



بررسی شبکه سایتوکاینی سلول‌های Th1 و Th2 در موش‌های توموردار مبتلا به عفونت آسپرژیلوزیس

نوشین سهرابی^{۱*}، مجید تیبانیان^۲، مهدی مهدوی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، واحد شهر جدید پردیس، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، البرز، ایران.

۳- گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۰۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۱/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آسپرژیلوس مهاجم یک عفونت کشنده در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات متقابل عفونت ناشی از آسپرژیلوس و تومور بر روی پاسخ‌های ایمنی و شبکه سایتوکاینی موش‌های مبتلا به سرطان آلوده به آسپرژیلوس بود.

مواد و روش‌ها: قطعات استریل تومور پستان به موش‌های تحت آزمایش پیوند زده شدند و سپس گروه‌های مورد نظر به وسیله تجویز درون وریدی به کونیدی‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس آلوده شدند. در گروه‌های کنترل تنها تجویز کونیدی آسپرژیلوس و یا پیوند تومور انجام شد. هفت روز بعد از ایجاد عفونت آسپرژیلوزیس، سلول‌های طحالی موش‌های تحت آزمایش استخراج شدند و میزان سایتوکاین‌های $IL-4$ ، $IL-10$ ، $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ تولید شده توسط آن‌ها به وسیله روش الایزا اندازه‌گیری گردید.

نتایج: موش‌های توموری که با کونیدی آسپرژیلوس فومیگاتوس آلوده شده بودند، افزایش قابل توجهی در میزان $IL-4$ در مقایسه با دو گروه کنترل نشان دادند، در حالی که میزان $IFN-\gamma$ و $IL-10$ آن‌ها کاهش و $TNF-\alpha$ در آن‌ها افزایش مختصری داشت.

نتیجه‌گیری: احتمالاً بیماری آسپرژیلوزیس مهاجم باعث تغییر در تولید سایتوکاین‌های سلول‌های T کمکی $CD4+$ و ایمنی اکتسابی در موش‌های دارای تومور می‌شود. این نکته می‌تواند در مدیریت بهتر بیماران سرطانی مبتلا به عفونت آسپرژیلوس مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوزیس، موش‌های توموردار، Th1، Th2، سایتوکاین

مقدمه

(شامل $IL-4$ و $IL-10$) در محیط کشت سلول‌های فوق، باعث اثر متضاد می‌شود (۹-۷).

مطالعات انجام شده در مدل موشی نشان داده است که مقاومت به عفونت تجربی آسپرژیلوس فومیگاتوس با القاء سایتوکاین‌های تومور نکروز فاکتور آلفا $TNF(\alpha)$ ، $IL-12$ و $IFN-\gamma$ و حساسیت به عفونت با تولید $IL-4$ و یا $IL-10$ در ارتباط است (۱۰-۸).

اگرچه اکثر مطالعات انجام شده نشان‌دهنده نقش مستقیم سایتوکاین‌های Th1 در دفاع با واسطه سلولی (لوکوسیت‌ها) در مقابل عفونت‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد اما تا کنون گزارشی در مورد نقش سایتوکاین‌ها در مدل موش سرطانی مبتلا به آسپرژیلوزیس ارائه نشده است. به همین منظور در مطالعه حاضر، پس از ایجاد مدل موشی مبتلا به سرطان و آلوده نمودن این حیوانات با سویه‌های بیماری‌زای آسپرژیلوس فومیگاتوس، میزان تولید سایتوکاین‌های مختلف ارزیابی و بررسی شدند.

آسپرژیلوس فومیگاتوس یکی از فراوان‌ترین قارچ‌های کپکی ساپروفیتی است که به میزان زیادی در محیط دیده می‌شود (۱ و ۲). این قارچ در بیماری‌هایی که دارای نقص سیستم ایمنی می‌باشند باعث ایجاد بیماری آسپرژیلوزیس مهاجم می‌شود که به عنوان یک بیماری خطرناک کشنده محسوب می‌شود (۲ و ۳). به دلیل شیوع ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV)، گسترش میزان پیوند اعضا و افزایش مصرف داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در بیماران مبتلا به خودایمنی و بدخیمی، بیماری آسپرژیلوس مهاجم در سال‌های اخیر با گسترش بی‌رویه‌ای همراه بوده است (۵-۳).

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که سایتوکاین‌های ناشی از لنفوسیت‌های T یاریگر (T-helper) در دفاع میزبان در مقابل آسپرژیلوس فومیگاتوس شرکت می‌کنند (۶ و ۷). کشت سلول‌های فاگوسیتیک در مجاورت سایتوکاین‌های Th1 (همانند $IFN-\gamma$) باعث افزایش فعالیت قارچ‌کشی این سلول‌ها می‌شود در حالی که افزودن سایتوکاین‌های Th2

* نویسنده مسئول: نوشین سهرابی، گروه زیست‌شناسی، دانشا پیام نور، واحد شهر جدید پردیس، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۷۶۲۴۳۱۳۸
Email: nsohrabi75@yahoo.com

مواد و روش ها

حیوانات: تعداد ۴۰ عدد موش ۸-۱۰ هفته ای نژاد BALB/c تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول (A) به عنوان موش های توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم شامل حیواناتی بودند که بافت توموری به آن ها پیوند زده شدند و سپس کونیدی آسپرژیلوس فومیگاتوس به آن ها تزریق گردید. موش های گروه (B) با تومور پیوند زده شدند و سرم فیزیولوژی به آن ها تزریق گردید و به عنوان موش های توموری سالم در نظر گرفته شدند. در گروه (C) به موش ها کونیدی آسپرژیلوس فومیگاتوس تزریق شد و موش های گروه (D) تنها سرم فیزیولوژی دریافت کردند.

شرایط کشت و القای عفونت آسپرژیلوس فومیگاتوس: سویه انتخابی آسپرژیلوس فومیگاتوس بر روی محیط سابورد کستروز آگار حاوی کلرامفنیکل به مدت ۴ روز کشت داده شد. سپس کونیدی های قارچی به وسیله شستشوی سطحی محیط کشت با ۵ میلی لیتر توئین ۲۰ (۰/۰۵ درصد) استخراج و در درون لوله مخروطی پلاستیکی جمع آوری شدند. پس از شستشو و شمارش کونیدی، غلظت مناسب از آن تهیه شد. برای ایجاد عفونت تجربی در موش های انتخابی، میزان 5×10^6 کونیدی در حجم ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به صورت داخل عروقی و از طریق رگ دمی، تزریق گردید. با تهیه نمونه های بافتی از موش های عفونی شده، وجود آلودگی آسپرژیلوزیس در آن ها تأیید شد.

مدل توموری: قطعات استریل و کوچک تومور از یک مدل موش مبتلا به spontaneous breast cancer به صورت زیر جلدی در داخل لایه چربی پستان موش های مورد آزمایش تلقیح شدند. پس از ۷-۵ روز که اندازه توده تومور به ۴-۶ میلی متر رسید، تزریق کونیدی آسپرژیلوس فومیگاتوس یا زمال سالین در گروه های مورد نظر انجام شد. میزان رشد تومور به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شد. برای سنجش زمان بقا، گروهی از موش های تحت آزمایش به مدت ۶۰-۴۵ روز مورد بررسی قرار گرفتند.

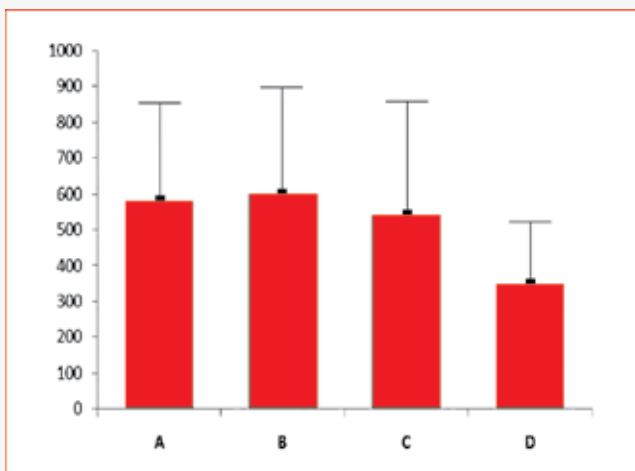
جداسازی و کشت سلول های طحال: ۱۴ روز بعد از تزریق کونیدی یا سرم فیزیولوژی، موش ها کشته و سلول های طحالی آن ها استخراج شدند. پس از حذف گلبول های قرمز به وسیله محلول لیز کننده، سوسپانسیون سلول های طحالی بر مبنای $10^6 \times 0/5$ سلول در میلی لیتر تهیه و در پلیت های ۲۴ حفره ای و در مجاورت محیط غنی شده RPMI کشت داده شدند. سپس به میزان ۲ میکروگرم در میلی لیتر فیتوهمگلوتنین به محیط کشت فوق افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. پس از این مدت محلول رویی جمع آوری و در ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

سنجش سایتوکائین ها: میزان تولید سایتوکائین های IFN- γ و IL-4 و IL-10 و TNF- α در سوپ رویی کشت سلول های طحالی به روش الایزا اندازه گیری شدند. محدوده اندازه گیری برای IL-10 و IL-4 کمتر از ۳ و برای IFN- γ کمتر از ۱۰ پیکوگرم در هر سی سی بود.

آنالیز آماری: داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS v.15 بررسی شدند. نتایج بین گروه ها با آنالیز واریانس مقایسه گردید و اختلاف $P < 0.05$ به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند.

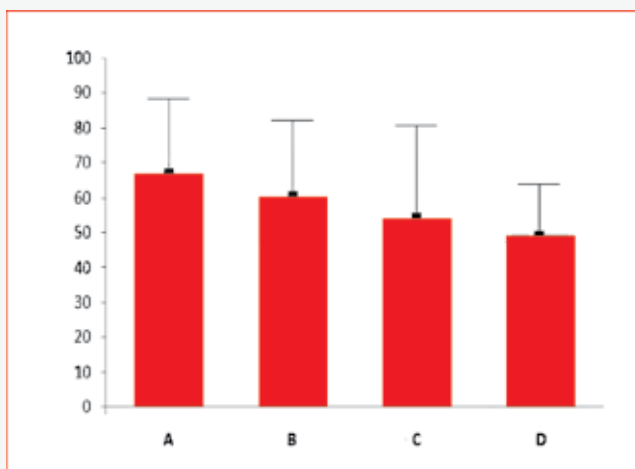
نتایج

به منظور ارزیابی اثرات همزمان عفونت آسپرژیلوس و تومور بر روی پاسخ های ایمنی، میزان سایتوکائین های تولید شده در سوپ رویی کشت سلول های طحالی گروه های مختلف اندازه گیری شد. بر اساس نتایجی که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، میزان IL-10 در موش های توموری آلوده به عفونت آسپرژیلوزیس در مقایسه با گروه های مبتلا به آسپرژیلوزیس و توموری غیر آلوده کاهش غیر معنی دار پیدا کرده بود ($P > 0.05$).



نمودار ۱: میزان تولید IL-10 توسط سلول های طحالی موش های تحت آزمایش: میزان IL-10 در گروه های A و C در مقایسه با گروه B به صورت غیر معنی داری کاهش دارد.

گروه A: موش های مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه B: موش های توموری، گروه C: موش های توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه D: موش های کنترل سالم



نمودار ۲: میزان تولید IFN- γ توسط سلول های طحالی موش های تحت آزمایش: این سایتوکائین در گروه های A و C در مقایسه با گروه B به صورت غیر معنی داری کاهش دارد.

میزان تولید $TNF-\alpha$ در سلول‌های طحالی موش‌های توموری و غیر توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس و هم‌چنین موش‌های توموری غیر آلوده، در مقایسه با گروه کنترل افزایش غیر معنی‌داری را نشان داده است (نمودار ۴).

بحث

آسپرژیلوزیس ریوی مهاجم به عنوان یکی از مشکلات شایع در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی مطرح می‌باشد (۱۳) و (۱۴). از آنجا که درمان‌های رایج این بیماران نتایج قابل توجهی را به همراه نداشته است، لذا شناخت مکانیسم پاسخ‌های ایمنی علیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می‌تواند در طراحی روش‌های نوین درمانی و یا پیش‌گیری از این عفونت مفید باشد (۱۵). به همین منظور در این مطالعه الگوی پاسخ سایتوکاین میزبان را بعد از ابتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم در مدل حیوانی سالم و توموری بررسی نمودیم.

همان‌طور که در مطالعات قبلی گزارش شده است، سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در مقاومت و یا حساسیت نسبت به عفونت *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به عهده دارند (۷، ۱۶ و ۱۷). اکثر این مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های $Th1$ در القای پاسخ‌های محافظتی در مقابل عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم نقش اصلی را به عهده دارند در حالی که پاسخ‌های $Th2$ با پیشرفت بیماری و پاسخ‌های غیر محافظتی همراه خواهند بود (۷، ۸ و ۱۶).

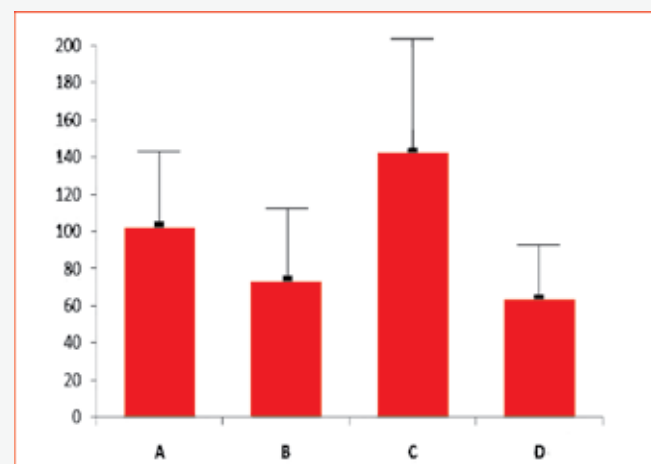
یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌ها در القای پاسخ‌های حفاظتی و مقاومت به عفونت آسپرژیلوزیس مهاجم، اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$) است که جلوگیری از ترشح آن با شدت بیماری همراه خواهد شد (۱۱ و ۱۸). در مقابل، اینترلوکین ۱۰ ($IL-10$)، که از دسته سایتوکاین‌های تنظیمی محسوب می‌شود، با تشدید شانس تهاجم و پیش‌آگهی بد عفونت آسپرژیلوزیس همراه می‌باشد (۱۹ و ۲۰). مشابه این امر در مورد اینترلوکین ۴ ($IL-4$) نیز دیده شده است. به طوری که مهار این سایتوکاین در اوایل عفونت آسپرژیلوزیس تا حد زیادی می‌تواند باعث مهار عفونت گردد (۸ و ۱۰).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اگر دوز بالایی از قارچ به موش‌های تحت آزمایش تلقیح شود، میزان بیشتری از $IL-4$ تولید خواهد شد در حالی که تزریق مقادیر کمتر از ذرات قارچی باعث القای تولید $IFN-\gamma$ خواهد شد (۹، ۱۱ و ۲۰). مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که عفونت آسپرژیلوزیس می‌تواند ماتریکس سلولی را تغییر داده و باعث تکثیر سلول‌های T تنظیمی شود که این سلول‌ها می‌توانند باعث تولید مقادیر بیشتری از سایتوکاین‌هایی نظیر $IL-10$ گردند (۲۱).

نتیجه‌گیری

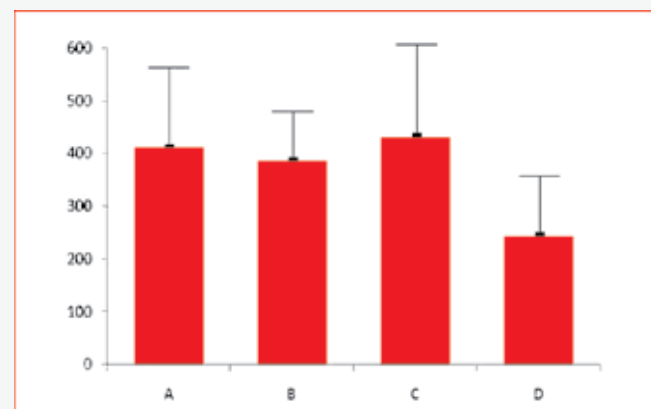
نتایج به دست آمده در این مطالعه نمایان‌گر تغییر و تخریب پاسخ‌های ایمنی محافظتی در مدل موشی توموری آلوده به *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می‌باشد. به گونه‌ای که پاسخ‌های سایتوکاینی ناشی از سلول‌های $Th2$ نظیر $IL-4$ افزایش نشان داد البته کاهش مختصر میزان $IFN-\gamma$ در این حیوانات می‌تواند نشان‌دهنده مهار پاسخ‌های ناشی از سلول‌های $Th1$ باشد.

مقادیر تولید شده از $IFN-\gamma$ در گروه‌های مختلف موش‌های تحت آزمایش در نمودار ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج موش‌های توموری که به عفونت آسپرژیلوزیس مبتلا شده‌اند کاهش غیر معنی‌داری را در سطح $IFN-\gamma$ در مقایسه با موش‌های غیر توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس و موش‌های توموری غیر آلوده نشان دادند ($P>0.05$). همان‌طور که در نمودار ۳ دیده می‌شود عفونت آسپرژیلوزیس باعث افزایش چشم‌گیر میزان تولید سایتوکاین $IL-4$ در موش‌های توموری، در مقایسه با سایر گروه‌ها شده است ($P>0.05$).



نمودار ۳: میزان تولید $IL-4$ توسط سلول‌های طحالی موش‌های تحت آزمایش: $IL-4$ در گروه‌های A و C در مقایسه با گروه B به صورت معنی‌داری افزایش دارد.

گروه A: موش‌های مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه B: موش‌های توموری، گروه C: موش‌های توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه D: موش‌های کنترل سالم



نمودار ۴: میزان تولید $TNF-\alpha$ توسط سلول‌های طحالی موش‌های تحت آزمایش: در گروه‌های A و C در مقایسه با گروه B به صورت غیر معنی‌داری افزایش دارد.

گروه A: موش‌های مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه B: موش‌های توموری، گروه C: موش‌های توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه D: موش‌های کنترل سالم

محسوب می‌شود، مؤید اهمیت پاسخ‌های سایتوکایینی در پیش آگهی بیماران مشابه می‌باشد که این امر نیازمند بررسی‌های بیشتر در زمینه پاسخ‌های ایمنی، به خصوص سلول‌ها و سایتوکاین‌های تنظیمی دیگر نظیر IL-17، می‌باشد. نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌تواند در تعیین راهکارهای نوین درمانی در بیماران توموری مبتلا به عفونت‌های مهاجم قارچی، از جمله آسپرژیلوس مهاجم، راه‌گشا باشد.

نتایج فوق می‌تواند با این فرض که عفونت آسپرژیلوسی در موش‌های توموری باعث نوعی به هم ریختگی در پاسخ‌های ایمنی می‌شود، تطبیق داشته باشد. در نتیجه این امر پیش آگهی عفونت بدتر خواهد شد که در نهایت با مرگ زودرس حیوانات فوق همراه خواهد شد. گزارش فوق که به عنوان تنها مطالعه انجام شده در زمینه پاسخ‌های سایتوکایینی در مدل موش توموری آلوده به آسپرژیلوس

References

1. Hohl T M, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and Host Defense. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(11):1953-1963.
2. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:310-350.
3. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;173:707-717.
4. Kauruna SV, Vidhan J, Rathore A S. Role of *Aspergillus* Spp. in causing possible nosocomial Aspergillosis among Immunocompromised cancer patients. *Indian J Allergy Asthma immunol*. 2003;17(2):77-83
5. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin. Infect Dis*. 2001;32(9):1319-1324.
6. Cenci E, Mencacci A, Fè d'Ostiani C, Del Sero G, Mosci P, Montagnoli C, et al. Cytokine and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis*. 1998;178(6):1750-1760.
7. Cenci E, Perito S, Enssle KH, Mosci P, Latgé JP, Romani L, et al. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun*. 1997;65(2): 564-570.
8. Graziutti ML, Rex JH, Cowart RE, Anaissie EJ, Ford A, Savary CA. *Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th1-type cytokine response. *J Infect Dis*. 1997;176(6):1579-1583.
9. Segal BH. Role of macrophages in host defense against Aspergillosis and strategies for immune augmentation. *The Oncologist*. 2007;12(2):7-13.
10. Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, d'Ostiani CF, et al. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis*. 1999;180:1957-1968.
11. Nagai H, Guo J, Choi H, Kurup VP. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 1995;172(6):1554-1560.
12. Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol*. 1999;162:1633-1640.
13. Bhatti Z, Shaikat A, Almyroudis NG, Segal BH. Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia*. 2006;162(1):1-15.
14. Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immuno-compromised patients. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:i5-14.
15. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:707-717.
16. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:1-23.
17. Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2002;100(13):4521-4528
18. Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, DeCarlo ES, Melnick DA. In vivo interferon- γ augments in vitro ability of chronic granulomatous disease neutrophils to damage *Aspergillus hyphae*. *J Infect Dis*. 1991;163(4):849-852.
19. Clemons KV, Grunig G, Sobel RA, Mirels LF, Rennick DM, Stevens DA. Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;122:186-191.
20. Roilides E, Dimitriadou A, Kadioglou I. IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus Fumigatus*. *J Immunol*. 1997;158:322-329.
21. Sohrabi N, Assan ZM H, Khosravi AR, Tebianian M, Mahdavi M, Tootian Z, et al. Invasive aspergillosis promotes tumor growth and severity in a tumor-bearing mouse model. *Can J Microbiol*. 2010;56:771-776.



Original Article

Evaluation of TH1 and TH2 Cytokine Network in *Aspergillus* Infected Tumor Bearing Mice

Sohrabi N^{1*}, Tebyaniyan M², Mahdavi M³

1- Department of Biology, Payam Noor University, Pardis, Tehran, Iran.

2- Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran.

3- Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objective: Invasive aspergillosis is a fatal infection in immunocompromised patients. The aim of this study was to evaluate the interaction of infectious with *aspergillus* and tumor on immune response and cytokine network in *Aspergillus* infected tumor-bearing mice.

Materials & Methods: Mice were implanted by sterile pieces of mouse mammary tumor and then infected by *Aspergillus* fungi conidia by IV injection. Control groups mice were infected with *Aspergillus* conidia or implanted by sterile funga pieces of mouse mammary tumor. Seven days after *Aspergillus* infection, cytokine production of extracted splenocytes was analyzed by ELISA method.

Results: Tumor bearing mice which were infected with *Aspergillus* conidia showed remarkable increase in IL-4 production. Conversely, the levels of IFN- γ and IL-10 were decreased and TNF- α was increased moderately.

Conclusion: Probably, *Aspergillus* infection could change cytokine production from CD4+ T helper cells and acquired immunity of tumor bearing mice. This point may be considered for better management of *Aspergillus*-infected patients suffering from cancer.

Keywords: Aspergillosis, Tumor bearing mice, Th1, Th2, Cytokines

* **Corresponding author:** Sohrabi Nooshin, Department of Biology, Payam-e-Noor University, Pardis Branch, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 76243138

E-mail: nsohrabi75@yahoo.com