جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶
صفحات: ۲۹ - ۴۰

بررسی تأثیر عفونتهای قارچی (کاندیدیازیس) بر بقاء و حجم تومور و نسبت سلولهای T (CD4/CD8) ارتشاح یافته به تومور در موشهای مبتلا به سرطان سینه

مرضیه هلاکوئی* M.Sc.، محمدحسین یادگاری? Ph.D.،
زهیرحسن صراف** Ph.D.، مهدی‌مهدوی** M.Sc.، آزاده اسکندری* M.Sc.

چکیــده

هدف: در این تحقیق تأثیر عفونت مخمر کاندیدا آلبیکنس و پروتئینهای ساختاری وترشحی آن بر حجم تومور، بقا و نسبت لنفوسیتهای ارتشاح یافته به تومور (CD4/CD8) در موشهای مبتلا به سرطان پستان (شرایط In vivo) و نیز خاصیت سرکوبگری این پروتئینها در شرایط In vitro مورد ارزیابی قرارگرفت.

روش بررسی: در ابتدا مخمر کاندیداآلبیکنس در محیط مایع کشت داده شد. سپس پروتینهای ترشحی کاندیداآلبیکنس آزاد شده در محیط کشت، با ستون کروماتوگرافی تخلیص گردید. پروتینهای ساختاری نیز با سونیکیت کردن مخمر بدست آمد و با کمک تست MTT خاصیت سرکوبگری آنها مورد ارزیابی قرارگرفت. جهت بررسی تأثیر عفونت کاندیدیازیس و اثر پروتئینهای ساختاری و ترشحی بر حجم تومور، بقا و نسبت لنفوسیتهای ارتشاح یافته به تومور (CD4/CD8)، موشهای Balb/c با جراحی ساده توموری شدند و سپس در چهار گروه مجزا قرار گرفتند. گروه اول مخمر زنده کاندیداآلبیکنس، گروه دوم پروتئینهای ساختاری، گروه سوم فراکشنهای پروتئینهای ترشحی و گروه چهارم (گروه کنترل) PBS به طور روزانه دریافت نمودند. روزانه حجم تومور در ۴ گروه فوق اندازه‌گیری شد. مرگ و میر موشها نیز در روزهای متوالی ثبت می‌گردید در نهایت بافت توموری در ۴ گروه فوق جداسازی و سوسپانسیون شد. سپس رنگ‌آمیزی با آنتی بادیهای CD4/CD8 انجام گردید در انتها سنجش نسبت این سلولها در بافت توموری با روش فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عفونت کاندیدائی ناشی از مخمر زنده کاندیداآلبیکنس و پروتئینهای ساختاری و ترشحی آن در مقایسه با گروه کنترل موجب سرکوب پاسخهای تکثیری لنفوسیتها شده است بررسی موشهای توموری که پروتئینهای ساختاری و ترشحی کاندیدا آلبیکنس را به صورت درون وریدی دریافت نموده بودند و یا عفونت کاندیدا آلبیکنس داشته‌اند، نشان داد که این گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش رشد تومور داشته‌اند. همچنین بقای این موشها نسبت به گروه کنترل کمتر شده بود. بررسی فلوسایتومتری نشان داد که نسبت سلولهای T(CD4/CD8) ارتشاح یافته به تومور در موشهای دریافت کننده پروتئینهای ساختاری و ترشحی و همچنین موشهای عفونی کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: بررسی‌های فلوسایتومتری نشان داده است که با توجه به افزایش حجم تومور نمی‌توان نقش کمکی برای این سلولهای TCD4 قائل شد. لذا با توجه به افزایش حجم و پیشرفت تومور، این سلولها احتمالاً سلولهای T تنظیمی هستند که در منطقه تومور پاسخهای ایمنی را سرکوب نموده و به رشد برق آسای تومور کمک نموده‌اند.

واژه‌های کلیدی: کاندیداآلبیکنس، تومور، کاندیدیازیس، نسبت لنفوسیتهای CD4/CD8 ارتشاح یافته به تومور.

دریافت مقاله: ۸۵/۵/۲۱، اصلاح مقاله: ۸۵/۱۲/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۶/۱/۲۰

? استادیار گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران – ایران
* گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
** گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
آدرس پست الکترونیکی: yadegarm2000@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقـدمـه

کاندیدیمی در سالهای اخیر در آمریکا چهارمین علت عفونتهای بیمارستانی بوده است و در حدود ۲۵ تا ۵۰ درصد عفونتهای بیمارستانی در بخش مراقبتهای ویژه و ۸ تا ۱۵ درصد کل عفونتهای بیمارستانی را تشکیل می‌دهد. میزان مرگ و میر ناشی از این عفونتها بسیار بالاتر از موارد مشابه باکتریایی می‌باشد و تخمین زده می‌شود که این میزان در حدود ۸۰-۳۸٪ باشد (۴-۱). افزایش یافتن تعداد بیمارانی که برای دوره‌های طولانی مدت توسط مراقبتهای خاصی تحت پیگیری می‌باشند، مانند بیماران سرطانی، افراد جمعیت در خطر کاندیدیازیس را افزایش داده است. کاندیدا آلبیکنس همچنان گونه غالب بوده، بیش از ۵۰٪ موارد عفونتهای کاندیدایی را تشکیل می‌دهد (۵). از جمله گروههای در معرض خطر، مبتلایان به سرطان هستند (۶)؛ سرطان، دومین عامل مرگ و میر در انسانهاست (۷) و شایع‌ترین سرطان در خانمها سرطان پستان است (۸). در مبتلایان به سرطان پستان، طی پروسه درمان با روشهای شیمی درمانی، عموماً به دلیل آسیبی که شیمی درمانی به سلولهای سیستم ایمنی وارد می‌آورد، این افراد مستعد عفونتهای فرصت‌طلب می‌شوند و یکی از عفونتهای شایعی که در این افراد مشاهده می‌شود، عفونت کاندیدیازیس است (۹). علی رغم تحریک سیستم ایمنی از سوی کاندیداآلبیکنس و القای پاسخ ایمنی بر ضد آن، گزارشهای متعددی وجود دارد که حاکی از سرکوب سیستم ایمنی و در نتیجه فرار کاندیداآلبیکنس از وقایع ایمونولوژیک می‌باشد. شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهد که در حضور آنتی ژنهای ساختاری کاندیدا آلبیکنس، سلولهای دندریتیک قادر به بیان مولکولهای کمک تحریکی نیستند و همچنین این سلولها قابلیت تولید IL-12 را ندارند؛ اما قادر خواهند بود که IL-10 ترشح نمایند و این می‌تواند مکانیسمی باشد که بوسیله آن کاندیدا آلبیکنس پاسخهای سیستم ایمنی را سرکوب می‌نماید (۱۰). شواهد دیگری نشان داده‌اند که در مبتلایان به عفونت کاندیدایی، پاسخ تزایدی و تولید IFN-γ لنفوسیتهای T در تحریک با آنتی ژنهای کاندیدا به شدت کاهش می‌یابد و به نوعی، سرکوب پاسخ ایمنی مشاهده می‌گردد (۱۱). همچنین کاندیدا آلبیکنس کشته شده، تولید IFN-γ را توسط سلولهای NK مهار می‌نماید (۱۲). جالب توجه این که کاندیدا آلبیکنس چندین فاکتور محلول آزاد می‌کند که تولید فراورده‌های آنیون سوپراکسید را در نوتروفیلها مهار می‌نماید (۱۳،۱۴). از سوی دیگر یکی از مشکلاتی که در مبتلایان به سرطان پستان مشاهده می‌شود، عفونتهای فرصت‌طلبی چون کاندیدا آلبیکنس است (۹). حال آن چه ما در این تحقیق به دنبال آن بودیم و به عنوان فرضیه مطرح نمودیم این بود که نشان دهیم آیا در موشهایی که مبتلا به سرطان پستان هستند، وجود یک ارگانیسم نظیر کاندیدا آلبیکنس که از جنبه‌های مختلف پاسخ سیستم ایمنی را سرکوب می‌نماید، زمینه لازم برای رشد بیشتر تومور را فراهم می‌آورد؟ به عبارت دیگر آیا باعث بدتر شدن وضعیت تومور می‌گردد؟ با توجه به این که چنین مطالعه‌ای تا به حال در سطح دنیا صورت نگرفته است، در این تحقیق بر آن شدیم که به سؤالات مذکور پاسخ دهیم.

روش بررسـی

تهیه کشت تازه از کاندیدا آلبیکنس. مخمر کاندیدا آلبیکنس سوش PTCC:5027 (Persian type culture collection) با رعایت شرایط استریل بر روی محیط سابرودکستروز آگار (Sabourad dextrose agar) در ۳۷ درجه و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. برای حصول اطمینان از سوش مورد نظر، آزمایشات افتراقی نمونه نظیر کشت در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ (corn meal agar+Tween 80) و کشت در سرم انجام شد.

تهیه سوپ رویی کشت کاندیدا آلبیکنس. در ابتدا $۵*۱۰^{۷}$ مخمر کاندیدا آلبیکنس را در پنجاه میلی لیتر محیط مایع RPMI+ FBS %10 (Fetal Bovine serum) کشت داده شد و سپس به مدت ۱۵ روز در انکوباتور ۵٪ Co_2، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید؛ سپس سوپ رویی جمع‌آوری و در $-۷۰^{o}C$ نگهداری گردید (۱۵).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تهیه فراکشن‌های کشت رویی کاندیدا آلبیکنس با استفاده از روش ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی. در این روش از ژل سفادکس G۱۰۰ و بافر PBS (pH=7.2-4) استفاده نمودیم. ابتدا پروتئین ترشحی کاندیدا آلبیکنس توسط Freez Drier تغلیظ شده؛ لیوفیلیزه گردید و Resolution نمونه بالا برده شد. سپس روی ستون سفادکس G-100 برده شده، فراکشن‌های ۰/۵ ml جمع‌آوری شدند. در انتها OD (optical density) نمونه‌های جمع‌آوری شده (فراکشن‌ها) توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید و نمونه‌های پروتئینی به دست آمده در ۷۰- درجه نگهداری شد.

تهیه عصاره پروتئینی کاندیدا آلبیکنس (پروتئینهای ساختاری). در این تحقیق از روش Elorza و همکارانش، یعنی از ورتکس (Vortexing) کردن مخمر در حضور پرل شیشه‌ای برای خرد کردن سلولها استفاده شد (۱۶). ابتدا محلول بافری PBS حاوی ۱ میلی مولار PMSF (Phenylmethyl sulfonyle floride) تهیه شد و سپس به میزان ۳۰ درصد وزنی- حجمی به هر کدام از نمونه‌های مخمری، در داخل لوله‌های سانتریفوژ اضافه گردید. بر روی این مخلوط دانه‌های شیشه‌ای (قطر ۳-۲ میلی متر) تا حدود کمی بالاتر از حجم کلی مخلوط اضافه شد. در تمامی این مراحل، نمونه داخل ظرف یخ قرار داشت. در مجاورت دانه‌های شیشه‌ای و بافر مخصوص حدود بیست و چهار تا سی بار مخمر ورتکس گردید. در حین انجام این مراحل هر بار سلولهای مخمری از نظر میزان خرد شدن توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. پس از آن که ۸۰ تا ۹۰ درصد سلولهای مخمری خرد شدند، مایع رویی که حاوی عصاره داخل سلولی بود، جمع‌آوری شد. جهت جداسازی نمک از پروتئینها و تغییر محیط بافری نمونه از کیسه دیالیز استفاده شد و میزان پروتئین نمونه به وسیله روش براد فورد اندازه‌گیری و در۷۰- درجه نگهداری گردید.

تومور نمودن موشها. موش توموری مدل سرطان خودبه‌خودی پستان از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سپس نوع سرطان با آزمایشات پاتولوژیک اثبات گردید (۱۷) و جهت پیوند زدن، تومور از بدن حیوان خارج شد و درون PBS استریل قرار گرفت. پس از قطعه قطعه کردن، قطعات کمتر از $۰/۵\ cm^3$ به موشهای BALB/c سالم به صورت زیرپوستی پیوند زده شد. بعد از گذشت یک هفته، تومور در ناحیه پیوندی ظاهر گردید.

عفونی نمودن موشهای توموری. به منظور به دست آوردن تعداد مطلوب از مخمر کاندیدا آلبیکنس برای استفاده در تستهای نهایی، پس از توموری نمودن موشها در روز پنجم تا هفتم، در گروههای مختلف به تعداد ۱×۱۰^۵، ۲×۱۰^۵، ۵×۱۰^۵، ۱×۱۰^۶، ۲×۱۰^۶ در حجم ۲۰۰ میکرولیتر از محلول PBS به صورت درون رگی (IV injection) از طریق دم تزریق شد (۱۸). هفت روز بعد موشها کشته شدند و احشای آنها از نظر کشت کاندیدا آلبیکنس و بررسی پاتولوژیک جهت حضور کاندیدا آلبیکنس در احشاء مورد ارزیابی قرار گرفت.

کشت وتهیه لام پاتولوژیک احشای موشهای توموری آلوده به عفونت کاندیدا آلبیکنس. جهت بررسی عفونت سیستمیک، در روز هفتم پس از تزریقات، موشها نخاعی شده، سپس به کمک پنس و قیچی استریل احشای آنها مشتمل بر کبد، طحال، کلیه جدا گردید و به همراه تومور جهت بررسی آلودگی، پس از له نمودن توسط سرنگ معمولی در محیط سابرود دکستروز آگار کشت داده شدند. همچنین از هر عضوی یک نمونه در فرمالین ۱۰٪ فیکس و برای تشخیص پاتولوژیک به آزمایشگاه ارسال گردید.

ارزیابی پاسخ تکثیری سلولهای گره لنفاوی موش در مقابل فراکشن حاصل از سوپ کشت کاندیدا آلبیکنس و پروتئین ساختاری به دست آمده از سونیکیت نمودن کاندیدا آلبیکنس در تست MTT. جهت بررسی پاسخ تکثیری سلولهای سیستم ایمنی، روشهای مختلفی وجود دارد. در این پژوهش، پاسخ تکثیری با کمک محلول MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) صورت گرفت. این محلول با NADPH ردوکتاز سلولهای زنده و فعال واکنش داده، رسوب نموده، تشکیل کریستالهای فورمازان را می‌دهد که شدت رنگ حاصل شده، متناسب با میزان تکثیر می‌باشد. از مزیتهای این روش عدم رادیواکتیو بودن آن نسبت به روش LTT است. بدین

منظور از موش Balb/c ۸ تا ۱۰ هفته‌ای استفاده گردید. در موش نخاعی شده، تحت شرایط استریل، گره لنفاوی براکیال و آگزیلاری با پنس و قیچی استریل خارج گردید و در محیط RPMI با کمک پیستون سرنگ گره له شد و سلولهای جدا شده از آن از الک سلولی ۱۵۰ میکرونی عبور داده شد. سپس در محیط کامل FCS+RPMI به تعداد نهایی یک میلیون در میلی لیتر رسانده شد. از سوسپانسیون سلولی حاصل ۱۰۰ لاندا به هر چاهک ۹۶ خانه‌ای مسطح اضافه شده، سپس آنتی‌ژن با غلظتهای نهایی ۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی لیتر به آنها اضافه شد، در چاهک و به کنترل منفی، هیچ آنتی ژنی به سلولها اضافه نشد (۱۹) و برای بلانک فقط از RPMI بدون FCS استفاده شد. حجم نهایی تمام چاهکها ۲۰۰ میکرولیتر بود و پاسخ تکثیری در سه نوبت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط محلول MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که پس از طی ساعات مذکور، به مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT به تمام حفرات اضافه شد و سپس پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۴ ساعت پلیت از انکوباتور خارج شده، محیطها از پلیت‌ها منتقل گردید و به تمام حفرات ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (دی متیل سولفوکساید) اضافه شد. پس از طی حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه جذب، در طول موج ۵۷۰nm قرائت گردید و جذب سلولهای تحریک شده به جذب سلولهای تحریک نشده به عنوان اندیکس تحریکی اندازه گرفته شد.

بررسی اثر عفونت سیستمیک ناشی از کاندیدا آلبیکنس، تزریق فراکشن حاصل از سوپ کشت رویی و پروتئینهای ساختاری کاندیدا آلبیکنس بر رشد تومور پستان و بقا در موشهای Balb/c. پس از توموری نمودن موشها در روز هفتم در گروه یک، به هر موشی به تعداد ۲×۱۰^{۶} کاندیدا آلبیکنس به حجم ۲۰۰ میکرولیتر PBS (فسفات بافرسالین) از طریق ورید دمی تزریق شد. در گروه دوم و سوم به ترتیب به هر موش توموری روزانه به مقدار ۵۰۰ میکروگرم از پروتئینهای فراکشن حاصل از کشت سوپ رویی کاندیدا آلبیکنس و پروتئینهای ساختاری کاندیدا آلبیکنس از طریق ورید دمی تزریق گردید. این تزریقات تا ۸ روز به صورت روزانه ادامه یافت و به عنوان گروه کنترل به موشهایی که توموری شده‌اند، روزانه به حجم ۲۰۰ میکرولیتر PBS تزریق گردید. همچنین در طی پروسه، بقای موشها نیز ثبت گردید.

اندازه‌گیری سیر رشد تومور در موشهای توموری. برای این کار از کولیس ورنیه استفاده می‌شد که پس از انجام عمل پیوند توموری و شروع رشد توموری در انتهای هفته دوم پیوند، هر روز اندازه تومور در سه مقطع طول، عرض و ارتفاع تعیین می‌گردید.

استخراج لنفوسیتهای ارتشاح یافته به تومور و آزمون فلوسایتومتری. پس از طی ۸ روز از تزریقات، موشهای توموری نخاعی شده، بافت توموری آنها توسط پنس و قیچی جدا می‌شد و در داخل PBS استریل قرار می‌گرفت. تومور به کمک قیچی به قطعات کوچکتر تقسیم می‌شد و مناطقی که کاملاً سفت و سخت بود، انتخاب (۱۷) و در ظرف هموژنایزر توسط محلول PBS له گردید تا سلولهای ارتشاح یافته به تومور، جداسازی شوند.

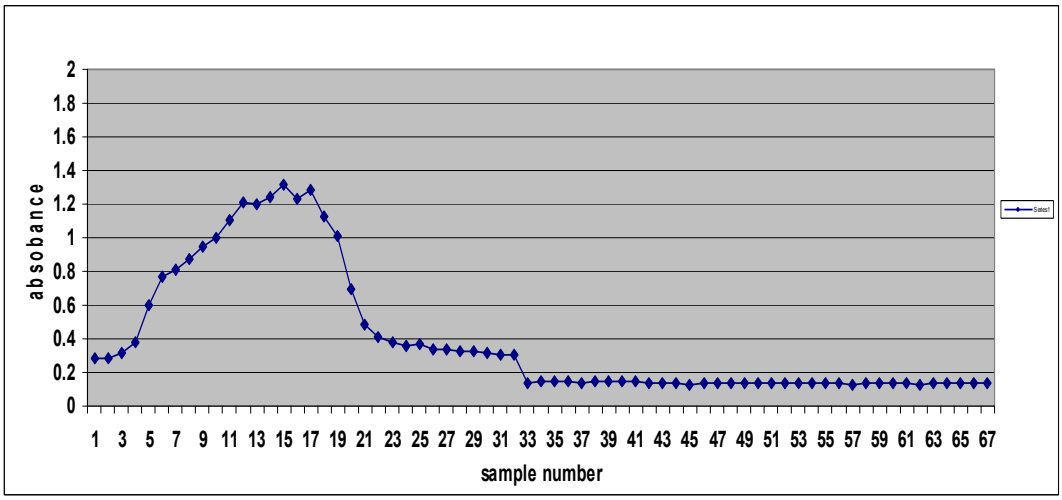
سوسپانسیون سلولی به دست آمده را از Mesh با منفذ ۱۵۰ میکرون عبور و با محلول PBS شستشو داده، پس از شمارش و تعیین تعداد سلول و زیست‌پذیری آنها، تعداد ۱۰۰,۰۰۰ سلول در هر لوله فالکون قرار گرفته، به آن ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های ضد CD4 و CD8 که کانژوگه به رنگ FITC بود، اضافه گردید. سوسپانسیون ورتکس گردیده و به مدت ۳۰ الی ۴۰ دقیقه در روی یخ قرار داده شد و با حجم بالای PBS شستشو داده شد. نمونه‌ها با محلول پارافرمالدئید ۲٪ فیکس گردید و در نهایت توسط دستگاه فلوسایتومتری قرائت گردید. پس از آنالیز فلوسایتومتری نسبت CD4 به CD8 به صورت تقسیم عددی درصد آن دو صورت گرفت.

روش آماری. تعداد نمونه در هر گروه پنج عدد و به دلیل کم بودن حجم نمونه، با استفاده از از روشهای Non-parametric و با آنالیز Mann whitney داده‌ها آنالیز گردید. حدود اطمینان ۹۵٪ بود و آنالیز با واریانس دو طرفه انجام گرفت و عدد P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافتــه‌هــا

نتایج حاصل از کشت کاندیدا آلبیکنس در محیط مایع و تهیه فراکشن سوپ کشت آن.

با عبور سوپ ناشی از کشت، از ستـون و بررسی پیک به دسـت آمده مشخص گردید که لوله‌های شماره ۵ تا ۲۵ دارای یک پیک بوده است. از تنها فراکشن به دست آمده در بررسی MTT و همچنین دیگر آزمایشات استفاده گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱. جذب نوری نمونه‌های مختلف پس از فراکشن‌گیری از سوپ کشت کاندیدا آلبیکنس. در این جا از لوله شماره ۵ تا۲۵ به عنوان یک فراکشن جمع آوری شد.

تصویر ۱و۲. موش سمت چپ مبتلا به سرطان پستان می‌باشد و در روز پانزدهم از پیوند قرار دارد و موش سمت راست نمایی از تومور کارسینوم پستان می‌باشد.

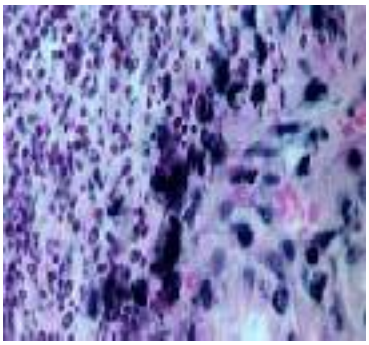
نتایج حاصل از توموری نمودن موشهای Balb/c. نتایج توموری شدن موشها نشان داده است که تقریباً پس از گذشت ۵ تا ۷ روز از پیوند، تومور در حد ۳ تا ۴ میلی متر رشد نموده و پس از آن تومور در طی ۲ تا ۳ هفته بعد (بسته به حجم تومور اولیه پیوند شده) به حداکثر حجم خود رسیده است (تصویر۱و۲)؛ موشها در این لحظه از نظر وزنی به شدت تحلیل می‌رفتند. در نهایت موشها در روزهای ۲۰ تا ۳۰ پس از پیوند می‌مردند. همچنین جهت اثبات نوع تومور، از بافت توموری لام پاتولوژیک تهیه گردید.

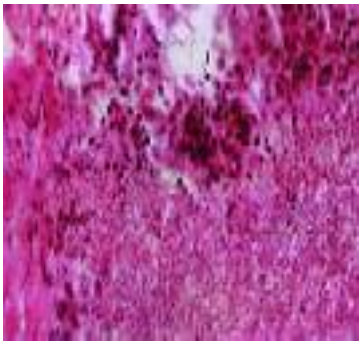
نتایج حاصل از عفونی نمودن موشها. نتایج عفونی نمودن موشهای توموری نشان داده است که هفت روز پس از تزریق مخمر به صورت درون وریدی، در

گروههایی که به تعداد 2×10^{6} مخمر تزریق شده بود، کشت ارگانهای مختلف از نظر وجود مخمر مثبت بود (تصویر۳ و ۴).

در این گروه لامهای پاتولوژیک نیز حضور مخمر را در بافتهای مختلف تائید نمود.

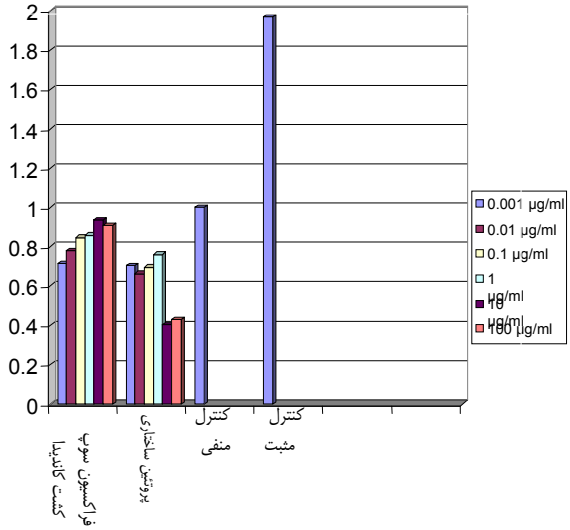
تصویر ۳و٤. در سمت راست کلونیهای کاندیدا آلبیکنس پس از کشت کلیه موشهای توموری و در سمت چپ کشت طحال موشهای توموری ۷ روز پس از عفونی نمودن موش با تزریق تعداد $2*10^{6}$ مخمر کاندیدا آلبیکنس بصورت داخل وریدی را نشان می‌دهد.



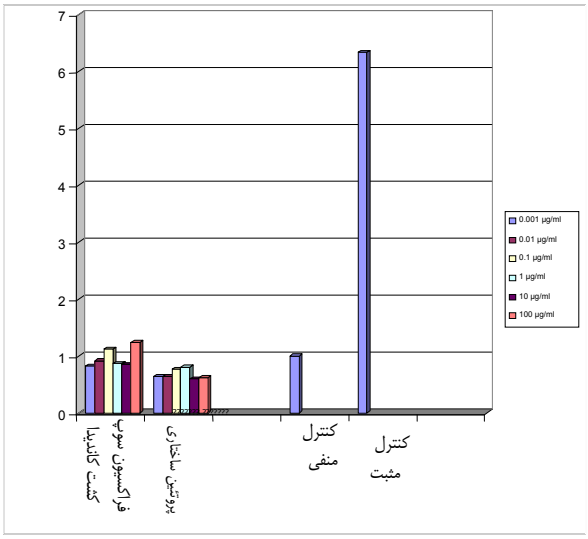


تصویر ٥ و ٦. درسمت راست بافت کلیه موشهای توموری و در سمت چپ بافت طحال موشهای توموری ۷ روز پس از عفونی نمودن موش با تزریق تعداد $2*10^{6}$ مخمر کاندیدا البیکنس به صورت تزریق داخل وریدی، ارتشاح کاندیدا مشخص می‌باشد.

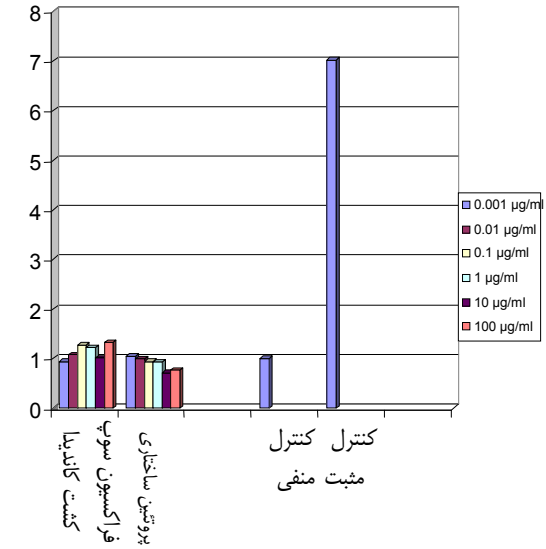
نتایج حاصل از ارزیابی پاسخ ضد تکثیری سلولهای گره لنفاوی موشBalb/c در مقابل فراکشن حاصل از سوپ کشت کاندیدا آلبیکنس و پروتئین ساختاری کاندیدا آلبیکنس در تستMTT. نتایج تستMTT نشان داد که پروتئینهای ساختاری در تمام غلظتها، موجب سرکوب پاسخهای تکثیری شدند؛ منتهی در مورد فراکشن پروتئینهای ترشحی این سرکوب در ۲۴ساعت اولیه (نمودار ۱) تنها در غلظتهای ۰/۰۰۱و ۰/۰۱ و ۰/۱ µg/ml به طور معنی‌دار مقایسه با گروه کنترل موجب سرکوب پاسخهای تکثیری شده است ($P<0/05$). در MTT ۴۸ ساعته (نمودار ۲) فراکشن پروتئینهای ترشحی تنها در غلظت ۰/۰۰۱ µg/ml موجب سرکوب شد که این سرکوب از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشته است ($P>0/05$). در حالی که در باقی غلظتها موجب تکثیر سلولهای گره لنفاوی شد. در MTT ۷۲ساعته (نمودار ۳) در غلظتهای ۰/۰۰۱ ، ۰/۰۱ ، ۱ و ۱۰µg/ml موجب سرکوب پاسخ تکثیری شد. اما تنها در غلظت ۰/۰۰۱µg/ml به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل موجب سرکوب پاسخهای تکثیری شده است و در باقی غلظتها موجب القای پاسخ تکثیری شده است. با توجه به این که سرکوبگری این پروتئینها دارای کینتیک ثابتی نبوده است، در این تحقیق به هر موش ۵۰۰µg (معادل ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آنتی‌ژن ساختاری و فراکشن سوپ روزانه تزریق شد.



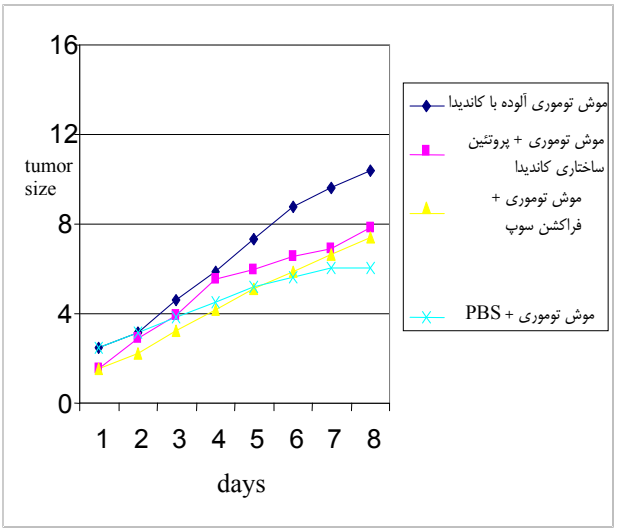
نمودار۱. نتایج ۲٤ ساعته تست MTT بر حسب اندیکس تحریک



نمودار۳. نتایج ۷۲ ساعته تست MTT بر حسب اندیکس تحریک



نمودار۲. نتایج ٤۸ ساعته تست MTT بر حسب اندیکس تحریک

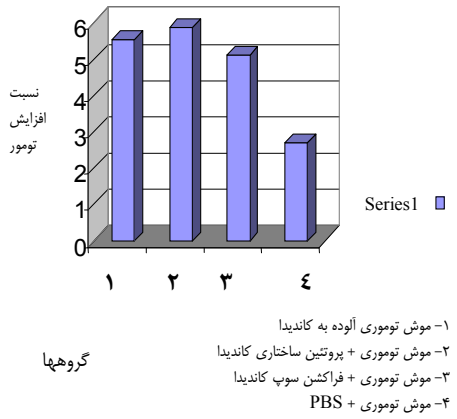


منحنی۱. تغییرات حجم تومور درروزهای متوالی درگروههای مختلف برحسب سانتی مترمکعب.

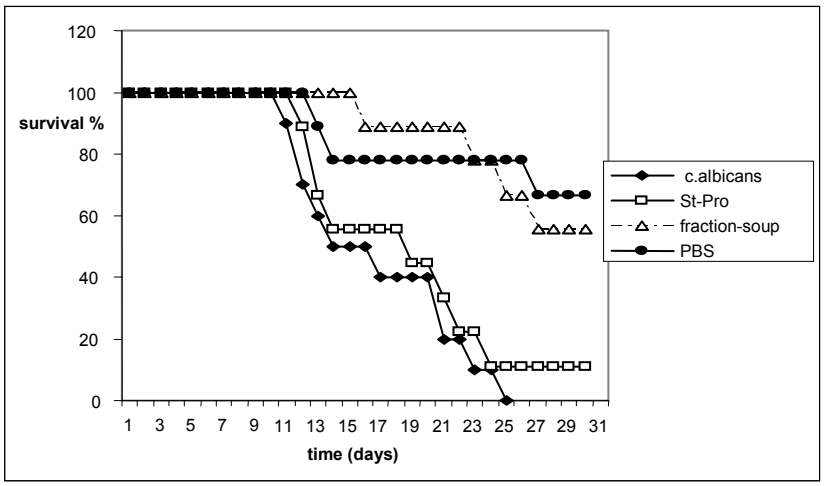
بررسی اثر عفونت سیستمیک کاندیدا آلبیکنس، فراکشن سوپ روئی کشت کاندیدا آلبیکنس و پروتئین ساختاری آن بر رشد تومور پستان و بقاء موش Balb/c. تزریق روزانه ۵۰۰ میکروگرم از فراکشن سوپ روئی کشت کاندیدا آلبیکنس و پروتئین ساختاری کاندیدا آلبیکنس به صورت درون وریدی در موشهای توموری نشان داده است که این گروهها در مقایسه با گروههای کنترل که حجم معادلی از PBS دریافت نموده بودند، به طور معنی‌داری موجب افزایش (منحنی ۱ و نمودار ۴) رشد تومور شدند (P<۰/۰۵). بررسی موشهای توموری از نظر بقاء نشان داده است که در هر سه گروه میزان بقاء کاهش می‌یابد (منحنی ۲)؛ این کاهش در گروه موشهای توموری آلوده به کاندیدا آلبیکنس و گروه دریافت کننده پروتئین‌های ساختاری معنی‌دار است (P<۰/۰۵). اما در گروه دریافت کننده فراکشن سوپ کاندیدا

آلبیکنس کاهش بقاء نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نمی‌باشد (P>۰/۰۵).

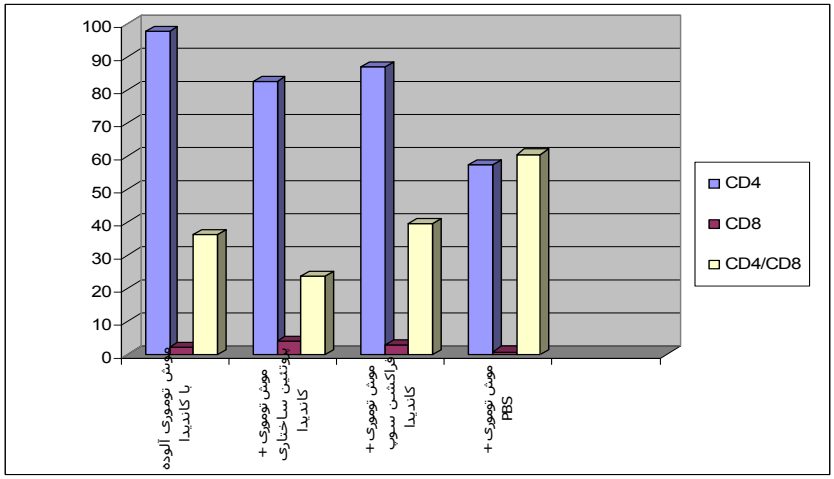
نتایج فلوسایتومتری لنفوسیتهای ارتشاح یافته به تومور. نتایج فلوسایتومتری سلولهای ارتشاح یافته به تومور در گروههای مختلف نشان می‌دهد که ارتشاح جمعیت لنفوسیتهای $TCD\ 4^+$ در تومور گروههای دریافت کننده کاندیدای زنده یا فراکشن سوپ کشت آن و یا پروتئین ساختاری آن در مقایسه با گروههای کنترل که PBS دریافت نموده بودند، افزایش یافته است و این افزایش در هر سه مورد نسبت به گروه کنترل معنی‌دار می باشد (P<۰/۰۵).



نمودار۴. نسبت افزایش حجم تومور در روز اخر به روز اول در گروههای مختلف.



منحنی۲. بقای موشهای توموری بر حسب روز و درصد بقا



نمودار۵. نتایج فلوسایتومتری (CD8 و CD4) در گروههای مختلف و نسبت CD4/CD8 در گروهها (P<۰/۰۵)

نتایج نسبت CD4/CD8 در گروههای مختلف نشان (نمودار ۵) می‌دهد که این نسبت در تومور گروههایی که کاندیدای زنده و یا پروتئین ساختاری آنرا دریافت نموده بودند، در مقایسه با گروههای کنترل که PBS دریافت نموده بودند، به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵) اما در گروهی که فراکشن سوپ کشت کاندیدا آلبیکنس را دریافت نموده‌اند، این کاهش معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).

بحـــث

یکی از بیماری‌هایی که زمینه‌ساز عفونت فرصت طلب کاندیدایی می‌باشد، سرطان سینه است که عموماً در حین درمان مبتلایان به این بدخیمی به علت آسیبی که به سیستم ایمنی وارد می‌آید، بدن مستعد ابتلا به عفونت‌های فرصت طلبی چون کاندیدا آلبیکنس می‌گردد (۲۰). یافته‌ها در مورد بعضی بدخیمی‌ها نشان می‌دهد که عفونت کاندیدایی میزان مرگ و میر را در افراد دچار بدخیمی ۳۰-۱۸٪ افزایش می‌دهد (۲۱). لذا با نگرشی بر عملکرد کاندیدا آلبیکنس در مقابل سیستم ایمنی، منطقی به نظر می‌رسد که به عنوان یک عامل پیشرفت دهنده رشد تومور تلقی گردد. شواهد متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد پروتئین‌های کاندیدا آلبیکنس دارای خاصیت سرکوبگری بر پاسخ ایمنی می‌باشند. بررسی‌های Rogers و همکارانش نشان داده است که کاندیدا آلبیکنس کشته شده با فرمالین، پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T به میتوژن PHA و همچنین Con A را کاهش می‌دهد (۲۲). در گزارشی دیگر Morelli و همکارانش نشان داده‌اند که اگر لنفوسیت‌های انسانی را در مقابل پلی ساکارید استخراج شده از کاندیدا آلبیکنس کشت دهند، سلول های T سرکوبگری ایجاد می‌گردد که پاسخ لنفوسیت‌های T را سرکوب می‌نماید و مکانیسم عمل چنین سلولی بالقوه می‌تواند یا با تماس مستقیم سلولی و یا با کمک برهمکنش با فاکتورهای محلول باشد (۲۳). Gehrz و همکارانش گزارش نمودند که پروتئین مانان یکی از عواملی است که باعث مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها می‌گردد. این پروتئین با شلاته کردن مس موجود در محیط کشت سلولی پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها را مهار می‌نماید (۲۴). در گزارشی دیگر Nelson و همکارانش نیز نشان داده‌اند که پروتئین مانان دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس موجب سرکوب پاسخ ایمنی می‌گردد (۲۵). در این تحقیق با توجه به شواهدی که در مورد عملکرد کاندیدا آلبیکنس در محیط in vitro و تعامل آن با سیستم ایمنی در دسترس بود و با توجه به این که از معظلات مهم پروسه درمانی مبتلایان به سرطان پستان، عفونت‌های فرصت طلبی چون کاندیدا آلبیکنس بوده است به بررسی نقش عفونت کاندیدا آلبیکنس در موش‌های مبتلا به سرطان پستان پرداختیم؛ مدل مطالعاتی موش مبتلا به Spontaneouse adenocarcinoma of Breast با تزریق وریدی کاندیدا آلبیکنس عفونت سیستمیک در آن ایجاد شد و سپس نقش این عفونت بررسی گردید. در مرحله بعد پروتئین‌های ساختاری و فراکشن پروتئین‌های ترشحی کاندیدا آلبیکنس در تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت که یافته‌ها حاکی از سرکوب پاسخ تکثیری بود. در مرحله بعد با ایجاد موش توموری از طریق یک جراحی ساده با عفونی نمودن این موش‌ها و همچنین در گروه‌های دیگر با تزریق پروتئین‌های ساختاری و فراکشن پروتئین‌های ترشحی به دست آمده از کاندیدا آلبیکنس، تأثیر این عوامل بر رشد تومور و همچنین جمعیت سلولی لنفوسیتی، در ارتشاح تومور مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد به بررسی اثر عفونت سیستمیک کاندیدا آلبیکنس و همچنین پروتئین‌های ترشحی و ساختاری در موش‌های مبتلا به سرطان پستان پرداختیم. پس از طی شدن هشت روز از عفونت و همچنین تزریق روزانه پروتئین‌های ساختاری و ترشحی، یافته‌ها نشان داد که این عوامل موجب افزایش حجم تومور گردیده‌اند. این افزایش حجم در گروه موش‌های توموری که آلوده به کاندیدا آلبیکنس بوده‌اند، در مقایسه با گروه‌های کنترل به طور چشمگیری (P>۰/۰۵) افزایش یافت. همچنین در گروه دریافت کننده پروتئین ساختاری (P=۰/۰۲۸) و گروه دریافت کننده فراکشن حاصل از سوپ کشت کاندیدا آلبیکنس (P>۰/۰۲۱) نیز

افزایش حجم تومور در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. چنین نتیجه‌ای نشان از فراهم بودن شرایط لازم برای رشد تومور می‌باشد و لذا می‌توان نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً سرکوب پاسخ ایمنی توسط عوامل کاندیدایی شکننده سد پاسخ ایمنی ایجاد شده است و تومور هیچ گونه پاسخ ایمنوژنتیکی در مقابل رشد بی‌رویه خود ندارد.

همچنین شواهد متعددی از نقش سرکوبگری پروتئین‌های ترشحی کاندیدا آلبیکنس نیز وجود دارد. گزارشهای متعددی نیز از سرکوب پاسخ سایتوکاین و تولید واسطه‌های آزاد اکسیژن توسط سوپ کشت کاندیدا آلبیکنس حکایت می‌کنند (۲۶).

در گام بعدی به آنالیز جمعیت لنفوسیت‌های T ارتشاح یافته به تومور پرداختیم. یافته‌های علمی حاکی از این است که لنفوسیتهای +TCD8 و +TCD4 در پاسخ به تومور و حذف آن نقش مهمی دارند. یافته‌های ما در این تحقیق نشان داده است که درصد جمعیت لنفوسیت‌های + TCD4 ارتشاح یافته به تومور در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند (P<۰/۰۵) و در کنار آن افزایش لنفوسیت‌های +TCD8 نیز در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵)؛ اما نسبت CD4/CD8 در تمامی گروه‌های تست در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد و این کاهش از نظر آماری در گروه آلوده به کاندیدا آلبیکنس و گروه دریافت کننده پروتئین‌های ساختاری معنی‌دار است (P<۰/۰۵) اما در گروه دریافت کننده فراکشن سوپ این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد.

با توجه به افزایش جمعیت CD4 , CD8 ارتشاح یافته به تومور و باتوجه به اهمیت آنها در پاسخ به تومور، قاعدتاً باید حجم تومور کاهش یابد اما عملاً چنین اتفاقی نیفتاد و تومورها در گروه‌های مختلف به شدت بزرگ شدند. لذا با توجه به افزایش حجم تومور و سلول‌های +CD4 ارتشاح یافته به تومور، نمی‌توان این سلول‌ها را به عنوان سلول‌های کمکی ضد تومور در نظر گرفت. شواهد متعددی مبنی بر بدتر شدن وضع تومور توسط سلول‌های +TCD4 وجود دارد.

سلولهای +TCD4+CD25 به عنوان دسته‌ای از سلول‌های تنظیمی (T-reg) هستند که در سرکوب پاسخ ایمنی ضد آنتی‌ژن‌های خودی در بدن نقش دارند. یافته‌های Toge و همکارانش در مورد سرطان پستان در مدل انسانی نشان داده است که سلول‌های +TCD4+CD25 در سرطان پستان موجب سرکوب پاسخ ایمنی می‌شوند و شاید این روند عامل پیشرفت سرطان و علت عدم موفقیت ایمونوتراپی در سرطان پستان باشد (۲۷). در تحقیق دیگر Li و همکارانش نیز افزایش سلول‌های T تنظیمی +TCD4+CD25 را در خون محیطی افراد مبتلا به سرطان پستان گزارش نمودند (۲۸).

عفونتهای فرصت طلب با مکانیسمهای متعددی به رشد تومور سرعت می‌بخشند. از سویی با کمک آنتی ژن های ترشحی و ساختاری خود موجب سرکوب پاسخ‌های ایمنی می‌شوند و از طرف دیگر احتمالاً با ایجاد سلول‌های T-reg با مکانیزمی غیر مستقیم موجب سرکوب پاسخ‌های ایمنی ضد تومور می‌شوند (برای اثبات این فرضیه نیاز به مطالعات تکمیلی بعدی می‌باشد) و لذا تومور با سرعت برق آسایی رشد نموده؛ بیمار را به سرعت از پای در می‌آورد (۲۱).

بنابراین، در ایمنوتراپی سرطان با توجه به نقشی که این عفونت‌ها در جهت تسریع نمودن رشد تومور دارند و با توجه به مرگ و میری که ایجاد می‌نمایند، شاید در آینده نیاز باشد به همان اندازه که به ایمنوتراپی سرطان اهمیت داده می‌شود، به جلوگیری از بروز هر گونه عفونت فرصت طلب در مبتلایان به تومور اهمیت داده شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه ما و تجربیات متعددی که توسط محققین گزارش شده است، افزایش رشد تومور در حضور کاندیدا آلبیکنس و آنتی ژن‌های آن منطقی به نظر می‌رسد.

در حقیقت با توجه به افزایش جمعیت CD4 در ارتشاح توموری و شواهدی که در این زمینه در مورد افزایش سلول‌های T-reg در ارتشاح تومور وجود دارد، باید پذیرفت که این افزایش جمعیت لنفوسیت‌های +TCD4 در ارتشاح توموری با توجه به این که رشد تومور را بیشتر نمودند، باید از دسته سلول‌های T-reg باشند و نقش کمکی برای آنها نمی‌توان قائل شد.

References

1. Sing N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors of antimicrobial use practices (Review article). Clinical Infectious Disease 2001; 23:1992-96.

2. Rangel-Frausto S, Wilblin T, Blumberg HM. Variation in rates of Candida blood stream infection in seven surgical ICUs and six neonatal ICUs. Clinical Infectious Disease 1999; 129: 253-258.

3. Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals: three years analysis. Clinical Infectious Disease 1999; 29: 239-244.

4. Wenzel RP. Severe sepsis-national estimates. Critical Care Medicine 2001; 29: 1472-1474.

5. Pfaller MA. Enternational surveillance of blood stream infections due to Candida albicans species, frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole,voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the sentry antimicrobial surveillance program.Journal of Clinical Microbiology 2001; 39: 3254-3259.

6. Tierney LM, Mcphee SJ, Papadakis MA. Cancer. Current medical diagnosis and treatment. Large medical books/MC Graw-Hill. Middle East Edition 2000; 71-74.

7. Lane IW, Shark LC. Don't get cancer. A very publishing group Inc. New york USA 1992.

8. Ahmedin J, Taylor M, Alicia S. Cancer statistics. Cancer Journal for clinicians 2003; 53: 5-26.

9. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. Candidiasis. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA; In clinical Mycology, Churchill Livingstone, New York 2003: 195-229.

10. Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Nisini R.Candida albicans yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. Infection and Immunity 2004; 72(2): 833-843.

11. Carvalho LP, Bacellar O, Neves NA, de Jesus AR. Evaluation of cellular immune response in patients with recurrent candidiasis. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical 2003; 36(5): 571-576.

12. Murciano C, Villamon E, Oconnor JE, Gil ML. Killed Candida albicans yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells. Infection and Immunity 2006; 74(2): 1403-2.

13. Smail EH, Melnick DA, Ruggeri R, Diamond RD. Anovel natural inhibitor from Candida albicans hyphae causing dissociation of the neutrophil respiratory burst response to chemotactic peptides from other post-activation events. Journal of Immunity 1988; 140: 3893-3899.

14. Danley DL, Hilger AE, Winkel CA. Generation of hydrogen peroxide by Candida albicans and influence on murine polymorphonuclear leukocyte activity. Infection and Immunity 1983; 40: 97-102.

15. Tang N, Liu L, Kang K, Mukherjee PK, Takahara M, Chen G, McCormick TS, Cooper KD, Ghannoum M. Inhibition of Monocytic Interleukin-12 Production by Candida albicans via Selective

Activation of ERK Mitogen-Activated Protein Kinase. Infection and Immunity 2004; 72: 2513-20.

16. Elorza MV, Murgui A, Sentandreu R. Dimorphism in Candida albicans: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell wall.Journal of General Microbiology 1985; 131(9): 12209-12216.

17. Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A. Modulation of CD4+ and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes by a fraction isolated from Shark cartilage: Shark cartilage modulates anti-tumor immunity. International Immunopharmacology 2003; 3: 921-926.

18. Boyne R, Arthur JR. The response of selenium-deficient mice to Candida albicans infection. Journal of Nutr ition 1986; 116: 816-822.

19. Nelson RD, Herron MJ, McCormack RT, Gehrz RC. Two mechanisms of inhibition of human lymphocyte proliferation by soluble yeast mannan polysaccharide. Infection and Immunity 1984; 43: 1041-1046.

20. Dibaise JK, Eamonn Q. Fatal diffuse invasive Gasterointestinal candidiasis masking as ileus after Bone Marrow Transplantation. Journal of Clinical Gastroenterology 1997; 24: 165-168.

21. Pagano L, Melle L, Fianchi L, Melillo L et al. Chronic disseminated candidiasis in patients with hematologic malignancies. Clinical features and outcome of 29 episodes. Hematologica 2002; 87: 535-541.

22. Rivas V, Rogers TJ. Studies on the cellular nature of candida albicans induced suppression. The Journal of Immunology 1983; 130: 376-379.

23. Piccolella E, Lombardi G, Morelli R. Generation of suppressor cells in the response of human lymphocytes to a polysaccharide from candida albicans. The Journal of Immunology 1981; 126: 2151-2155.

24. Nelson RD, Herron MJ, McCormack RT, Gehrz RC. Two mechanisms of inhibition of human lymphocyte proliferation by soluble yeast mannan polysaccharide. Infection and Immunity 1984; 43: 1041-1046.

25. Podzorski RP, Herron MJ, Fast DJ, Nelson RD. Pathogenesis of candidiasis. Immunosuppression by cell wall mannan catabolites. Archive of Surgery 1989; 124: 1290-1294.

26. Bernhard H. Possible role of secreted proteinases in candida albicans infections. Rev ibroam micol 1998; 15: 65-68.

27. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. Oncol Rep 2005; 14: 1269-1273.

28. Liu JT, Yue J, Ren XB, Li H. Measurement of CD4+CD25+ T cells in breast cancer patients and its significance. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2005; 27: 423-425