اسکوراد نمره‌گذاری می‌شود.<sup>۲۰</sup> اما با توجه به پراکندگی داده‌های حاصله، اطلاعات مطالعه حاضر در مورد این شاخص به دو گروه زیر ۲۵ امتیازی و بیش از ۲۵ امتیازی (>۲۵) و >۲۵) طبقه‌بندی گردید. هم‌زمان با آن نمونه‌های کنترل (۵۰ نفر) از شیر مادران دارای شیرخوار غیر مبتلا به درماتیت آتوپیک (یا هرگونه بیماری آلرژیک دیگر) انتخاب شدند. شیرخواران مورد آزمایش، حداقل دو هفته قبل، هیچ‌یک از داروهای آنتی‌هیستامین، استروئیدهای سیستمیک و موضعی را استفاده نمی‌کردند.

با استفاده از یک فرم جمع‌آوری اطلاعات، شیرخواران دو گروه از نظر سن تطابق می‌یافتند. سایر اطلاعات دموگرافیک از جمله رابطه خویشاوندی والدین، سابقه خانوادگی بیماری، جنس شیرخوار و

البته نقش آن در پیش‌گیری از بیماری‌های آلرژیک مورد بحث است.<sup>۵</sup> مطالعات زیادی در زمینه رابطه تغذیه با شیر مادر و درماتیت آتوپیک صورت گرفته است، اما این مطالعات دارای نتایج متناقضی می‌باشند. به‌طوری‌که، برخی از مطالعات مذکور، یک اثر حفاظتی را نشان دادند،<sup>۶</sup> با این وجود، سایرین اثری خنثی<sup>۷</sup> و یا اثرات مضر<sup>۸</sup> را عنوان کردند. شیر انسان حاوی انواعی از سایتوکین‌ها می‌باشد.<sup>۹</sup> این سایتوکین‌ها عموماً از سلول‌های موجود در غدد شیری ترشح می‌شوند.<sup>۱۰</sup> سایتوکین‌ها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در تنظیم عملکردهای مهم سلولی مانند بقا، تکثیر، تمایز و فعالیت نقش دارند.<sup>۱۱</sup> شواهد موجود حاکی از آن است که روند التهاب در بیماری درماتیت آتوپیک، دو مرحله‌ای می‌باشد: در مرحله اولیه بیماری سلول‌های T helper-2 (Th2) غالب هستند که با پیش‌روی بیماری به سمت فاز مزمن به سلول‌های Th0 و Th1 تمایز می‌یابند.<sup>۱۲</sup> به‌گونه‌ای که سایتوکین‌های Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) در ضایعات حاد بیماری غالب هستند و در ضایعات مزمن، سلول‌های Th0، Th1 و سایتوکین‌های IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-5 و Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)<sup>۱۳</sup> افزایش می‌یابند. تعدادی از این سایتوکین‌ها بیش‌تر مورد توجه هستند.

IL-4: این سایتوکین برای تمایز سلول Th2، تولید Immunoglobulin-E (IgE) و فراخوانی ائوزینوفیل ضروری می‌باشد. به‌علاوه در رشد و تمایز لنفوسیت‌ها، بازوفیل، ماستوسیت و غیر فعال کردن ماکروفاژ نقش دارد.<sup>۱۴</sup>

IL-13: این سایتوکین یک مدیاتور مهم التهاب آلرژیک (anti-Th1/pro-Th2) می‌باشد.<sup>۱۵</sup> این سایتوکین در ضایعات هر دو نوع حاد و مزمن درماتیت آتوپیک بیان می‌شود<sup>۱۶</sup> و ممکن است به‌طور مستقیم با القای بیان IL-5 و ارتشاح ائوزینوفیل، عبور از مرحله حاد بیماری به مرحله مزمن را تسهیل کند.<sup>۱۷</sup>

IFN- $\gamma$ : این سایتوکین دارای نقشی مرکزی در بیماری‌های آتوپیک می‌باشد که از طریق مهار تولید IgE توسط IL-4، از تولید بیش از حد این آنتی‌بادی ممانعت می‌کند.<sup>۱۸</sup>

TNF- $\alpha$ : این سایتوکین با القای بیان مقادیر زیاد Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) توسط کراتینوسیت‌ها، در حفظ فنوتیپ Th2 ایفای نقش می‌کند.<sup>۱۹</sup> هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری غلظت سایتوکین‌های TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$

نحوه تغذیه شیرخوار، نیز در دو گروه ثبت گردید و رضایت کلیه مادران مورد آزمایش قبل از ورود به مطالعه اخذ گردید. در نهایت، غلظت سایتوکین‌های التهابی و ضد التهابی موجود در شیر مادر بر اساس تست آزمایشگاهی الایزا و طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

نمونه‌گیری: جمع‌آوری نمونه‌ها به طریقه ساده انجام گرفت. بدین صورت که از بین مراجعه‌کنندگان به مرکز درمانی آلرژی اطفال (و بر اساس معاینه بالینی و معیارهای تشخیصی با نظر متخصص اطفال و فوق تخصص آسم و آلرژی) تعدادی از مادران دارای شیرخوار مبتلا به درماتیت آتوپیک به‌عنوان گروه مورد و تعدادی از مادران دارای شیرخوار غیر مبتلا به درماتیت آتوپیک (یا هرگونه بیماری آلرژیک دیگر) به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شده و سپس نمونه‌های شیر آنان به میزان ۱۰ میلی‌لیتر توسط خود بیمار تحت شرایط آسپتیک (پس از تمیز کردن ناحیه با گاز یا پنبه آغشته به نرمال سالین استریل به‌منظور کاهش بار آلودگی فلور پوست) اخذ گردید و در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری فالتون استریل جمع‌آوری شد. به منظور جدا شدن قسمت چربی‌دار و مایه شیر از یکدیگر، نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از حذف (یا کنار زدن) لایه چربی، مقداری از بخش تحتانی شیر برداشت گردیده و تعدادی مقسوم (الیکوت) از آن در چند لوله اپندورف (میکروتیوب) شفاف تهیه شد. به‌منظور اطمینان بیش‌تر از حذف چربی شیر و عدم تداخل در مرحله سنجش سایتوکین‌ها، لوله‌های مزبور ساتریفوز شدند (پنج دقیقه در ۴۰۰g) و بخش مایه نمونه شیر (محللول آبگون فاقد سوسپانسیون چربی) تا زمان انجام آزمایش در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری گردید. تعداد نمونه‌های مورد نیاز بر اساس مطالعات مشابه (مثلاً ۲۱ نفر در هر گروه<sup>۲۱</sup> یا ۶۳ مورد و ۷۰ شاهد<sup>۲۲</sup> یا ۱۵ مورد و هفت شاهد<sup>۲۳</sup>) تخمین زده شد به این صورت که در مطالعه حاضر با لحاظ نمودن تعداد متغیرهای مورد بررسی و با هدف بالاتر بردن قدرت مطالعه و پیش‌گویی‌های صحیح‌تر، نهایتاً تعداد ۱۰۰ نفر به‌عنوان نمونه (۵۰ مورد و ۵۰ شاهد) انتخاب شدند.

به افراد مورد مطالعه در مورد نحوه انجام کار توضیحات کافی داده شد. پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق تایید شد و رضایت کلیه مادران مورد آزمایش قبل از ورود به مطالعه اخذ گردید. بیماران برای ورود به مطالعه کاملاً آزاد بودند و کلیه اطلاعات افزوده در فرم

جمع‌آوری اطلاعات محرمانه ماند.

سنجش سایتوکین‌ها با تکنیک الایزا: پس از آماده‌سازی نمونه‌های شیر در دو گروه، غلظت هر چهار سایتوکین بر اساس تست آزمایشگاهی الایزا و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (U-CyTech, The Netherlands) اندازه‌گیری شد. تکنیک الایزا از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با آنزیم<sup>۲۴</sup> به منظور شناسایی آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌کند. به‌طور مختصر، برای آسترکشی (کوت کردن) ۹۶ چاهک پلیت الایزا (Microtiter plate)، مقدار ۵۰ $\mu\text{l}$  از محللول غلیظ آنتی‌بادی ضد سایتوکین مورد نظر به پنج میلی‌لیتر Phosphate Buffered Saline, pH (PBS) 7.4 اضافه گردید (با رقت نهایی ۱:۱۰۰) و به آرامی مخلوط شد. سپس ۵۰ $\mu\text{l}$  از این محللول آماده شده به هر چاهک اضافه شد و با ۵۰ $\mu\text{l}$  دیگر از بافر فسفات سالین (PBS) پر شد. در نهایت، پلیت به مدت یک تا دو ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. پس از هفت بار شستشوی چاهک‌ها با ۲۰% Tween ۰/۰۵ containing PBS (PBST)، مقدار ۲۰۰ $\mu\text{l}$  از بافر بلوک‌کننده Bovine serum albumin (BSA) ۱% containing PBS اضافه گردید. سپس، پلیت به مدت یک ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. پس از تخلیه بافر بلوک‌کننده (بدون نیاز به شستشوی بعدی)، ۱۰۰ $\mu\text{l}$  از نمونه‌های استاندارد و تست به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت دو ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید (ویال محتوی استاندارد سایتوکین لیوفیلیزه در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. سپس استاندارد غلیظ سایتوکین تهیه شده به‌عنوان محللول استوک - روی یخ در حال ذوب نگهداری شده و بلافاصله با مقادیر متفاوتی از BSA ۰/۵% - PBST-B) برای هر سایتوکین رقیق شد به نحوی که بالاترین و پایین‌ترین غلظت مورد نیاز سایتوکین، در محدوده استاندارد مورد استفاده در کیت الایزا قرار گرفت). پس از هفت بار شستشوی چاهک‌ها با بافر شستشو، ۱۰۰ $\mu\text{l}$  از الیکوت فریز شده محتوی محللول آنتی‌بادی ثانویه (بیوتینیل) رقیق شده (آنتی‌بادی‌های بیوتینیل لیوفیلیزه با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به ویال حاوی پودر آنتی‌بادی آماده می‌گردد) برداشته و به ۱۰ میلی‌لیتر PBST-B اضافه شد (رقت ۱:۱۰۰). پس از این‌که محللول آماده شده به آرامی مخلوط گردید، ۱۰۰ $\mu\text{l}$  از این محللول به هر چاهک افزوده شد. سپس پلیت به مدت یک ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. پس از هفت بار شستشوی چاهک‌ها با بافر شستشو، ۱۰۰ $\mu\text{l}$  از الیکوت فریز شده محتوی محللول HRP conjugated

مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۸ انجام شد. در تمام موارد،  $P \leq 0/05$ ، مبنای معنی‌دار بودن اختلاف‌ها قرار گرفت.

## یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک به‌دست آمده از افراد مطالعه حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه محدوده سنی شیرخواران از یک تا ۲۴ ماه بود و  $58/2\%$  آن‌ها بین یک تا هشت ماه بودند ( $N=98$ ). همچنین، ارتباط بین رابطه خویشاوندی والدین، سابقه خانوادگی بیماری، جنس شیرخوار و نحوه تغذیه شیرخوار با احتمال ابتلا به درماتیت آتوپیک بررسی شد و نتایج حاصل با گروه شاهد مقایسه گردید. آنالیز داده‌ها نشان داد که فراوانی و درصد شیرخواران دارای سابقه خانوادگی درماتیت آتوپیک و شیرخواران پسر در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد است و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (به ترتیب  $P=0/001$  و  $P=0/003$ ). در مقابل، در متغیرهای رابطه خویشاوندی والدین و نحوه تغذیه شیرخوار در زمان نمونه‌برداری و در زیر سن شش ماهگی، اختلاف معنی‌داری در فراوانی و درصد بین دو گروه مشاهده نشد (به ترتیب  $P=0/16$ ،  $P=0/79$  و  $P=0/41$ ). همچنین شدت بالینی درماتیت آتوپیک (اندازه‌گیری بر اساس شاخص SCORAD) در نمونه‌های شیر مورد ارزیابی قرار گرفت، به طوری که شدت بیماری در  $31(62/0\%)$  شیرخواران خفیف (شاخص اسکوراد کم‌تر از ۲۵) بود و  $19(38/0\%)$  آن‌ها از بیماری با شدت متوسط و شدید رنج می‌بردند (شاخص اسکوراد بیش‌تر از ۲۵).

تعیین غلظت و مقایسه سایتوکین‌های التهابی و ضدالتهابی بین دو گروه: غلظت سایتوکین‌های التهابی  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  و ضدالتهابی  $IL-4$  و  $IL-13$  (anti-Th1 / pro-Th2) با استفاده از تکنیک الایزا اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل با گروه‌های شاهد مقایسه گردید (جدول ۲).

اختلاف معنی‌داری در غلظت  $IFN-\gamma$  و  $IL-13$  بین دو گروه مشاهده شد (به ترتیب  $P=0/04$  و  $P=0/02$ ). میانگین غلظت هر دو سایتوکین مذکور در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت (به ترتیب  $Mean \pm SD$   $41/96 \pm 17/37$  و  $5/85 \pm 3/72$  در گروه مورد و  $35/35 \pm 14/16$  و  $4/38 \pm 2/37$  در گروه شاهد)، در حالی که

streptavidin (SPP conjugate) رقیق شده (پودر لیوفیلیزه با افزودن  $0/5$  میلی‌لیتر آب مقطر استریل به ویال آماده گردید) برداشته و به  $10$  میلی‌لیتر PBST-B اضافه شد (رقت  $1:100$ ). پس از مخلوط کردن آرام محلول آماده شده،  $100 \mu l$  از این محلول به هر چاهک افزوده شد. سپس، پلیت به مدت یک ساعت در  $37^\circ C$  انکوبه شد. پس از هفت بار شستشوی چاهک‌ها با بافر شستشو،  $100 \mu l$  از محلول سوبسترا {ابتدا یک قرص تترامتیل بنزیدین (Tetramethylbenzidine, TMB) در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) حل شد. سپس، به منظور تهیه محلول سوبسترا،  $10$  میلی‌لیتر بافر سوبسترا اضافه گردید و کاملاً مخلوط شد} به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت  $30$  دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت. در نهایت، واکنش با افزودن  $50 \mu l$  اسید سولفوریک ( $H_2SO_4$ )  $2$  مولار متوقف گردید و محلول زرد رنگ ایجاد شده توسط یک دستگاه الایزا خوان {ELX800 ELISA Reader, Biotek, U.S.} در طول موج  $450$  نانومتر (و طول موج مرجع  $630$  نانومتر) با مقایسه شدت نور (یا Optical Density, OD) تست با استاندارد خوانده شد. غلظت هر سایتوکین در نمونه شیر بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر ( $pg/mL$ ) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این پژوهش، از روش‌های آماری توصیفی و استنباطی بهره گرفته شد. از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها و نیز تنظیم جداول و نمودارهای فراوانی استفاده شد. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت تک متغیره و چند متغیره انجام گرفت. در آزمون آماری تک متغیره از آزمون Unpaired t-test و یا Mann-Whitney U-test در مورد متغیرهای چوله‌دار (دارای توزیع غیر نرمال) برای تعیین هر گونه اختلاف معنی‌دار در میانگین غلظت سایتوکین‌ها بین دو گروه مورد و شاهد استفاده گردید.

همچنین برای تعیین هر گونه اختلاف معنی‌دار در میانگین غلظت سایتوکین‌ها بین دو گروه شاخص SCORAD، از این آزمون استفاده گردید. در روش چند متغیره و بررسی ارتباط مستقل هر یک از متغیرها با غلظت سایتوکین‌ها از روش رگرسیون لجستیک بهره گرفته شد.

به این منظور متغیرهایی که  $P > 0/25$  داشتند یا در آزمون تک متغیره معنی‌دار شده بودند، در مدل آماری لجستیک وارد شدند. در ابتدا هر متغیر به صورت جداگانه و سپس همه متغیرها در کنار هم

جدول ۱: توزیع فراوانی اطلاعات دموگرافیک شیرخواران دو گروه

متغیر	گروه مورد	گروه شاهد	P*
سن (ماه)	تطابق یافته	تطابق یافته	
۱-۸			
۹-۱۶			
۱۷-۲۴			
رابطه خویشاوندی والدین			
خیر	۳۴(۰/۶۸)	۲۶(۰/۵۲)	۰/۱۶
بلی	۱۶(۰/۳۲)	۲۲(۰/۴۵)	
مجموع	۵۰(۱/۰۰)	۴۸(۱/۰۰)	
سابقه خانوادگی بیماری			
خیر	۱۷(۰/۳۴)	۳۲(۰/۶۶)	۰/۰۰۱**
بلی	۳۳(۰/۶۶)	۱۶(۰/۳۳)	
مجموع	۵۰(۱/۰۰)	۴۸(۱/۰۰)	
جنس شیرخوار			
پسر	۳۴(۰/۶۸)	۲۲(۰/۴۵)	۰/۰۳**
دختر	۱۶(۰/۳۲)	۲۶(۰/۵۲)	
مجموع	۵۰(۱/۰۰)	۴۸(۱/۰۰)	
نحوه تغذیه شیرخوار در زمان نمونه برداری			
انحصاری با شیر مادر	۲۲(۰/۴۴)	۱۸(۰/۳۷)	۰/۷۹
شیر مادر توام با شیر خشک	۶(۰/۱۲)	۷(۰/۱۴)	
شیر مادر و غذای کمکی	۲۲(۰/۴۴)	۲۳(۰/۴۷)	
مجموع	۵۰(۱/۰۰)	۴۸(۱/۰۰)	
نحوه تغذیه شیرخوار در کم تر از سن شش ماهگی			
انحصاری با شیر مادر	۴۰(۰/۸۰)	۳۵(۰/۷۲)	۰/۴۱
شیر مادر توام با شیر خشک	۱۰(۰/۲۰)	۱۳(۰/۲۷)	
مجموع	۵۰(۱/۰۰)	۴۸(۱/۰۰)	
شاخص SCORAD			
<۲۵	۳۱(۰/۶۲)	-	
>۲۵	۱۹(۰/۳۸)		
مجموع	۵۰(۱/۰۰)		

\* مقایسه‌ها بر اساس آزمون آماری  $\chi^2$  انجام شد و در تمام موارد،  $P \leq 0/05$ ، مبنای معنی‌دار بودن اختلاف‌ها قرار گرفت. \*\* از نظر آماری معنی‌دار هستند.

جدول ۲: تعیین غلظت (pg/mL) سایتوکین التهابی  $IFN-\gamma$  و ضد التهابی  $IL-13$  بین دو گروه مورد و شاهد و مقایسه آنها

متغیر	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	P*
$IFN-\gamma$	۴۱/۹۶	۱۷/۳۷	۳۵/۳۵	۱۴/۱۶	۰/۰۴
$IL-13$	۵/۸۵	۳/۷۲	۴/۳۸	۲/۳۷	۰/۰۲

\* مقایسه‌ها بر اساس آزمون آماری Unpaired t-test انجام شد و در تمام موارد،  $P \leq 0/05$ ، مبنای معنی‌دار بودن اختلاف‌ها قرار گرفت. هر دو متغیر از نظر آماری معنی‌دار هستند.

جدول ۳: تعیین غلظت (pg/mL) سایتوکین التهابی IFN- $\gamma$  و دو سایتوکین ضد التهابی بین دو گروه زیر ۲۵ امتیازی و بیش از ۲۵ امتیازی و مقایسه آن‌ها

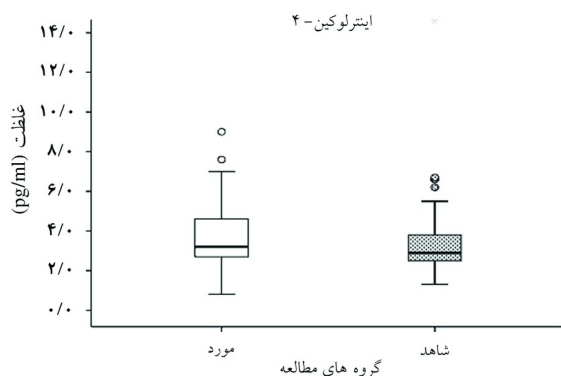
متغیر	SCORAD < ۲۵		SCORAD > ۲۵		P*
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
IFN- $\gamma$	۴۴/۳۸	۱۸/۴۴	۳۸/۲۶	۱۵/۳۵	۰/۲۴
IL-13	۶/۴۵	۴/۱۶	۴/۹۲	۲/۷۴	۰/۱۶
IL-4	۴/۰	۱/۸۶	۳/۳۱	۰/۹۰	۰/۱۵

\* مقایسه‌ها بر اساس آزمون آماری Unpaired t-test انجام شد و در تمام موارد،  $P \leq 0.05$ ، مبنای معنی‌دار بودن اختلاف‌ها قرار گرفت. هیچ یک از متغیرها از نظر آماری معنی‌دار نیستند.

جدول ۴: تعیین ارتباط بین غلظت سایتوکین‌های دو گروه و دیگر متغیرهای مورد بررسی با درماتیت آتوپیک

متغیر	تک متغیره			چند متغیره		
	OR	CI	P	OR	CI	P
غلظت IFN- $\gamma$ * در شیر	۱/۳۰۹**	۱/۰۰۴-۱/۷۰۵	۰/۰۵**	۱/۴۸۶**	۱/۰۵۰-۲/۱۰۳	۰/۰۲**
غلظت IL-13 در شیر	۱/۱۷۱**	۱/۰۲۰-۱/۳۴۵	۰/۰۲**	۱/۱۷۲	۰/۹۷۴-۱/۴۱۰	۰/۰۹
غلظت IL-4 در شیر	۱/۰۶۲	۰/۸۵۱-۱/۳۲۶	۰/۵۹	۰/۹۷۷	۰/۷۵۲-۱/۲۷۰	۰/۸۶
رابطه خویشاوندی والدین	۰/۵۵۶	۰/۲۴۴-۱/۲۶۵	۰/۱۶	۰/۷۰۴	۰/۲۵۷-۱/۹۳۲	۰/۵۰
سابقه خانوادگی بیماری	۳/۸۸۲**	۱/۶۷۹-۸/۹۷۶	۰/۰۰۲**	۶/۲۸۰**	۲/۲۳۴-۱۷/۶۵۳	< ۰/۰۰۱**
جنس شیرخوار	۰/۳۹۸**	۰/۱۷۵-۰/۹۰۶	۰/۰۰۳**	۰/۲۲۴**	۰/۰۷۵-۰/۶۶۵	۰/۰۰۷**

\* با توجه به مقادیر پایین OR (نسبت شانس) در داده‌های حاصله، محاسبه این سایتوکین بر حسب ۱۰ واحد افزایش، صورت گرفته است. \*\* از نظر آماری معنی‌دار هستند. برای تطبیق هر یک از متغیرها در حضور هم از آزمون آماری Logistic regression استفاده گردید و نتایج به‌صورت Odds Ratio (OR) و Confidence Interval (CI) ارائه شد.



در مورد غلظت TNF- $\alpha$  و IL-4 اختلاف معنی‌داری در گروه مورد در مقایسه با گروه‌های شاهد مشاهده نشد (به ترتیب  $P=0.38$  و  $P=0.16$ ). هر چند به‌طور ظاهری افزایش اندکی در غلظت IL-4 (البته به‌صورت غیر معنی‌دار) در شیرخواران آلرژیک در مقایسه با گروه شاهد دیده شد (نمودار ۱).

طبقه‌بندی بالینی بیماری بر اساس نمره‌گذاری: ارتباط سایتوکین‌های التهابی IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  و ضد التهابی (anti-Th1 / pro-IL-4 و IL-13 Th2) با شدت درماتیت آتوپیک بررسی شد. هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در غلظت این سایتوکین‌ها در گروه زیر ۲۵ امتیازی در مقایسه با گروه بیش از ۲۵ امتیازی مشاهده نشد (به ترتیب برای سایتوکین‌های IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$ ،  $P=0.24$  و  $P=0.54$  و برای سایتوکین‌های IL-4 و IL-13،  $P=0.16$  و  $P=0.15$ ). با این وجود، غلظت سایتوکین التهابی IFN- $\gamma$  و دو سایتوکین ضد التهابی، در

نمودار ۱: تعیین غلظت سایتوکین ضد التهابی IL-4 بین دو گروه مورد و شاهد و مقایسه آن دو. به‌دلیل توزیع غیر نرمال این سایتوکین در هر دو گروه، رسم شده است، بارها (از پایین به بالا) نشان دهنده مقادیر Min (حداقل)، Q1 (چارک اول یا ۲۵٪)، Q2 (چارک دوم یا ۵۰٪ یا میانه)، Q3 (چارک سوم یا ۷۵٪) و Max (حداکثر) می‌باشند. مقادیر کم‌تر از حداقل و بیش‌تر از حداکثر به‌صورت دایره رسم شده است. مقایسه‌ها بر اساس تست ناپارامتری Mann-Whitney U-test انجام گرفت.  $P > 0.05$  بود.

## بحث

درماتیت آتوپیک یکی از رایج‌ترین اختلالات پوستی در کودکان با شیوع ۱۰ تا ۲۰ درصد در دهه اول زندگی می‌باشد.<sup>۶</sup> در مطالعه‌ای مشابه، شیوع این بیماری به میزان ۸٪ در کودکان زیر دو سال و به میزان ۶/۲٪ در کودکان با رنج سنی دو تا ۱۱ سال گزارش شد.<sup>۲۵</sup> در مطالعه حاضر، نمونه‌های دو گروه از نظر سن شیرخوار، تطابق یافتند و طیف سنی شیرخواران در دو گروه مورد مطالعه بین یک تا ۲۴ ماه قرار گرفت. از طرفی، بیش‌تر شیرخواران در محدوده سنی یک تا هشت ماه بودند که در سایر پژوهش‌ها نیز همین محدوده سنی را شامل می‌شده است، چرا که شروع بیماری اغلب در شش ماه اول زندگی می‌باشد.<sup>۲۶</sup> دیگر خصوصیات دموگرافیک که در شیرخواران دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفتند، عبارتند از: رابطه خویشاوندی والدین، سابقه خانوادگی بیماری، جنس شیرخوار، نحوه تغذیه شیرخوار (در زمان نمونه‌برداری و در زیر سن شش ماهگی) و شاخص SCORAD.

درماتیت آتوپیک یک بیماری چندعاملی می‌باشد که ناشی از میان‌کنش ژن با محیط است. در مطالعه حاضر، در بین عوامل ژنتیکی، رابطه خویشاوندی والدین (هم‌خونی) و سابقه خانوادگی بیماری (تاریخچه مثبت در بستگان بیمار) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج پژوهش حاضر گویای آن است که سابقه خانوادگی بیماری بیش‌ترین تاثیر را بر درماتیت آتوپیک داشت. پیش از این نیز، مشخص شده است که درماتیت آتوپیک تحت تاثیر سابقه خانوادگی قرار می‌گیرد.<sup>۲۷</sup> در این مطالعه، با استفاده از آزمون  $\chi^2$ ، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در رابطه خویشاوندی والدین بین دو گروه دیده نشد. در واقع دو گروه از این نظر شبیه هم بودند. نظر به این‌که در مورد ارتباط بین رابطه خویشاوندی والدین و درماتیت آتوپیک تاکنون پژوهش متقنی انجام نشده است، جای آن دارد که محققین با دامنه نمونه وسیع‌تر در این زمینه به مطالعه بپردازند. با این وجود، بر اساس نتایج این مطالعه، احتمالاً در بین عوامل ژنتیکی، سابقه خانوادگی بیماری، نقش مهم‌تری در مقایسه با رابطه خویشاوندی والدین ایفا می‌کند. در کار فعلی، بیش‌تر شیرخواران مبتلا به درماتیت آتوپیک، پسر بودند. در مقابل، در مطالعه‌ای دیگر، به فراوانی اندکی بیش‌تر بیماری در دختران در مقایسه با پسران، اشاره گردید.<sup>۲۸</sup> بدین ترتیب با توجه به نتایج مطالعه

شیرخواران مبتلا به نوع خفیف بیماری (به ترتیب میانگین‌های ۴۴/۳۸، ۶/۴۵ و ۴/۰) در مقایسه با شیرخواران دارای انواع متوسط و شدید بیماری (به ترتیب میانگین‌های ۳۸/۲۶، ۴/۹۲ و ۳/۳۱)، افزایش غیر معنی‌داری داشت (جدول ۳). سایتوکین‌های هر دو گروه با شاخص شدت رابطه معکوسی داشتند که چندان قوی نبود (به ترتیب برای سایتوکین‌های IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$ ،  $r = -0/17$  و  $r = -0/09$  و برای سایتوکین‌های IL-13 و IL-4،  $r = -0/20$  و  $r = -0/21$ ). در نهایت، برای این‌که اثر هر یک از متغیرها در حضور هم تطبیق داده شود به‌طور هم‌زمان اثر غلظت این چهار سایتوکین و متغیرهای توصیفی در دو گروه با استفاده از رگرسیون لجستیک (Logistic regression) مقایسه شده و نتایج به‌صورت نسبت شانس (Odds Ratio, OR) و فاصله اطمینان (Confidence Interval, CI) ارایه شد (جدول ۴). در آزمون رگرسیون لجستیک تک متغیره غلظت سایتوکین‌های IFN- $\gamma$  و IL-13 بین دو گروه دارای اختلاف معنی‌دار بود (به ترتیب  $P = 0/05$  و  $P = 0/02$ ). در حالی‌که در آزمون چند متغیره تنها غلظت IFN- $\gamma$  از نظر آماری معنی‌دار شد ( $P = 0/02$ ).

احتمالاً این مسئله ناشی از نقش برجسته‌تر سایتوکین التهابی IFN- $\gamma$  در درماتیت آتوپیک می‌باشد. هم‌چنین بررسی OR و CI نشان داد که به ازای ۱۰ واحد افزایش در شیر مصرفی در IFN- $\gamma$ ، شانس ابتلا به بیماری ۴۹٪ افزایش یافته است. در مورد متغیرهای توصیفی نیز سابقه خانوادگی بیماری (وجود سابقه خانوادگی به فقدان آن) و جنس شیرخوار (دختر به پسر) در هر دو آزمون تک متغیره و چند متغیره اختلاف معنی‌دار داشتند (به ترتیب  $P < 0/01$  و  $P = 0/07$ ) که بیان‌گر نقش مستقل این دو متغیر می‌باشد.

در واقع، در شیرخواران دارای سابقه خانوادگی درماتیت آتوپیک در مقایسه با گروه فاقد سابقه خانوادگی بیماری، شانس ابتلا به بیماری، ۶/۲۸ بار بیش‌تر است.

هم‌چنین در شیرخواران دختر در مقایسه با شیرخواران پسر، شانس ابتلا به بیماری، ۷۸٪ کاهش می‌یابد. از طرفی با توجه به این‌که غلظت IL-13 در آزمون چند متغیره بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت، برای اطمینان از اعتبار نتایج رابطه بین این سایتوکین با دو سایتوکین دیگر سنجیده شد. هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین IL-13 و IFN- $\gamma$  دیده نشد ( $P = 0/79$ )، اما بین IL-13 و IL-4 رابطه معنی‌دار معکوسی مشاهده شد که چندان قوی نبود ( $r = -0/198$ ).

می‌شوند.<sup>۱۱</sup> شواهد موجود حاکی از آن است که در این بیماری، التهاب به صورت دو مرحله‌ای بروز می‌یابد. در مرحله اولیه و ضایعات حاد بیماری سایتوکین‌های Th2 (IL-4، IL-5، IL-13) غالب هستند که با پیش‌روی بیماری به سمت فاز مزمن، افزایش در سلول‌های Th0 و Th1 و سایتوکین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-12، IL-5 و GM-CSF دیده می‌شود.<sup>۱۳</sup> در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری در غلظت IFN- $\gamma$  و IL-13 بین دو گروه مشاهده شد (به ترتیب  $P=0/04$  و  $P=0/02$ ). میانگین غلظت هر دو سایتوکین مذکور در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت (به ترتیب (Mean $\pm$ SD)  $41/96 \pm 17/37$  و  $5/85 \pm 3/72$  در گروه مورد و  $35/35 \pm 14/16$  و  $4/38 \pm 2/37$  در گروه شاهد). غلظت بالای IFN- $\gamma$ ، در ضایعات درمانیت آتوپیک مزمن دیده می‌شود. بنابر تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که این سایتوکین، در فعال کردن ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال نقش مهمی ایفا می‌کند.<sup>۳۰</sup> بنابراین، با توجه به عملکردهای گفته شده برای این سایتوکین و ماهیت التهابی درمانیت، نقش التهابی IFN- $\gamma$  در این بیماری برجسته می‌باشد. در توافق با نتایج ما در مطالعه‌ای توسط Grewe، با بررسی بیوپسی از ضایعات بیماراران مبتلا به درمانیت آتوپیک، به نقش کلیدی IFN- $\gamma$  در پاتوژنز این بیماری پی برده شد.<sup>۳۱</sup> در مقابل، در مطالعه‌ای دیگر توسط Tang با استفاده از تکنیک الایزا مشاهده شد که نوزادانی با علائم بیماری آتوپیک یا تست پوستی مثبت در یک‌سالگی نسبت به نوزادان سالم به‌طور قابل توجهی غلظت پایین‌تری از IFN- $\gamma$  را در زمان تولد تولید می‌کنند.<sup>۳۲</sup> در موافقت با نتایج ما، پیش از این گزارش شده است که غلظت بالای IL-13 در پیش‌گویی پیشرفت بعدی آتوپیی مفید می‌باشد.<sup>۳۳</sup> زیرا این سایتوکین، یک میانجی‌گر مهم در شبکه التهابی است.<sup>۳۴</sup> بنابر گزارشی، پلی‌مورفیسم ژنی در IL-13، با غلظت بالای IGE توتال سرم و خطر افزایش یافته ابتلا به درمانیت آتوپیک ارتباط دارد.<sup>۳۵</sup> Akdis میزان بیش‌تر mRNA بیان‌کننده IL-13 و IL-5 (اما نه برای IL-4) را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) بیماراران مبتلا به درمانیت آتوپیک در مقایسه با افراد سالم نشان داد.<sup>۳۶</sup> در مورد غلظت TNF- $\alpha$  اختلاف معنی‌داری در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد ( $P=0/38$ ). مشخص شده است که TNF- $\alpha$ ، رابط بین پاسخ‌های Th1 و Th2 می‌باشد.<sup>۳۷</sup> البته این سایتوکین (به‌عنوان یک سایتوکین التهاب‌زای

حاضر و برآیند سایر مطالعات انجام شده در این زمینه، احتمالاً جنسیت، نقش مهمی در درمانیت آتوپیک ایفا نمی‌کند. شدت بالینی درمانیت آتوپیک (اندازه‌گیری شده بر اساس شاخص SCORAD کم‌تر و بیش‌تر از ۲۵) در نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت، بیش از نیمی از شیرخواران مبتلا به نوع خفیف بیماری بودند.

در بین عوامل غیر ژنتیکی (محیطی) برای پیدایش درمانیت آتوپیک، نقش تغذیه نوزاد مورد بررسی قرار گرفته است.<sup>۴</sup> تاثیر شیر مادر (به‌عنوان روش برتر تغذیه نوزاد) در بروز بیماری آلرژی و نقش اختصاصی آن در پیش‌گیری از آلرژی هم‌چنان مورد بحث و بررسی می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در اثر نحوه تغذیه شیرخوار بین دو گروه دیده نشد. از طرفی در مطالعات مختلف در این زمینه، نتایج متناقضی گرفته شده است، به‌طوری‌که برخی از مطالعات مذکور، یک اثر حفاظتی را نشان دادند: کمیته تغذیه و انجمن آلرژی و ایمونولوژی کودکان آمریکا عنوان کرد که برای شیرخواران مستعد به درمانیت آتوپیک استفاده از شیر مادر حداقل برای چهار ماه (در مقایسه با شیر گاو) وقوع درمانیت آتوپیک را در دو سال اول زندگی کاهش می‌دهد.<sup>۶</sup> برخی از مطالعات اثری خنثی را نشان داده‌اند: طبق بررسی‌های *Mihrshahi*، تغذیه طولانی‌مدت با شیر مادر، در پیش‌گیری از شروع آسم، اگرما یا آتوپیی تا پنج سالگی نقشی ندارد.<sup>۷</sup> برخی دیگر نیز اثرات مضر را عنوان کردند: *Pesonen* در مطالعه‌ای آینده‌نگر پی برد که تغذیه انحصاری با شیر مادر به مدت ۹ ماه یا بیش‌تر در تشدید علائم درمانیت آتوپیک و آلرژی غذایی در کودکان نقش دارد.<sup>۸</sup> از جمله دلایل تناقض در مطالعات مذکور عبارتند از: تفاوت در روش مطالعه یا بی‌توجهی به برخی عوامل در مطالعات انجام گرفته مانند پیچیدگی ایمونولوژیک شیر مادر و احتمالاً تفاوت‌های ژنتیکی بین بیماراران.<sup>۵</sup> بنابراین به سادگی نمی‌توان به تاثیر یا عدم تاثیر قطعی تغذیه با شیر مادر بر درمانیت آتوپیک پی برد و نیاز به مطالعات بیش‌تری در این زمینه با رفع نقایص موجود می‌باشد.

در این مطالعه، غلظت سایتوکین‌های التهابی IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  ضد التهابی (Anti-Th1 / pro-Th2) IL-13 و IL-4 در شیر مادر تعیین شد و ارتباط آن‌ها با افزایش یا کاهش خطر ابتلا به درمانیت آتوپیک در شیرخواران مورد ارزیابی قرار گرفت. شیر انسان حاوی انواعی از سایتوکین‌ها می‌باشد.<sup>۹</sup> این سایتوکین‌ها از سلول‌های غدد شیری ترشح



یا بازدارندگی التهاب را در مورد سایر سایتوکین‌ها (غیر از چهار سایتوکین پژوهش ما) مورد بررسی قرار بدهند.

در این مطالعه، هم‌چنین، به بررسی رابطه غلظت سایتوکین‌های التهابی و ضد التهابی در شیر مادر با شدت درماتیت آتوپیک در شیرخواران بیمار پرداخته شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در غلظت سایتوکین‌های التهابی  $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$  بین دو گروه (بر اساس شاخص SCORAD کم‌تر و بیش‌تر از ۲۵) مشاهده نشد (به ترتیب  $P=0/24$  و  $P=0/53$ ). اما در  $IFN-\gamma$  میانگین غلظت در شیرخواران مبتلا به نوع خفیف بیماری افزایش داشت (به ترتیب  $Mean=44/38$  و  $Mean=38/26$  در شیرخواران مبتلا به نوع خفیف بیماری و شیرخواران دارای انواع متوسط و شدید بیماری). هم‌چنین این سایتوکین‌ها با شاخص شدت رابطه معکوسی داشتند که چندان قوی نبود. در تناقض با مشاهدات ما، Grewe به رابطه مثبتی بین سلول‌های  $TCD4+$  مولد  $IFN-\gamma$  در بیوپسی پوست با شدت ضایعات پوستی درماتیت آتوپیک اشاره کرد.<sup>۳۱</sup>

در مطالعه‌ای دیگر، تعداد سلول‌های  $TCD4+$  اختصاصی آلرژن مولد  $TNF-\alpha$  در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به نوع شدید درماتیت در مقایسه با افراد مبتلا به نوع خفیف بیماری و افراد سالم افزایش معنی‌داری داشت.<sup>۳۲</sup> هم‌چنین، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در غلظت سایتوکین‌های ضدالتهابی  $IL-4$  و  $IL-13$  بین دو گروه (بر اساس شاخص SCORAD کم‌تر و بیش‌تر از ۲۵) مشاهده نشد (به ترتیب  $P=0/16$  و  $P=0/15$ ). با این وجود در این متغیرها، میانگین غلظت در شیرخواران دارای نوع خفیف بیماری افزایش داشت. (به ترتیب  $Mean=6/45$  و  $Mean=4/0$  در شیرخواران مبتلا به نوع خفیف بیماری و  $Mean=4/92$  و  $Mean=3/31$  در شیرخواران دارای انواع متوسط و شدید بیماری). این سایتوکین‌ها نیز با شاخص شدت رابطه معکوسی داشتند که چندان قوی نبود. بر خلاف نتایج ما، La Grutta به یک رابطه قوی بین تعداد سلول‌های  $CD4+$  مولد  $IL-13$  در خون محیطی کودکان مبتلا به درماتیت آتوپیک و شدت بیماری پی برد.<sup>۳۳</sup> جستجوی منابع موجود نشان می‌دهد که در مورد ارتباط غلظت  $IL-4$  در شیر مادران دارای شیرخوار مبتلا به درماتیت آتوپیک و شدت درماتیت تاکنون پژوهشی انجام نشده است.

در نهایت، بررسی‌های صورت گرفته در مورد ارتباط مستقل هر یک از متغیرها با غلظت سایتوکین‌ها بر اساس مدل آماری رگرسیون

اولیه) در درماتیت آتوپیک، در القای تولید مواد جاذب شیمیایی و مولکول‌های چسبان از جمله مولکول چسبندگی بین سلولی-۱ (Intercellular Adhesion molecule-1, ICAM-1)، تحریک فراخوانی، تکثیر و بقای لکوسیت‌ها در نواحی جلدی نقش دارد.<sup>۳۸</sup> هر چند ما تفاوتی در غلظت  $TNF-\alpha$  بین دو گروه مشاهده نکردیم. بنابر گزارشی توسط Dunstan غلظت کم‌تر این سایتوکین در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی کودکان مبتلا به درماتیت آتوپیک در مقایسه با گروه سالم مشاهده شد.<sup>۳۹</sup> در مقابل، سایر پژوهش‌های بالینی، مهار این سایتوکین را در افراد مبتلا به درماتیت آتوپیک مطرح می‌کنند.<sup>۴۰</sup> جستجوی منابع موجود نشان می‌دهد که در مورد ارتباط درماتیت آتوپیک و حضور این سایتوکین در شیر مادر تاکنون پژوهشی انجام نشده است.

به نظر می‌رسد با حجم نمونه بیش‌تر، می‌توان با قطعیت بیش‌تری در مورد این سایتوکین نظر داد. در مورد غلظت  $IL-4$  نیز، اختلاف معنی‌داری در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد ( $P=0/16$ ). هر چند به‌طور ظاهری افزایش اندکی در غلظت این سایتوکین (البته به‌صورت غیر معنی‌دار) در شیرخواران آلرژیک در مقایسه با گروه شاهد دیده شد.  $IL-4$  با همکاری  $IL-13$  به‌واسطه زنجیره گیرنده مشترک و مسیرهای انتقال سیگنال، در غیر فعال‌سازی ماکروفاژها نقش دارد.<sup>۴۱</sup>

این دو سایتوکین در فعالیت سلول‌های B، تمایز به پلاسماوسیت و تولید Ige نقش دارند.<sup>۴۲</sup> هم‌چنین،  $IL-4$  و  $IL-13$  با القای تولید کموکاین‌های فراخوان‌کننده سلول‌های  $Th2$ ، در حفظ التهاب ناشی از این سلول‌ها نقش دارند.<sup>۳۰</sup> بر اساس مطالعه Prokešová که تا حدی مشابه با نتایج ما بوده است، غلظت  $IL-4$  در کلسترول مادران آلرژیک به‌صورت غیر معنی‌دار در مقایسه با مادران سالم افزایش داشت.<sup>۴۱</sup> بر اساس نتایج پژوهش حاضر و سایر مطالعات می‌توان عنوان کرد که احتمالاً حضور  $IFN-\gamma$  و  $IL-13$  در شیر مادران، نقش مهمی در پیدایش و بیماری‌زایی درماتیت آتوپیک ایفا می‌کنند. از طرفی، به‌تازگی بنابر نتایج مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که سایتوکین‌های  $Th2$  ( $IL-13$ )، زمینه را برای پیشرفت بیماری و به‌دنبال آن، ایجاد سایتوکین‌های  $Th1$  ( $IFN-\gamma$ )، در درماتیت آتوپیک و گذر از فاز حاد به مزمن بیماری فراهم می‌کنند<sup>۳۳</sup> که خود تاییدی بر دستاوردهای مطالعه ما است. البته لازم است محققین دیگری اثرات تشدیدکنندگی

موجود در شیر مادر با درمانیت آتوپیک تاکنون. ۲- با پرهیز دادن کودکان از خوردن شیر مادر حاوی سایتوکین‌های التهابی، چه بسا بتوان به بهبود بیماری و کاهش علائم درمانیت آتوپیک کمک کرد و در مورد سایر شیرخواران نیز مانع قطع مصرف شیر مادر شد تا بدون دلیل از این منبع مهم غذایی و ایمنولوژیک محروم نگردند. ۳- با لحاظ نمودن ارتباط بین این سایتوکین‌ها با درمانیت آتوپیک، یک مدل آماری ارائه گردید که بر طبق آن می‌توانیم احتمال ایجاد بیماری درمانیت آتوپیک را بر اساس آزمایش سایتوکین‌های شیر مادر تعیین کنیم.

**سپاسگزاری:** این مقاله حاصل بخشی از یک پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی پزشکی تحت عنوان "بررسی غلظت و منشا ترشح سایتوکین‌های التهابی  $TNF-\alpha$  و  $IFN-\gamma$  و ضدالتهابی IL-13 و IL-4 در شیر مادر و ارتباط آن‌ها با درمانیت آتوپیک در شیرخواران سنین زیر ۲۴ ماه" به راهنمایی دکتر محمدمهدی محمدی در سال ۱۳۹۱ (دفاع‌شده با کد ۴/۹۱) می‌باشد که با حمایت مالی مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شده است.

از همکاری خانم‌ها آرزو خسروی و فاطمه عزت‌خواه (کارشناسان ارشد آزمایشگاه ایمنولوژی)، از حمایت کمیته تحقیقات دانشجویی و از مساعدت‌های کارکنان کلینیک آسم و آلرژی در بیمارستان افضل‌ی پور کرمان و مادران شیرخواران هر دو گروه مورد و شاهد که نمونه‌های خود را در کمال مهربانی در اختیار این پژوهش قرار دادند، قدردانی می‌شود.

لجستیک، گویای آن است که از میان متغیرهای توصیفی، سابقه خانوادگی بیماری و جنسیت، به‌عنوان عوامل مستقل پیش‌گویی‌کننده استعداد ابتلا به درمانیت آتوپیک، نقش مهمی ایفا می‌کنند. در مقابل، رابطه خویشاوندی والدین، به نظر نمی‌رسد که نقش مهمی در پیش‌گویی ابتلا به درمانیت آتوپیک، داشته باشد. در مورد تاثیر تغذیه با شیر مادر بر پیش‌گویی بروز درمانیت آتوپیک هم نمی‌توان نتیجه قطعی را عنوان کرد. رفع مشکلات مطالعات قبلی (حجم نمونه کوچک، فقدان انتخاب تصادفی، دوره کوتاه‌مدت تغذیه با شیر مادر، عدم طراحی یک سویه کور) و انجام مطالعات مداخله‌ای (کارآزمایی‌های *Interventional*) بیش‌تر در جهت شناسایی تاثیر یا عدم تاثیر قطعی تغذیه با شیر مادر بر درمانیت آتوپیک، می‌تواند مفید باشد. از میان سایر متغیرها، بر اساس نتایج گرفته شده، می‌توان عنوان کرد که غلظت سایتوکین  $IFN-\gamma$  در شیر مادر، به‌صورت مستقل، در پیش‌گویی استعداد ابتلا به درمانیت آتوپیک، نقش مهمی ایفا می‌کند. در مقابل، با توجه به این‌که غلظت سایتوکین IL-13 در آزمون چند متغیره بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت، احتمالاً نمی‌تواند به‌عنوان عاملی مستقل در پیش‌گویی بروز درمانیت آتوپیک، نقش چندانی داشته باشد و تحت تاثیر سایر عوامل قرار می‌گیرد. چنان‌که پیش‌تر هم اشاره شد، میان این سایتوکین و IL-4 رابطه معنی‌دار معکوسی مشاهده شد که چندان قوی نبود.

نقاط قوت و آثار کاربردی حاصل از این پژوهش: ۱- عدم وجود سابقه بررسی ارتباط غلظت سایتوکین‌های التهابی و ضد التهابی

## References

1. Marcadante KJ, Kliegman RM, Jenson HB, Behrman RE, editors. Nelson Essentials of Pediatrics. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA; Saunders Elsevier: 2011. p. 324-7.
2. Bieber T. Mechanisms of disease: Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358(14):1483-94.
3. Noel RJ, Putnam PE, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis. *N Engl J Med* 2004;351(9):940-1.
4. Laubereau B, Brockow I, Zirngibl A, Koletzko S, Gruebl A, von Berg A, et al. Effect of breast-feeding on the development of atopic dermatitis during the first 3 years of life: results from the GINI-birth cohort study. *J Pediatr* 2004;144(5):602-7.
5. Friedman NJ, Zeiger RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(6):1238-48.
6. Krakowski AC, Eichenfield LF, Dohil MA. Management of atopic dermatitis in the pediatric population. *Pediatrics* 2008; 122(4):812-24.
7. Mihrshahi S, Ampon R, Webb K, Almqvist C, Kemp AS, Hector D, et al. The association between infant feeding practices and subsequent atopy among children with a family history of asthma. *Clin Exp Allergy* 2007;37(5):671-9.
8. Pesonen M, Kallio MJ, Ranki A, Siimes MA. Prolonged exclusive breastfeeding is associated with increased atopic dermatitis: a prospective follow-up study of unselected healthy newborns from birth to age 20 years. *Clin Exp Allergy* 2006;36(8):1011-8.
9. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005;135(1):1-4.
10. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003;77(6):1537S-1543S.
11. Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41(3):245-53.
12. Grewe M, Walther S, Gyufko K, Czech W, Schöpf E, Krutmann J. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen

- patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 1995;105(3):407-10.
13. Taha RA, Leung DY, Ghaffar O, Boguniewicz M, Hamid Q. In vivo expression of cytokine receptor mRNA in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(2):245-50.
  14. Ricci M, Matucci A, Rossi O. Source of IL-4 able to induce the development of TH2-like cells. *Clin Exp Allergy* 1997;27(5):488-500.
  15. Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011;2(3). pii: 110.
  16. Hamid Q, Naseer T, Minshall EM, Song YL, Boguniewicz M, Leung DY. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(1):225-31.
  17. Ong PY, Leung DY. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6(5):384-9.
  18. Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90(3 Pt 1):323-31.
  19. Vestergaard C, Johansen C, Otkjaer K, Deleuran M, Iversen L. Tumor necrosis factor-alpha-induced CTACK/CCL27 (cutaneous T-cell-attracting chemokine) production in keratinocytes is controlled by nuclear factor kappaB. *Cytokine* 2005;29(2):49-55.
  20. Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, de Waard-van der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol* 2007;157(4):645-8.
  21. Prokesová L, Lodiňová-Zádníková R, Zizka J, Kocourková I, Novotná O, Petrásková P, et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17(3):175-83.
  22. Breckler LA, Hale J, Jung W, Westcott L, Dunstan JA, Thornton CA, et al. Modulation of in vivo and in vitro cytokine production over the course of pregnancy in allergic and non-allergic mothers. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(1 Pt 1):14-21.
  23. Rigotti E, Piacentini GL, Ressa M, Pigozzi R, Boner AL, Peroni DG. Transforming growth factor-beta and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants. *Clin Exp Allergy* 2006;36(5):614-8.
  24. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 1969;6(1):43-52.
  25. Roguedas-Contios AM, Misery L. What is intrinsic atopic dermatitis? *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41(3):233-6.
  26. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(6 Suppl):S118-27.
  27. Kang K, Stevens SR. Pathophysiology of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2003;21(2):116-21.
  28. Küster W, Petersen M, Christophers E, Goos M, Sterry W. A family study of atopic dermatitis. Clinical and genetic characteristics of 188 patients and 2,151 family members. *Arch Dermatol Res* 1990;282(2):98-102.
  29. Singh V, Agrewala J. Regulatory role of pro-Th1 and pro-Th2 cytokines in modulating the activity of Th1 and Th2 cells when B cell and macrophages are used as antigen presenting cells. *BMC Immunology* 2006;7:17.
  30. Mamessier E, Magnan A. Cytokines in atopic diseases: revisiting the Th2 dogma. *Eur J Dermatol* 2006;16(2):103-13.
  31. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998;19(8):359-61.
  32. Tang ML, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994;344(8928):983-5.
  33. Sivaprasad U, Warriar MR, Gibson AM, Chen W, Tabata Y, Bass SA, et al. IL-13R $\alpha$ 2 has a protective role in a mouse model of cutaneous inflammation. *J Immunol* 2010;185(11):6802-8.
  34. La Grutta S, Richiusa P, Pizzolanti G, Mattina A, Pajno GB, Citarrella R, et al. CD4(+)IL-13(+) cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopic dermatitis in children. *Allergy* 2005;60(3):391-5.
  35. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritzsche C, et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(3):506-13.
  36. Akdis CA, Akdis M, Simon HU, Blaser K. Regulation of allergic inflammation by skin-homing T cells in allergic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118(2-4):140-4.
  37. Artis D, Humphreys NE, Bancroft AJ, Rothwell NJ, Potten CS, Grecis RK. Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *J Exp Med* 1999 4;190(7):953-62.
  38. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(1):178-89.
  39. Dunstan JA, Hale J, Breckler L, Lehmann H, Weston S, Richmond P, et al. Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon-gamma responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy* 2005;35(10):1309-17.
  40. Jacobi A, Antoni C, Manger B, Schuler G, Hertl M. Infliximab in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(3 Pt 1):522-6.
  41. Gauchat JF, Schlagenhaut E, Feng NP, Moser R, Yamage M, Jeannin P, et al. A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T, and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/interleukin-13 receptor. *Eur J Immunol* 1997;27(4):971-8.
  42. Ryzhov S, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I, Feoktistov I. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A2B-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *Immunol* 2004;172(12):7726-33.
  43. Wisniewski J, Wright PW, Patrie JT, Heymann PW, Woodfolk JA. Distinct Serum Cytokine Profiles Predict Atopic Dermatitis in Children and Adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(Suppl 2):AB40.
  44. Seneviratne SL, Jones L, Bailey AS, Black AP, Ogg GS. Severe atopic dermatitis is associated with a reduced frequency of IL-10 producing allergen-specific CD4+ T cells. *Clin Exp Dermatol* 2006;31(5):689-94.

## Evaluation of the concentration of Proinflammatory/Pro Th1 Cytokines IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ and anti inflammatory/Pro Th2 Cytokines IL-13 and IL-4 in breast milk and their relationship to atopic dermatitis

### Abstract

Received: September 04, 2012 Accepted: October 03, 2012

Sepideh Moradkhani M.Sc.<sup>1,2</sup>  
Mohammad Mahdi  
Mohammadi L.M.D., Ph.D.  
M.P.H.<sup>1,2\*</sup>  
Hamid Daneshvar Ph.D.<sup>2</sup>  
Nasrin Bazargan Harandi M.D.<sup>3</sup>  
Mohammad Reza Baneshi  
Ph.D.<sup>4</sup>

1- Physiology Research Center,  
Kerman University of Medical  
Sciences, Kerman, Iran.

2- Department of Immunology,  
Kerman University of Medical  
Sciences, Kerman, Iran.

3- Department of Pediatrics,  
Faculty of Medicine, Kerman  
University of Medical Sciences,  
Kerman, Iran.

4- Research Center for Modeling in  
Health, Kerman University of  
Medical Sciences, Kerman, Iran.

\* Corresponding author:  
Department of Immunology, Kerman  
University of Medical Sciences,  
P.O.Box:444, Kerman, Iran.  
Area Postal Code: 76169-14115  
Tel: +98- 341- 3224617  
E-mail: mmmohamadi@razi.tums.ac.ir

**Background:** Atopic dermatitis (AD) is one of the most common chronic, highly pruritic and inflammatory skin diseases. The exclusive influence of breastfeeding in the prevention of inflammatory diseases is a matter of debate. In this study, we aimed to determine the concentration of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-13 (IL-13) and interleukin-4 (IL-4) cytokines as anti Th2 or anti Th1 cytokines in breast milk and their relationship with atopic dermatitis in breastfed infants.

**Methods:** This study carried out in Afzalipour Hospital of Kerman during one year from 2010 to 2011, we selected 50 breastfed infants with AD as cases and 50 healthy infants without AD or any other allergic disease as the controls. The concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines were measured by ELISA in the mothers' milk. The demographic characteristics were recorded in a data collection form. Moreover, severity of the disease was determined by SCORAD index. T-test and logistic regression were used for assessment of the correlation among study variables.

**Results:** The concentrations of IFN- $\gamma$  and IL-13 were significantly higher (respectively,  $P=0.04$ , and  $P=0.02$ ) in the case group. However, logistic regression revealed that only IFN- $\gamma$  significantly increased the risk for atopic dermatitis ( $P=0.02$ ). Concentration of TNF- $\alpha$  was similar in the milk from mothers belonging to the two groups.

**Conclusion:** The results indicate that the concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-13 and IL-4 cytokines are higher in the milk of mothers whose infants have AD. However, the risk for atopic dermatitis increases by 49% by every ten-unit (in pg/mL) increase in the level of IFN- $\gamma$ .

**Keywords:** atopic dermatitis, breastfeeding, cytokine, ELISA, IFN-  $\gamma$ , IL-13, IL-4, TNF- $\alpha$ .