

تحقیقی

پاسخ‌های ایمنی Th1 و Th2 در عفونت *Hymenolepis Nana*

دکتر ابوالقاسم عجمی*^۱، عراز محمد میرابی^۲، فرشیده عابدیان^۲، رؤیا قوامی^۳

۱- استاد گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۲- کارشناس ارشد ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

۳- دبیر زیست شناسی مرکز آموزشی فرزنانگان ساری.

چکیده

زمینه و هدف: با وجود مطالعات زیادی که روی حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته و نقش لنفوسیت‌های Th2 در ایمنی بر علیه کرم‌ها موثر دانسته شده، اما مطالعات جدیدتری که روی موش انجام شده، سلول‌های Th1 را نیز در بعضی از عفونت‌های ناشی از کرم مثل *Hymenolepis nana* دخیل دانسته‌اند. در مطالعه حاضر به منظور روشن شدن نقش لنفوسیت‌های Th1 و Th2 در ایمنی بر علیه *Hymenolepis nana* در سرم افراد آلوده به این انگل با استفاده از اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌های IL12، IFN γ ، IL5 و IL13 انجام گردید.

روش بررسی: این مطالعه مورد - شاهده طی سال ۱۳۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. ۳۱ بیمار که در آزمایش مدفوع آنها تخم انگل *Hymenolepis nana* دیده شد و ۳۰ فرد سالم که از نظر سن و جنس مشابه گروه آزمایش بودند، وارد مطالعه شدند. میزان IL5، IFN γ ، IL13 و IL12 در سرم آنها به وسیله روش ELISA اندازه‌گیری شد. شمارش گلبول‌های سفید و درصد لنفوسیت‌ها، منوسیت‌ها، اتوزینوفیل‌ها و بازوفیل در خون محیطی تعیین گردید. برای مقایسه داده‌ها از آزمون‌های تی، من‌ویتنی و ویلکاکسون استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت سرمی هر کدام از سایتوکاین‌های IFN γ ، IL12، IL5 و IL13 در سرم بیماران بیشتر از گروه کنترل بود. ولی فقط بین غلظت IFN γ و IL13 در دو گروه اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$). تعداد منوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و اتوزینوفیل‌ها در بیماران بیشتر از گروه کنترل بود. ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که علاوه بر Th2، لنفوسیت‌های Th1 نیز در پاسخ‌های ایمنی بر علیه *Hymenolepis nana* فعالیت دارند.

کلید واژه‌ها: سایتوکاین، هیمنولپیس نانا، عفونت

* نویسنده مسؤول: دکتر ابوالقاسم عجمی، پست الکترونیکی: a.ajami@mazums.ac.ir

نشانی: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده دریا، مجتمع دانشگاهی رسول اعظم (ص)، دانشکده پزشکی گروه ایمنولوژی، تلفن: ۰۱۵۱-۳۵۴۳۰۸۱-۳، نمابر: ۳۵۴۳۰۸۷
وصول مقاله: ۸۶/۱/۲۵، اصلاح نهایی: ۸۶/۹/۱۲، پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۹

مطالعه به منظور روشن شدن نقش لنفوسیت های Th1 و Th2 در ایمنی بر علیه H.nana در سرم افراد آلوده به این انگل با استفاده از اندازه گیری میزان سایتوکاین های IL12، IFN γ ، IL5 و IL13 انجام گردید.

روش بررسی

این مطالعه مورد - شاهده طی سال ۱۳۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. ۳۱ بیمار (۱۷ مرد و ۱۴ زن) آلوده به انگل H.nana که از نظر بالینی سیستم ایمنی آنها مشکلی نداشت و هیچ دارویی مصرف نمی کردند، وارد مطالعه شدند. تشخیص آلودگی به H.nana براساس وجود تخم انگل در مدفوع آنها با استفاده از روش فلوتاسیون انجام شد. بیمارانی که دارای عفونت های مختلط انگلی بوده و یا علائمی ناشی از عفونت های ویروسی و میکروبی و التهاب داشتند (تب و آزمایش CRP مثبت) از مطالعه خارج شدند.

۳۰ فرد سالم که از نظر بالینی مبتلا به نقص ایمنی نبوده و مبتلا به بیماری های التهابی و آلودگی انگلی نبودند (آزمایش مدفوع و CRP منفی) و از نظر سن و جنس با بیماران همانند بودند، به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. ۵ میلی لیتر از خون محیطی بیماران و گروه کنترل گرفته شد و به دو بخش تقسیم گردید. ۲ میلی لیتر از آن با EDTA ۵ درصد مخلوط و برای انجام آزمایش CBC استفاده شد. ۳ میلی لیتر سرم از خون بعد از لخته شدن جدا شد و تا زمان انجام آزمایش برای تعیین غلظت سایتوکاین ها در فریزر و دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

غلظت هر کدام از سایتوکاین ها در سرم با استفاده از روش الیزا (ELISA) تعیین گردید. کیت های مورد استفاده مربوط به شرکت استرالیایی Bender Med System بود که حساسیت کیت ها ۴ pg/ml، ۳/۲ pg/ml، ۲ pg/ml و ۱/۵ pg/ml به ترتیب برای IL12، IFN γ ، IL5، IL13 بود.

CBC توسط دستگاه کولتر T 890e انجام شد و درصد هر کدام از لنفوسیت های گردش خون (نوتروفیل، بازوفیل، ائوزینوفیل، مونوسیت و لنفوسیت) تعیین گردید.

نتایج به دست آمده به صورت انحراف معیار \pm میانگین نشان داده شد. از آزمون های آماری تی و من ویتنی برای مقایسه میانگین غلظت سایتوکاین ها در گروه بیمار و کنترل استفاده

ادامه حیات انگل در بدن میزبانی که ایمنی در مقابل آن انگل را کسب کرده، در تحقیقات ایمونوپارازیتولوژی مسأله جالب و حل نشده ای می باشد (۱). در تحقیقات تجربی، نقش سلول های T و زیر گروه های آن در ایمنی انگل ها مشخص شده است (۲). انگل های پرسلولی از جمله کرمها به وسیله فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل ها از بین نمی روند. بلکه آنتی بادی، کمپلمان و آزاد شدن مولکول های تخریب کننده ائوزینوفیلی مثل پروتئین های کاتیونی (ECP) در از بین بردن بافت های سطحی انگل و ارگان های متصل کننده آن موثر می باشد و در همه این فعالیت ها Th2 دخالت دارد (۳). اطلاعات زیادی مبنی بر نقش سلول های Th2 در دفاع بر علیه عفونت های کرمی وجود دارد. IL4 در تولید IgE، IL5 و IL9 از طریق افزایش تولید ائوزینوفیل ها و ماست سل ها و احتمالاً IL13 با افزایش TNF در ایمنی بر علیه کرمها دخالت دارند (۴ و ۵). اگرچه اثر سایتوکین های Th2 در دفع کرمها روشن می باشد، ولی دفع بعضی از کرم های دستگاه گوارش در غیاب فعالیت های کلاسیک سلول های Th2 یعنی فعال شدن سلول های B، تولید آنتی بادی، افزایش ائوزینوفیل ها و ماست سل ها هم انجام می گیرد (۶). مطالعات تجربی انجام شده در موش، Th1 را در دفاع بر علیه بعضی از سستودها مثل *Hymenolepis diminuta* و *Hymenolepis nana* در بعضی از مراحل سیکل تکاملی انگل مؤثر می دانند (۷ و ۸).

تحریک لنفوسیت های غدد لنفاوی مزاتریک موش های آلوده به تخم یا کیست انگل H.nana در *in vitro* توسط Con cavalin A نشان داد که تولید سایتوکاین های IL5، IL4، IL3، IL2 و IFN γ در مراحل مختلف سیکل تکاملی انگل متفاوت می باشد (۹). جدا کردن لنفوسیت های اختصاصی بر علیه آنتی ژن های H.nana از غدد لنفاوی مزاتریک موش های BALB/c آلوده و بررسی فعالیت آنها نشان داد که سلول های Th1 در جلوگیری از H.nana اهمیت زیادی دارند (۱۰).

تمام مطالعات در مورد پاسخ های ایمنی در آلودگی های H.nana روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده و در مورد مکانیسم های دفاعی در انسان گزارشی وجود ندارد. لذا این

شد. همچنین آزمون ویلکاکسون و من‌ویتنی برای آنالیز درصد لکوسیت‌ها در دو گروه به کار برده شد. میزان همبستگی بین مقدار سایتوکاین‌های مختلف در بیماران به‌وسیله آزمون پیرسون محاسبه شد. در همه موارد $P < 0.05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

غلظت سایتوکاین‌ها و درصد گلبول‌های سفید خون در ۳۱ بیمار آلوده به انگل H.nana شامل ۱۴ زن و ۱۷ مرد با متوسط سنی 32.9 ± 13.9 و ۳۰ فرد سالم شامل ۱۵ مرد و ۱۵ زن با متوسط سنی 35.1 ± 15.2 اندازه‌گیری شد. سن افراد مورد مطالعه از ۲/۵ تا ۴۸ سال متفاوت بود.

میانگین غلظت γ IFN، IL13، IL12، IL5 در سرم بیماران آلوده به H.nana بیشتر از گروه کنترل بود. اما فقط اختلاف بین غلظت γ IFN و IL13 در دو گروه معنی‌دار بود (جدول ۱) ($P < 0.05$).

جدول ۱: مقایسه میانگین و انحراف معیار غلظت سایتوکاین‌های

مختلف در سرم افراد آلوده به H.nana و گروه شاهد

گروه‌ها	مورد	شاهد	مقدار	ارزش
سایتوکاین‌ها	(pg/ml)	(pg/ml)	T	P
IFN γ	9.6 ± 6.3	3.8 ± 4.3	۴/۲	< 0.05
IL13	12.4 ± 25.9	2.6 ± 3.6	۲/۰	< 0.05
IL12	8.3 ± 14.3	7.2 ± 12.5	۰/۳	طبیعی
IL5	15.5 ± 16.0	8.9 ± 11.07	۱/۸	طبیعی

جدول ۲: میزان همبستگی میان غلظت سایتوکاین‌های مختلف

در بیماران آلوده به H.nana

سایتوکاین‌ها	ایندکس همبستگی	ارزش P
IFN γ - IL12	-۰/۲۹۴	۰/۱۰۹
IFN γ - IL5	-۰/۰۷۴	۰/۶۹۴
IFN γ - IL13	-۰/۲۴۱	۰/۱۹۱
IL13 - IL12	-۰/۲۲۸	۰/۲۱۷
IL13 - IL5	-۰/۰۱۵	۰/۹۳۰

محاسبه میزان همبستگی بین غلظت سایتوکاین‌های مختلف در گروه بیماران نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین

آنها می‌باشد (جدول ۲).

بررسی گلبول‌های سفیدخون محیطی و تعیین درصد هر کدام از انواع آنها نشان داد که با وجود افزایش درصد مونوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و کاهش نوتروفیل‌ها در گروه بیماران در مقایسه با گروه شاهد این کاهش و افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که غلظت سایتوکاین‌های Th1 و Th2 در سرم انسان بعد از آلوده شدن به H.nana افزایش می‌یابد که این افزایش برای γ IFN و IL13 معنی‌دار می‌باشد. در یک مطالعه تجربی Conchedda نشان داد که تولید سایتوکاین‌ها در مراحل مختلف عفونت و در نژادهای مختلف موش با هم متفاوت می‌باشند (۹). اطلاعات آنها افزایش مقدار γ IFN را در هر دو نژاد موش مورد مطالعه در شروع عفونت با تخم انگل بیان می‌کند. در حالی که فقط در نژاد BAIB/c مقدار IL5 و IL4 بعد از ۴-۵ روز از شروع عفونت افزایش یافته که احتمالاً این افزایش هم‌زمان با زندگی داخل روده‌ای انگل می‌باشد. آنها نتیجه گرفتند که پاسخ‌های Th1 در مرحله تکامل داخل بافتی انگل صورت می‌گیرد و در اولین روزهایی که انگل زندگی داخل روده‌ای را شروع می‌کند، فعالیت Th2 شروع می‌شود. آنها همچنین پیشنهاد کردند که در زمان خودآلودگی (Autoinfection) مهم‌ترین پاسخ ایمنی از نوع Th1 می‌باشد (۹).

مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده پاسخ‌های Th1 و Th2 در افراد آلوده به H.nana می‌باشد، ولی با توجه به تجربی نبودن مطالعه و عدم آگاهی از مرحله تکاملی انگل در بیماران نمی‌توانیم فعالیت Th1 و Th2 را در مراحل مختلف تکاملی انگل از یکدیگر تفکیک کنیم. بدیهی است که Th1 بعد از نفوذ Onchospher به دیواره روده و Th2 در مرحله زندگی داخل روده‌ای انگل فعالیت می‌نمایند (۱۱).

IL12 سایتوکاینی است که به‌وسیله ماکروفاژهای عرضه‌کننده آنتی‌ژن در شروع عفونت تولید می‌گردد و در به‌وجود آمدن Th1 نقش مهمی به عهده دارد. اما از آنجا که H.nana می‌تواند خود آلودگی (Autoinfection) و عفونت‌های مکرر ایجاد کند، بنابراین IL12 می‌تواند هم‌زمان

یک میزبان انجام دهد، با سستوهای دیگر متفاوت می‌باشد. در نتیجه فعالیت هم‌زمان Th1 و Th2 ممکن است بروز کرده و مانع از تشخیص همبستگی بین سایتوکاین‌های ترشح شده از آنها گردد.

شمارش افتراقی لکوسیت‌ها نشان‌دهنده افزایش غیرمعنی‌دار در ائوزینوفیل‌ها، مونوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و کاهش غیرمعنی‌دار نوتروفیل‌ها می‌باشد. افزایش می‌تواند ناشی از فعالیت توأم Th1 (لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها) و Th2 (ائوزینوفیل‌ها) بوده و در نتیجه میزان نوتروفیل‌ها (درصد آنها) را کاهش دهد (۱۴).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر، همانند نتایج مطالعات دیگر نشان‌دهنده پاسخ‌های ایمنی از دو نوع Th1 و Th2 در افراد آلوده به H.nana می‌باشد که احتمالاً Th1 پاسخ‌های ایمنی را بر علیه Onchospher و مرحله بافتی انگل و Th2 پاسخ‌های ایمنی بر علیه مرحله داخل روده‌ای انگل را ایجاد می‌کند.

در این مطالعه غلظت سایتوکاین در سرم بیماران اندازه‌گیری شد و با توجه به پایین بودن غلظت سایتوکاین‌ها در سرم پیشنهاد می‌شود، مطالعه‌ای در مورد ترشح سایتوکاین‌ها توسط لنفوسیت‌های خون محیطی افراد آلوده بعد از تحریک با آنتی‌ژن‌های H.nana در محیط آزمایشگاهی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی (شماره ۸۳-۱۲) مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. محققین مراتب تشکر و سپاس خود را از کلیه بیماران و افراد گروه شاهد اعلام می‌دارند.

References

- 1) Ito A. Basic and applied immunology in cestode infections: from Hymenolepis to Taenia and Echinococcus. *Int J Parasitol.* 1997; 27(10):1203-11.
- 2) Palmas C, Bortoletti G, Gabriele F, Wakelin D, Conchedda M. Cytokine production during infection with Hymenolepis diminuta in BALB/c mice. *Int J Parasitol.* 1997;27(7):855-9.
- 3) Persaud R, Wang A, Reardon C, McKay DM. Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm Hymenolepis diminuta in the non-permissive mouse host. *Int J Parasitol.* 2007;

با افزایش سایتوکاین Th1 و Th2 افزایش پیدا کند (۱۲).
 γ IFN یکی از شاخص‌های فعالیت Th1 می‌باشد و در پاکسازی عفونت‌های داخل سلولی مؤثر می‌باشد. این سایتوکاین در تنظیم تولید نوع آنتی‌بادی و افزایش MHCII دخالت داشته و باعث فعالیت ماکروفاژها می‌گردد. در تحقیق Asano نشان داده شده که γ IFN مهم‌ترین و اصلی‌ترین سایتوکاینی است که در جلوگیری از عفونت مجدد با H.nana در میزبان آلوده دخالت دارد (۷). Toenjes در بررسی سایتوکاین‌های تولید شده توسط لنفوسیت‌های جداشده از غدد لنفاوی مزاتریک حفره صفاقی و طحال موش‌های BALB/c که یک هفته از آلودگی آنها به لارو Taenia crassiceps گذشته بود، نشان داد که شروع پاسخ‌های ایمنی با افزایش γ IFN همراه بوده است، ولی بلافاصله مقدار γ IFN کاهش یافته و مقدار IL10 افزایش یافته است (۸).

مطالعات تجربی در موش‌های BAIB/c با حذف ماکروفاژها انجام گرفته و دیده شده که این سلول‌ها در ایمنی بر علیه H.nana دخالت دارند (۱۰).

در مطالعه حاضر در همبستگی بین سایتوکاین‌های مترشحه از یک نوع سلول (Th1 یا Th2) و بین سایتوکاین‌های دوسلول (Th1 و Th2) در افراد آلوده به H.nana مشاهده نگردید (جدول ۲). در حالی که در پاسخ‌های ایمنی، سلول‌های Th1 و Th2 همدیگر را تنظیم می‌کنند و می‌بایستی بین سایتوکاین‌های ترشح شده توسط Th1 و Th2 همبستگی منفی و بین سایتوکاین‌های هر کدام از انواع Th1 یا Th2 ارتباط مثبت برقرار باشد (۱۳). نتایج حاضر ممکن است به خاطر ایمونوبیولوژی H.nana به دست آمده باشد. این سستود به دلیل این که می‌تواند هر دو مرحله سیکل زندگی بافتی و داخل روده‌ای خود را (خود آلودگی) به صورت هم‌زمان در

37(3-4):393-403.

4) Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001; 32(1):76-102.

5) Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Corrêa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine profiles in Ascaris lumbricoides and Trichuris trichiura infected patients. *Parasite Immunol.* 2002; 24(11-12):499-509.

6) Artis D. New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of

gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol.* 2006;36(6):723-33.

7) Asano K, Muramatsu K. Importance of interferon-gamma in protective immunity against *Hymenolepis nana* cysticercoids derived from challenge infection with eggs in BALB/c mice. *Int J Parasitol.* 1997; 27(11):1437-43.

8) Toenjes SA, Kuhn RE. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. *Parasitol Res.* 2003; 89(5):407-13.

9) Conchedda M, Bortoletti G, Gabriele F, Wakelin D, Palmas C. Immune response to the cestode *Hymenolepis nana*: cytokine production during infection with eggs or cysts. *Int J Parasitol.* 1997; 27(3):321-7.

10) Asano K, Okamoto K. Murine T cell clones specific for *Hymenolepis nana*: generation and functional analysis in vivo and in vitro. *Int J Parasitol.* 1991; 21(8):891-6.

11) Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11(4):420-6.

12) Mizuno Y, Takada H, Nomura A, Jin CH, Hattori H, Ihara K, et al. Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection. *Clin Exp Immunol.* 2003;131(1):111-7.

13) Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Fifth Ed. Philadelphia. Pennsylvania. Elsevier, Saunders company. 2005; pp:243-274.

14) Bhagwant S. Host-tissue reactions and cellular responses to initial and super-imposed *Hymenolepis nana* (cestoda) low level infections in male swiss albino mice. *Science and technology-research Journal.* 1999; 4: 26-37.