The Comparison of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Concentration in the Serum and Cerebrospinal Fluid of Children with Bacterial Meningitis

Mashayekhi, F. (PhD)
Assistant Professor of Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Rajaei,F. (PhD)
Assistant Professor of Histology and Embryology, Department of Anatomy , Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Corresponding Author: Mashayekhi, F.
Email: www.mashayekhi@guilan.ac.ir

Received: 11/Mar/2012
Revised: 7/Aug/2012
Accepted: 20/Dec/2012

Abstract

Background and objectives: Meningitis is one of the most common infectious of the central nervous system (CNS), defined as an inflammation of the meninges. LIF is a potent pro-inflammatory factor. Cerebrospinal fluid (CSF) contains the growth factors and cytokines whose concentrations have been changed in most neurological diseases. The aim of this study was to determine the LIF concentration of serum and CSF in the children with bacterial meningitis.

Material and Methods: In this study, the total protein concentration (TPC) and LIF in the serum and CSF of normal subjects and children with bacterial meningitis were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: the Values of serum TPC for children with meningitis (74.17±7.73 g/L) and controls (73.50±7.28 g/L) are not different significantly (P=0.7), and the TPC in the CSF of children suffering from meningitis and controls are 35±0.03 and 0.34±0.05 g/L, respectively (P=0.65). The concentration of serum LIF for children with meningitis(253±19.14 ng/ml) is higher than that of controls (49.75±8.97 ng/ml), and also the concentration of LIF in the CSF of the children with meningitis (116.25±8.60 ng/ml) is significantly higher than that of controls which is 9.04±1.83ng/ml (P<0.001).

Conclusion: The LIF concentration in the CSF and serum may provide additional information in the differential diagnosis of meningitis. It is also concluded that LIF could be significantly involved in the pathophysiology of meningitis.

Key words: Serum, Cerebrospinal fluid, Leukemia inhibitory factor, Children, Bacterial meningitis

مقایسه غلظت فاکتور مهار کننده لوکمیا در سرم و مایع مغزی - نخاعی کودکان مبتلا به مننژیت باکتریایی

دارای رتبه علمی – پژوهشی

از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

فرهاد مشایخی

دکتری زیست شناسی سلولی و تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

فرزاد رجائی

دکتری بافت شناسی و جنین شناسی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نویسنده مسئول: **فرهاد مشایخی**

تلفن:09113330017

پست الکترونیک

www.mashayekhi@guilan.ac.ir

آدرس:رشت، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان، گروه بیولوژی

وصول مقاله:90/12/20

اصلاح نهایی:91/5/17

پذیرش مقاله:91/8/30

چکیده

زمینه و هدف: *مننژیت یکی از شایع ترین عفونت های سیستم عصبی مرکزی است که در اثر التهاب مننژ ایجاد می‌شود. فاکتور مهارکننده لوکمیا(LIF) به عنوان یک فاکتور التهابی قوی نیز محسوب می شود. مایع مغزی- نخاعی دارای فاکتورهای رشد و سیتوکاین ها است که تغییر در غلظت آنها در بیماری های نورولوژیکی دیده شده است. هدف از این تحقیق، مقایسه غلظت فاکتور مهارکننده لوکمیا در سرم و مایع مغزی- نخاعی در کودکان مبتلا به مننژیت باکتریایی و افراد سالم بود.*

روش بررسی: *در این تحقیق غلظت کل پروتئین و میزان فاکتور مهارکننده لوکمیا در سرم و مایع مغزی- نخاعی افراد سالم و کودکان مبتلا به مننژیت باکتریایی به روش الیزا بررسی شد.*

یافته ها: *غلظت کل پروتئین در سرم در بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی و گروه کنترل به ترتیب 7/73 ±74/17 و 7/28 ±73/5گرم در لیتر بود که این اختلاف معنی دار نبود(P= 0.7) این مقدار در نمونه های مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به مننژیت و گروه کنترل به ترتیب 0/03±0/35و 0/05±0/34گرم در لیتر محاسبه گردید (P=0.65) . غلظت LIF در سرم بیماران و گروه کنترل به ترتیب 19/14 ±253 و 8/97 ±49/75نانوگرم در میلی لیتر بود(P<0.001) . مقدار LIF در مایع مغزی –نخاعی در بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی و گروه کنترل به ترتیب 8/60 ±116/25 و 1/83 ±9/04نانوگرم در میلی لیتر به دست آمد (P<0.001) .*

نتیجه گیری: *غلظت این فاکتور در سرم و مایع مغزی- نخاعی ممکن است اطلاعات تکمیلی در تشخیص افتراقی مننژیت فراهم کند. بنابراین به نظر می رسد که فاکتور مهارکننده لوکمیا به طور معنی داری در پاتوفیزیولوژی مننژیت نقش دارد.*

واژه های کلیدی: *سرم، مایع مغزی- نخاعی، فاکتور مهار کننده لوکمیا، کودکان، مننژیت باکتریایی*

آدرس مقاله :

مشایخی ف، رجائی ف " مقایسه غلظت فاکتور مهار کننده لوکمیا در سرم و مایع مغزی - نخاعی کودکان مبتلا به مننژیت باکتریایی". مجله علوم آزمایشگاهی پاییز و زمستان، 1391دوره ششم(شماره 2):7-3

مقدمه

عفونت های سیستم عصبی مرکزی به دو دسته منتژیت و آنسفالیت تقسیم بندی مـی شونـد. منتژیت یـکی از عفونت های شایع است که در آن التهاب منتژ رخ می دهد. باکتری ها یا ویروس ها می توانند باعث ایجاد منتژیت حاد شوند. از نـظر بـالینی منتژیت به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می شود. فرم حاد در طی چند ساعت ایجاد می شود اما فـرم مـزمن آن در طـی چـند روز یا حتی هـفته هـا به وجود می آید (1). مهمترین عامل بیماری زا هموفیلوس آنفلوانزا نوع b (Heamophilus influenza type b= Hib) است. اما عوامل ایجاد کننده منتژیت نظیر استرپتوکوکوس نومونیا (Streptococcus pneumonia=sp) و نایسریا منتژیتیدیس (Neisseria meningitides=NM) با استفاده از واکسن ها قابل پیشگیری هستند. از ماه اول بعد از تولد Hib، NM و Sp عامل 70 تا 90 درصد از منتژیت باکتریایی حاد در تمام جهان است. در حال حاضر پنوموکوک ها مهمترین علت منتژیت باکتریایی در کودکان، بالغین در امریکا و اروپا است. فراوانی این بیماری در اروپا، امریکا 1/1 تا 2 و در افریقا تا 12 نفر در هر صدهزار نفر می باشد (2). بیشترین خطر ابتلا به منتژیت در کودکان کمتر از 5 سال و افراد بالاتر از 60 سال است. وجود طولانی مدت پنوموکوک ها در مایع مغزی-نخاعی ممکن است باعث مرگ و میر بیشتر و همچنین آسیب های نورولوژیکی در افراد شوند(3). پنوموکوک ها قادرند در منتژیت از عروق خونی لپتومنتژ خارج شوند (4). بررسی نمونه های مایع مغزی نخاعی اطلاعات مـهمـی را دربـاره عامل مولد بیماری های نورولوژیکی یا منتژیت می دهد. مایع مغزی-نخاعی توسط شبکه کـوروئید ترشح شده و حاوی فاکتورهای رشد و سایتوکاین هایی نظیر فاکتور رشد عصبی، فاکتور رشد فیبروبلاستیک، فاکتور رشد مشتق از مغز، فاکتور رشد ترانسفورمینگ، فاکتور مهار کننده لوکمیا و بقیه فاکتورهای نوروتروفیک می باشد(5). تغییر در غلظت فاکتورهای رشد در برخی از بیماری های نورولوژیکی نظیر هیدروسفالی ، الـزایـمر، پـارکینسون و منتژیت مشاهده شده است (8-6).

مایع مغزی نخاعی به طور دائم توسط شبکه کوروئید تولید می شود. با توجه به اینکه این مایع در تماس نزدیک با فضای خارج سلولی مغز قرار دارد لذا تغییرات بیوشیمیایی مـغز مـی تواند در این مایع مشاهده شود. بررسی سیتوکاین ها و فاکتورهای رشد منجر به شناسایی نشانگرهای زیستی برای منتژیت می شود. مطالعه بیوشیمیایی مایع مغزی-نخاعی جهت یافتن نشانگر قابل اعتماد جهت تشخیص به موقع بیماری های نورولوژیکی و از جمله منتژیت بسیار مهم است.در میان فاکتورهای رشد، فاکتور مـهـار کنند لـوکـمیـا (Leukemia inhibitory factor=LIF) یـک سایتوکاین پلی پپتیدی است که نقش مهمی در بقاء سلولهای عصبی و بیماری های التهابی سیستم عصبی بازی می کند. LIF از لحاظ ساختمانی و مکانیسم عمل متعلق به خانواده اینترلوکین-6 (IL-6) می باشد. مدت کوتاهی بعد از تزریق مواد سمی به موش، میزان LIF در سرم و مایع مغزی-نخاعی زیاد می شود. LIF با اتصال به گیرنده خود یعنی LIFR اثرات خود را اعمال می کند (9).همچنین نشان داده شد که LIF باعث افزایش تولید ، بلوغ و بقاء اولیگو دندروست ها و نورون ها در محیط کشت می شود. بیان همزمان LIF و گیرنده آن (LIFER) در مغز مبتلایان به بیماری تحلیل رونده عصبی و التهابی مغز و منتژ نشان دهنده نقش این فاکتور در ترمیم آسیب نورونی در این بیماران می باشد. در چنـدین فـاکتور نـظیر فـاکتور رشـد مـشتق از مـغـز (BDNF=Brain Derived Neurotrophic Factor)، فاکتور رشد مشتق اپی تلیال (EGF=epithelial growth factor)، فاکتور مهار کننده لوکمیا و فاکتور های نوروتروفیک دیگر بـاعـث تحریک نوروژنز می شوند (11). مطالعات نشان می دهد که LIF یک سیتوکاین مهمی است که در التهاب نقش دارد. به علاوه LIF فاکتور مهمی است که در پاسخ به صدمات در سیستم عصبی مرکزی تولید می شود. در سیستم عصبی مرکزی، منتژیت باکتریایی باعث آپوپتوزیس در سلول های عصبی می شود (12). با توجه به نقش LIF در بقاء و تمایز سلول های عصبی و همچنین با توجه به اینکه LIF تـوسط لنفوسیت ها، مونوسیت ها، ماکروفاژها و برخی

سلول های اپی تلیال تولید می شود (13) ممکن است میزان LIF در طی مننژیت در سرم و مایع مغزی- نخاعی تغییر کند. هدف از این مطالعه بررسی غلظت کل پروتئین و LIF در مایع مغزی– نخاعی و سرم کودکان مبتلا به مننژیت باکتریایی و مقایسه آن با کودکان سالم (گروه کنترل) بود.

روش بررسی

این مطالعه در طی یک سال و از مهر 1389 تا مهر 1390 انجام شد. تعداد 62 کودک مبتلا به مننژیت باکتریایی با محدوده ی سنی 155-20 ماه مورد مطالعه قرار گرفت. گروه کنترل نیز شامل 59 کودک با محدوده ی سنی 162-23 ماه می بود. تشخیص بیماران مبتلا به مننژیت بر اساس بررسی تاریخچه،آزمایشات فیزیکی،یافته های آزمایشگاهی مایع مغزی- نخاعی از قبیل نوع سلول ها، وجود عوامل باکتریایی در رنگ آمیزی گرم و کشت مایع مغزی- نخاعی انجام شد. تشخیص بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی از مننژیت ویروسی بر اساس نتایج حاصل از کشت میکروبی مایع مغزی-نخاعی و ویژگی های بیوشیمیایی از قبیل تغییرات میزان قند و پروتئین و تغییرات سیتولوژیکی تعیین گردید.محلول بالایی مایع مغزی- نخاعی نمونه هایی که فاقد سلول های نوروایی تلیال یا گلبول های قرمز بودند پس از سانتریفوژ کردن و نمونه های سرم تا زمان آزمایش در فریزر 70- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. برای بررسی کمی محتوای پروتئینی مایع مغزی-نخاعی از روش برادفورد استفاده شد (14). غلظت LIF در مایع مغزی- نخاعی و سرم با روش ELISA (USCN, Life Sciences Inc. China) با حساسیت 30.5 pg/mL اندازه گیری شد. آنالیز آماری با استفاده از student's t-test انجام و $P\leq 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

غلظت کل پروتئین در سرم بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی و گروه کنترل به ترتیب 7/73 ±74/17 و 7/28 ±73/5 گرم در لیتر می باشد که این اختلاف معنی دار بود(P= 0.7). غلظت کل پروتئین در نمونه های مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به مننژیت و گروه کنترل به ترتیب 0/03±0/35و 0/05±0/34 گرم در لیتر محاسبه گردید. بررسی آماری نشان داد که این تغییر نیز معنی دار نمی باشد(P=0.65) . غلظت LIF در سرم بیماران و گروه کنترل به ترتیب 19/14 ±253 و 8/97 ±49/75 نانوگرم در میلی لیتر محاسبه گردید. بررسی آماری نشان داد که اختلاف غلظت در بین این دو گروه در سرم و مایع مغزی-نخاعی معنی دار بود(P<0.001) . LIF در مایع مغزی- نخاعی و سرم بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی بیشتر از میزان آن در گروه کنترل بود. مقدارLIF در مایع مغزی – نخاعی در بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی و گروه کنترل به ترتیب 8/60 ±116/25 و 1/83 ±9/04 نانوگرم در میلی لیتر محاسبه شد. بررسی آماری نشان داد که اختلاف غلظت در بین این دو گروه در مایع مغزی-نخاعی معنی دار می باشد(P<0.001) .

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که غلظت LIF در مایع مغزی- نخاعی و سرم بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی به طور معنی داری افزایش می یابد. در این تحقیق به مطالعه غلظت LIF پرداخته شد زیرا LIF یکی از سیتوکاین ها است که نقش مهمی در بقاء سلول های عصبی بازی می کند. بنابراین با توجه به نقش LIF در بقاء سلول های عصبی در طی سالهای اخیر بررسی نقش این فاکتورها در بیماریهای التهابی مغز و تحلیل رونده سیستم عصبی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (15). LIF در تحریک و شروع جایگزینی اپی تلیوم بویایی از دست رفته در پستانداران نقش مهمی دارد (16). LIF همچنین به عنوان یک میانجی مهم در پاسخ های التهابی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی عمل می کند. LIF در بقاء و تکثیر سلول های زاینده بدوی نقش داشته و باعث پیشبرد تکوین آستروسیت ها در نخاع می گردد (17). در سیستم عصبی مرکزی، مننژیت باکتریایی باعث آپوپتوزیس در نورون ها و

نوروگلیا می شود (12). بنابراین با توجه به نقش LIF در بقاء و تمایز سلول های عصبی ، افزایش غلظت LIF در سرم و مایع مغزی- نخاعی ممکن است به دلیل واکنش جبرانی جهت محافظت و جلوگیری از مرگ بیشتر سلول های عصبی باشد. در این تحقیق افزایش غلظت LIF در سرم و مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به مننژیت در مقایسه با افراد سالم مشاهده شد. با توجه به اینکه LIF توسط لنفوسیت ها، مونوسیت ها، ماکروفاژها و برخی سلول های اپی تلیال تولید مـی شود(13) و از طرفی نقش مهم این سلول ها در واکنش های التهابی، لذا افزایش غلظت LIF در سرم بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی ممکن است به دلیل فعالیت زیاد یا افزایش تعداد این سلول ها باشد. همچنین احتمال دارد که افزایش غلظت LIF در مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی به دلیل ورود LIF از سرم به درون این مایع باشد. مطالعات نشان می دهد که غلظت LIF در سرم و مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس، بیماری الزایمر و تحلیل رونده عصبی تغییر مـی کند(20-18). همان گونه که نتایج این مطالـعه نشان می دهد، غلظت LIF در سرم و مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به مننژیت در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی داری را نشان می دهد، ولی افزایش غلظت کل پروتئین در سرم و مایع مغزی-نخاعی در بیماران مبتلا به مننژیت معنی دار نیست. این امر شاید به دلیل عدم تغییر در غلظت بقیه پروتئین های سرم و مایع مغزی-نخاعی باشد و به همین دلیل است که افزایش معنی دار LIF فقط باعث افزایش جزئی و نامحسوس در غلظت کل پروتئین در سرم و مایع مغزی-نخاعی شده است. غلظت LIF در سرم و مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به مننژیت باکتریایی در مقایسه بـا افراد سالم بیشتر است که LIF در پاتوفیزیولوژی مننژیت نقش اساسی را نشان می دهد. همچنین اندازه گیری غلظت LIF در سرم یا مایع مغزی- نخاعی ممکن است اطلاعات بیشتری در خصوص تشخیص افتراقی مننژیت فراهم کند.

تشکر و قدردانی

از خانم دکتر نوری و آقای دکتر سمائی به جهت کمک در انجام الیزا و تهیه نمونه ها تشکر می کنیم.

References

1. Leib SL, Tüber MG. *Meningitis (I)--differential diagnosis; aseptic and chronic meningitis. Ther Umsch.* 1999; 56(11): 631-9.

2. O'Dempsey TJ, McArdle TF, Morris J, Lloyd-Evans N, Baldeh I, Laurence BE, et al. *A study of risk factors for pneumococcal disease among children in a rural area of west Africa*. Int J Epidemiol. 1996;25(4):885-93.

3. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, et al., *Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis.* N Engl J Med. 2009; 360(3): 244-56.

4. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Roord JJ, van Furth AM. *Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis.*Infect Immun. 2006;74(3):1445-51.

5. Blasko I, Lederer W, Oberbauer H, Walch T, Kemmler G, Hinterhuber H, et al. *Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias.* Dement Geriatr Cogn Disord. 2006; 21(1): 9-15.

6. Salehi Z. and Gholizadeh L. *Relative expression of fibroblast growth factor-1 in the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis; A Western Blot analysis.* International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2011; 1(1): 15-20

7. Salehi Z. *Cerebrospinal fluid nerve growth factor and total protein concentration in the children with meningitis.* International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2011; 1(1): 46-50

8. Mashayekhi F, Salehi Z. *Expression of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of congenital hydrocephalic and normal children.* Eur J Neurol. 2005; 12(8): 632-7.

9. Takahashi Y, Takahashi M, Carpino N, Jou ST, Chao JR, Tanaka S, et al., *Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway.* Mol Endocrinol. 2008; 22(7):1673-81.

10. Soilu-Hänninen M, Broberg E, Röyttä M, Mattila P, Rinne J, Hukkanen V. *Expression of LIF and LIF receptor beta in Alzheimer's and Parkinson's diseases.* Acta Neurol Scand. 2010; 121(1): 44-50.

11. Zhang Q, Liu G, Wu Y, Sha H, Zhang P, Jia J. *BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway.* Molecules. 2011; 16(12): 10146-56.

12. Gianinazzi C, Grandgirard D, Imboden H, Egger L, Meli DN, Bifrare YD, et al. *Caspase-3 mediates hippocampal apoptosis in pneumococcal meningitis.* Acta Neuropathol. 2003; 105(5): 499-507.

13. Bradford MM. *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 1976; 72: 248–254.

14. Linker R, Gold R, Luhder F. *Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination.* Crit Rev Immunol. 2009; 29(1): 43-68.

15. Bauer S, Rasika S, Han J, Mauduit C, Raccurt M, Morel G, et al. *Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium.* J Neurosci. 2003; 23(5): 1792-803.

16. Covey MV, Loporchio D, Buono KD, Levison SW. *Opposite effect of inflammation on subventricular zone versus hippocampal precursors in brain injury.* Ann Neurol. 2011; 70(4): 616-26.

17. Mashayekhi F, Salehi Z. *Expression of leukemia inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.* J Clin Neurosci. 2011; 18(7): 951-4.

18. Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Naldi P, Molinari R, et al. *The expression pattern of inflammatory mediators in cerebrospinal fluid differentiates Guillain-Barré syndrome from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.* Cytokine. 2010; 51(2): 138-43.

19. Galimberti D, Venturelli E, Fenoglio C, Guidi I, Villa C, Bergamaschini L, et al. *Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration.* J Neurol. 2008; 255(4): 539-44.