بررسی آلودگی انگل لیشمانیا ماجور بر رشد تومور فیبرو سارکوما در موش‌های Balb/c

دکتر حسین یوسفی[1]، نیلوفر وکیل[2*]، دکترهدایت اله شیرزاد[3]

۱- دانشیار گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۲- مربی انگل شناسی، عضوهیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک
۳- استادیار گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

تاریخ دریافت۸۵/۱۱/۵، تاریخ پذیرش ۸۶/۸/۹

چکیده

مقدمه: مطالعات و آمارهای مختلف نشان می‌دهد که در کشورهای پیشرفته بیماری‌های عفونی و انگلی در صد کمی از علل مرگ و میر را به خود اختصاص می‌دهند و در مقابل سرطان‌ها از اصلی‌ترین علل مرگ و میر دراین کشورها می‌باشند. در کشورهای در حال توسعه الگوی مرگ و میر متفاوت است به این صورت که بیمارهای عفونی وانگلی سبب مرگ و میر بیشتری نسبت به سرطان‌ها می‌گردند. اگر چه عوامل متعددی در تفاوت این دو الگوی مرگ و میر در جوامع پیشرفته و در حال توسعه نقش دارند اما شواهد مدللی وجود دارد که احتمالاً آلودگی به عوامل عفونی و انگلی به صورت غیر اختصاصی میتواند در رشد سلول‌های بدخیم تأثیر گذار باشد. لذا در این مطالعه تأثیر آلودگی انگل لیشمانبا ماجور بر رشد سلول‌های بدخیم در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: در این مطالعه تجربی یک گروه شش تایی از موش‌های کوچک آزمایشگاهی Balb/c به عنوان گروه مورد با انگل لیشمانیای ماجور آلوده شدند. یک ماه بعد موش‌های فوق همراه با یک گروه شش تایی دیگر از موش‌های کوچک آزمایشگاهی Balb/c به عنوان گروه شاهد از راه تزریق زیرجلدی در معرض سلول‌های سرطانی فیبر و سارکوسا قرار گرفتند. این سلول‌ها از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شدند. رشد توده های سرطانی در موش‌های گروه مورد و شاهد از راه اندازه‌گیری قطر تومورها تا دو هفته بعد از تزریق بررسی شد. در این مدت اندازه تومورها در پنج دفعه در روزهای ۵ ،۷، ۱۱، ۱۳ و۱۶ بعد از تزریق سلول‌های سرطانی اندازه‌گیری شد. با استفاده از قطرهای اندازه‌گیری شده تومورها مساحت هر تومور اندازه گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی- تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: نتایج این بررسی نشان داد که در سه مرحله اول اندازه‌گیری، میانگین اندازه تومور در موش‌های گروه مورد کمتر از موش‌های گروه شاهد بوده است. اما در اندازه‌گیری‌های نوبت چهارم و پنجم میانگین مساحت تومور در موش‌های گروه مورد بیشتر از موش‌های گروه شاهد بوده است. در هیچ‌کدام از موارد فوق اختلاف اندازه تومورها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اختلاف میانگین مساحت تومورها در گروهای شاهد و مورد از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. لذا برای بررسی بیشتر فرضیه این تحقیق پیشنهاد می‌گردد آزمایش‌های مذکور با استفاده از انگل‌های بافتی دیگر و رده‌های سلول‌های سرطانی بیشتر مورد تحقیق قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تومور، انگل، موش Balb/C

***نویسنده مسئول:** اراک، سردشت، میدان بسیج، مجتمع پردیس، دانشکده پزشکی

Email: n_vakil66@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:01 +0430 on Thursday September 21st 2017

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:01 +0430 on Thursday September 21st 2017

مقدمه

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که الگوی شیوع بیماری‌ها در کشورهای در حال توسعه متفاوت با این الگوها در کشورهای پیشرفته است. برای مثال در دو قاره‌ی آفریقا و اروپا که با اندک اختلاف جمعیت نسبتاً مساوی دارند علت مرگ متفاوت است. در قاره‌ی افریقا مرگ به دلیل بیماری‌های عفونی و انگلی نسبت به قاره‌ی اروپا ده برابر است. متقابلا در قاره‌ی اروپا مرگ به دلیل سرطان نسبت به قاره‌ی آفریقا تقریباً ده برابر است(۱). نکته جالب توجه در برسی علت مرگ این نکته است که بین توسعه یافتگی و بیماری‌های عفونی به عنوان علت مرگ رابطه‌ی معکوس و بین توسعه یافتگی و سرطان‌ها به عنوان علت مرگ رابطه‌ی مستقیم وجود دارد(۱).

به عبارت دیگر هر کجا آلودگی‌های عفونی شایعند سرطان‌ها شیوع کمتری دارند(۲). اگر چه عوامل متعددی از جمله الگوهای تغذیه، کم تحرکی و آلودگی‌های ناشی از صنعت می‌تواند دلیلی بر اختلاف در الگوی علت مرگ در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه باشد اما یک فرضیه دیگر هم می‌تواند مطرح باشد و آن این که تحریک سیستم ایمنی توسط انواع پاتوژن‌های زنده و تولید فرآورده‌های ایمونولوژیک در بدن ساکنین کشورهای در حال توسعه احتمالاً می‌تواند به صورت غیر اختصاصی اثر حفاظتی ضد سرطان داشته باشد. شواهد آزمایشگاهی و کلینیکی زیادی در حمایت از این فرضیه وجود دارد(۷-۳). به عنوان مثال در یک مطالعه در سال ۱۹۹۷ نشان داده شده است که بیماران لوسمی که مبتلا به انگل استرونزیلوئیدرس استرکورالیس بوده‌اند عمر بیشتری از بیماران لوسمی غیر مبتلا به انگل داشته‌اند(۳). برای بررسی فرضیه فوق در این مطالعه در یک پژوهش تجربی و در مدل حیوانی تاثیر ایمنی ناشی از انگل لیشمانیا ماجور بر رشد سلول‌های بد خیم مورد پژوهش قرار گرفته است.

روش کار

در این مطالعه‌ی تجربی موش‌های کوچک آزمایشگاهی Balb/c به عنوان آزمودنی‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یک گروه شش تایی از این موش‌ها به عنوان گروه مورد با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماجور به تعداد ۶ میلیون برای هر موش در حجم ۲۰۰ میکرولیتر از طریق تزریق زیر پوست در ناحیه قاعده دم آلوده شدند. یک گروه شش تایی دیگر به عنوان گروه شاهد بدون هیچ تزریقی در شرایط مساوی با گروه مورد نگهداری شدند.

بعد از یک ماه، تمام موش‌های فوق مورد تزریق سلول‌های سرطانی WEHI164 قرار گرفتد. برای این منظور سلول‌های فوق از بانک سلولی انستیتوپاستور تهران تهیه گردیدند و به هر موش تعداد پنج میلیون سلول در حجم ۲۰۰ میکرو لیتر در زیر پوست ناحیه سینه تزریق گردید. این سلول‌ها از نوع فیبروسارکوما ایجاد شده در موش Balb/c بودند.

به منظور ارزیابی رشد سلول‌های بدخیم از روز دوم بعد از تزریق، هر موش از نظر وجود تومور توده‌ای در ناحیه سینه از طریق لمس محل تزریق مورد معاینه قرار می‌گرفت. زمانی که تومور با پوست انگشت لمس می‌گردید بلافاصله قطر آن در دو جهت با استفاده از یک کولیس اندازه‌گیری می‌شد. بررسی موش‌ها از نظر وجود تومور و اندازه‌گیری قطر آن تا دو هفته بعد از تزریق ادامه یافت. در این مدت اندازه‌ی تومور در پنج دفعه و در روزها ۵، ۷، ۱۱، ۱۳ و۱۶ بعد از تزریق سلول‌های سرطانی اندازه‌گیری شد. برای محاسبه ی میانگین مساحت تومور دو قطر اندازه‌گیری شده آن با هم جمع شده و حاصل جمع به عدد ۴ تقسیم شد. ماحصل تقسیم به توان دو رسید و سر انجام عدد حاصله در ۳/۱۴ ضرب گردید. جهت مقایسه میانگین مساحت تومور در دو گروه مورد و شاهد آزمون آماری تی مورد استفاده قرار گرفت.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:01 +0430 on Thursday September 21st 2017

نتایج

در این آزمایش مداخله‌ای پس از تزریق سلول‌های بدخیم، رشد تومور در موش‌ها در ۵ بار متوالی به ترتیب در روهای ۵، ۷، ۱۱، ۱۳ و۱۶ روز پس از تزریق سلول‌های سرطانی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت که نتایج ان به صورت میانگین مساحت تومور در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس این نتایج در روزهای ۵، ۷ و ۱۱ پس از تزریق میانگین مساحت تومور در گروه مورد کمتر از گروه شاهد بوده است اما در روزهای ۱۳ و ۱۶ پس از تزریق، میانگین مساحت تومور در گروه شاهد کمتر از گروه مورد بوده است. به هر حال در هیچ‌کدام از موارد فوق اختلاف اندازه تومورها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است.

جدول ۱. میانگین مساحت تومور توده‌ای (میلی‌متر مربع) در موش‌های مبتلا به لیشمانیا ماجور (مورد) و موش‌ها فاقد آلودگی مذکور (شاهد) ۵ و۷ و۱۱ و۱۳ و۱۶ روز بعد از تزریق سلول‌های سرطانی WEHI164

فاصله‌ی زمانی بعد از تزریق سلول‌های سرطانی WEHI164	میانگین مساحت تومور در گروه مورد	میانگین مساحت تومور در گروه شاهد	p
۵ روز بعد از ترزیق	۱۵/۷۹±۱۴/۴۵	۲۸/۴۴±۲۷/۳۳	*
۷ روز بعد از ترزیق	۲۹/۷۴±۲۱/۹۷	۳۷/۱۵±۲۷/۹۳	*
۱۱روز بعد از ترزیق	۸۳/۰۱±۴۶/۱۵	۱۰۴/۳۸±۱۰۰/۸۲	*
۱۳روز بعد از ترزیق	۱۱۵/۸۶±۵۴/۲۵	۱۰۵/۸۲±۸۹/۹	*
۱۶روز بعد از ترزیق	۱۵۲/۷۵±۷۱/۶۶	۱۴۶/۴۷±۹۵/۰۲	*

* اختلاف معنی دار نداشت.

بحث

در این بررسی تاثیر انگل لیشمانیا ماجور بر رشد سلول‌های بدخیم در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این آزمایش نشان داده که تا روز یازدهم بعد از تزریق سلول‌های بدخیم به موش‌ها، میانگین مساحت تومورها در موش‌های گروه مورد کمتر از میانگین مساحت تومور در موش‌های گروه شاهد بوده است. اما در اندازه‌گیری‌های روز یازدهم به بعد وضعیت فوق تغییر یافته و میانگین مساحت تومور در موش‌های گروه مورد بیشتر از میانگین مساحت تومور در موش‌های گروه شاهد بوده است اما در هیچ‌کدام از موارد فوق اختلاف میانگین مساحت تومور در موش‌های گروه مورد و شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبوده است.

مطالعات و شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد وجود آلودگی‌های انگلی در بدن انسان و حیوان رشد سلول‌های بدخیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد(۷-۳). در سال ۱۹۹۷ نشان داده شده که بیماران مبتلا به لوسمی که هم‌زمان به انگل استرونژیلوئیدس استرکورالیس هم آلوده بوده‌اند نسبت به بیماران لوسمی که فاقد آلودگی انگلی بوده‌اند عمر بیشتری داشته‌اند(۳). در مطالعات دیگر اثر ضد توموری آمیب پاتوژن در محیط کشت سلولی نشان داده شده است(۵-۴). در سال ۱۹۹۵ تاثیر ترشحات پنج نماتود بررشد سلول‌های بدخیم مورد برسی قرار گرفت و نشان داده شد که ترشحات مذکور بعضی از نماتودها رشد سلول‌های بدخیم را کاهش می‌دهد(۶). هم‌چنین مشخص شده که تزریق BCG به صورت چشم‌گیری باعث مهار سلول‌های سرطانی مثانه می‌شود(۷). از طرف دیگر نشان داده شده است که بعضی از آلودگی‌های انگلی مانند شیستوزومیازیس(۸) و اوپیستورکیازیس(۹) شانس ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهند.

تأثیر احتمالی عوامل انگلی بر رشد سلول‌های سرطانی احتمالاً می‌تواند به این دلیل باشد که موش‌های

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:01 +0430 on Thursday September 21st 2017

گروه مورد قبل ازاین که در معرض سلول‌های سرطانی قرار گیرند به انگل لیشمانیا ماجور آلوده شده بوده‌اند. به علت حساس بودن آنها به انگل مذکور در ابتدا ماکروفاژها و سلول‌های NK بلافاصله در برابر آن واکنش نشان داده مقادیر قابل توجهی سیتوکین ترشح می‌کنند. تولید INF گاما بوسیله NK صورت می‌گیرد. هم‌چنین IL19 توسط بازوفیل‌ها و ماست سلول‌ها تولید می‌شود. ماکروفاژها(۱۰) و سلول‌های NK (۱۱) و T cell (۱۲) فعال شده و مقدار آن‌ها در این گونه موش‌ها بالاتر از موش‌هایی است که قبلاً در معرض انگل قرار نگرفته‌اند . از طرف دیگر سلول‌های NK که کارگزاران دفاع غیر اختصاصی و اختصاصی بر علیه تومورها هستند نقش عملی در دفاع میزبان در برابر تومورها را بر عهده دارند(۱۳).

هم‌چنین تخریب مستقیم سلول‌های توموری توسط لنفوسیت‌ها سیتوتوکسیک با همکاری سلول‌های کمکی ویا وابسته به آنتی‌بادی اتفاق می‌افتد(۱۴). سلول‌های NK فعال شده در اثر وجود انگل تولید INF می‌کند که تولید این سیتو کاین باعث فعال شدن ماکروفاژها می‌شود(۱۵). اما چون مکانیسم‌های فوق برای انگل لیشمانیا اختصاصی و برای سلول‌های سرطانی غیر اختصاصی هستند با رشد بیشتر سلول‌های سرطانی سیستم ایمنی غیر اختصاصی مذکور قادر به مهار بیشتر آلودگی نیست و با اثرات مخربی که از طرف انگل در موش‌ها وجود دارد(۱۵). چنان چه در تحقیق حاضر دیده شد، در روزهای بعد از یازدهم پس از تزریق سلول‌های بدخیم، میانگین مساحت تومورها در موش‌های گروه مورد بیشتر از موش‌های گروه شاهد است.

با توجه به نتایج فوق و با توجه به نتایج تحقیقات قبلی که وجود توام سرطان و ابتلا به انگل لیشمانیا ماجور را گزارش نموده‌اند(۱۶) به نظر می‌رسد که این انگل مورد مناسبی برای برسی فرضیه تحقیق نمی‌باشد لذا توصیه می‌گردد در تحقیقات آینده از انگل‌های کرمی که بزرگ‌تر از تک یاخته‌ها می‌باشند مخصوصاً آنهایی که حمله بافتی دارند از جمله شیستوزوما مانسونی و تریکینلااسپایرالیس استفاده گردد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اختلاف میانگین مساحت تومورها در گروهای شاهد و مورد از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. لذا برای بررسی بیشتر فرضیه این تحقیق پیشنهاد می‌گردد آزمایش‌های مذکور با استفاده از انگل‌های بافتی دیگر و رده‌های سلول‌های سرطانی بیشتر مورد تحقیق قرار گیرد.

تشکر و قدر دانی

هزینه انجام این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تامین گردیده است. از زحمات آقای غلامرضا مبینی کارشناس آزمایشگاه تشکر می‌گردد. هم‌چنین از زحمات خانم دکتر فروزان گنجی به عنوان مشاور آماری این تحقیق تشکر می‌گردد.

منابع

1. WHO. The world health report. Geneva, Switzerland: World Health Organization;2000.
2. Center for disease control and prevention (CDC). Cancer mortality among American Indians and Alaska natives in united states 1994-1998, MMWR Morb. Mortal weekly Rep 2003; 52(30):704-70.
3. Plumelle, Y, Gonin C, Eduard A, Buther BJ, Thomas L, Brebion A, Panelatti G. Effect of Strongyloides stercoralis infection and eosinophilia on age an onset and prognosis of adult T cell leukemia. Am J Patho 1997; 107(1):81-7.
4. Pidherney MS, Alizadeh H, Stevart GL, Macculley JP, Niederkon JY. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic free living amoeba. Cancer Lett 1993; (1-2):81-7.
5. Alizadeh H, Pidhereney MS, Macculley JP, Niederkon JY. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. Infect Immun 1994; 64(4): 1298-30.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:01 +0430 on Thursday September 21st 2017

6. Huby F, Hoste H, Mallet S, Fournel S, Nano J. Effect of the excretory secretory products of six nematode species parasites of digestive tract on the prolifretation of Ht-29-D4 and HGT-1 cell lines epithelial cell. Biol 1995;4(4):156-62.
7. Mcaveney KM, Gomella LG, Lottime EC. Induction of Th-1 and Th2 associated cytokine mRNA in mouse bladder following transvesical growth of the murine bladder tumor mb46 and BCG immunotherapy. Cancer Immunol 1994;39(6): 401-6.
8. Lopes EJ, dos Santos TC, Martins V. Schistosomiasis mansoni simulating bladder neoplasia. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39(3): 287-8.
9. Bychkov VG, Trukhanova LS, Krylov GG, Kulikova LN, Mal'tseva ED, Smirnova EA, Kondalenko VF. N-nitrosodiethylamine-induced changes in the liver of Syrian hamster with superinvasive opistorchiasis. Vopr Onkol 2003; 49(4):476-83.
10. Lemos MP, Esquivel F, Scott P, Laufer TM. MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of Leishmania major. J Exp Med 2004; 1995:725-30.
11. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. Int J Parasitol 2004;34(13-14):17-28.
12. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nohealing infection despite Th1 polarization by a strain of Leishmania major in C57BL/6 mice. J Immunol 2005;174(5):2934-41.
13. Kodama N, Asakawa A, Inui A, Mauda Y, Nanba H. Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from Grifola frondosa. Onco Rep 2005;13(3)497-502.
14. Catros-Quemener V, Bouet F, Genet N. Antitumor immunity and cellular cancer therapies. Med Sci (paris) 2003;19(1):43-53.
15. Wu CM, Li XY, Huang TH. Anti-tumor effect of pEgr-IFN gamma gene radiotherapy in B16 melanoma-bearing mice. World Gastroenterol 2004;10(20):3011-5.
16. Babay BE, Louzir H, Kebier C, Boubaker S, Dellagi K, Cazenave PA. Inbred strain derived from feral mice reveal new pathogenic mechanisms of experimental lishmaniasis due to Leishmania major. Infect Immunol 2004; 72(8): 4603-11.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:01 +0430 on Thursday September 21st 2017

A survey about the effect of immune response raised by Leishmania major on fibrosarcoma tumor in Balb/c mice

Yoosefi H[1], Vakil N[2]*, Shirzad H[3]

Abstract

Introduction: Previous investigations and available data demonstrate that there are different patterns of diseases distribution in developed and developing countries. While in developed countries the major cause of death is cancers, in developing countries the main cause of death is infectious diseases. Various factors may be responsible for different causes of death in two those groups of countries. However there are raising scientific evidences that some infectious and parasitic organisms when enter the body may effect the tumor growth. In order to explore this presumption, in this work the effect of Leishmania major infection on fibrosarcoma tumor growth in mouse model has been investigated.

Materials and Methods: In this experimental study a group of inbred mice (n=6) were infected with Leishmania major as case group. After one month both these mice and some more mice as control group (n=6) were challenged with fibrosarcoma cells. The size of growing solid tumors was measured in individual mouse every two days up to two weeks. This measurement was performed 5 times on days 5, 7, 11, 13 and 16. Tumor area was also calculated for every single mouse. T test was used to analyze data.

Results: Results of this work showed that the mean size of tumor in case group was smaller than that of control group only in the first week following challenge with fibrosarcoma cells but the tumor mass was bigger in days 13 and 16 in case group. However the difference between the tumor mass in case and control groups was not statistically significant.

Conclusion: Results of this investigation revealed that there was no significant difference between the tumor mass in case and control mice. However to explore more about the hypothesis of this study, it is recommended that the research work be carried out using different tissue parasites and also different cell lines.

Key words: Tumor, parasite, Balb/c mouse

*Corresponing author; Email: n_vakil66@yahoo.com

1 - Associate professor, department of parasitology, Shahrekord University of medical sciences.
2 - Instructor of parasitology, Arak University of medical sciences.
3 - Assistant professor, department of immunology, Shahrekord University of medical sciences.