

Bruselloz olgularında sitokin düzeyleri

Kemal Avşar*, Onur Kaya**, Recep Sütçü***, Medine Cüre****.

*Gülkent Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Isparta.

**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Isparta.

***Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Isparta.

****Safranbolu Devlet Hastanesi Biyokimya AD, Isparta.

Özet

Bu çalışmada komplikasyon gelişen ve komplikasyon gelişmeyen bruselloz olgularında takipte kullanılacak sitokin benzeri bir parametre bulunması amaçlanmıştır. Yirmiiki komplikasyonlu, 18 komplikasyonsuz bruselloz hastası ile yaş, meslek, cinsiyet açısından benzer olan 40 sağlıklı erişkin çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışma gününde bruselloz olgularının tedavi öncesi serumları ile kontrol grubunun serumlarında IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiş olup, gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U ve student' s t testi kullanılmıştır. Hasta grubundaki IFN- γ düzeylerinin daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,011). Komplike olgular grubundaki TNF- α düzeylerinin komplikasyonsuz grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,013). Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara dayanarak komplike olgularında TNF- α düzeylerinin dikkate alınması gerektiği inancındayız. Hasta grubunda IFN- γ düzeylerinin yüksek bulunması literatürdeki verilere benzer şekilde brusellozda Th1 tip hücresel immün yanıtın daha ön planda olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Bruselloz, immunité, sitokin

Abstract

Cytokine levels in brucellosis

In this study, we aimed that complicated, non-complicated cases of brucellosis have follow-up was to be used in a parameter-like cytokine. Twenty-two complications, 18 patients with uncomplicated brucellosis and age, occupation, gender-matched 40 healthy adults enrolled in the study. The study of cases of brucellosis on the day before the treatment and control group sera sera of IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ levels were determined by ELISA method, comparisons between groups Mann-Whitney U and Student's t test was used. IFN- γ levels in the patient group was higher and statistically significant (p = 0.011). TNF- α levels in the group with complications compared with the uncomplicated group was higher and statistically significant (P=0.013). Based on the results of our study, we found TNF- α levels in patients with complicated brucellosis believe should be taken into account. To find high levels of IFN- γ in patient group similarly literature data suggested that Th1-type cellular immun response is foreground for brucellosis.

Key Words: Brucellosis, immunity, cytokine

Giriş

Bruselloz temelde bir hayvan hastalığı olup, enfekte hayvanların etleri, sütleri, idrar, vücut sıvıları, gebelik materyali, enfekte süt ile hazırlanan süt ürünleri aracılığı ile insanlara bulaşan zoonozdur (1). Hastalığın seyri sırasında bir çok organ ve sistem etkilenebilmektedir.

Komplikasyonla seyreden bruselloz olgularının %20-60'ında osteoartiküler tutulum gözlenirken,

Yazışma Adresi: Uz. Dr. Kemal Avşar
Gülkent Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Isparta
E-mail: drkavsar@hotmail.com

Müracaat tarihi: 05.07.2011
Kabul tarihi: 01.12.2011

gastrointestinal sistem, santral sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, genitouriner sistem, hematolojik sistem ve deri tutulumu daha nadir gözlenmektedir (2). Brusellozun patogeneğinde immün sistemin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. T helper (Th1/Th2) dengesi bruselloza direnç veya duyarlılığın oluşmasında, sitokinler ise brusellozun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadırlar (3). Farelerde yapılan çalışmalarda, brusellozda Tip 1 (Th1) hücresel immün yanıtın uyarıldığı gösterilmiştir. Tip 1 hücresel yanıt hastalığın başlangıcında üretilen tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interferon gama

(IFN- γ), interlökin-12 (IL-12) nin kontrolü altında gelişmektedir (4). Virulan *Brucella* türlerinin eliminasyonu Th1 tip immünite yolu ile oluşan makrofaj aktivasyonu ile gerçekleşir. Makrofajların antibrusella aktivite göstermesinde rol oynayan temel sitokinler TNF- α , TNF- γ , IL-1 ve IL-12'dir (5). Bu durumda brusellozun komplike seyretmesinde immun sistemin rolünün olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda komplikasyonlu ve komplikasyonsuz bruselloz olgularında, kontrol grubu ile karşılaştırmak suretiyle sitokin düzeylerini araştırdık. Böylece brusellozun takibinde immun değişiklikler açısından yeni kriterler elde etmeyi hedefledik.

Materyal Metod

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji servisinde takip edilen bruselloz tanısı konulmuş komplikasyonlu ve komplikasyonsuz olarak iki gruba ayrılan hastalardan alınan tedavi öncesi serumları ve hasta grubu ile yaş, cinsiyet, meslek özellikleri bakımından benzer olan kontrol grubundan alınan serum örneklerinde yapılmıştır. Tedavi öncesi hasta grubundan ve kontrol grubundan alınan serum örnekleri, çalışılacağı güne kadar -80 °C'de saklanmış olup ELISA yöntemi ile IL-10 (7,8-500 pg/ml), IL-6 (7,8-500 pg/ml), TNF- α (15,6-1000 pg/ml), IFN- γ (15,6-1000 pg/ml), IL-2 (15,6-1000 pg/ml) (İnvitrogen®) düzeyleri pikogram/ml cinsinden belirlenmiştir.

Bruselloz tanısı klinik belirti ve bulgularla beraber standart tüp aglutinasyon testinde (STA) 1/160 ve üzeri titrenin olması ve/veya kan veya diğer vücut sıvılarında *Brucella* bakterilerinin üretilmesi ile konulmuştur. STA yönteminde antijen olarak Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan antijen kullanılmıştır.

Komplikasyonlu hasta grubunda; hematolojik tutulum gösteren olgularda; Hemogloblin (Hb) değerinin bayanlarda <12 g/dl erkeklerde <14 gr/dl olması anemi, lökosit düzeyinin <4000/ mm³ olması lökopeni, >12000/ mm³ olması lökositoz, trombosit düzeyinin <150000/ mm³ olması trombositopeni, >450000/ mm³ olması trombositoz olarak tanımlandı. Gastrointestinal sistem tutulumu gösteren olgularda; hepatomegali, dalak apsesi, splenomegali, komplikasyonlu gruba dahil edildi. Osteoartiküler tutulumu olan olgular; sakroileit, periferik artrit, spondilit, osteomyeliti olan vakalar olarak belirlendi. Kardiyovasküler sistem tutulumu gösteren olgularda endokardit komplikasyonlu gruba dahil edildi. SSS

tutulumu gösteren menenjit olguları komplikasyonlu gruba dahil edildi. Genitoüriner sistem tutulumu gösteren olgularda epididimoorşit, salpenjit, pelvik apse tanısı konulan hastalar komplikasyonlu gruba dahil edildi. Solunum sistemi tutulan olgularda ise plevral effüzyon, bronkopnömoni tanısı konulan olgular komplikasyonlu gruba dahil edildi.

Sonuçlar

1-) Hasta ve kontrol grubu arasında sitokin düzeylerinin ortalama değerleri student's t testi ile değerlendirildi. Test sonucuna göre hasta ve kontrol grupları arasında IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken; hasta grubundaki IFN- γ düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür p=0.011; Tablo 1. Hasta grubunda IL-6, IL-10 düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi p=0,442; p=0,897.

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarında sitokin düzeyleri

	Sayı n	Ortalama değer (pg/ml)	Standart sapma (pg/ml)	p
Hasta grubu IL-10 düzeyi	40	119.39	402.51	0.897
Kontrol grubu IL-10 düzeyi	40	109.04	303.79	
Hasta grubu IL-6 düzeyi	40	46.31	189.29	0.442
Kontrol grubu IL-6 düzeyi	40	22.95	25.58	
Hasta grubu IL-2 düzeyi	40	21.06	3.47	0.490
Kontrol grubu IL-2 düzeyi	40	21.77	5.45	
Hasta grubu TNF- α düzeyi	40	339.81	328.72	0.438
Kontrol grubu TNF- α düzeyi	40	395.63	310.82	
Hasta grubu IFN- γ düzeyi	40	99.23	153.24	0.011
Kontrol grubu IFN- γ düzeyi	40	35.67	12.6	

2-) Komplike olgular ve komplikasyonsuz hasta grupları IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ düzeyleri açısından istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Her iki grup arasında IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Komplike olgular grubundaki TNF- α düzeylerinin komplikasyonsuz grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü p=0.013. Diğer taraftan komplike olgular grubunda IL-10, IL-6, IFN- γ düzeylerinin daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olmadığı saptandı Tablo 2.

Tablo 2. Komplike ve komplike olmayan hasta gruplarında sitokin düzeyleri

	Sayı	Ortalama değer (pg/ml)	Standart sapma (pg/ml)	p değeri
Komplike grup IL-10	22	194.70	535.78	0.568
Komplikasyonsuz IL-10	18	27.34	27.59	
Komplike grup IL-6	22	70.60	254.67	0.220
Komplikasyonsuz IL-6	18	16.61	19.82	
Komplike grup IL-2	22	21.01	3.79	0.754
Komplikasyonsuz IL-2	18	21.12	3.15	
Komplike grup TNF- α	22	458.71	357.93	0.013
Komplikasyonsuz TNF- α	18	194.5	221.33	
Komplike grup IFN- γ	22	115.35	203.40	0.634
Komplikasyonsuz IFN- γ	18	79.53	44.93	

Tartışma

Brusella enfeksiyonlarına karşı gelişen konak immün yanıtlarından antijen spesifik T hücre aktivasyonu; CD4, CD8 T hücreleri, humoral immün cevap rol oynamaktadır (6). Bununla birlikte asıl koruyucu immün yanıt hücrel immünitedir. Hücrel bağışıklıkta temelde iki tip reaksiyon rol oynar. T hücre kökenli sitokinler, mikroorganizmaların öldürülmesine yol açarken, diğer taraftan CD8 sitolitik T lenfositleri yolu ile enfekte hücrelerin lizisi gerçekleşir (7).

Brucella abortus enfeksiyonlarında konak savunmasının primer olarak Th1 tip immün cevap yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. *B. abortus* konak antijen sunan hücrelerinden IL-12 salınımını tetikleyerek Th0 hücrelerinin IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerine dönüşmesini sağlayarak makrofaj öldürme mekanizmalarını aktive etmektedir. Bununla birlikte IFN- γ sentezleyen CD8+ sitotoksik T hücreleri de *B. abortus* ile enfekte makrofajları öldürebilir (6). Sitokinlerin *B. abortus*' un hücre içi ortamdaki gelişimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada deneysel olarak fare makrofajları kullanılmış olup, IL-1- α , IL-4, IL-6, TNF- α , GM-CSF sitokinlerinin *B. abortus* 19 suşunun hücre içi gelişimine bir etkisi olmadığı, buna karşın IL-2 veya IFN- γ makrofaj kültür ortamına eklendiğinde intrasellüler bakteri sayısında anlamlı bir düşme olduğu gözlenmiştir (8). Farelerde elde edilen bu sonuçlar, Kamruddin ve arkadaşlarının insanlarda yaptıkları çalışma ile benzer olup insanlarda da Th1 aracılı immün yanıtın brusellozda dominant olduğunu göstermektedir (9). Bizim çalışmamızda da buna benzer şekilde Th1 kökenli sitokin olan IFN- γ hasta grubunda anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur.

B. abortus enfeksiyonuna karşı konak immün yanıtının Th1 tip immün cevap yolu ile olduğu düşünülmektedir. Th1 hücrelerinden IFN- γ dışında diğer salgılanan sitokin IL-2'dir (6,10). Bu çalışmada hasta ve kontrol grupları arasında IL-2 düzeylerinin ortalamaları benzerdi ve anlamlı bir fark yoktu ($p=0,490$). Aynı şekilde Kamruddin ve arkadaşlarının (9), yaptığı çalışmada da benzer şekilde hastalarda IL-2 düzeyinin tespit edilemeyecek derecede olduğu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Diğer taraftan hasta grubunda IL-12 ve IFN- γ düzeylerinin yüksek olduğu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olduğu bildirilmiştir. Galanakis ve arkadaşlarının (11) yaptığı bir çalışmada ise çocuklarda tedavi öncesi ve sonrasında serum IL-2 ve IL-2 reseptör alfa düzeyleri belirlenmiş olup, tedavi öncesinde ve sonrasında kontrol grupları ile kıyaslandığında serum IL-2 düzeylerinin anlamlı bir fark oluşturmadığı, serum IL-2 reseptör alfa düzeylerinin ise tedavi öncesinde kontrol grubundan anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada hasta grubunda serum IL-10 ve IL-6 düzeyleri daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer taraftan serum TNF- α düzeyi kontrol grubunda daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Buna benzer olarak Kamruddin ve arkadaşlarının (9) çalışmalarında da akut brusellozlu hastalarda TNF- α düzeyinin yüksek olmadığı bildirilmiş olup, *Brucella* suşlarının TNF- α 'yı indüklediği öne sürülmüştür. Th1 ve Th2 hücreler birbirlerinin fonksiyonlarını karşılıklı olarak regüle ederler. Th2 hücrelerde yapılan IL-4 ve IL-10, Th1 hücrelerini inhibe ederken, Th1 hücrelerde yapılan IFN- γ , Th2 hücrelerini inhibe eder. İnflamatuar ve immün yanıtlar Th1 hücrelerince oluşturulurken, humoral immün yanıtlar ve allerjik yanıt Th2 hücrelerince oluşturulur (12). Çalışmamızda Th2 hücreleri tarafından salınan bir sitokin olan IL-10, hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda IL-10 düzeyi ortalama değeri daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer taraftan Tip 1 hücrel immünitenin göstergesi olan IFN- γ hasta grubunda daha yüksek ve anlamlı bulunmuştur ($p=0.011$). Biz bu çalışmada komplikasyon gösteren ve komplikasyon göstermeyen bruselloz olgularında serum IL-10, IL-6, IL-2, TNF- α , IFN- γ düzeyleri açısından anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek üzere hasta grubunu komplikasyonlu ve komplikasyonsuz olmak üzere iki gruba ayırdık ve ELISA yöntemi ile serum sitokin düzeylerini

belirledik. Komplikeşyonlu hasta grubunda serum IL-6, IL-10, IFN- γ düzeylerinin daha yüksek bulunmasına karşı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Serum IL-2 düzeyleri ise her iki grupta benzerdi. Komplikeşyonlu grupta serum TNF- α düzeyleri ise daha yüksek ve anlamlı bulundu ($p=0.013$).

Literatürde Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz bruselloz olgularında sitokin düzeyleri ile ilgili benzer bir çalışma bulunamadı. Bu nedenle çalışmamızda komplikeşyon gösteren olgularda TNF- α düzeyinin daha yüksek istatistiksel olarak anlamlı bulunmasını destekleyecek bir veriye ulaşamadı. TNF- α makrofaj aktivasyonu ile bruselloza karşı oluşan hücreşel immunité de önemli bir sitokindir (5). Komplikeşyon gösteren bruselloz olgularında TNF- α düzeyinin belirlenmesi yararlı olabilir. Çalışmamızda literatürdeki verilere benzer bir şekilde hasta grubunda IFN- γ düzeylerinin yüksek olması brusellozda Th1 tip hücreşel immün yanıtın daha ön planda olduğunu desteklemektedir.

Kaynaklar

1. Baysal B. Brucella. Ustaçelebi Ş(ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı Ankara:Öncü Basımevi 1999; 571-577.
2. Sümerkan B. Brusella türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2002;2:1647-1652.
3. Galanakis E, Makis A, Bourantas K.L and Papadopoulou Z.L. Interleukin-3 and interleukin-4 in childhood brucellosis. *Infection* 2002; 30: 33-34.
4. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard J.P. The innate immune response against Brucella in humans. *Vet. Mikrobiol* 2002; 90: 383-94.
5. Young E.J. Brucella Species. In:Mandel GL, Bennet JE, Dolin R(eds). Principles and Practice of Infectious Disease. Seventh edition Philadelphia: Churchill Livingstone, vol 2 2010: 2921-25.
6. Oliveira S.C, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between Brucella abortus antigens and host immune responses. *Veterinary Microbiology* 2002; 90(1-4): 417-424.
7. Yücel A. Bakteri, parazit ve funguslara karşı immün yanıt. Ustaçelebi Ş(ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı Ankara: Öncü basımevi 1999; 267-289.
8. Jiang X; Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus. *Infection and immunity (Infect Immun)* Jan 1993;61(1): 124-34.
9. Kamruddin A, KA Al-Matrouk, G Martinez et al. Increased serum levels of interferon- α and interleukin-12 during human brucellosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(3): 425-7.
10. Demirdağ K, Ozden M, Kalkan A, Gödekmerdan A, Sirri Kiliç S. Serum cytokine levels in patients with akut brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003; 39: 149-153.
11. Makis AC, Galanakis E, Hatzimichael EC, Papadopoulou ZL, Siamopoulou A, Bourantas KL. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor alpha (sIL-2Ralpha) as a predictor of outcome in brucellosis. *The Journal of infection (J Infect)* Oct 2005; 51(3): 206-10.
12. Kokuludağ A. Sitokinler. Gürler iliçin, Kadir biberöglü, Gültekin Süleymanlar, Serhat Ünal (editörler). İç hastalıkları 2. baskı Ankara: Güneş Kitabevi 2005; 2: 2586-2592.