Original Article

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

نوشین سهرابی[۱*]، مجید تبیانیان[۲]، مهدی مهدوی[۳]

۱ـ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، واحد شهر جدید پردیس، تهران، ایران.
۲ـ گروه بیوتکنولوژی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، البرز، ایران.
۳ـ 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 TNF-α، IL-4، IL-10 و IFN-γ 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-γ و IL-10 آن‌ها کاهش و TNF-α 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 تومودار، Th1، Th2، سایتوکاین

مقدمه

آسپرژیلوس فومیگاتوس یکی از فراوان‌ترین قارچ‌های کپکی ساپروفیتی است که به میزان زیادی در محیط دیده می‌شود (۱ و ۲). این قارچ در بیمارانی 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-γ) باعث افزایش فعالیت قارچ‌کشی این سلول‌ها می‌شود در حالی که افزودن سایتوکاین‌های Th2 (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(α)، IL-12 و IFN-γ 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 ارایه 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.

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

مواد و روش‌ها

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

شرایط کشت و القای عفونت *آسپرژیلوس فومیگاتوس*: سویه انتخابی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر روی محیط سابورود دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل به مدت ۴ روز کشت داده شد. سپس کونیدی‌های قارچی به وسیله شستشوی سطحی محیط کشت با ۵ میلی لیتر توئین ۲۰ (۰/۰۵ درصد) استخراج و در درون لوله مخروطی پلاستیکی جمع‌آوری شدند. پس از شستشو و شمارش کونیدی، غلظت مناسب از آن تهیه شد.

برای ایجاد عفونت تجربی در موش‌های انتخابی، میزان ۵×۱۰^{۶} کنیدی در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به صورت داخل عروقی و از طریق رگ دمی، تزریق گردید. با تهیه نمونه‌های بافتی از موش‌های عفونی شده، وجود آلودگی آسپرژیلوزیس در آن‌ها 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 موش‌های مورد آزمایش تلقیح شدند. پس از ۷-۵ روز که اندازه توده تومور به ۶-۴ میلی‌متر رسید، تزریق کونیدی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* یا نرمال سالین در گروه‌های مورد نظر انجام شد. میزان رشد تومور به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. برای سنجش زمان بقا، گروهی از موش‌های تحت آزمایش به مدت ۶۰-۴۵ روز مورد بررسی قرار گرفتند.

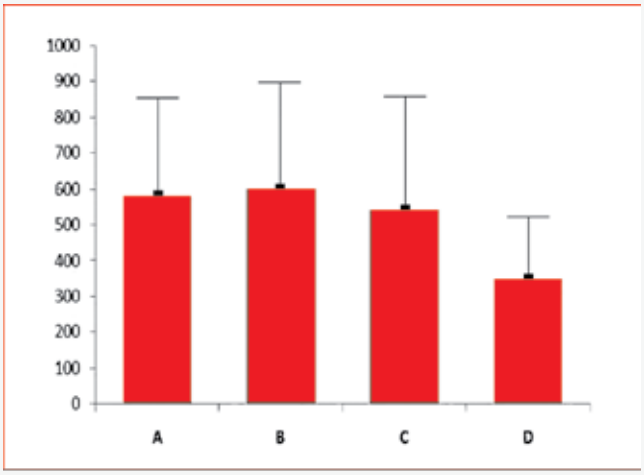
جداسازی و کشت سلول‌های طحال: ۱۴ روز بعد از تزریق کونیدی یا سرم فیزیولوژی، موش‌ها کشته و سلول‌های طحالی آن‌ها استخراج شدند. پس از حذف گلبول‌های قرمز به وسیله محلول لیز کننده، سوسپانسیون سلول‌های طحالی بر مبنای $۰/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر تهیه و در پلیت‌های ۲۴ حفره‌ای و در مجاورت محیط غنی شده RPMI کشت داده شدند. سپس به میزان ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر فیتوهماگلوتینین به محیط کشت فوق افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. پس از این مدت محلول رویی جمع‌آوری و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

سنجش سایتوکاین‌ها: میزان تولید سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 و IL-10 و TNF-α در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی به روش الایزا اندازه‌گیری شدند. محدوده اندازه‌گیری برای IL-4 و IL-10 کمتر از ۳ و برای IFN-γ کمتر از ۱۰ پیکوگرم در هر سی‌سی بود.

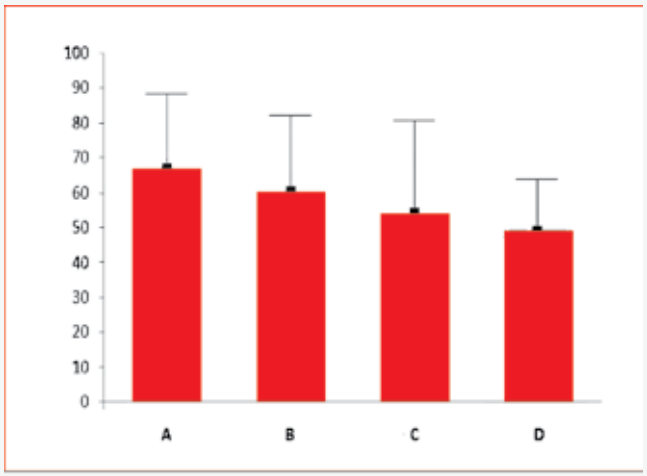
آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.15 بررسی شدند. نتایج بین گروه‌ها با آنالیز واریانس مقایسه گردید و اختلاف $P<0.05$ به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند.

نتایج

به منظور ارزیابی اثرات هم‌زمان عفونت *آسپرژیلوس* و تومور بر روی پاسخ‌های ایمنی، میزان سایتوکاین‌های تولید شده در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایجی که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، میزان IL-10 در موش‌های توموری آلوده به عفونت آسپرژیلوزیس در مقایسه با گروه‌های مبتلا به آسپرژیلوزیس و توموری غیر آلوده کاهش غیر معنی‌دار پیدا کرده بود ($P>0.05$).



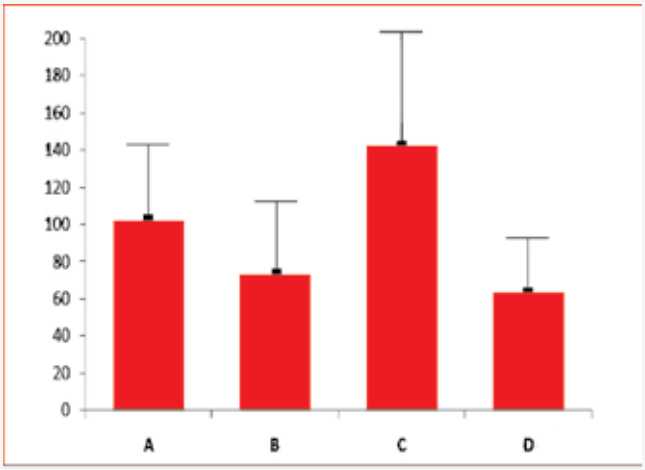
نمودار ۱: میزان تولید IL-10 توسط سلول‌های طحالی موش‌های تحت آزمایش: میزان IL-10 در گروه‌های A و C در مقایسه با گروه B به صورت غیر معنی‌داری کاهش دارد.
گروه A: موش‌های مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه B: موش‌های توموری، گروه C: موش‌های توموری مبتلا به آسپرژیلوزیس، گروه D: موش‌های کنترل سالم



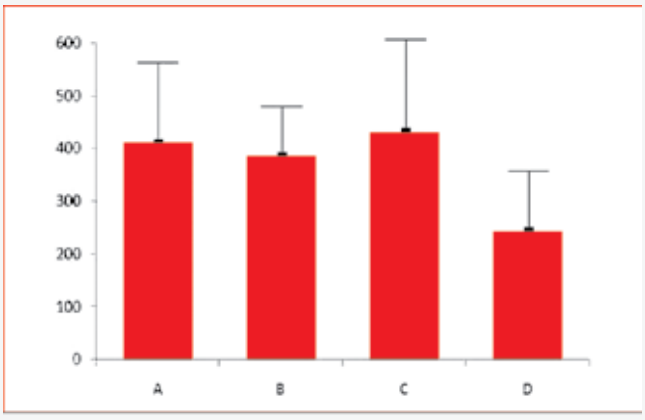
نمودار ۲: میزان تولید IFN-γ توسط سلول‌های طحالی موش‌های تحت آزمایش: این سایتوکاین در گروه‌های A و C در مقایسه با گروه B به صورت غیر معنی‌داری کاهش دارد.

مقادیر تولید شده از IFN-γ 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-γ 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-α 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

میزان تولید TNF-α 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-γ) است که جلوگیری از ترشح آن با شدت بیماری همراه خواهد شد (۱۱ و ۱۸). در مقابل، اینترلوکین 10 (IL-10)، که از دسته سایتوکاین‌های تنظیمی محسوب می‌شود، با تشدید شانس تهاجم و پیش آگهی بد عفونت آسپرژیلوزیس همراه می‌باشد (۱۹و۲۰). مشابه این امر در مورد اینترلوکین 4 (IL-4) نیز دیده شده است. به طوری‌که 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-γ 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-γ در این حیوانات می‌تواند نشان‌دهنده مهار پاسخ‌های ناشی از سلول‌های Th1 باشد.

نتایج فوق می‌تواند با این فرض که عفونت آسپرژیلوسی در موش‌های توموری باعث نوعی به‌هم‌ریختگی 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 سایتوکاینی در مدل موش توموری آلوده به *آسپرژیلوس* محسوب می‌شود، مؤید اهمیت پاسخ‌های سایتوکاینی 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.

References

1. Hohl T M, Feldmesser M. Aspergillus fumigatus: Principles of pathogenesis and Host Defense. Eukaryotic Cell. 2007;6(11):1953-1963.
2. Latge´ 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 allogenic 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. Grazziutti ML, Rex JH, Cowart RE, Anaissie EJ, FordA, 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-g and tumor necrosis factor-a protect mice from invasive aspergillosis. J Infect Dis. 1995;172(6):1554–1560.
12. Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. J Immunol. 1999;162:1633-1640.
13. Bhatti Z, Shaukat 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 imm-unecompromised 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, Kadiltsoglou I. IL-10 exerts supressive 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 *Aspergilus* Infected Tumor Bearing Mice

Sohrabi N[1*], Tebyaniyan M[2], Mahdavi M[3]

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, Payem-e-Noor University, Pardis Branch, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 76243138
E-mail: nsohrabi75@yahoo.com