

مطالعه انفجار تنفسی در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن به روش Chemiluminescence

دکتر احمد مسعود، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ایمنولوژی پزشکی

دکتر گیتی نمر، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان امام خمینی (ره)

مریم دبیر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ایمنولوژی پزشکی

Study of Respiratory Burst in Patients With Brucella Infection by Using Chemiluminescence Method

ABSTRACT

Although cellular immunity involving activated macrophage is important in resistance to brucella infections, serum factors and polymorphonuclears (PMNs) play some role in the initial responses to brucella infections. In this research, we studied respiratory burst of PMNs against opsonized yeast and opsonized inactivated brucella melitensis in chronic brucellosis patients and controls with no previous history of brucellosis. A group of 41 patients and another group of 20 blood donors as control, were included. The other two groups included 10 cases and 6 controls. Mean responses of PMNs of patients and controls to opsonized yeast were 110.3 and 129.3 milivolt respectively and the difference was not statistically significant. No statistically significant difference was observed between respiratory burst of PMNs exposed to inactivated brucella in 10 patients with chronic brucellosis (mean 67.2) and 6 control blood donors (mean 112.5), so we concluded that inactivated brucella melitensis can't inhibit activity of myeloperoxidase enzyme.

Keywords: Brucella infection, Respiratory burst, Polymorphonuclears

چکیده

اگر چه ایمنی سلولی و از جمله ماکروفاژها در مقاومت به عفونت بروسلایی اهمیت دارند، عوامل سرمی مانند سلول‌های PMN نیز در ایجاد پاسخ اولیه در مقابل این میکروارگانیسم نقش دارند. در پژوهش حاضر به بررسی انفجار تنفسی (مسیر اکسیداتیو) سلولهای فاگوسیت بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در مواجهه با ارگانیسم غیربروسلایی (مخمر اپسونیزه) و ارگانیسم بروسلایی غیرفعال شده

پرداخته ایم. ۵۱ نفر از بیماران بروسلوزی مزمن از نظر فعالیت انفجار تنفسی پلی مورفونوکلترها در مواجهه با مخمر بیکر و بروسلاملیتنتسیس غیرفعال شده مورد مطالعه قرار گرفتند. یک گروه شامل ۴۱ بیمار بروسلوزی و ۲۰ نفر بعنوان کنترل انتخاب شدند. دو گروه دیگر شامل ۱۰ بیمار و ۶ کنترل نیز وارد مطالعه شدند. در مواجهه پلی مورفونوکلترها با مخمر اپسونیزه، متوسط انفجار تنفسی در گروه بیماران ۱۱۰/۳ و در گروه کنترل

زن (۰.۳۵) و ۲۷ بیمار مرد (۰.۶۵) می شد. حداقل سن ۸ سال و حداکثر ۷۰ سال با میانگین سنی ۳۵ سال بود. فعالیت اکسیداتیو PMN این گروه در مقابل مخمر بررسی شد. از میان افرادی است که هیچگونه برخورد قبلی با گونه‌های مختلف بروسلا یا سابقه‌ای از بروسلوزیس نداشتند و آزمایش رایت همه آنها به روش رزینگال منفی بود، ۲۰ داوطلب جهت کنترل آزمایش فوق انتخاب شدند.

گروه دوم شامل ۱۰ بیمار بروسلوزی مزمن، متشکل از ۴ زن (۰.۴۰) و ۶ نفر مرد (۰.۶۰) بود. این گروه از نظر فعالیت انفجار تنفسی (مسیر اکسیداتیو) سلولهای پلی مورفونوکلتر در مقابل بروسلای غیرفعال ملی تنسیس بررسی و شدند. ۶ نفر از داوطلبانی که هیچگونه سابقه بیماری بروسلوز نداشتند و آزمایش رایت همه آنها منفی بود، برای کنترل آزمایش گروه دوم انتخاب شدند. ۵ سی سی خون به صورت هپارینه از بیمار گرفته و برای انجام مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. جهت مقایسه نتایج آزمایش در بیماران بروسلوزی مزمن با گروه کنترل از نظر فعالیت انفجار تنفسی سلولهای پلی مورفونوکلتر از آزمون آماری ۱t استفاده گردید.

مواد و محلول‌های مورد استفاده

- ۱- سرم دکستران ۰.۶/۷.۰٪
- ۲- هپارین ۵۰۰۰۱۱
- ۳- بافر PBS (فسفات بافر سالین)
- ۴- بافر لایزینگ
- ۵- محلول دی‌متیل سوکفوکساید (DMSO)
- ۶- پودر لومینول
- ۷- پودر مخمر نانوائی یا باکتری بروسلا ملی تنسیس غیرفعال شده
- ۸- سرم AB

تکنیک کمیومینسانس

دریافت انرژی الکترومغناطیس توسط الکترون‌ها و آزاد سازی انرژی بصورت صدور فوتون در هنگام بازگشت به تراز انرژی اولیه، اساس کمیومینسانس را تشکیل می‌دهد. میزان نور تولید شده بوسیله دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری می‌شود.

۱۲۹/۳ میلی‌ولت بود که تفاوت معنی‌دار آماری را نشان نمی‌داد. در حضور بروسلاملیتنسیس غیرفعال شده، این میزان‌ها در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب ۶۷/۲ و ۱۱۲/۵ میلی‌ولت بود که تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌داد. لذا این نتیجه گرفته شد که بروسلا ملی تنسیس غیرفعال شده قدرت مهار فعالیت میلیوپراکسیدازی مسیر اکسیداتیو را ندارد.

مقدمه

بروسلوزیس یک عفونت سیستمیک است که مشکلات فراوانی از جمله عود مکرر بدنال دارد (۱). این شکل بخصوص از سیر تکاملی بیماری در ارتباط با جایگزینی ارگانسیم در درون سلولهای میکروارگانسیم تا حدودی از عمل میکروبوکشی آنتی‌بیوتیک‌ها حفاظت می‌گردد. چون بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها بدلیل نامحلول بودن در چربی قادر به نفوذ از غشای سلول به درون نیستند (۱)، بروسلا قادر به تکثیر و تقسیم و ادامه حیات در داخل فاگوسیت‌ها و مهار فعالیت تهاجمی سیستم ایمنی می‌باشد. در داخل سلولهای فاگوسیتیک پلی مورفونوکلتر (PMNS) دو نوع فعالیت میکروبوکشی مهم اتفاق می‌افتد (۲): تولید محصولات اکسیژنه توکسیک (مسیر اکسیداتیو) و تخریب میکروارگانسیم توسط آنزیمهای لیزوزومال که در گرانولهای متصل به واکوئل‌های فاگوسیتیک حضور دارند (۳، ۴، ۵).

اولین مرحله از واکنش PMN با باکتری مرحله اتصال و بلع است. سپس هضم (تشکیل فاگوزوم-لیزوزوم) و بالاخره کشته شدن یا Killing می‌باشد.

در این مقاله به بررسی انفجار تنفسی (مسیر اکسیداتیو) سلولهای فاگوسیت بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در مواجهه با ارگانسیم غیربروسلایی (مخمر اپسونیزه) و ارگانسیم بروسلایی غیرفعال شده پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

۵۱ نفر از بیماران بروسلوزی مزمن از نظر فعالیت انفجار تنفسی (PMNS) پلی مورفونوکلترها در مواجهه با مخمر بیکر و بروسلاملیتنسیس غیرفعال شده مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

گروه اول شامل ۴۱ بیمار بروسلوزی، متشکل از ۱۴ بیمار

شدت این نور به میزان واکنش‌های کسیداسیون و رنگ آن به نوع مولکول اکسید شده و انرژی آزاد شده بستگی دارد (۹). برای اندازه‌گیری مقدار ماده موجود در یک محلول کمیلومینسانس، pH باید قلیایی و حدود ۱۰ الی ۱۱ باشد. لازم به تذکر است که لومینول در pH طبیعی بطور کامل غیرفعال است ولی برای بررسی فاگوسیتوز با تکنیک کمیلومینسانس pH باید بین ۷/۲ تا ۷/۴ باشد. افزایش دما بر روی واکنش‌های کمیلومینسانس تأثیر دارد و باعث کاهش تولید نور می‌شود این امر ناشی از افزایش فرکانس برخورد مولکولها در محلول می‌دانند.

میزان نور تولید شده برحسب میلی‌ولت در هر دقیقه بوسیله کامپیوتری که به دستگاه وصل بود ثبت گردید. بعد از مدتی میزان نور تولید شده به حداکثر خود می‌رسد و سپس افت می‌کند. منحنی مربوطه را ترسیم و وجود یا عدم وجود اختلال را بررسی نمودیم.

نتایج

در مواجهه پلی‌مورفونوکلترها با مخمر اپسونیزه، متوسط انفجار تنفسی در گروه بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن ۱۱۰/۳ میلی‌ولت و در گروه کنترل طبیعی ۱۲۹/۳ میلی‌ولت بود که

تفاوت معنی‌دار آماری را نشان نمی‌داد (جدول ۱). در حضور بروسلامیتنسیس غیرفعال شده، پلی‌مورفونوکلترهای بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن بطور متوسط انفجار تنفسی ۶۷/۲ میلی‌ولت را نشان دادند. این میزان در گروه سالم ۱۱۲/۵ میلی‌ولت بود. فعالیت انفجار تنفسی در دو گروه بیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (جدول ۱).

بحث

در تحقیق حاضر سلولهای فاگوسیتی بیماران بروسلوز مزمن را از نظر انفجار تنفسی در مواجهه با مخمر اپسونیزه و بروسلامیتنسیس غیرفعال شده مورد بررسی قرار داده‌ایم. در تحقیق Lehrer و Cline واکنش متقابل کاندیدا آلیکانس و پلی‌مورفونوکلترهای انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱). نتیجه حاصله این بود که پلی‌مورفونوکلترهای انسانی نقش مهمی در عفونتهای کاندیدایی دارند و بطور مؤثر قادر به بلع و کشتن این عوامل عفونی می‌باشند و بیماری‌ها را گرانولوماتوز مزمن و بیماران با نقایص لیزوزومال از این نظر دچار نقص بودند.

جدول ۱- انفجار تنفسی در گروه‌های مختلف تحت بررسی

گروه	مواجهه	تعداد	متوسط انفجار تنفسی PMNs بر حسب میلی‌ولت
بیمار	مخمر اپسونیزه	۴۱	۱۱۰/۳
کنترل	مخمر اپسونیزه	۲۰	۱۲۹/۳
بیمار	بروسلامیتنسیس غیرفعال	۱۰	۶۷/۲
کنترل	بروسلامیتنسیس غیرفعال	۶	۱۱۲/۵

Lkreutzer و همکارانش تحقیقی در ارتباط با مواجهه PMN انسانی با گونه‌های ویرولان بروسلا آبورتوس انجام دادند و مشاهده کردند که ناتوانی این سلولها در کشتن اینگونه ویرولان فاکتوری کلیدی جهت علت انتشار بروسلا به غدد لنفاوی و سپس سیستم رتیکولاندوتلیال است (۶).

Canning بر روی مواجهه PMNS انسانی و بروسلا آبورتوس

و ویرولان کار کرد. تکنیک مورد استفاده Nitro blue tetrazolium (NBT) بود. سپس یانگ و همکارانش مواجهه بروسلا آبورتوس و ویرولان و ملی‌تنسیس ضعیف شده را با PMN انسانی مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه یانگ بررسی Ulter Structural با میکروسکوپ الکترونی بعد از بلع میکروارگانیسم بعمل آمد (۴).

در اینجا لازم به تذکر است که تشابه بین نیپوبلی ساکارید بروسلا و DNA هسته سلول باعث ایجاد پاسخهای نابجا و تولید اتوآنتی بادی ضدهسته و در نتیجه ایجاد بیماری شبه لوپوس می کند و چه بسا بیمارانی با علائم بالینی لوپوس بستری و در نهایت با تشخیص و درمان بروسلا درمان شده اند.

بیشتر فاکتورهایی که ذکر آنها رفت در گونه های ویرولان بروسلا ملی تنسیس تنها گونه جدا شده از انسان (در ایران) مشاهده گردیده است. این فاکتورها مسؤول کاهش قدرت فاگوسیتیک PMNS هستند. بروسلا ملی تنسیس قادر به مهار دگرانولاسیون لیزوزوم هاست و فعالیت میلوپراکسیدازی را نیز مهار می کند (۷).

پس در بیمارانی بروسلازی (فعال) انفجار تنفسی بطور کافی و مناسب آغاز می گردد و H_2O_2 تولید می شود ولی دگرانولاسیون گرانولهای اولیه که منجر به آزادسازی میلوپراکسیداز می شوند یا بطور نسبی یا کلی بوسیله میکروارگانسیم مهار می گردد. و این دلیلی بر علت ادامه حیات بروسلائی فعال در سلول فاگوسیتیک و همچنین تداوم عفونت و تمایل آن به عود مجدد می باشد.

هیچ ارتباطی بین پاسخهای سرولوژیکی و عملکرد سلولهای فاگوسیتیک وجود ندارد و پاسخ هومورال اختصاصی نقش کمی در پاکسازی عفونت دارد (۹).

در مطالعه ما انفجار تنفسی یا لومینانس نوتروفیلی که حکایت از میزان تولید مواد اکسیدانت یا رادیکالهای آزاد مسیر اکسیداتیو می کند، در پلی مورفونوکلترهای دو گروه بیمار و کنترل تفاوت معنی داری نداشت، لذا این نتیجه گرفته می شود که بروسلا ملی تنسیس غیرفعال شده قدرت مهار فعالیت میلوپراکسیدازی مسیر اکسیداتیو را نداشته و دگرانولاسیون لیزوزوم نیز صورت می گیرد نظیر آنچه در مواجهه با مخمر دیده شد.

البته لازم به تذکر است که بروسلائی زنده و ویرولان که در بروسلازی باکترمیک فعال مشاهده می شود بنحوی از دگرانولاسیون لیزوزوم جلوگیری و مانع فعالیت میلوپراکسیدازی شده و در نهایت مانع از اتصال فاگوزوم لیزوزوم و کشته شدن خود می گردد و باعث تداوم عفونت و رشد و تکثیر در سلول فاگوسیت و عودهای مکرر و در نتیجه

نتایج این تحقیق ها به قرار زیر است:

- در مرحله اول فاگوسیتوز یعنی عمل بلع، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس فاقد مکانیسم هایی هستند که بتوانند مانع عمل بلع گردند.

- متابولیسم اکسیداتیو بوسیله PMN یکی از استراتژیهای مهم برای فعالیت های باکتریسیدال وابسته با اکسیژن است. وقتی PMN تحریک می گردد آنزیم اکسیداز از سطح غشاء پلاسمایی سلول فاگوسیت تبدیل O_2 به سوپراکسید آنیون را کاتالیز می کند و سپس سوپراکسید آنیون (O_2^-) خودبخود به H_2O_2 تبدیل می گردد. همان سوپراکسید برای MPO (میلوپراکسیداز) می باشد. پس هرگاه انفجار تنفسی از سوی میکروارگانسیم دیگر تحریک گردد بروسلا قادر به مهار آن نخواهد بود.

در تحقیق یانگ در بررسی فاگوسیتوز و killing داخل سلولی بروسلا توسط PMN انسانی معلوم شد که بروسلا آبورتوس غیرویرولان و بروسلا ملی تنسیس هر دو بلعیده می شوند ولی آبورتوس بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه به صورت intact و دست نخورده باقی می ماند (۷)

در فاصله سالهای ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۵ تیم دکتر Ocon فعالیت PMN انسانی را در مقابل بروسلا بررسی کرد که نتایج حاصله به قرار زیر است (۷):

- هیچ تغییری در قدرت فاگوسیتوز توسط PMNS انسان در مقابل ارگانسیم بروسلا حاصل نمی گردد.

- در ارتباط با پاسخ ایمنی، پاسخ، پاسخ ایمنی اولیه در مقابل این عفونت مناسب است و در مراحل اولیه ابتلا اتصال PMNS (کموکینز) افزایش دارد. این افزایش حتی در حرکت تصادفی PMN در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می شود.

- بروسلا محتوی فاکتورهایی است که توانایی مهاجرت فاگوسیت ها را کاهش می دهد پس در بیمارانی مبتلا به باکتری می بروسلا کموکینز کاهش نشان می دهد.

- هیچ تغییری در سیستم کمپلمان حاصل نمی گردد (۷).

- فاکتورهایی از بروسلا شناخته شده اند که باعث مهاجرت شده با فعال شدن لکوسیتها می گردند که همانان نیمه های نیپوبلی ساکاریدی هستند که در غشاء خارجی بروسلا یافت می شوند.

مزمّن شدن بیماری می‌گردد.

منابع

- 1- Clin Infectious Dis 1992; 14:131-5.
- 2- Brown W, Atkinson JP, Fearon DT. Innate Immunity: 50 ways to kill a microb. Curr Opin Immunol 1994; 6: 43-74.
- 3- Microbiology 1991; 7:113-9.
- 4- Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5-guanosine monophosphate and adonine by bruceella abortus and their Role in the Intracellular survival of the bacteria. J infec c's 1986; 154: 464-70.
- 5- Downey GP. Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis. Curr Opin Immunology 1994; 6: 113-24.
- 6- Infect Dis Clinics North Am 1994; 8(1): 115-8.
- 7- Immunology 19882; 46: 17-22.
- 8- J Cell Biology. 1993; 123: 1-5.
- 9- McEver RP. Selections. Curr Opin Immunol 1994; 6: 75-84.