بررسی اثر سوختگی بر سیستم ایمنی سلولی انسان

پرویز کوخایی ۱*(M.Sc)، زهیر محمد حسن ۲ (Ph.D)، حسین مطیعیان ۳ (Ph.D)،
فاطمه پاک ۴ (M.Sc)

۱ – دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، بخش ایمونولوژی

۲ – دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، بخش ایمونولوژی

۳ – انستیتو پاستور ایران، بخش کشت سلول

۴ – سازمان انتقال ایران، بخش ایمونولوژی

خلاصه

سابقه و هدف: علی‌رغم پیشرفت زیاد در تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، هنوز عفونت عامل اصلی مرگ و میر در سوختگی‌ها است. این موضوع ناشی از تخریب پوست به عنوان اولین سد دفاعی بدن در ضایعه سوختگی و تغییراتی است که در سیستم ایمنی بیمار سوخته ایجاد می شود. هدف این مطالعه بررسی اثر سوختگی بر سیستم ایمنی سلولی است.

مواد و روش‌ها: دو گروه افراد مورد بررسی قرار گرفتند: گروه بیمار شامل ۱۸ نفر بود که ۲۰ تا ۶۰ درصد سطح کل بدن آنها دچار سوختگی شده بود و گروه کنترل که شامل ۲۲ نفر فرد سالم بود. میانگین سن بیماران و گروه کنترل ۳۲ سال و به نسبت مساوی از هر دو جنس بودند. برای بررسی فعالیت سیستم ایمنی سلولی، میزان پرولیفراسیون لنفوستی‌های T (Lymphocyte transformation test, L.T.T) و HLA-DR به عنوان مارکر فعالیت سلولی و CD_3، CD_4 و CD_8 به عنوان تعیین کننده‌های نوع سلول با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال و فلوسایتومتری اندازه‌گیری شدند.

یافته ها: نتایج نشان می دهد که L.T.T در بیماران سوخته نسبت به افراد سالم کاهش معنی داری ($P<۰/۰۰۱$) نشان می‌دهد. همچنین تعداد کل لنفوسیت‌های خون محیطی در بیماران سوخته در مقایسه با افراد سالم کاهش معنی داری ($P<۰/۰۰۱$) نشان می‌دهد. بین تعداد لنفوسیت‌های B و لنفوسیت‌های TCD_8^+ در بیماران سوخته و افراد سالم تفاوتی نداشت. میزان بروز مارکر HLA-DR در بیماران سوخته افزایش معنی داری نشان می‌دهد ($P<۰/۱$) و نهایتاً بین نسبت CD_4/CD_8 و CD_3/HLA-DR در دو گروه تفاوت معنی دار وجود داشت ($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه گیری: یافته های فوق نشان می دهند که در طی سوختگی شدید، تعداد کل و میزان فعالیت لنفوسیت های T خون محیطی، مارکرهای CD_3 و CD_4 و نسبت لنفوسیت های CD_4/CD_8 کاهش شدیدی پیدا می کند ولی تعداد لنفوسیت های B و TCD_8 تغییری نمی کند.

واژه‌های کلیدی: سوختگی؛ پاسخ ایمنی سلولی؛ تست تکثیر لنفوسیتی؛ فلوسایتومتری

* نویسندهٔ مسئول. تلفن: ۳-۳۱۵۵۲، فاکس: ۳۱۵۵۱

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مقدمه

تخریب بافت در سوختگی نتیجه منعقد شدن، از بین رفتن ساختمان پروتئین‌ها یا یونیزاسیون محتویات درون سلولی می‌باشد. اولین اثر سوختگی گشاد شدن مویرگ‌ها و رگ‌های کوچک در ناحیه سوختگی است که سبب ورود پلاسما به داخل بافت‌های مجاور و تشکیل خیز می شود.

عفونت‌ها عامل ۵۰ تا ۷۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از سوختگی می‌باشند [۸]. در بیماران سوخته مراقبت‌های درمانی دقیق و بستری کردن بیماران در بخش‌های نیمه استریل نیز مانع عفونی شدن زخم‌ها نمی‌شود. بافت سوخته مانند غربالی موجب خروج پروتئین‌ها از عروق شده و ادم و کاهش حجم پلاسما را موجب می‌شود. همچنین بافت سوخته محیط مغذی مناسبی برای رشد و تکثیر انواع استافیلوکوک‌ها، استرپتوکوک‌ها، سودوموناس آئروژنوزا، قارچ کاندیدا و عفونت هرپس می‌باشد [۱۱]. در عارضه سوختگی به علت تخریب پوست و نیز تضعیف سیستم ایمنی، بیمار سوخته مستعد ابتلاء به شدیدترین سپتیسمی‌ها می‌شود [۱]. علاوه بر عوامل میکروبی که در پوست سوخته به راحتی تکثیر و گسترش می‌یابند و برای میزبان مضر می‌باشند، ترکیبات آزاد شده از بقایای بافت‌های خودی نیز اثرات سوئی بر سیستم‌های حیاتی میزبان دارند. به همین دلیل درسوختگی‌ها غالباً با برداشتن بافت سوخته و جایگزین نمودن آن با پوست سالم خودی (پیوند اتوگرافت) از این ضایعه جلوگیری می شود.

در طی سوختگی سیستم ایمنی دچار تغییرات شدیدی می شود. نشان داده شده است که در طی سوختگی غلظت اجزاء $C_3.C_2.C_1$ و C_4 سیستم کمپلمان تا ده برابر میزان نرمال کاهش می‌یابد و میزان CH_{50} در بیمارانی که ۹۰-۳۰ درصد سوختگی داشته‌اند ۴۹ درصد میزان نرمال است [۱۲]. فعالیت سلول‌های بیگانه خوار تک هسته‌ای کبد و خون متعاقب سوختگی کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند [۴].

کمپلکسهای لیپو پروتئینی آزاد شده از زخم سوخته مونوسیت‌ها را وادار به ترشح IL-۱ می‌کنند و افزایش IL-۱ آثار متعددی از جمله کاهش ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های T را موجب خواهد شد [۷]. همولیز زیاد خون در اثر سوختگی، توان سلول‌های فاگوسیتوز کننده را اشباع می‌کنند و توانائی فعالیت فاگوسیتوزی آنها را کاهش می دهد [۴]. از آنجائی که تزریق مونوسیت‌های نرمال سینژنیک گرفته شده از موش‌های نرمال به موش‌های سوخته، سیستم ایمنی را در موش‌های سوخته بهبود می‌بخشد [۱۳]، احتمالاً جایگاه مهم آسیب پذیری سیستم ایمنی سلولی مونوسیت‌ها می‌باشند.

میزان فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها و قدرت تولید H_2O_2 و سیستم میلوپراکسیداز این سلول‌ها در بیماران سوخته دچار اختلال می شود[۲]؛ در مورد سلول‌های کشنده طبیعی، بررسی‌ها حاکی از کاهش توانایی کشندگی این سلول‌ها می‌باشد در حالی که تعداد این سلول‌ها در خون محیطی تغییری را نشان نمی‌دهد[۵]. نشان داده شده است که فعالیت سلول B و میزان تولید آنتی‌بادی توسط آنها در طی سوختگی کاهش مشخصی را نشان می‌دهد؛ این کاهش در پاسخ ثانویه مشهودتر است که همراه با آن میزان تولید IL-۲ در بیماران افت پیدا می‌کند. این مشاهده بیانگر نقش اساسی فعالیت سلول T در فعالیت سلول B می‌باشد[۹].

تا کنون مطالعه زیادی در زمینه اثرات سوختگی بر سیستم ایمنی سلولی انجام نشده است، از این رو دراین مطالعه میزان کل لنفوسیت‌ها، میزان لنفوسیت‌های T و جمعیت‌های فرعی آن و نیز میزان تحریک و تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

گروههای مورد مطالعه. دوگروه افراد مورد بررسی قرارگرفتند: گروه بیمارکه شامل ۱۸ نفر بود که ۲۰ تا ۶۰ درصد سطح کل بدن آنان دچار سوختگی شده بود و در بیمارستان شهید مطهری تهران بستری بودند و گروه کنترل که شامل ۲۲ نفر فرد سالم بودند که جهت انجام آزمایشهای خون به سازمان انتقال خون تهران مراجعه کرده بودند. میانگین سنی گروه بیمار و کنترل ۳۲ سال و از هر دو جنس به نسبت مساوی بوده‌اند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

تهیه نمونه خون : چهار روز بعد از سوختگی 5cc خون محیطی از ورید فمورال گرفته می‌شد و در لوله‌های استریل دارای هپارین (15 µ) به آزمایشگاه منتقل می شد. همین مقدار خون از گروه کنترل نیز گرفته شد.

روش بررسی فعالیت سیستم ایمنی سلولی.

الف ـ تست تکثیر لنفوسیتی (transfromation test) L.T.T (Lymphocyte این تست میزان تکثیر لنفوسیت های خون محیطی را اندازه گیری می کند. برای انجام آن، 4cc خون کامل را به آرامی در زیر هود استریل کشت سلول روی 2cc فایکول ریخته و در دور 2500 (400G) به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با پیپت پاستور بافی کوت را برداشته و در دور 1500 به مدت 10 دقیقه با بافر هنکس شستشو داده شد و در ادامه مایع رویی را دور ریخته و سلولهای رسوب کرده را در حجم یک سی سی با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. سپس بامحلول RPMI واجد 20٪ سرم +AB انسانی و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین، تعداد سلول‌هابه پانصد هزار در سی‌سی رسانده شد. سپس با اختصاص هر ردیف پلیت کشت سلول به یک نمونه، به هر کدام از چاهکها 100 هزار سلول اضافه شد. در ادامه به سه چاهک دوم 2 میکروگرم PHA و به سه چاهک سوم 1 میکروگرم PHA افزوده گردید. سپس به مدت 48 ساعت در انکوباتور CO_2 ودمای 37 درجه و رطوبت کافی انکوبه نموده و به هر کدام از چاهکها2 میکرولیتر تایمیتدین نشاندار اضافه شد و بعد از 16- 4 ساعت نمونه را هاروست کرده و جذب نمونه‌هابا دستگاه بتاکانتر خوانده شد و میزان پرولیفراسیون سلولی با استفاده روش های استاندارد [2 و 13] محاسبه شد.

ب- آنالیزفلوسایتومتری: در این روش با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال anti CD_8 ،HLA-DR anti CD_3 ، anti CD_4 و آنتی‌بادی کنترل، مارکرهای سطحی CD_3،CD_4،CD_8، CD_{19} و HLA-DR اندازه‌گیری شدند. 1cc از خون کامل به مدت 30 دقیقه با 10 میکرولیتر آنتی‌بادی مورد نظر در دمای 4C انکوبه شد و سپس با دستگاه مخلوط کننده مخصوص که به طور اتوماتیک محلول‌های فیکس کننده غشا سلول و لیز کنندهٔ RBC را اضافه می‌کند نمونه برای بررسی مارکرهای سطحی آماده گردید. با استفاده از نمونه کنترل، محدوده معتبر اندازه‌گیری فلورسانس نمونه‌های بیماران با دستگاه اندازه‌گیری شد. دستگاه برحسب میزان فلورسانس تابشی از هر سلول، میزان مارکرهای سطحی و تعداد سلولهای دارای آن مارکر را نشان می‌دهد.

روش‌های آماری. برای مقایسه میانگین پارامترهای مورد مطالعه، از آزمون آماری t دانشجویی استفاده شد و مقادیر $P<0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

۱- میزان پرولیفراسیون لنفوسیت‌های T خون محیطی در گروه بیمار 40٪ افراد سالم بود که آنالیز آماری تفاوت معنی داری را ($P<0/001$) نشان می‌دهد. همچنین تعداد کل لنفوسیت‌های خون محیطی در بیماران سوخته در مقایسه با افراد سالم کاهش معنی داری ($P<0/001$) نشان می‌دهد.

۲- جدول 1 میانگین مارکرهای سطح سلولی گروه سالم و بیمار رانشان می‌دهد. مقایسه مارکرها نشان می‌دهد که به جز در دو مارکر CD_{19} و TCD_8 که بین گروه بیمار و سالم تفاوتی وجود ندارد در سایر مارکرهای مورد مطالعه CD_3، CD_4، CD_8 و HLA-DR تفاوت معنی داری ($P<0/001$) بین دو گروه وجود دارد. همچنین نسبت CD_4/CD_8 و CD_3/HLA-DR در دو گروه تفاوت معنی دار داشت ($P<0/001$).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

جدول ۱. میانگین ± انحراف معیار (بر حسب درصد) شاخصهای سطح سلول در آنالیز فلوسایتومتری

گروههای مورد مطالعه / شاخص‌ها	بیمار (درصد)	سالم (درصد)
CD_3	۵۷±۱۳*	۶۷±۵
CD_4	±۸/۶*	۴۷±۷/۳
CD_8	۲۳±۵/۷	۲۴±۹
CD_4/CD_8	۱/۴۶±۰/۳۹*	۱/۹±۰/۵
HLA-DR	۲۴±۷/۹*	۱۸/۳±۶
CD_3/HLA-DR	۱/۸۴±/۷*	۱/۳۵±۰/۶
CD_{19}	۳۲±۱۴	۱۶±۴/۲
lymphocyteTotal	۱۸±۶/۷*	۳۵±۷/۶

(P<۰/۰۱)* در مقایسه با کنترل

بحث

مهم‌ترین یافته‌های این مطالعه عبارتند از: (۱) در طی سوختگی شدید تعداد کل و میزان فعالیت لنفوسیت های T خون محیطی کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد، [۲] مارکرهای CD_3وCD_4 و نسبت لنفوسیت‌های CD_4/CD_8 کاهش شدیدی پیدا می‌کند ولی تعداد لنفوسیت های B و TCD_8 تغییری نمی‌کند.

شیوع عفونت‌هامختلف در بیماران سوخته فقط به علت تخریب پوست به عنوان اولین سد دفاعی و فراهم شدن محیط مناسب رشد عوامل پاتوژن نیست بلکه تضعیف سیستم ایمنی خصوصاً بازوی سلولی آن عامل مساعد کننده وضعیت برای تکثیر باکتری‌ها ،قارچ‌ها و ویروس‌ها می‌باشد . نتایج ما نشان می‌دهد که تعداد و میزان لنفوسیت‌های T در این بیماران کاهش معنی دارای پیدا می‌کند که موافق نتایج دیگران می‌باشد [۹]. این کاهش به دلیل بروز التهاب گسترده و افزایش مولکول‌های چسبنده در سطح این سلول‌ها می‌باشد که موجب جذب این سلول‌ها به ارگان‌های لنفاوی (طحال، غدد لنفاوی موضعی) می‌شود. بررسی میزان سلول‌های CD_3 و CD_4 نشان می‌دهد که کاهش قابل توجه‌ای در این لنفوسیت‌ها در طی سوختگی ایجاد می‌شود. از این رو می‌توان گفت که سرکوب پاسخ ایمنی متعاقب سوختگی تا حد زیادی ناشی از کاهش لنفوسیت‌های CD_4+ و CD_3 می‌باشد.

نظر به اینکه نسبت صحیح $\frac{CD_4}{CD_8}$ بیانگر سلامت سیستم ایمنی است و در طی نقص سیستم ایمنی این نسبت تغییر می‌کند [۷]، مطالعه این نسبت در سوختگی حائز اهمیت است. نسبت لنفوسیت‌های $\frac{CD_4}{CD_8}$ در طی سوختگی کاهش معنی داری نشان می‌دهد. یافته ما نتایج Omahony و همکارانش را تائید می‌کند [۷] ولی با یافته‌های Zedler و همکاران مبنی بر عدم تغییر معنی دار در نسبت $\frac{CD_4}{CD_8}$ در طی سوختگی موافق نیست [۱۴]. دلیل این تناقض روشن نیست ولی ممکن است تا اندازه‌ای مربوط به روش کار باشد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که مارکر HLA-DR (که یک مارکر فعالیت در سلول می‌باشد) در طی سوختگی زیاد می‌شود. مطالعات Suhlater در مورد سایر مارکرهای اکتیواسیون CD25 و CD69 و CD70 نیز افزایش این مارکرها را در سطح سلول‌های بیماران سوخته نشان می‌دهد [۱۰]. بررسی قدرت پرولیفراسیون لنفوسیت‌های T در محیط invitro در تحریک با فیتوهماآگلوتینین کاهش معنی داری را نسبت به افراد نرمال نشان می‌دهد. در محیط کشت لنفوسیتی، هیستامین موجب تولید ترکیبی به نام HSF (Histamin induced suppressor factor) می‌شود. این ترکیب که گلیکوپروتئینی به وزن 25KD می‌باشد احتمالاً با اثر بر مونوسیت‌ها و تحریک تولید PGE2 موجب سرکوب پاسخ ایمنی می‌شود [۳].

عامل دیگر سرکوب پاسخ ایمنی احتمالاً ترشح میزان زیاد IL-۱۰ می‌باشد که در مطالعه Zedler و همکاران گزارش شده است [۱۴]. مشاهده بروز مارکرهای فعالیت همراه با کاهش میزان پرولیفراسیون بیانگر این موضوع می‌باشد که لنفوسیت‌های T تا مرحله‌ای از فعالیت که بروز رسپتورهای خاص می‌باشد پیش رفته‌اند ولی مرحله بعد از آن که تکثیر سلول‌ها می‌باشد مهار شده است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

منابع

[1] Bjornson, A.B., Complement and the immune response to bacterial infection in burned patiens, Ann. Surg., 191 (1980) 323-9.

[2] Byerknes, R., Altered neutrophil function in patients with large burns, Blood Cells, 16 (1990) 127-143.

[3] Dennis, J.B., The Influence of histamine on immune and inflammatory responses, Advan. Immunolo., 35 (1984) 208-268.

[4] Hans-brought, J.F., Post burn immune suppresion in an animal model: monocyte dysfunction induced by burned tissue, Surgery, 416 (1983) 93-98.

[5] klipel, G.R., Defective NK cell activity following thermal injury, Exp.Immunolo, 66 (1986) 384-342 (1986).

[6] Menen,T. and Omahony J.B., Kinetics of peripheral blood T cell numbers and functions in patients with burns, J. Trauma 24 (1994) 220-223(1994).

[7] Omahony, J.B., Changes in T lymphocyte subsets following injury, Ann. Surg., 25 (1985) 580-586.

[8] Robbins, K.C. and Kumuar, V., Inflammation and repair, In:R.S. Cotran, V. Kumar, and T. Collons (Eds), Robbins pathologic basis of disease, Sixth Edition, W.P. Saunders Company, Philadelfia, 1999, pp.50-89.

[9] Schlute, B., Studies on B lymphocyte dysfunction in severely burned patient, J. Trauma, 11 (1990) 1380-1380.

[10] Schlute, B. and Smath, J. Differention of T and B Lymphocytes activation in severely burned patients, J. Trauma, 31 (1991) 233-236 (1991).

[11] Sevit, S. A. Review of complications of burns, their origin and importance for illness and death J. Trauma, 19 (1989) 358 -369.

[12] Solomlcin, A. and Golfanel, J.A, Infection in burn patient at risk, Am. J. Med., 15(1993) 158-165.

[13]Teodorczyk, J.A., Immunosuppression follows systemic T Lymphocyte activation in the burn patient, Clin. Exp.Immunol., 85 (1991) 515-518.

[14] Zedler, S., Bone, R.C., Baue, A.E., Von-Donnersmarck, C.H. and Faist,E. Postburn constitutional changs in T cell reactivity occur in CD8 rather than in CD4 cells, Crit.Care Med., 27 (1999) 66-72.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

The effect of burn on cell mediated immunity

P. Kokhaei [*1] (M.Sc), Z.M. Hassab [2] (Ph.D), H.Motieyan [3] (Ph.D), F. Pak [4] (M.Sc)

[1] Department of Immunology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences,Semnan, Iran
[2] Department of Immunology, School of Medical, Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
[3] Department of Cell Culture,Pastur Institute of Iran, Tehran, Iran.
[4] Department of Immunology, Iran Blood Transfusion Organnization, Tehran, Iran.

Introduction. In spite of new development in antibiotic production, infections are the main causes of death after burn injuries. This is due to skin destruction as the first defense barrier abd alteration in immune status of the burn patient. In this study, the effect of burn on cell mediated immunity was studied.

Material and Methods. Two groups were studied: experiental group consisting of 18 patient (9 men and 9 woman) with 20-60% burn of total body surface are and control group consisting 22 (11 men and 11 woman) healthy persons. The average age of both group was 32 years and in each group subjects were equal of boyh sexes. Immune status was evaluated by T lymphocyte transformation test (L.T.T) and HLA-DR as a cell activation marker and also cell surface marker such as CD3, CD4 and CD8 which are measured by monoclonal antibody and flowcytometric analysis.

Results. L.T.T of burned patients was significantly decrased in comparison of control group ($P<0.0001$). The total number of peripheral bloob lymphocytes of burned patients was significantly lower than that of control group ($P<0.001$).There was no significant difference in number of B and TCD8 lymphocytes between two groups. Experssion of HLA marker was significantly incrased in patient group ($P<0.01$). Finally, there was significant difference between ratios of CD3 to CD8 and CD3 to HLA-DR in two groups ($P<0.001$).

Conclusion. The above results show that after severe burn, total number and activity of peripheral blood T-lymphocyte, CD3, CD4 and ratio ot CD4 to CD8 dramaticaly decreas but the number of B and TCD8 lymphocytes dont change.

Key words: Immunity, Burn, T-cells, B-cells

* Corresponding authour. Fax: 0231- 31551; Tel:0231-32080

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]