طب‌نظامی
بهار ۱۳۸۶، شماره ۹ (۱)
صفحات: ۲۹-۲۳

مطالعه قدرت تحریک‌کنندگی انتروتوکسین تیپ B استافیلوکوکوس اورئوس بر روی سلولهای لمفوسیت موش

عباسعلی ایمانی‌فولادی[۱]* Ph.D. ، مرتضی ستاری[۲]** Ph.D. ، زهیر محمدحسن[۳]*** Ph.D. ،
تقی عزیزی[۴]**** Ph.D. ، مهدی مهدوی[۵]** M.Sc. ، نیما خرم‌آبادی[۶]** M.Sc. ،
سیدهمایون صدرایی[۷]***** Ph.D. ، سیدرضا حسینی‌دوست[۸]* Ph.D.

*آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) – دانشکده پزشکی- گروه میکروبیولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی- تهران-ایران ** دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده پزشکی – گروه باکتری‌شناسی *** دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده پزشکی – گروه ایمنی‌شناسی **** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) – دانشکده پزشکی- گروه پاتولوژی و مرکز تحقیقات بهداشت نظامی ***** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) – دانشکده پزشکی- گروه علوم تشریح*

تاریخ اعلام وصول:۱۳۸۶/۳/۲۸ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۸/۱۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۶/۸/۲۰

خلاصه

مقدمه: انتروتوکسینهای استافیلوکوکی (SEB) در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) باعث فعال‌سازی سلولهای T از طریق ژن V_β می‌شود. خصوصاً انتروتوکسین تیپ B استافیلوکوکوس اورئوس $V_\beta 8$ سلولهای T را فعال می‌کند.

مواد و روشها: در این تحقیق میزان تحریک و فعال‌سازی سلولهای T توسط SEB در شرایط In vitro مورد بررسی قرار گرفت. به منظور دستیابی به دوز مطلوب توکسین جهت فعال‌سازی سلولهای T، ابتدا سلولهای T از گره لمفاوی موش Balb/c جدا شد. لمفوسیتهای T جدا شده در معرض غلظتهای ۱۰۰۰۰،۱۰۰۰،۱۰۰،۱۰،۱ نانوگرم بر میلی لیتر از SEB قرار گرفت. پاسخ میتوژنیک و قدرت تحریک کنندگی SEB بعد از ۷۲ ساعت با آزمایش MTT مطالعه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که دوز ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از SEB باعث تحریک مطلوب سلولهای T می‌شود. علاوه‌بر این میزان آپپتوزیس ایجاد شده ناشی از SEB در سلولهای لمفوسیت به روش رنگ‌آمیزی هوخست بررسی گردید، نتایج اختلاف معنی‌داری مبنی بر ایجاد آپپتوزیس ناشی از اثر غلظت فوق SEB در مقایسه با کنترل منفی نشان نداد، و هیچ اثر سوء بر روی سلولهای لمفوسیت نداشت.

بحث: از آنجائیکه انتروتوکسینها سوپر آنتی‌ژن هستند و با تحریک سلولهای لمفوسیت سرکوبگر قادرند از رشد تومور جلوگیری کنند، لذا می‌توانند نامزد خوبی در درمان تومورها باشند. لازم به ذکر است که SEB بصورت آئروسل قادر به عبور از دستگاه تنفسی نیز است و می‌تواند به عنوان یک عامل بیولوژیک مطرح باشد. لذا در مطالعات آزمایشگاهی باید این خصوصیت SEB مدنظر بوده تا باعث آلودگی تیم تحقیقاتی نگردد.

واژه‌گان کلیدی: انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس، سوپرآنتی‌ژن، تومور، سلول لمفوسیت.

۱- استادیار- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»- نویسنده مسئول
۲- دانشیار- دانشگاه تربیت مدرس
۳- استاد - دانشگاه تربیت مدرس
۴- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۵- دانشجوی دکتری ایمنی‌شناسی - دانشگاه تربیت مدرس
۶- دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی - تربیت مدرس
۷- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۸- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

مقدمه

سوپر آنتی‌ژنهای باکتریایی مولکولهایی‌اند که به رسپتور V_β موجود در سلولهایT (TCR) متصل شده و در کنار مولکول MHC-II عرضه می‌گردند. از جمله سوپر آنتی‌ژنهای مهم باکتریایی، انتروتوکسینهای استافیلوکوکی، توکسین سندرم شوک سمی (TSST-1)، توکسینهای اکسفولیاتیو و توکسینهای تب‌زا استرپتوکوکی و مایکوپلاسما آرترتیدیس می‌باشند، که تکثیر سلولهای T را تحریک می‌کنند [۱] و باعث آزادسازی مقادیر زیادی سایتوکاینهای مربوط به h_1 (IL-2 وINF-γ و TNF) می‌گردند [۲،۳].

سوپر آنتی ژنهای باکتریایی از جمله SEB باعث تکثیر شدید لمفوسیتهای T انسانی و موشی می‌شود [۴،۵] که از رشد سلولهای توموری جلوگیری می‌کند. در شرایط Invitro، SEB با واسطه سلولهای T باعث کشتار سلولهای توموری می‌گردد [۶]. قدرت تحریک کنندگی و فعال‌سازی یک ماده از جمله سوپر آنتی ژنها بر روی سلولهای T در شرایط In vitro به روشهای مختلف، از جمله اندازه‌گیری بیان رسپتور IL-2R، میزان آزادسازی لمفوکاینها و میزان تکثیر سلولهای T ارزیابی می‌شود [۷]. هدف این تحقیق بررسی اپتیمم دوز SEB مورد نیاز برای تحریک لمفوسیتهای T جدا شده از گره لمفاوی موش Balb/c و بررسی میزان آپپتوزیس ایجاد شده در این سلولها است.

روش بررسی

۱. جداسازی لمفوسیتهای T از موش Balb/c.

برای جداسازی لمفوسیتهای T از موش Balb/c ۸-۶ هفته‌ای انستیتوپاستور استفاده شد. در شرایط کاملاً استریل گره‌های لمفاوی اگزیلاری، براکیال و مزانتریال موش جدا شد و در بافر فسفات (PBS) سرد به صورت سوسپانسیون درآمد، پس از سانتریفوژ سلولها در ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و سه بار با بافر فسفات شستشو شد، و به روش تریپان بلو شمارش شد، و میزان زنده بودن (Viability) سلولهای لمفوسیتی تعیین گردید. سلولهای جدا شده در محیط RPMI-1640 شرکت Gibco حاوی گلوتامین و بی کربنات سدیم و ۲- مرکاپتواتانول (2ME) کشت داده شد.

۲. آماده سازی توکسین و اثر برروی سلولهای لمفوسیت.

SEB از شرکت Sigma تهیه و طبق دستور شرکت سازنده آماده شد. سپس سریال رقتهای ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه گردید، و سلولهای T به تعداد 10^5Cell/Well در محیط RPMI-1640 کشت داده شده و به صورت مجزا به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض این رقتها قرار گرفت.

۳. انجام تست MTT . به منظور بررسی میزان پاسخ‌دهی سیستم ایمنی نسبت به یک آنتی ژن خاص می‌توان میزان تکثیر این سلولها را در مجاورت آنتی‌ژن اندازه‌گیری کرد. معرف MTT (۳- (۴و۵- دی متیل تترازویل- ۲) -۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است، جذب میتوکندری سلولهای فعال شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز NADH و NADPH تولید می‌کند. شکل اکسید شده نمک تترازولیوم تولید بلور فورمازان بنفش رنگ می‌کند که در حلال مناسب (DMSO) حل شده و میزان جذب نوری رنگ تولید شده با طول موج ۵۴۰ نانومتر در الیزاریدر اندازه‌گیری می‌شود. در این آزمایش به لمفوسیتهای T که در معرض رقتهای مختلف توکسین قرار گرفته بود، معرف MTT اضافه شد و به مدت ۶-۴ ساعت در ^{oC} ۳۷ انکوبه کردیم. پس از طی این زمان و به دنبال بررسی و مشاهده تشکیل بلورهای بنفش رنگ فورمازن (شکل۱) با میکروسکوپ، محلول روئی سلولها به آرامی جمع‌آوری و دور ریخته شد و به میزان ۱۰۰ µl محلول DMSO به هر چاهک حاوی سلول اضافه کرده و باچند بار پیپت کردن، کریستالها حل شد، و پس از ۲۰ دقیقه میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزاریدر خوانده شد و عدد اندیکس تحریکی محاسبه گردید. در این آزمایش از PHA (فیتوهماگلوتینین) به عنوان کنترل مثبت و محیط RPMI-1640 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای اطمینان از نتایج بدست آمده آزمایشات پنج بار تکرار شد. برای محاسبه اندیکس تحریک از فرمول زیر استفاده

شد (۸) .

$$\text{اندیکس تحریک} = \frac{\text{OD Test}}{\text{OD Negative control}}$$

٤. بررسی آپپتوزیس ناشی از دوزهای مختلف انتروتوکسین در سلولهای لمفوسیتی. با توجه به اینکه LD_{50} توکسین در حیوان آزمایشگاهی موش (Balb/c) مورد بررسی قرار گرفت، و دوز کشنده آن مشخص شده است، دوزهای انتخابی جهت تحریک سلولهای لمفوسیتی کمتر از دوز کشنده تا مرز کشندگی 1µg/ml مورد بررسی قرار گرفت [۹]. به منظور بررسی القاء آپپتوزیس ناشی از SEB از روش رنگ آمیزی هوخست استفاده شد. میزان القاء آپپتوزیس در رقتهای مختلف توکسین در شرایط Invitro بصورت اندیکس آپپتوزیس محاسبه گردید [۱۰]. سلولهای لمفاوی کشت داده شده در معرض رقتهای فوق از انتروتوکسین SEB قرار گرفت و پس از ۷۲ ساعت از سلولها بر روی لامهای میکروسکوپی گسترش تهیه شد، و با فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و به روش هوخست رنگ آمیزی شد، و با میکروسکوپ فلورسانت میزان شکستگی کروموزوم مورد بررسی قرار گرفت (شکل۲). پس از محاسبه کینیتیک رقت مطلوب SEB درایجاد آپپتوزیس، همان رقت برای بررسی آماری ایجاد آپپتوزیس انتخاب شد. نتایج بدست آمده ناشی ازسه بار تکرار آزمایش می‌باشد.

نتایج

۱. MTT. تکثیر سلولهای لمفوسیت موش Balb/c در محیط کشت RPMI-1640 حاوی رقتهای میتوژن SEB در طی زمانهای ۲۴– ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد، که بهترین نتیجه در زمان ۷۲ ساعت و مناسب ترین رقتهای تحریک کننده رشدngr/ml ۱۰۰۰و۱۰۰۰۰بود. اما اختلاف بین این دو از نظر آماری معنی دار نیست ($P<0.05$). ولی با در نظر گرفتن LD_{50} توکسین، مناسب ترین رقت ng/ml ۱۰۰۰ می‌باشد و قدرت تحریک کنندگی آن در مقایسه با سایر رقتها از اختلاف معنی داری بر خوردار است ($P<0.05$) (منحنی و جدول ۱).

جدول۱: نتایج ۷۲ ساعته MTT ناشی ازSEB در سلولهای لمفوسیت موش بر حسب اندیکس تحریک

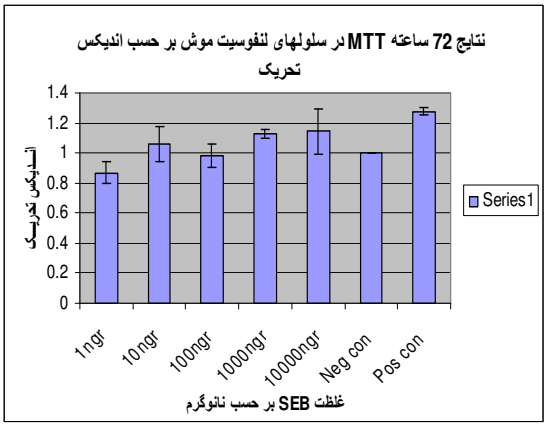
غلظت / گروه آزمایش	۱ngr/ml	۱۰ngr/ml	۱۰۰ngr/ml	*۱۰۰۰ngr/ml	۱۰۰۰۰ngr/ml	POS .con	Neg.con
۱	۰/۸۸۳	۱/۱۳	۰/۹۴۰	۱/۱۶۱	۰/۹۸۸	۱/۲۹	۱
۲	۰/۹۵۰	۱/۰۰	۰/۹۴۱	۱/۰۸۶	۱/۱۹۷	۱/۳۰	۱
۳	۰/۷۸۰	۱/۱۸۵	۱/۰۹۸	۱/۱۲	۱/۳۳	۱/۲۶	۱
۴	۰/۸۷۰	۰/۹۲۶	۰/۹۴۷	۱/۱۳	۱/۰۵۸	۱/۲۵	۱
Mean±SD	۰/۸۷۰±۰/۰۶۹	۱/۰۶۰±۰/۱۱۸	۰/۹۸۱±۰/۰۷۷	۱/۱۲۴±۰/۰۳۰	۱/۱۴۳±۰/۱۵۱	۱/۲۷±۰/۰۲۳۸	۰

جدول۲: بررسی کینیتیکSEB در تحریک آپپتوزیس سلولهای لمفوسیت موش

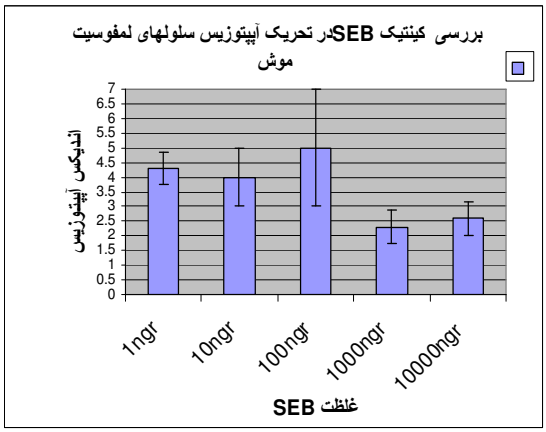
غلظت / گروه آزمایش	۱ngr/ml	۱۰ngr/ml	۱۰۰ngr/ml	۱۰۰۰ngr/ml	۱۰۰۰۰ngr/ml
۱	۴	۳	۳	۲	۳
۲	۴	۵	۷	۲	۲
۳	۵	۴	۵	۳	۳
Mean±SD	۴/۳±۰/۵۷	۴±۱	۵±۲	۲/۳±۰/۵۷	۲/۶±۰/۵۷

جدول۳ : میزان آپپتوزیس ناشی از SEB (100ngr/ml) در سلولهای لنفوسیت موش بر حسب درصد اندیکس آپپتوزیس ومقایسه با کنترل منفی

شماره گروه / گروه	۱	۲	۳	٤	٥	Mean±SD
SEB	۵	۷	۴	۶	۴	۵/۲±۱/۵۸
Neg .con	۸	۵	۵	۴	۴	۵±۱/۷۳

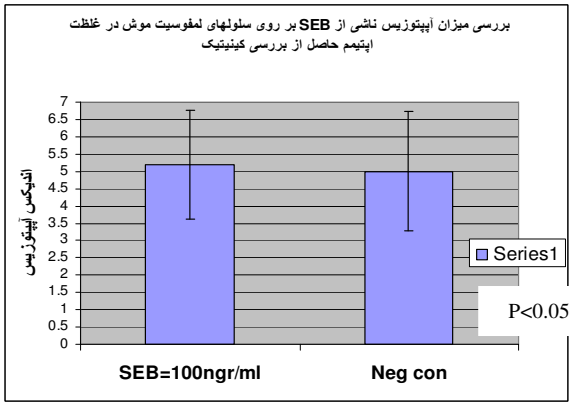


منحنی ۱: نتایج ۷۲ ساعته MTT ناشی از SEB در سلولهای لمفوسیت موش بر حسب اندیکس تحریک

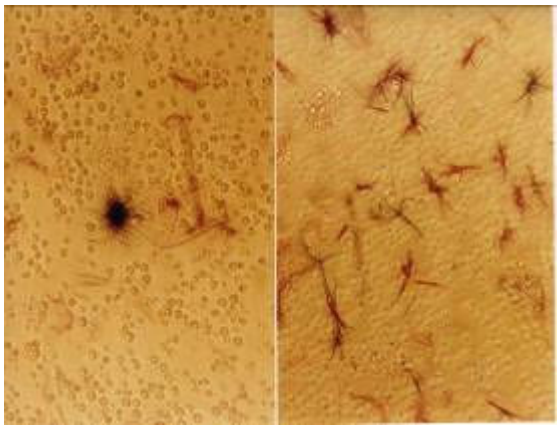


منحنی۲: بررسی کینتیک SEB در ایجاد آپپتوزیس سلولهای لمفوسیت موشی

۲. آپپتوزیس: قدرت SEB بر روی سلولهای لمفوسیت در شرایط Invitro به روش رنگ آمیزی هوخست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ناشی ازمنحنی کینتیک مشخص کرد که رقت ماکزیمم در تحریک آپپتوزیس ۱۰۰ngr/ml است. اما در بررسی آماری همین رقت از SEB و حتی سایر رقتها، نشان داد که اندیکس آپپتوزیس در مقایسه با گروه کنترل منفی از اختلاف معنی داری برخوردار نیست (P<0.05). می توان نتیجه گرفت که این رقتها برای تحریک سلولهای لمفوسیت به منظور جلوگیری از رشد سلولهای توموری مناسب می‌باشد و هیچگونه اثر سوء برروی سلولهای لمفوسیت ندارد (منحنی ۲و۳).



منحنی۳: میزان آپپتوزیس ناشی از SEB (100ngr/ml) د ر سلولهای لنفوسیت موش بر حسب درصد اندیکس آپپتوزیش و مقایسه با کنترل منفی

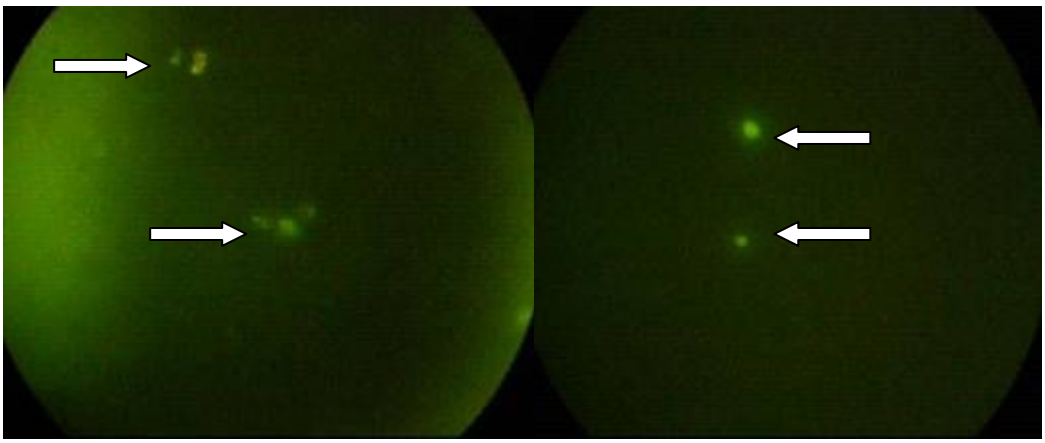


تصویر۱: کریستالهای فورمازن تشکیل شده در آزمایش MTT در این تصویر به وضوح قابل رویت است

بحث

حذف ویروسها و درمان تومور محققین را وادار کرد که بدنبال

درمانهای بهتر و جایگزین باشند.از پر امید ترین روشها بررسی خصوصیات تحریک کنندگی آنتی بادیهای منو کلنال در افزایش پاسخهای ضد توموری و ضد ویروسی توسط سیستم ایمنی است.



تصویر۲: در تصویر سمت راست یک هسته سلول سالم لمفوسیت موش و در سمت چپ هسته با نمای قطعه قطعه قطعه شده کروموزوم قابل رویت است.

مشخص شد که فعال‌سازی سلولهای لنفوسیتی بعد از درمان با آنتی بادی منو کلنال در شرایط Invivo منجر به سرکوبی تومورهای بدخیم در موش می‌شود. از آنجایی که روش فعال شدن سلولهایT موشی مشابه با سلولهای انسانی است، لذا نتایج آزمایش نیز قابل تعمیم به انسان می‌باشد [۱۱]. SEB خیلی سریع و بسیار محکم به غشاء خارجی سطح سلولهای لمفوسیتی متصل می‌شوند و یک میتوژن پلی کلنال بسیار قوی برای سلولهای T محسوب می‌شود [۱۲]. SEB با اتصال به Vβ سلولهایT با آن اتصال محکمی بر قرار می‌کند و حتی با چندین بار شستشو همچنان محکم بر روی آن باقی می‌ماند و موجب افزایش تکثیر آن می‌شود. محققین تحریک و تکثیر سلولهای لمفاوی را وابسته به دوز و زمان دانستند بطوریکه هر چه میزان SEB بیشتر باشد. تحریک و تکثیر بیشتری رخ می‌دهد اما معتقدند حداکثر زمان تحریک در ۲۴ ساعت اول می‌باشد [۱۱،۱۲]. آزمایشات ما وابسته به دوز بودن تحریک سلولهای لمفاوی را تایید می‌کند، اما در مورد زمان معتقدیم هر چه زمان بیشتر باشد تحریک بیشتری صورت می‌گیرد بطوریکه بهترین نتیجه در ایجاد تحریک در بین زمانهای ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت مربوط به ۷۲ ساعت است. از آنجایی که SEB بصورت محکم به سلولهای لمفاوی می‌چسبد و به سادگی جدا نمی‌شود. هرچه زمان مجاورت طولانی‌تر باشد تعداد بیشتری از سلولها به SEB متصل شده و سلولهای بیشتری تحریک می‌شوند.

Kenneth و همکاران دوز بالایی از SEB (۵۰µgr/ml) را استفاده کردند، که ممکن است تمام سلولها همان ابتدا ازSEB اشباع شده باشند. این دوز از SEB بیش از LD_{50} می‌باشد، در حالیکه در تحقیق حاضر میزان LD_{50} در نظر گرفته شده و از رقتهای پایین‌تر از آن استفاده شد، تا بتوان در آزمایشات Invivo از این رقتها استفاده کرد و نتایج بدست آمده را بررسی نمود. در این تحقیق با بررسی قدرت آپپتوزیس رقتهای SEB استفاده شده میزان سمیت آن بر روی سلولهای لمفوسیت مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخص شد که رقت ngr/ml ۱۰۰۰صرفا اثر تحریکی دارد و در شرایط Invivo قادر به تحریک سلولهای T می‌باشد و با فعالیت بیشتر این سلولها میزان آپپتوزیس و نکروزیس در سلولهای توموری افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای Anne و همکاران نیز نشان دادند که رقت ۱۰۰۰ng/ml قادر به ایجاد آپپتوزیس در سلولهای مهاجم می‌باشد [۱۳]. البته به این نکته هم معتقدیم که

در شرایط Invivo یک سری از فاکتورها واکنش بین سلولهای لمفوسیت باSEB را تحت تاثیر قرار می‌دهند، و باید در شرایط Invivo مورد بررسی بیشتر قرار بگیرد. از طرف دیگر با بررسی قدرت ایجاد آپپتوزیس توسط SEB می‌توان به این مسئله هم اشاره کرد که باید از غلظتی ازSEB استفاده شود که حداقل قدرت آپپتوزیس و حداکثر قدرت تحریکی را بر روی سلولهای لمفاوی داشته باشد. چرا که آپپتوزیس سلولهای لمفاوی علاوه بر اینکه در درمان سرطان اختلال ایجاد می‌کند، بلکه منجر به ایجاد بیماریهای التهابی مزمن از قبیل آرتریت، بیماری کاوازکی، پسوریازیس و Atopic Dermatitise می‌شود. چرا که سوپر آنتی‌ژنها عامل اینگونه بیماریهای خطرناک نیز هستند، و اگر کنترل نشده در دمان استفاده شوند باعث مشکلات جدی می‌شوند. در این گونه بیماریها سوپر انتی ژنها با تقویت Th1 و تولید بیش از حد سایتوکاینهایی نظیر IFNγ در ایجاد بیماریهای فوق دخالت دارند [۱۴].

منابع

1- Peavy DL, Adler WH, Smith RT. The mitogenic effect of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells human peripheral lymphocytes. J Immunol 1970; 105:1453-1458.

2- Carlsson R, Sjogren HO. Kinetic of IL-2 and IFN-γ production, expression of IL-2 receptor and cell proliferation in human mononuclear cells exposed to staphylococcal enterotoxin A. Cell Immunol 1985; 96: 175-183.

3- Fischer H, Dohlston M, Andersson U. Production 0f TNF-α and TNF-β by staphylococcal enterotoxin A activated human T-Cells. J Immuol 1990; 144: 4663-4669.

4- Marrack P, Kapple J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science Washington DC 1990; 248: 705-711.

5- White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. The v_β _ specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T-Cells and clonal deletion in neonatal mice. Cell 1989; 56: 27-35.

6- Lando PA, Dohlston M, Hedlund G, Akerblom E, Kalland T. T- cell killing of human colon carcinomas by monocolonal antibody – targeted superantigens. Cancer Immunother 1993; 36: 223-228.

7- Callahan JE, Herman A, Kappler JW, Marrack P. Stimulation of B10. BR T cell with superantigenic staphylococcal toxins. J Immunol 1990; 144: 2473-2479.

8- Younkin LH. Invitro response of lymphocytes to phytohemagglutinin (PHA) as studied with antiserum to PHA. Initiation period doughter – cell proliferation and restimulation . Exp Cell Res 1972; 75: 1-10.

9- Sinha P, Sengupta J, Ray PK. A minimized FC binding peptide from protein A induce immunocyte and evokes Th-1 type response in mice. Biochem Biophys Res Commun 1999; 258: 141-147.

10- Catt SL, Sakkas D, Bizzaro D, Bianch PG, WMaxwell MC, Evans G. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometricsorting does not affect the frequency of detected endogenous DNAnicks in abnormal and normal human spermatozoa. Molecular Human Reproduction. 1997; 3(9): 821–825.

11- Kenneth AN, Joshua DIE, David SB, Jeffrey B. Invivo T-Cel activation by staphylococcal enterotoxin B prevent out growth of a malignant tumor. Proc Natl Acad SCi USA 1991; 88: 1074-1078.

12- John RW. Mitogenic stimulation of murine

spleen cells by Brief exposure to staphylococcus aureus enterotoxin B 1977; 18(1): 99-101.

13- Anne KW, Ulrich W, Harald R. Superantigen-Induced T Cell Death byApoptosis: Analysis on a Single Cell Level and Effect of IFN-γ and IL-4 Treatment. Int Arch Allergy Immunol 2000; 121: 215–223.

14- Romagnani S. Th1 and Th2 Cells: Role in Human Disorders. Madrid. EAACI 1995; 5–9.