Original Article

اثر تنظیم کنندگی سیکلوفسفامید بر روی سیستم ایمنی موش‌های عفونت یافته با *کاندیدا آلبیکنس*

عزیز ژاپونی[۱]، مجتبی انوری نژاد[۱*]، شهره فرشاد[۱]، داوود مهربانی[۲]

۱- مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲ - مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۵/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: سیکلوفسفامید، ماده آلکیله کننده‌ای است که باعث توقّف تکثیر DNA می‌گردد. از این ماده برای درمان سرطان‌ها و اختلالات ایمنی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر تنظیم کنندگی سیکلوفسفامید بر سیستم ایمنی موش‌های واکسینه و غیر واکسینه شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی سه گروه موش‌ها، شامل: گروه‌های واکسینه، غیر واکسینه و کنترل انجام شد. واکسیناسیون با تزریق داخل صفاقی *کاندیدا آلبیکانس* طی ۳ مرحله مجزا انجام شد. گروه واکسینه که سیکلوفسفامید را در روز شروع تست (۰) دریافت کرده بودند با دوز کشنده از ارگانیسم در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶ و ۱۲ مورد چالش قرار گرفتند. گروه غیر واکسینه شبیه گروه واکسینه با سیکلوفسفامید و دوز کشنده به چالش کشیده شدند.گروه کنترل در روز (۰) تزریق سیکلوفسفامید دریافت کردند. در روزهای ذکر شده بعد از تزریق سیکلوفسفامید؛ به منظور مطالعات پاتولوژیک کشته شدند. سپس از لام تهیه شده خون استفاده شد و بافت طحال و کلیه به صورت میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در گروه واکسینه شده افزایش زمان بقا، افزایش سلول‌ها با هسته‌ی چند قسمتی و هیپرپلازی در پالپ سفید طحال، مشاهده شد. در گروه غیر واکسینه، این فاکتورها؛ پس از تزریق سیکلوفسفامید در روز های ۱ و ۳؛ کاهش یافته بود.

نتیجه‌گیری: هیپرپلازی در پالپ سفید طحال و افزایش سلول‌های پلی مورفونوکلئر محیطی به علت اثرات انتخابی سیکلوفسفامید می‌باشد که به طور موثر از حیوانات در برابر عفونت *کاندیدا آلبیکنس* محافظت می‌کند.

کلمات کلیدی: اثر تنظیم کنندگی سیستم ایمنی، دوز کشنده، *کاندیدا آلبیکنس*، موش واکسینه شده، موش غیر واکسینه شده، سیکلوفسفامید.

مقدمه

مخمر *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان فلور طبیعی در اکثر افراد سالم، عمدتا در سطوح مخاط دستگاه گوارش زندگی می‌کند. با این حال، «کاندیدیاز حاد منتشر» یک بیماری تهدید کننده است که می‌تواند در بیماران دچارنقص ایمنی دیده شود (۱). با وجود معرفی داروهای پیشرفته ضد قارچ به منظور درمان و پیشگیری، کاندیدیاز تهاجمی؛ به عنوان یک مشکل بالینی در نظر گرفته می‌شود. در یکی از گزارشات در هر میلیون جمعیت ۷۲/۸ مورد از گونه‌های کاندیدا در هر سال گزارش شده است (۲). *کاندیدا آلبیکنس* می‌تواند اندام‌های زیادی را در بیماران دچار نقص ایمنی درگیر کند که نهایتا، منجر به عفونت و مرگ شود (۳).

فاکتورهای اصلی برای فرم منتشر بیماری عبارتند از: کاتتر، استفاده از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف، رژیم‌های دارویی سرکوب کننده سیستم ایمنی مرتبط با پیوند مغز استخوان یا ارگان و شیمی درمانی در بیماران سرطانی (۴و۵). متاسفانه، تشخیص کاندیدیاز مهاجم با علائم بالینی و نشانه‌های تهاجم و اشکال بیماری اختصاصی نمی‌باشد و در حال حاضر آزمون‌های سرولوژیکی در دسترس، اغلب فاقد حساسیت و اختصاصیت مورد نیاز می‌باشند (۶)، در حالی که مطالعه آسیب شناسی از بافت آلوده می‌تواند بسیار اختصاصی باشد. روش‌های تهاجمی مورد نیاز برای به دست آوردن نمونه‌های بیوپسی از ارگان‌های داخلی و عمیق برای افراد دچار ضعف سیستم ایمنی که ممکن است دچار ترومبوسیتوپنی باشند، توصیه نمی‌شود (۵).

سیکلوفسفامید به عنوان عامل آلکیله کننده باعث القا سرکوب سیستم ایمنی در مغز استخوان می‌شود (۴و۵). این اثر انتخابی از دارو در کاهش قدرت ایمنی آن را به یک تنظیم کننده مطلوب سیستم ایمنی برای تحقیقات ایمنی شناسی در آزمایش بر روی حیوانات تبدیل کرده است (۷، ۸). هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر تنظیم کنندگی سیکلوفسفامید بر روی سیستم ایمنی موش قبل از درگیری با دوز کشنده از *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد.

* **نویسنده مسئول: مجتبی انوری نژاد**، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. تلفن: ۶۴۷۴۲۶۴ ـ ۰۷۱۱
Email: anvarinejad@yahoo.com

مواد و روش‌ها

یک‌صد و پنجاه موش نر سفید با وزن ۲۰–۱۹گرم و به طول عمر ۴۰-۳۰ روز از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شیراز انتخاب شده و سپس به ۳ گروه مساوی شاهد، واکسینه و غیر واکسینه تقسیم شدند و هر کدام به ۵ گروه دیگر تقسیم شدند. گروه شاهد سیکلوفسفامید (خریداری شده از شرکت Farmos، کشور فنلاند)، دریافت کرد هر ویال حاوی ۵۰۰ میلی گرم از پودر سیکلوفسفامید و ۲۲۵ میلی گرم از نمک طعام است. به هر ویال ۲۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد تا محلولی حاوی ۲۰ میلی گرم در هر میلی لیتر سیکلوفسفامید به‌دست آید. گروه غیر واکسینه در روز شروع تست سیکلوفسفامید دریافت و سپس دوز کشنده از *کاندیدا آلبیکنس* {تیپ A ،NCPF- 3153 (National Collection of Pathogenic Fungi) از آزمایشگاه مرجع قارچ شناسی انگلستان} در روزهای ۰، ۱، ۳، ۶ و ۱۲ دریافت نمودند. برای تعیین دوز کشنده ۵۰ ٪ (50LD)؛ ۵ گروه مساوی از موش به صورت داخل صفاقی با کاندیدا آلبیکنس زنده با مقادیر بین CFU(colony-forming unit) $۱۰^{۷}$ - $۱۰^{۴}$به روش رید و مونش آلوده شدند (۹). گروه واکسینه شده در ۵ نوبت، ۲×۱۰^{۵} از ارگانیسم زنده را در یک حجم ۰/۲ میلی لیتر قبل از تزریق سیکلوفسفامید دریافت کردند. بعد از فاصله زمانی ۴ روزه ۵ تزریق $۲/۵ \times ۱۰^{۵}$ از ارگانیسم زنده در یک حجم ۰/۲۵ میلی لیتر و بعد از فاصله زمانی ۳ روزه ۵ تزریق از ۳×۱۰^{۵} ارگانیسم زنده در یک حجم ۰/۳ میلی لیتر را دریافت کردند. این گروه‌های واکسینه شده سپس با سیکلوفسفامید و دوز کشنده از *کاندیدا آلبیکنس* مشابه گروه غیر واکسینه شده تزریق شدند. سیکلوفسفامید به صورت داخل صفاقی برای سرکوب سیستم ایمنی تجویز شد (۲۰۰ میلی گرم در کیلو گرم). بعد از تهیه لام از خون رگ‌های محیطی و جمع آوری نمونه سرم، تیتراسیون آنتی بادی با استفاده از خون به‌دست آمده از مویرگ به روش اگلوتیناسیون انجام شد و از سلول‌های کشته شده با حرارت به غلظت ۲٪ به عنوان آنتی ژن استفاده گردید. بدین ترتیب که پس از اضافه کردن خون حاوی آنتی بادی و اضافه کردن سلول‌های کشته شده به درون میکروپلیت‌ها و بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، تیتر آنتی بادی‌ها تعیین گردید. در حالی که به موش‌های مورد آزمایش دوز کشنده تزریق شده بود شمارش گلبول‌های سفید خون برای تمام حیوانات انجام شد. حیوانات آلوده با *کاندیدا آلبیکنس* برای مدت ۶۰ روز مانیتور شدند. اگر حیوانات از بین می‌رفتند، کلیه ها و طحال آن‌ها را برداشته و در بافر فرمالین به منظور بررسی هیستوپاتولوژیک نگهداری می‌شدند.

حیوانات زنده پس از ۶۰ روز از زمان تزریق دوز کشنده *کاندیدا آلبیکنس* کشته شدند و به منظور مطالعه میکروسکوپی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین) و ماکروسکوپی در بافر فرمالین نگهداری شدند. متوسط زمان بقا پس از تزریق دوز کشنده از *کاندیدا آلبیکنس* تعیین گردید. اگر حیوانات پس از ۶۰ روز جان سالم به در می‌بردند، به عنوان مقاوم در برابر دوز کشنده از ارگانیسم در نظر گرفته می‌شدند. نتایج با استفاده از روش‌های آماری Student T و Chi-Square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در این آزمون مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آمار با استفاده از بسته آماری برای علوم اجتماعی (نسخه، SPSS11.5) نرم افزار انجام شد.

شایان ذکر است که تمام ملاحظات اخلاقی طبق استانداردهای تعیین شده توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی شیراز رعایت شده است.

نتایج

وزن طحال و کلیه‌ها به صورت معنی‌داری در روزهای ۱ و ۳ پس از تزریق سیکلوفسفامید کاهش یافت، در حالی که بعد از روزهای ۶ و ۱۲، افزایش وزن قابل رویت بود (جدول ۱). آتروفی و نکروز نیز در لایه زاینده در روزهای اول و سوم مشاهده شدند، در حالی که هیپرپلازی در روزهای ۶ و ۱۲، پس از تزریق به‌وجود آمد (جدول ۲). در مقابل، هیچ تغییر قابل توجهی در کلیه ها مشاهده نشد (جدول ۳). LD ۵۰ *کاندیدا آلبیکنس* برای موش‌های مورد آزمایش در طی یک دوره ۳۰ روزه، زمانی که دوز کاندیدا CFU $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ بود میزان مرگ و میر به ترتیب به ۸۰ ٪ و ۱۰۰ ٪ می رسید. در مقابل با CFU $۱۰^{۴}$ و $۱۰^{۵}$ هیچ میزان مرگ و میری مشاهده نشد. بر این اساس CFU ۲×۱۰^{۶} در تمام آزمایشات به عنوان دوز کشنده در نظر گرفته شد. متوسط زمان بقای موش‌های غیر واکسینه پس از روزهای۱ و ۳ کاهش نشان داد و سپس بعد از ۶ و ۱۲ روز افزایش یافت. ارتباط معنی‌داری در مورد تغییر وزن در طحال و کلیه‌ها، شمارش سلول‌های سفید خون و زمان بقا مشاهده شد. مطالعه هیستوپاتولوژیک کلیه‌ها، تهاجم قابل توجهی از ارگانیسم در بافت با علائمی همچون آبسه‌های کوچک و نکروز نشان داد (جدول ۳)، که نکروز در منطقه پالپ سفید طحال در روزهای ۱ و ۳ به‌وجود آمد که از روزهای ۶ و ۱۲ معنی دارتر بود (جدول ۲ و تصاویر ۱ و ۲).

در گروه واکسینه شده، زمان زنده ماندن در موش‌هایی که ۱ و

جدول ۱ـ تغییرات در وزن طحال و کلیه موش‌ها پس از تزریق سیکلوفسفامید

روز بعد از تزریق سیکلوفسفامید	گروه کنترل	۱	۳	۶	۱۲
وزن طحال (میلی گرم)	۹۶± ۵/۷	۵۵ ± ۱۰/۸	۲۴±۱/۱۰۱	۵۱±۲/۱۲	۱۲۴±۱۶/۸
P. value	_	P< 0.01	P< 0.01	P< 0.01	P< 0.01
وزن کلیه (میلی گرم)	۱۹۶±۱۱/۱	۱۹۷±۱۰/۶	۱۷۵±۹/۰۱	۱۸۳±۳۲/۷	۲۰۷±۱۳/۸
P. value	_	Not significant	P< 0.01	Not significant	Not significant

جدول ۲ـ تاثیرات *کاندیدا آلبیکنس* در منطقه پالپ سفید طحال در موش‌های نرمال و واکسینه شده بعد از تزریق سیکلوفسفامید و دوز کشنده میکرو ارگانیسم

روز بعد از تزریق دوز کشنده میکروارگانیسم	۰	۱	۳	۶	۱۲
گروه کنترل	-	بدون تغییر	آتروفی	هیپرپلازی قابل توجه	هیپرپلازی قابل توجه
موش‌های غیر واکسینه شده	نکروز خفیف	نکروز شدید	نکروز شدید + آتروفی	نکروز شدید + هیپرپلازی قابل توجه	نکروز خفیف + هیپرپلازی قابل توجه
موش‌های واکسینه شده	هیپرپلازی قابل توجه	بدون تغییر	آتروفی	هیپرپلازی قابل توجه	هیپرپلازی قابل توجه

جدول ۳ـ تغییرات هیستوپاتولوژیکی در کلیه‌ها بر اثر عفونت *کاندیدا آلبیکنس* در موش‌های نرمال و واکسینه شده بعد از تزریق سیکلوفسفامید.

روز بعد از تزریق دوز کشنده میکروارگانیسم	۰	۱	۳	۶	۱۲
گروه کنترل	-	بدون تغییر	بدون تغییر	بدون تغییر	بدون تغییر
موش‌های غیر واکسینه شده	آبسه بزرگ	آبسه‌های کوچک وگسترده شده	التهاب خفیف	التهاب خفیف	آبسه
موش‌های واکسینه شده	آبسه بزرگ + التهاب + اسپور	آبسه بزرگ	بدون زخم	آبسه بزرگ	آبسه بزرگ + التهاب + اسپور

جدول ۴ـ تغییرات در وزن طحال و کلیه‌ها، زمان بقا و تعداد گلبول‌های سفید در موش‌های غیر واکسینه بعد از تزریق سیکلوفسفامید و سپس تزریق دوز کشنده *کاندیدا آلبیکنس*.

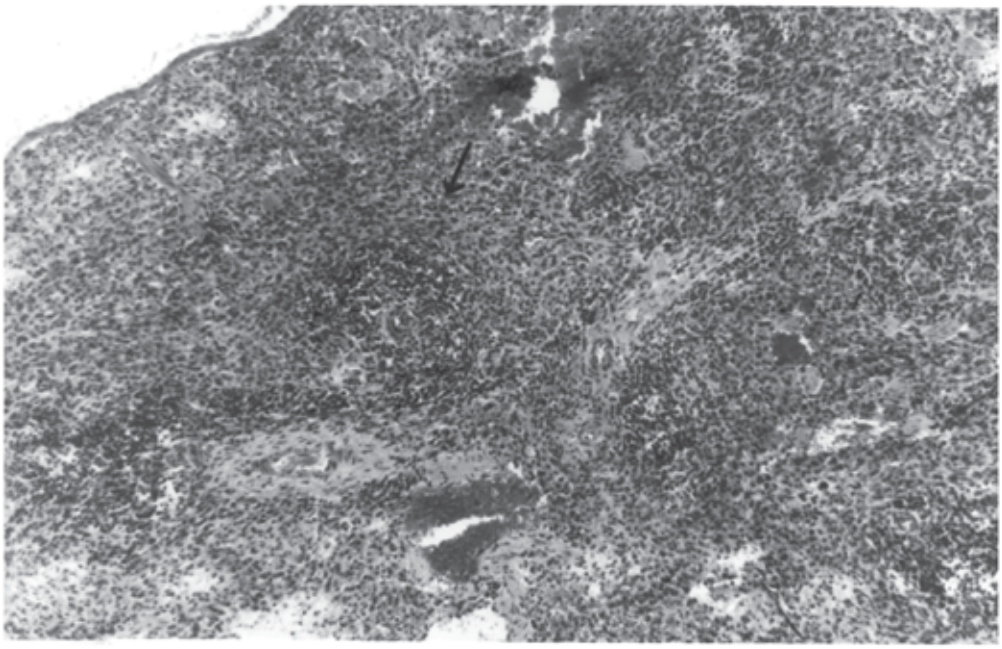
روز بعد از تزریق دوز کشنده میکروارگانیسم	وزن طحال (mg)	وزن کلیه (mg)	زمان بقا (days)	شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (درصد)						گلبول‌های سفید (mm^3)
				DC	B	E	M	L	PMN	
گروه کنترل	۵۴±۵/۶۲	۱۹۶±۱۳/۰۴	۱۱/۳±۱/۲۹	-	۰/۱	۱/۲	۴/۴	۶۱/۸±۰/۸۲	۳۲/۵±۰/۹۱	۱۱۱۲۵±۹۲۵
۱	۳۶±۳/۱۹	۱۶۰±۱۲/۵	۵/۷±۰/۷۲	۴۰/۳	-	۰/۸	۳/۲	۳۳/۲±۰/۶۲	۲۲±۰/۵۶	۴۹۵۰±۴۱۱
۳	۲۲±۱/۶۸	۱۳۹±۱۶/۳	۱/۵±۰/۱۶	۸۱	۰/۳	۰/۹	۲/۱	۱۰/۴±۰/۸۸	۵/۳±۰/۵۹	۱۷۱۰±۱۰۲
۶	۴۸±۱۱/۶	۱۵۲±۱۳/۷	۱۲/۱±۲/۱۸	۴۱/۵	۰/۸	۲/۱	۸	۱۶/۴±۰/۵۸	۳۱/۲±۰/۴۹	۵۳۵۰±۲۳۰
۱۲	۱۱۲±۱۶/۳	۲۴۷±۱۸/۱	۲۵±۴/۹۶	۷/۳	۱/۲	۴/۲	۱۰	۱۹/۷±۰/۵۸	۷۵/۵±۰/۴۷	۱۱۴۶۰±۵۳۴

سلول های از بین رفت ;DC، بازوفیل ;B، ائوزینوفیل ;E، مونوسیت ;M لنفوسیت ;L، گلبول های سفید چند هسته‌ای ;PMN. گروه کنترل فقط با ۲×۱۰^۶ سلول کاندیدا تلقیح شدند،

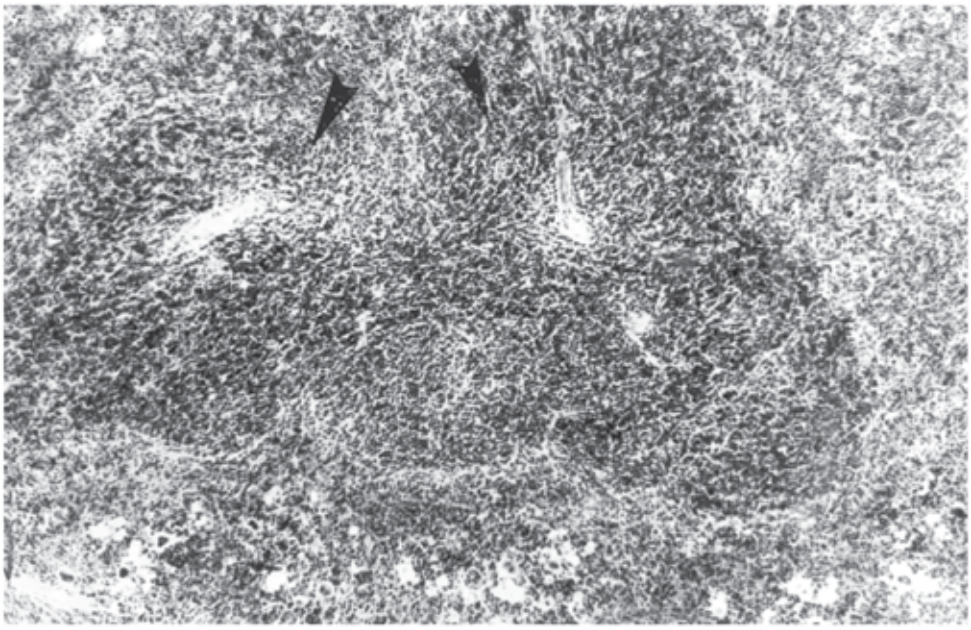
جدول ۵ـ تغییرات در وزن طحال و کلیه‌ها، زمان بقا و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در موش‌های غیر واکسینه بعد از تزریق سیکلوفسفامید و سپس تزریق دوز کشنده *کاندیدا آلبیکنس*

روز بعد از تزریق دوز کشنده میکروارگانیسم	وزن کلیه (mg)	وزن طحال (mg)	زمان بقا (days)	شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (درصد)						گلبولهای سفید (mm3)
				DC	B	E	M	L+SE	PMN	
گروه کنترل	۲۴۴±۲۳/۶	۱۵۷±۲۸/۵	۲۱±۶/۱۴	-	۰/۶	۲/۲	۵/۲	۶۱±۰/۷۱	۳۱±۰/۷	۹۵۲۰±۵۰۵
۱	۲۳۳±۱۶/۶	۱۳۲±۲۸/۴	۱۲/۴±۳/۱۴	۴۱	-	۲/۶	۴	۳۲/۴±۱/۷	۲۰±۰/۷	۵۴۵۰±۲۲۱
۳	۱۴۶±۵/۰۵	۷۱±۶/۷	۳/۱±۲/۸۳	۵/۴	-	۱	۱۶	۱۴/۲±۰/۸	۷/۸±۰/۹۶	۲۴۵۰±۱۲۹
۶	۲۴۷±۲۱/۳	۶۴±۳۲/۷	۲۵±۱۰/۳	۴۱/۴	۱	۳	۷	۱۷/۴±۰/۹۲	۳۰/۲±۰/۶۶	۷۶۷۵±۲۱۷
۱۲	۲۲۷±۲۲/۶	۱۶۰±۲۴/۱۸	۲۹±۶/۶۷	۹/۲	۰/۸	۲/۴	۸/۶	۱۹±۱/۰۵	۶۰±۱	۱۱۲۸۰±۳۲۱

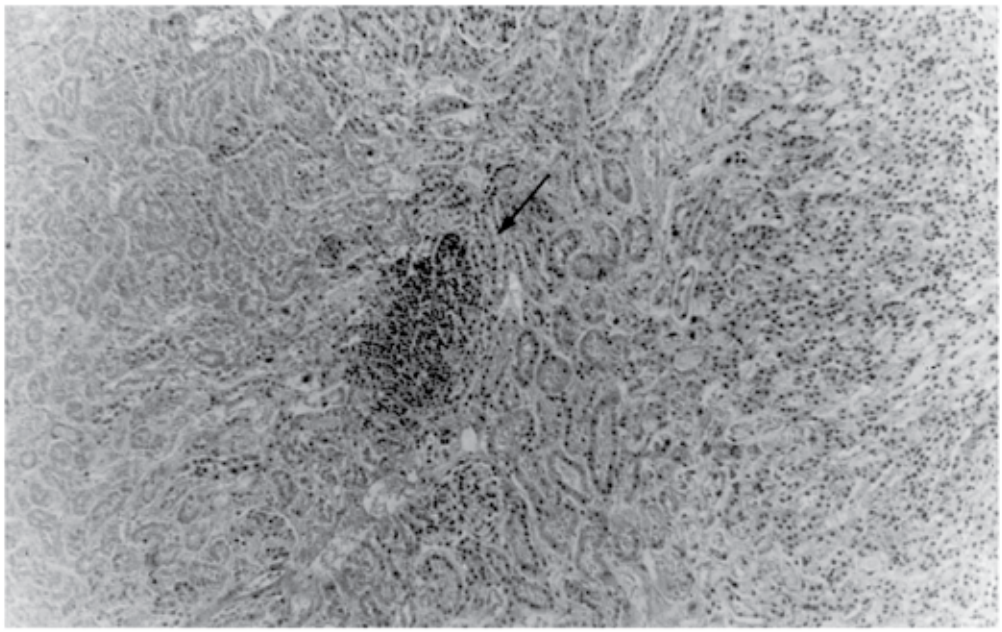
سلول‌های از بین رفت;DC، بازوفیل;B، ائوزینوفیل;E، مونوسیت;M لنفوسیت;L، گلبول های سفید چند هسته‌ای;PMN. گروه کنترل فقط با ۲×۱۰^۶ سلول کاندیدا تلقیح شدند.



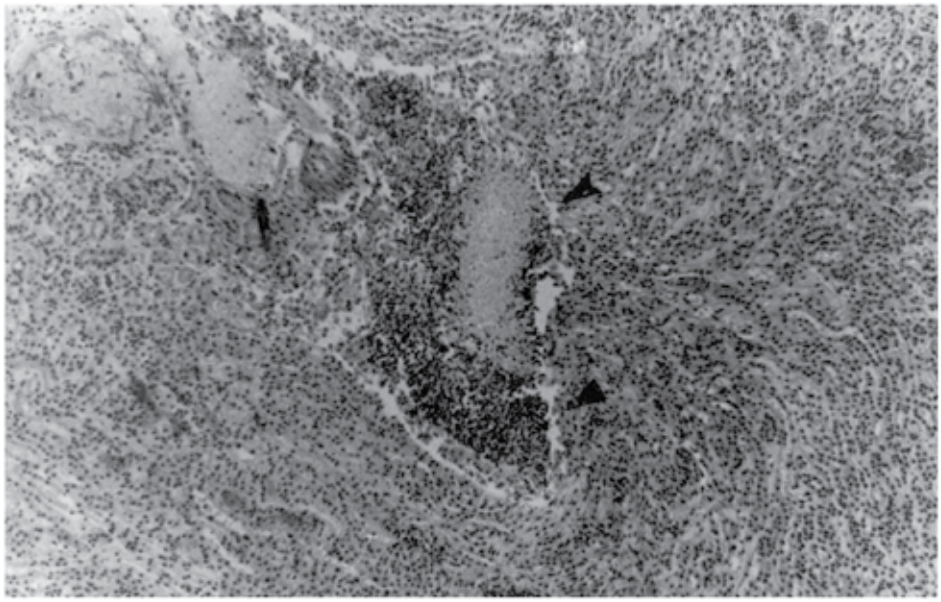
شکل ۱ـ برش بافتی از طحال موش ۳ روز بعد از تزریق سیکلوفسفامید، جهت پیکان نشان‌دهنده آتروفی در منطقه پالپ سفید می‌باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگنمایی ۱۰۰)



شکل ۲ـ برش بافتی از طحال موش ۱۲ روز بعد از تزریق سیکلوفسفامید، جهت پیکآن‌ها نشان‌دهنده هیپرپلازی در منطقه پالپ سفید می‌باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگنمایی ۱۰۰)



شکل ۳ـ مقطعی از کلیه بعد از تزریق سیکلوفسفامید و تزریق دوز کشنده *کاندیدا آلبیکنس* که تجمع سلولی را در منطقه مدولا نشان می‌دهد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگنمایی ۳۰۰)



شکل ۴ـ مقطعی از کلیه بعد از تزریق سیکلوفسفامید و تزریق دوز کشنده *کاندیدا آلبیکنس* که آبسه‌های کوچک را در منطقه مدولا نشان می‌دهد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگنمایی ۳۰۰)

۳ روز پس از تزریق سیکلوفسفامید به قارچ کاندیدا آلوده گردیده بودند کاهش یافت، در حالی که ۶ و ۱۲ روز پس از تزریق دارو، این زمان افزایش یافت. ارتباط معنی‌داری بین زمان بقا و افزایش وزن کلیه‌ها و طحال و تعداد گلبول‌های سفید خون مشاهده شد (جدول ۱). واکسیناسیون توانست باعث کاهش میزان مرگ و میر و افزایش وزن طحال و کلیه‌ها شود. تغییرات هیستوپاتولوژیک در کلیه ها و در لایه زاینده از پالپ سفید طحال نیز مشاهده شد (تصاویر ۳ و ۴). نکروز توبولی منعقد شونده در بافت کلیه نیز قابل رویت بود (تصویر ۳). شمارش گلبول‌های سفید خون در موش‌های واکسینه شده تغییرات کمتری نشان داد. واکسیناسیون توانست باعث افزایش وزن طحال شود در حالی که اختلاف وزن طحال در موش واکسینه و غیر واکسینه به صورت معنی دار بود ($p<0.01$). در موش‌های واکسینه، افزایش بیشتری در وزن کلیه‌ها در مقایسه با موش‌های غیر واکسینه مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت در برابر عفونت *کاندیدا آلبیکنس* ممکن است به خاطر عوامل متعددی باشد. نقش فلور طبیعی به عنوان عامل عمده در پیشگیری از تهاجم این فرصت طلب گزارش شده است (۱۰). برخی از گزارشات به نقش عوامل دیگری در سرم مثل آهن، فاکتور توده‌ای، سیستم کمپلمان اشاره کرده‌اند (۱۱و۱۲). بعضی از تحقیقات نیز به نقش سلول‌های سیستم ایمنی در برابر عفونت با *کاندیدا آلبیکنس* اشاره دارند (۱۳و۱۰) در حالی که دیگران به نقش ایمنی هومورال در برابر این قارچ فرصت طلب معتقدند (۱۴). در بعضی از گزارشات ایمنی غیر اختصاصی را در برابر این قارچ عنوان کرده‌اند (۱۰، ۱۵ و ۱۶). سلول‌های در حال تکثیر به عنوان سلول‌های اصلی هدف برای سیکلوفسفامید می‌باشند. مهار همانند سازی DNA توسط آلکیله کردن هسته‌ای موضوعی است که قبلا پیشنهاد شده است (۱۷). این دارو اثر انتخابی خود را در اجزای مختلف سیستم ایمنی بدن اعمال می‌کند. به این ترتیب، با تجویز آن، ارتباط بین تغییرات برخی از اجزای سیستم ایمنی بدن و مقاومت در برابر عفونت روشن می‌شود (۱۸). بر اساس نتایج به‌دست آمده در روز ۱ و ۳ پس از تزریق سیکلوفسفامید، وزن این اندام‌ها کاهش و پس از روزهای ۶ و ۱۲ افزایش یافت. در مطالعات آسیب شناسی مشخص گردیده که طحال به عنوان بزرگترین اندام لنفاوی درگیر در فعل و انفعالات آنتی بادی- آنتی ژن می‌باشد (۱۹) و سیکلوفسفامید می‌تواند به صورت انتخابی سیستم ایمنی درگیر در طحال را تنظیم نماید (۲۰).

نتایج به دست آمده نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین افزایش زمان بقا و افزایش تعداد گلبول‌های سفید وجود دارد. با این حال، تغییرات اساسی در سلول‌های با هسته چند قسمتی بیشتراز لنفوسیت‌ها مشاهده شد که ممکن است به علت اثرات انتخابی سیکلوفسفامید در سلول‌های با هسته چند قسمتی محیطی پس از ۱۲ روز باشد، که نمایشگر نقش این سلول‌ها بر ضد عفونت *C. آلبیکنس* می‌باشد (۲۱). در مطالعات آسیب شناسی، کاهش وزن طحال ممکن است به خاطر نکروز و آتروفی شدید در ناحیه پالپ سفید اتفاق بیفتد. تغییرات هیستوپاتولوژیک مانند آبسه‌های کوچک در کلیه‌ها نیز گزارش شدند. در واقع، در گروه‌هایی با زمان بقا طولانی‌تر بلاستوسپور (Blastospur) و سودو هایفی (pseudo hyphi) قارچ می‌تواند در محل اتصال corticomedullar نفوذ کند و باعث این تغییرات پاتولوژیک شود (تصاویر۳ و۴). در مطالعه حاضر، اثرات مثبت واکسیناسیون موقعی نشان داده شد که موش‌های تحت اثر سیکلوفسفامید وقتی در مجاورت با دوز کشنده *کاندیدا آلبیکنس* قرار گرفتند مدت زمان طولانی‌تری زنده ماندند (۲۲). علاوه بر این، زمان متوسط مدت زنده ماندن گروه واکسینه شده بیشتر از گروه غیر واکسینه شده بود.

در مطالعه حاضر هیچ تفاوت معنی‌داری در میان گلبول‌های سفید در گروه واکسینه و غیر واکسینه مشاهده نشد. واکسیناسیون می‌تواند باعث افزایش وزن طحال به علت هیپرپلازی در لایه زاینده منطقه پالپ سفید و اختلاف وزن طحال در گروه‌های واکسینه و غیر واکسینه شود ($p<0.01$). مشابه گزارشات ایتو و تاناکا (۲۳) ما نیز نشان دادیم که کلیه‌ها بیشتر مستعد ابتلا به عفونت *کاندیدا آلبیکنس* هستند.

تیتر آنتی بادی در موش واکسینه (Ab=۲۵۶/۱) نقش ایمنی هومورال در برابر عفونت *آلبیکنس* نشان داد. آنتی بادی با اپسونیزه کردن سلول‌هایی که کاندیدا را بلعیده‌اند این کار را انجام می‌دهد (۲۴). فعال شدن سلول‌های T و B نیز ممکن است باعث آزاد شدن سایتوکاین و اینترلوکین شود که به صورت غیر مستقیم باعث تحریک سیستم ایمنی می‌گردند (۲۵). نتایج نقش ایمنی غیر اختصاصی سلول‌های با هسته چند قسمتی محیطی در برابر عفونت *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که با نتایج انگولو قابل مقایسه است (۲۶). بنابراین، در موش‌های واکسینه آزاد شدن سایتوکاین و اینترلوکین باعث فعال کردن تکثیر سلول‌های با هسته چند قسمتی می‌شود (۲۵و۲۷).

کاندیدا آلبیکنس یکی از ارگانیسم‌های تهدید کننده زندگی در بیماران با نقص سیستم ایمنی می‌باشد، بنابراین لازم است که داروهای ضد کاندیدیاز در رژیم‌های درمانی این افراد تجویز شود (۲۸-۳۱). از آنجایی که واکسن می‌تواند برخی از موش‌ها را در برابر دوز کشنده از *کاندیدا آلبیکنس* محافظت کند، بنابراین از واکسیناسیون می‌توان به عنوان روش جایگزین برای کمک به سیستم ایمنی افراد در معرض خطر در برابر تهاجم این آندوژن فرصت طلب استفاده کرد. نتایج مطالعه حاضر ممکن است منجر به توسعه استراتژی‌های امن تر در میان بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی شود.

با توجه به اثرات انتخابی سیکلوفسفامید، می‌توان نتیجه‌گیری کردکه هیپرپلازی پالپ سفید طحال و افزایش سلول‌های با هسته چند قسمتی محیطی باعث حفاظت حیوانات در برابر عفونت *کاندیدا آلبیکنس* می‌گردد.

References

1. Mane A, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Increased expression of virulence attributes in oral Candida albicans isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. J Med Microbiol. 2012; 61(2): 285-90.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1): 133-63.
3. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikayatis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. Clin Infect Dis. 2001; 33(5): 641-647.
4. Fleming RV, Walsh TJ. Risk factors for Candida infections in the intensive care unit. Maryland USA: Kluwer Academic Publishers; 2001. P.23-43.
5. Morrison CJ, Lindsley MD. Serological approaches to the diagnosis of invasive fungal infection. New York, Marcel Dekker Inc; 2001. P.667-716.
6. Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. J Microbiol. 2005; 43: 65-84.
7. Morrison CJ, Hurst SF, Ross E. Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of Candida albicans as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10(5): 835-848.
8. Shadkchan Y, Segal E. Treatment of experimental candidiasis with amphotericin B-intralipid admixtures in immunocompromised mice. J Antimicrob Chemother. 2001; 48(2): 245-251.
9. Reed L, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27(3): 493-497.
10. Blanco JL, Garci ME. Immune response to fungal infections. Vet Immunol Immunopathol. 2008; 125(1-2): 47–70.
11. Kinght SA, Lesuisse E, Stearman R, Klausner RD, Dancis A. Reductive iron uptake by Candida albicans: role of cupper, iron and TUPI regulator. Microbiology. 2002; 148(1): 29-40.
12. Ramanan N, Wang Y. A high-affinity iron permease essential for Candida albicans virulence. Science. 2000; 288(5468): 1062- 1064.
13. Moyes DL, Naglik JR. Mucosal Immunity and Candida albicans Infection. Clin Dev Immunol. 2011; 2011: 1-9. doi: 10.1155/2011/346307. Epub 2011 Jun 23.
14. Soloviev DA, Jawhara S, Fonzi WA. Regulation of innate immune response to Candida albicans infections by αMβ2-Pra1p interaction. Infect Immun. 2011;79(4): 1546-58.
15. Crameri R, Blaser K. Allergy and immunity to fungal infections and colonization. Eu Respir J. 2002; 19(1): 151-157.
16. Jain A, Jain S, Rawat S. Emerging fungal infections among children: A review on its clinical manifestations, diagnosis and prevention. J Pharm Bioallied Sci. 2010; 2(4): 314-20.
17. Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Gatica-Carbonnera
R, Calabersi P. Antineoplastic agents. New York: McGraw-Hill Company; 2001. P.1389-1459.
18. Salem ML, Kadima AN, El-Naggar SA, Rubinstein MP, Chen Y, Gillanders WE, et al. Defining the ability of cyclophosphamide preconditioning to enhance the antigen-specific CD8+ T-cell response to peptide vaccination: creation of a beneficial host microenvironment involving type I IFNs and myeloid cells. J Immunother. 2007; 30(1): 40-53.
19. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, Cells and Tissue of the Immune System. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2003. P.17-38.
20. Vespa MN. Adherence in tissues of immunocompromised mice of a non-mycelium producing of Candida albicans. Mycoses. 2000; 43(5): 185-189.
21. Okawa Y, Kobayashi M, Sakai K, Suzuki M. Role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance of tumor-bring mice against Candida albicans infection. Biol Pham Bull. 2004; 27(5): 674- 678.
22. Mizutanti M, Endo M, Ino-Ue T, Kurasawa M, Uno Y, Saito H, et al. Immunization with Candida albicans membrane fraction and in combination with fluconazole protects against systemic fungal infections. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(2): 243-247.
23. Ito E, Tanaka Y. Influence of immunosuppressive agents, FK505 and cyclosporine on systemic Candida albicans infections in mice. Mycopathologia. 1997; 138(2): 57-64.
24. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between Candida albicans and the mammalian innate host defense. Infect Immun. 2012; 80(4): 1304-13.
25. Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by Cryptococcus neoformans. Infect Immun. 2009; 77(8): 3450-7.
26. Angulo I, Jiménez-Díaz MB, García-Bustos JF, Gargallo D, de las Heras FG, Muñoz-Fernández MA, et al. Candida albicans infection enhances immunosuppression induced by cyclophosphamide by selective priming of suppressive myeloid progenitors for NO production. Cell Immunol. 2002; 218(1-2): 46-58.
27. Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. Microbiology. 2004; 150(9): 2807-13.
28. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183(1): 96-128.

29. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. Intensive Care Med. 2009; 35(2): 206-14.
30. Kuhara T, Uchida K, Yamaguchi H. Therapeutic efficacy

Original Article

Immunomodulating Effect of Cyclophosphamide in Mice Infected with *Candida albicans*

Zhaponi A[1], Anvarinejad M[1*], Farshad Sh[1], Mehrbani D[2]

1- Prof. Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2- Stem Cell Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 12 Aug 2013 Accepted: 08 Dec 2013

Abstract

Background & Objective: Cyclophosphamide is an alkylating agent that stops the replication of DNA, which is used to treat various types of cancer and some autoimmune disorders. This study was aimed at then evaluating the immunomodulating effect of cyclophosphamide (Cy) on the immune system of vaccinated and non-vaccinated mice.

Materials & Methods: The study was performed on three groups of mice consisting of vaccinated, non-vaccinated and control groups. Vaccination was carried out by three separated courses of C. albicans injection intraperitoneally. Then, the vaccinated group received Cy on day zero and were challenged with lethal doses of C. albicans on days zero, one, 3, 6 and 12 post-Cy injection. Non-vaccinated group received Cy on day zero and similar to vaccinated ones were challenged with lethal doses of the organism. The control groups received just Cy on day zero and were sacrificed on days post-Cy injection. Then, the hemogram and the spleen and the renal tissues were studied microscopically and macroscopically.

Results: In the vaccinated group, an increase in survival time, the number of polymorphonuclear and the significant hyperplasia in the white pulp on days 6 and 12 post-Cy injection were noticed. In non-vaccinated ones, these factors had significant decrease on days 1 and 3.

Conclusion: It is concluded that the hyperplasia in the white pulp of spleen and an increasing in peripheral polymorphonuclear due to the selective effects of Cy could effectively protect the animal against C. albicans infection.

Keywords: **Immunomodulating effect, cyclophosphamide, *Candida albicans*, lethal dose, mice.**

*** Corresponding author: Mojtaba Anvarinejad,** Prof. Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Nemazee Hospital, Shiraz, Iran.
E-mail: anvarinejad@yahoo.com
Tel : +98 711 6292021