

## اثرات تزریق داخل وریدی کاندیدا آلبیکنس بر شمارش مطلق و افتراقی سلول‌های طحالی و الگوی الکتروفورتیکی لیزات آن‌ها در موش‌های BALB/c

محمدرضا شکوه امیری<sup>۱</sup>، دکتر محمد حسین یادگاری<sup>۲</sup>، دکتر زهیر محمد حسن<sup>۳</sup>

### چکیده

**مقدمه:** استفاده از واکسن‌های مبتنی بر پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs یا Heat shock proteins)، عرصه‌ی جدیدی از تحقیقات علوم پزشکی را رقم زده است و امیدهای جدیدی را برای پیش‌گیری و درمان بیماری‌های عفونی و تومورهای سرطانی به وجود آورده است. در این تحقیق به منظور تهیه‌ی لیزات غنی از HSPs از سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با کاندیدا، ارزیابی اثر شوک ناشی از تزریق کاندیدا آلبیکنس زنده بر ترکیب جمعیتی و الگوی پروتئینی لیزات سلول‌های طحالی با تأکید بر تغییرات HSPs مد نظر قرار گرفت.

**روش‌ها:** تعداد ۳۰ سر موش BALB/c پس از عادت دادن به محیط نگهداری، به دو گروه مداخله و شاهد تقسیم شدند. در گروه مداخله، پس از چندین مرحله تزریق تقویت‌کننده‌ی کاندیدا، دوز نهایی به صورت  $10^6 \times 4$  عدد کاندیدا آلبیکنس زنده در هر موش از طریق ورید دمی تزریق شد. ۷ روز بعد از تزریق نهایی، موش‌های مداخله و شاهد از طریق قطع نخاع کشته شدند و سلول‌های طحالی آن‌ها به صورت خالص تهیه گردید. میزان کل سلول‌های طحال و درصد افتراقی آن‌ها تعیین شد و سپس لیزات تهیه شده از تعداد معینی سلول طحالی برای تعیین میزان HSP70 با روش ELISA و الگوی پروتئینی با روش الکتروفورز SDS-PAGE مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تزریق کاندیدا منجر به افزایش تعداد مطلق سلول‌های طحال شد. از نظر شمارش افتراقی نیز درصد ماکروفاژها افزایش معنی‌داری پیدا کرد. مقایسه‌ی میزان HSP70 سلول‌های طحالی در گروه مداخله، افزایش ۱۳ برابری این پروتئین‌ها را نسبت به گروه شاهد نشان داد ( $P < 0/001$ ). همچنین، مقایسه‌ی الگوی الکتروفورتیکی دو گروه (SDS-PAGE+Western) افزایش ۱۱ و ۷/۳ برابری را به ترتیب در میزان HSP70 و HSP90 در گروه مداخله نسبت به شاهد نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** تزریق وریدی کاندیدا آلبیکنس ضمن افزایش جمعیت منوسیت و ماکروفاژها در طحال، میزان HSPs را به ازای هر سلول نیز افزایش چشمگیری می‌دهد، که بیشترین افزایش مربوط به HSP70 و HSP90 می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** کاندیدا آلبیکنس، الگوی الکتروفورتیکی، سلول‌های طحال، موش BALB/c

### مقدمه

ناحیه‌ی دهان، گلو، مری و واژن می‌باشد. هر دو پاسخ ایمنی هومورال (با واسطه‌ی Th2) و سلولی (با واسطه‌ی Th1) در مقابل عفونت کاندیدایی القا می‌شوند. در حالی که پاسخ Th2 برای مقابله با کاندیدا کمک کننده است. سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th2 باعث تضعیف مکانیزم‌های میکروب‌کشی فاگوسیت‌ها (نوتروفیل و ماکروفاژ)

کاندیدا آلبیکنس، قارچ مخمری فرصت‌طلبی است که در افراد دارای نقص ایمنی، مثل بیماران مبتلا به ایدز (۱-۳) یا دریافت کنندگان پیوند (۴-۵) و بیماران مبتلا به دیابت، ایجاد کاندیدیازیس می‌کند. عفونت با کاندیدا یا به صورت سیستمیک، همراه با انتشار وسیع قارچ در بدن و یا به صورت عفونت‌های مخاطی در

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.

شده و ریشه‌کنی بیماری را با مشکل مواجه می‌کنند، اما سایتوکاین‌های مترشح‌ه از سلول‌های Th1 فاگوسیت‌ها را تحریک و تقویت می‌کنند و سبب ریشه‌کنی عفونت می‌شوند (۶).

طحال یکی از اعضای سیستم رتیکولاندوتلیال است که نقش مهمی را در به دام انداختن عوامل بیماری‌زای وارد شده به گردش خون ایفا می‌کند. طحال علاوه بر این که عضو پاک‌کننده‌ی خون از گلبول‌های قرمز و سفید فرسوده است، همچنین محل استقرار سلول‌های توانمند ایمنی از جمله ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها (T & B) نیز می‌باشد. هر جرم بیگانه‌ای که به صورت مستقیم (به طور مثال از طریق تزریق وریدی) و یا از طریق سیستم لنفاوی، به گردش خون راه پیدا کند در این عضو توسط سلول‌های ماکروفاژی به‌دام می‌افتد و پس از برداشته شدن توسط این سلول‌ها پردازش می‌شود. آنتی‌ژن‌های بیگانه در سطح این سلول‌ها و در کنار مولکول‌های HLA1, HLA2 به سلول‌های اختصاصی ایمنی از نوع B و T عرضه می‌شوند تا ایمنی اکتسابی از نوع هومورال و سلولی را به راه بیندازند. بدین ترتیب، در صورت رخ دادن عفونت مجدد، پاسخ ایمنی قوی‌تری را بر علیه همان عامل بیگانه ایجاد می‌کنند و ریشه‌کنی عفونت را ممکن می‌نمایند (۷).

کاندیدا آلبیکنس تزریق شده از طریق وریدی پس از دو ساعت به طور کامل از خون پاکسازی می‌گردد و قسمت عمده‌ی آن توسط ماکروفاژهای مستقر در طحال برداشت می‌شود (۸). دوز کشنده‌ی (LD<sub>50</sub>) یا (Lethal dose 50) کاندیدا آلبیکنس زنده از طریق تزریق وریدی، تعداد  $10^4 \times (1/4 - 1/6)$  واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی (Colony forming unit یا CFU) و

دوز LD<sub>90-100</sub> آن  $10^7$  واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در هر موش گزارش شده است (۹). همچنین روش‌های مختلفی برای بالا بردن تحمل حیوان در مقابل دوز کشنده گزارش شده است. استفاده از لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی، استفاده از ادجوانت فروند و یا عفونت با دوز خیلی پایین، به صورت کارآمدی تحمل حیوان را در قبال تزریق سیستمیک میکروارگانیزم‌ها افزایش می‌دهد (۱۰). این دو ماده از طریق افزایش توان غیر اختصاصی ایمنی در مقابله با عفونت، منجر به افزایش تحمل حیوان می‌شوند. بدین معنی که هر دو ماده منجر به افزایش تولید و ترشح سایتوکاین‌های ایمنی (اغلب تقویت‌کننده‌ی بازوی سلولی ایمنی) می‌گردند. اما نوع دیگری از مقاومت نیز به صورت اختصاصی بر علیه عامل بیماری‌زا از طریق عفونت با دوز پایین به وجود می‌آید. به طور کلی هر تحریک آنتی‌ژنی با دوز پایین و غیر کشنده می‌تواند توان مقابله‌ی بدن حیوان را برای دوزهای بالاتری از همان محرک در مواجهه‌ی بعدی افزایش دهد. در این تحقیق از هر دو روش افزایش مقاومت برای بالا بردن تحمل حیوان استفاده شده است، با این هدف که بتوان اثر شوک ناشی از بالاترین دوز ممکن تزریق کاندیدای زنده را بر سلول‌های طحالی ارزیابی نمود.

بخشی از مقاومت ایجاد شده در مقابل تزریق سیستمیک دوز کشنده‌ی کاندیدا آلبیکنس به دلیل افزایش سلول‌های اختصاصی T و B در قبال کاندیدا می‌باشد. سلول‌های B و T آنتی‌ژن‌های کاندیدایی را بر سطح ماکروفاژهای طحالی شناسایی کرده و ضمن بسط کلنی منجر به افزایش سلول‌های اختصاصی کاندیدا می‌گردند. بخش دیگری از مقاومت ایجاد شده می‌تواند به دلیل افزایش پتانسیل تصفیه‌ای طحال ناشی

از تزریق‌های قبلی باشد (که اغلب با بزرگ شدن طحال و افزایش تعداد سلول در آن همراه است) (۱۱). به همین دلیل این تحقیق به دنبال مشخص کردن تغییرات تعداد کل گلبول‌های سفید و ترکیب جمعیتی (منوسیت، لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و بازوفیل) ناشی از مراحل مقاوم سازی در طحال بود. راه‌یابی کاندیدا آلبیکنس به درون ماکروفاژهای طحالی منجر به افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock proteins یا HSPs) هم از طرف کاندیدا و هم از طرف ماکروفاژها می‌گردد (۱۶-۱۲). بر این اساس، این تحقیق در نظر داشت این فرضیه را نیز آزمون کند که آیا ورود حجم عظیمی از کاندیدا به درون ماکروفاژهای طحالی، از طریق تزریق مکرر سیستمیک و با دوز بالا رونده‌ی کاندیدا آلبیکنس زنده، می‌تواند منجر به تغییر در محتوی HSPs سلول‌های طحالی گردد؟

به تازگی از HSPs در ایمونوتراپی سرطان و بیماری‌های عفونی استفاده شده است و نتایج خوبی نشان داده است. HSPs در قسمت‌های مختلف سلولی و در انواع سلول‌ها حضور دارند و نقش‌های زیستی مهمی را در سلول‌ها به عهده دارند (۱۸-۱۷). در اثر انواع استرس‌ها، نظیر حرارت، محرومیت از گلوکز، عفونت‌ها، سایتوکاین‌ها، تابش اشعه و توکسین‌ها، بیان این مولکول‌ها در سلول بالا می‌رود. این مولکول‌ها به عنوان چاپرون‌های اصلی سلول عمل می‌نمایند و پپتیدهای سلولی را به صورت متصل به ناحیه‌ی N خود، به همراه دارند. پیوند پپتیدهای آنتی‌ژنی با این مولکول مقاوم است و حتی در روند تخلیص این پروتئین (با روش‌هایی که تا به حال به کار رفته است)، از آن جدا نمی‌شوند (۱۹).

HSPها در هر سلول، پپتیدهای آنتی‌ژنی (خودی یا بیگانه) موجود در آن سلول را به همراه خود دارند. این پروتئین‌ها دارای گیرنده‌ی اختصاصی (CD91) بر روی سلول‌های دندریتیک هستند و پس از برداشت با واسطه‌ی گیرنده، این مولکول‌ها پپتیدهای همراه خود را از طریق مسیر MHC-I در سطح همان سلول بیان نمی‌نمایند و سلول‌های TCD8+ را فعال می‌سازند. بدین ترتیب سایتوتوکسیسیته سلولی بر علیه آنتی‌ژن همراه خود را افزایش می‌دهند (۲۱-۲۰). همچنین، این مولکول‌ها به عنوان ادجوانت اندوژن نیز عملکرد خوبی دارند و القای بیان سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های ایمنی را افزایش می‌دهند و سایتوتوکسیسیته مناسبی را القا می‌کنند (۲۴-۲۲).

یکی از روش‌های قدیمی و اثبات شده‌ی انتقال مقاومت اختصاصی در مقابل یک عامل عفونت‌زا، انتقال سلول‌های طحالی از حیوان ایمن شده به حیوان ایمن نشده می‌باشد. با توجه به پیشرفت‌های اخیر، نشان داده شده است که انتقال لیزات سلول‌های طحالی از حیوان ایمن شده (یا فراکسیون‌های حاوی HSPs) می‌تواند به طور مؤثری مقاومت اختصاصی را در حیوان دریافت‌کننده‌ی آن افزایش دهد. در واقع استفاده از واکسن‌های مبتنی بر HSPs عرصه‌ی جدیدی از تحقیقات علوم پزشکی و امیدهای جدیدی برای پیش‌گیری و درمان بیماری‌های عفونی و تومورهای سرطانی به وجود آورده است (۱۸-۱۷). در این تحقیق به منظور تهیه‌ی لیزات غنی از HSPs از سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با کاندیدا، ارزیابی اثر شوک ناشی از تزریق کاندیدا آلبیکنس زنده بر ترکیب جمعیتی و الگوی پروتئینی لیزات سلول‌های طحالی با تأکید بر تغییرات HSPs مد نظر قرار گرفت.

بر این اساس، یکی از اهداف این تحقیق تهیه‌ی فرمولاسیون مناسب (لیزات غنی از نظر HSPs و کارآمد برای ایمونوتراپی) حاوی HSPهای طحالی برای استفاده‌ی بعدی در ایمونوتراپی کاندیدا بود.

## روش‌ها

تعداد ۳۰ سر موش نژاد خالص BALB/c، دارای ۶ تا ۸ هفته سن، از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و پس از یک هفته نگهداری در حیوان‌خانه، به دو گروه مداخله و شاهد تقسیم شدند. برای بالا بردن تحمل موش‌های گروه مداخله در مقابل تزریق سیستمیک کاندیدای زنده (به منظور افزایش دوز تزریق در مرحله‌ی نهایی و پیش‌گیری از مرگ حیوان) از روش مقاومت‌سازی استفاده گردید. هفت روز پس از آخرین تزریق، موش‌های مداخله و شاهد از طریق قطع نخاع کشته شدند و سلول‌های طحالی آن‌ها از طریق شمارش کل سلول‌های طحال و تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید مورد ارزیابی قرار گرفت. محتوای HSP70 سلول‌ها با روش ELISA اندازه‌گیری شد. همچنین، لیزات حاصل از تعداد معینی از سلول‌های طحالی نیز برای بررسی الگوی پروتئینی از طریق الکتروفورز SDS-PAGE و مقایسه‌ی آن بین دو گروه مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت پروتئین‌های HSP70 و HSP90 از طریق روش Western blot تعیین مقدار شد و میزان آن بین دو گروه مقایسه گردید. روش مقاومت‌سازی در مورد گروه مداخله انجام گرفت و هدف از آن بالا بردن دوز کاندیدای زنده‌ی دریافتی در تزریق مرحله‌ی آخر و پیش‌گیری از مرگ حیوان بود. تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند (۵۰ میکرولیتر) و کاندیدای کشته شده (۵۰

میکرولیتر معادل  $10^5$  سلول کاندیدا) و از طریق عضلانی انجام گردید. تزریق‌های بعدی به صورت افزایش یابنده، با کاندیدای زنده و بدون به کار بردن ادجوانت و از طریق داخل صفاقی (دو مرحله تزریق) و داخل ورید دمی (بار آخر) انجام شد. دوزهای فراینده‌ی کاندیدا به ترتیب  $10^6$ ،  $2 \times 10^6$  و  $4 \times 10^6$  واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی کاندیدای زنده برای هر موش بود و فاصله‌ی بین تزریق‌ها ۱۰ روز انتخاب گردید. گروه شاهد فقط ادجوانت کامل فروند را یک بار (همانند گروه مداخله) دریافت کردند، اما به جای کاندیدای کشته شده یا زنده، فقط PBS دریافت کردند. ۷ روز پس از آخرین تزریق، موش‌ها از طریق قطع نخاع کشته شدند و پس از باز کردن محوطه‌ی شکم حیوان (در داخل هود میکروبیولوژی و تحت شرایط استریل)، طحال حیوان با پنس و قیچی جدا شد و در داخل تشتک پتری حاوی محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ غنی شده با سرم گاوی (۱۰ درصد) و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین که تا ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سرد شده بود، قرار گرفت. سپس سلول‌های طحالی از طریق استفاده از سرنگ‌های پلاستیکی و گذراندن از مش‌های پلاستیکی استریل از بافت پارانشیم طحالی جدا شدند. برای حذف توده‌های درشت سلولی، سوسپانسیون‌های تهیه شده به مدت یک دقیقه در داخل فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری به صورت ساکن و بی‌حرکت قرار گرفتند و سلول‌های منفرد رویی به فالكون استریل دوم که برچسب داشتند، منتقل شدند. برای حذف گلبول‌های قرمز از محلول لیزکننده‌ی LCK استفاده شد و در نهایت تعداد کل سلول‌های هر طحال پس از شمارش نمونه‌ای از آن و ضرب کردن در حجم کل سوسپانسیون، محاسبه

و یادداشت گردید. برای محاسبه‌ی تعداد مطلق ۵ نوع سلول طحالی، درصد حاصل از شمارش افتراقی آن‌ها در تعداد کل سلول‌های طحال ضرب گردید.

برای شمارش افتراقی و تعیین درصد گلبول‌های سفید (نوتروفیل، بازوفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و منوسیت) از رنگ‌آمیزی گسترش تهیه شده از سلول‌های طحالی با رنگ اختصاصی هماتولوژی (گیمسا) و مشاهده‌ی لام رنگ شده با عدسی ایمرسیون میکروسکوپ استفاده شد. هر لام دو بار و هر بار تا حد رسیدن به یک صد سلول بازبینی و درصد سلول‌ها یادداشت گردید.

برای سنجش میزان HSP70 نمونه‌ها از کیت (DYC1663-2 (R & D Systems) استفاده شد. برای تهیه لیزات سلول‌های طحالی از محلول لیز کننده‌ی اختصاصی تعبیه شده در کیت استفاده گردید. همه‌ی تست‌ها به صورت سه تایی انجام گردید. همچنین برای همه‌ی نمونه‌ها سوسپانسیون حاوی  $10^7$  سلول مورد استفاده قرار گرفت. پس از قرائت نتایج ELISA، از کنترل‌های دوتایی میانگین گرفته شد و سپس بر اساس مقادیر استاندارد مقادیر نمونه‌ها محاسبه و عدد حاصل وارد محاسبات آماری گردید.

برای مقایسه‌ی پروتئین‌های موجود در لیزات سلول‌های طحالی بین دو گروه، ابتدا سوسپانسیون  $10^7$  سلول در هر میلی‌لیتر از PBS برای همه‌ی نمونه‌ها تهیه شد. پس از حذف بافر فسفات، سلول‌ها با بافر نمونه‌ی الکتروفورز (2X SDS-sample buffer) مخلوط گردید و پس از ۵ دقیقه نگهداری در حرارت ۹۵ درجه و سرد شدن، حجم ثابتی از آن (۱۰ میکرولیتر) با استفاده از سمپلر به چاهک ژل SDS-PAGE منتقل گردید. الکتروفورز، به صورت

دوتایی و با استفاده از ژل جدا کننده‌ی ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد، در حضور سدیم دودسیل سولفات و با استفاده از روش استاندارد Laemmli (۲۵)، تحت شرایط احیا کننده، با ولتاژ ثابت ۱۳۰ ولت و به صورت شبانه و با استفاده از تجهیزات استاندارد انجام گردید. یکی از ژل‌ها پس از شستشو، به مدت ۲ ساعت در داخل رنگ کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie brilliant blue staining) قرار گرفت و پس از رنگ‌بری کامل، تصویر تهیه شده از آن با نرم‌افزار ImageJ آنالیز گردید. برای کمی‌سازی داده‌های قرائت شده از غلظت‌های استاندارد پروتئین استفاده گردید. مارکرهای وزنی به کار برده شده ۱۲۰، ۹۱، ۷۰، ۴۶ و ۱۹ کیلودالتون بودند.

ژل دوم برای انجام Western blot به کار برده شد. باندهای پروتئینی جدا شده با SDS-PAGE با استفاده از روش Western blot و در حضور بافر حاوی SDS به غشایی از جنس نیترات سلولز منتقل گردید. غشای حاوی باندهای پروتئینی پس از غوطه‌ور شدن به مدت ۱ ساعت (همراه با مخلوط شدن آرام) در بافر فسفات نمکی مسدود کننده‌ی حاوی ۰/۵ درصد تواین و ۳-۵ درصد شیر بدون چربی (Non-fat dry milk)، شسته شد و با محلول حاوی آنتی‌بادی‌های اولیه‌ی موشی ضد HSP70 و HSP90 به مدت ۲ ساعت همراه با مخلوط شدن مجاور گردید. پس از شسته شدن به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم پراکسیداز مجاور گردید. در نهایت پس از شستشو، غشا در تاریکی در محلول سوبسترای حاوی دی‌آمینوبنزیدين و هیدروژن پراکسید غوطه‌ور شد و به محض مشخص شدن باندهای پروتئینی موجود در نمونه‌ی شاهد، غشا شسته و تصویر آن تهیه گردید.

از تست‌های دو تایی و سه تایی میانگین گرفته شد. برای مقایسه‌ی داده‌های حاصل از شمارش کل، شمارش مطلق و شمارش افتراقی سلول‌های طحالی و نیز داده‌های کمی شده‌ی حاصل از باندهای پروتئینی روی ژل SDS-PAGE و غشای نیتروسلولز بین دو گروه از آزمون Student-t استفاده گردید.

اولیه مناسب‌سازی شده بود. همچنین در زمان نمونه‌گیری طحال، آزمایش میکروسکوپی از گسترش تهیه شده از سلول‌های طحالی فاقد سلول‌های کاندیدایی خارج و یا داخل سلولی بود و کشت انجام شده از نمونه‌ی طحال گروه مداخله از نظر کاندیدا آلبیکنس منفی بود.

### یافته‌ها

**نتایج مقاوم سازی:** استفاده از ادجوانت فروند با کاندیدای کشته شده در مرحله‌ی اول تزریق و افزایش تدریجی دوز کاندیدای زنده در دو مرحله‌ی بعدی منجر به افزایش تحمل حیوان گردید. LD<sub>50</sub> کاندیدا از طریق تزریق وریدی برای موش‌ها برابر  $10^4 \times (1/6 - 1/4)$  واحد ایجاد کننده‌ی کلنی برای هر موش گزارش شده است. تزریق مرحله‌ی آخر در این تحقیق با استفاده از دوز  $4 \times 10^6$  واحد ایجاد کننده‌ی کلنی کاندیدای زنده انجام شد (۲۵۰ برابر دوز LD<sub>50</sub>) و به دلیل تحمل ایجاد شده در طی مرحله‌ی مقاوم‌سازی حتی یک مورد تلفات در جمعیت موش‌های گروه مداخله مشاهده نشد. اثر دوزهای متفاوت کاندیدا و فاصله‌های زمانی تزریق در مطالعات

**نتایج شمارش کل:** تزریق مکرر کاندیدای زنده به موش‌ها سبب افزایش حجم طحال (در این تحقیق اندازه‌گیری نشد) و افزایش تعداد سلول‌های طحال گردید که در مقایسه با گروه شاهد این اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/0001$ ). میانگین محتوای گلبول‌های سفید طحال در جدول ۱ ارائه شده است که برای طحال موش‌های گروه مداخله حدود ۱۶۶ میلیون سلول و برای گروه شاهد ۷۶ میلیون سلول بود.

**نتایج شمارش افتراقی:** نتایج شمارش افتراقی سلول‌های طحالی و شمارش مطلق سلول‌ها به تفکیک نوع سلول در جدول ۱ ارائه شده است. برای به دست آوردن شمارش مطلق هر سلول در طحال، تعداد کل سلول طحال در درصد افتراقی هر سلول، ضرب شد.

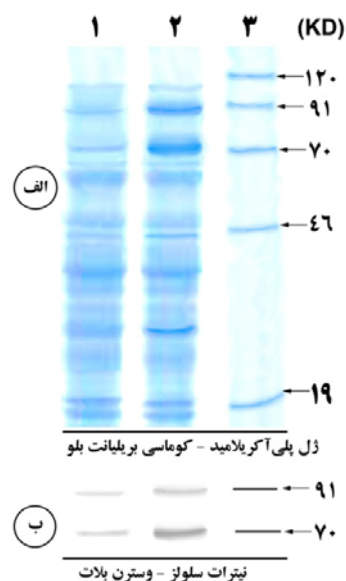
**نتایج ELISA:** غلظت پروتئین HSP70 در لیزات حاصل از سوسپانسیون  $10^7$  سلول در میلی‌لیتر از

جدول ۱. شمارش نسبی و مطلق سلول‌های طحال

مقدار P	شمارش مطلق سلول‌های طحال*		شمارش نسبی سلول‌های طحال (درصد)		نوع سلول
	شاهد	مداخله	شاهد	مداخله	
۰/۵۶	۱/۵۵۸ ± ۰/۳۸	۲/۵۷۳ ± ۰/۹۱۳	۲۰/۵ ± ۵	۱۵/۵ ± ۵/۵	نوتروفیل
< ۰/۰۵	۵/۳۲ ± ۰/۹۱۲	۱۰/۲۹۲ ± ۱/۸۲۶	۷۰ ± ۱۲	۶۲ ± ۱۱	لنفوسیت
< ۰/۰۰۰۱	۰/۶۱ ± ۰/۱۸۳	۳/۵۸۵۶ ± ۱/۱۲۹	۸ ± ۲/۴	۲۱/۶ ± ۶/۸	منوسیت
۰/۸۱	۰/۰۷۶ ± ۰/۰۳۰	۰/۰۹۹۶ ± ۰/۰۶۶	۱ ± ۰/۴	۰/۶ ± ۰/۴	ائوزینوفیل
۰/۹۵	۰/۰۳۸ ± ۰/۰۱۵	۰/۰۴۹۸ ± ۰/۰۳۳	۰/۵ ± ۰/۲	۰/۳ ± ۰/۲	بازوفیل
	۷/۶ ± ۳/۴	۱۶/۶ ± ۳/۵	۱۰۰ ± ۲۰	۱۰۰ ± ۲۳/۹	جمع

\* واحد اعداد مربوط به شمارش مطلق  $10^7$  سلول می‌باشد.

قرائت شده برای هر باند پروتئینی موجود بر ژل پلی آکرلامید بر اساس غلظت باند پروتئینی استاندارد نزدیک به آن (از نظر غلظتی) مقایسه و محاسبه شد.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز روی ژل پلی آکرلامید و Western blot از لیزات سلول‌های طحال الف- ۱۰۶ سلول طحالی (رسوب) با یک سی سی بافر نمونه (2x SB) مخلوط شده، پس از ۵ دقیقه نگهداری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شد و از محلول رویی ۱۰ میکرولیتر به هر چاهک ژل منتقل گردید. ستون ۱ مربوط به سلول‌های طحال موش‌های سالم و دست نخورده می‌باشد. افزایش شدید پروتئین در باندهای ۹۰ و ۷۰ کیلو دالتون مربوط به گروه مداخله در ستون ۲ مشاهده می‌شود. همچنین لیزات تهیه شده از سلول‌های طحال موش‌های دریافت‌کننده کاندیدا در باندهای ۴۴ و ۲۷ دالتون نیز افزایش خفیف نشان می‌دهند. ب- Western blot از ژل الکتروفورز پلی آکرلامید با استفاده از آنتی‌بادی‌های شناساگر پروتئین‌های HSP70 و HSP90 که با آنتی‌بادی ثانویه از نوع خرگوشی و کونژوگه با آنزیم پراکسیداز ردیابی شد و سپس با سوبسترای دی‌آمینوبنزیدين و هیدروژن پراکسید رسوب رنگی ایجاد گردید. ارزیابی اولیه نشان داد که هیچ کدام از دو نوع آنتی‌بادی اولیه و ثانویه با لیزات کاندیدا آلبیکنس واکنش متقاطع ندارند. با این حال و برای اطمینان بیشتر لیزات کاندیدا آلبیکنس به محلول مسدود کننده نیز اضافه شد.

سلول‌های طحال با روش ELISA در موش‌های گروه شاهد برابر ۳۴۹/۸۵ پیکوگرم در  $10^7$  سلول و در گروه مداخله برابر ۴۵۴۸/۳۵ پیکوگرم در  $10^7$  سلول بود. میزان متوسط این پروتئین در سلول‌های گروه مداخله بیش از ۱۳ برابر میزان آن در گروه شاهد بود. برای رد احتمال واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های به کار برده شده در سیستم ELISA با HSP‌های کاندیدا آلبیکنس بلع شده توسط ماکروفاژهای طحالی، لیزات کاندیدا آلبیکنس نیز با این روش ارزیابی گردید و واکنشی مشاهده نگردید.

### نتایج الکتروفورز و Western blot الکتروفورز

سلول‌های طحالی به صورت نمونه‌هایی با تعداد سلول برابر  $(10^6)$  سلول در میلی‌لیتر) و نه غلظت پروتئینی برابر انجام گردید. بدین معنی که برای هر چاهک ژل الکتروفورز، لیزات حاصل از تعداد مساوی سلول منتقل شد. بنابراین، هر گونه تغییر مشاهده شده در تراکم باندهای الکتروفورزی یا از تغییر ترکیب جمعیتی و یا از تغییر ترکیب پروتئینی هر سلول واحد ناشی می‌گردد. با توجه به این که سلول‌های برداشت‌کننده کاندیداهای تزریق شده، منوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها هستند، تغییر در تعداد نسبی این دو سلول منجر به تغییر تراکم باندهای الکتروفورزی مربوط به پروتئین‌های استرس می‌گردد. در گروه مداخله که شمارش نسبی و شمارش مطلق منوسیت‌ها افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان داد، افزایش در تراکم باندهای معادل ۹۰، ۷۰، ۴۴ و ۲۷ کیلو دالتون مشاهده گردید که بیشترین مقدار افزایش به ترتیب در باندهای معادل ۷۰، ۹۰، ۲۷ و ۴۴ کیلو دالتون و به صورت ۱/۱، ۷/۳، ۲/۱ و ۱/۵ برابر دیده شد (شکل ۱- الف). برای بالا بردن دقت مقایسه، داده‌ی عددی



آنالیز باندهای مربوط به HSP70 و HSP90 بر روی غشای Western با استفاده از نرم افزار ImageJ نیز افزایش ۱۱/۵ و ۸/۸ برابری را به ترتیب برای دو پروتئین ذکر شده در گروه مداخله نشان داد و چون امکان استفاده از غلظت‌های استاندارد برای تعیین تراکم آن‌ها وجود نداشت، بنابراین داده‌های قرائت شده به طور مستقیم با هم مقایسه گردیدند (شکل ۱-ب). برای روشن کردن ماهیت دو باند پروتئینی دیگر (معادل ۴۴ و ۲۷ کیلودالتون) که افزایش نسبی را در ژل نشان دادند، اقدامی صورت نگرفت؛ ولی به احتمال قوی آن دو پروتئین نیز از خانواده‌ی HSPها بودند.

### بحث

برای اولین بار محققى به نام Ritossa در اثر افزایش اتفاقی دمای انکوباتور به افزایش چشمگیر پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) در مگس سرکه (*Drosophila*) پی برد (۲۶). از آن زمان تاکنون تحقیقات گسترده‌ای توسط دانشمندان در مورد نقش و اهمیت این پروتئین‌ها انجام شده است و نتایج تحقیقات انجام شده حاکی از وجود طیف گسترده‌ای از این نوع پروتئین با عملکردها و جایگاه‌های متفاوت در درون سلول‌ها اعم از یوکاریوت و پروکاریوت می‌باشد. توالی مولکول‌های HSPs در طی تکامل بین انواع موجودات و گونه‌ها حفظ شده است و هومولوژی بالایی بین HSPهای اخذ شده از انواع سلول‌ها وجود دارد. این هومولوژی در وهله‌ی اول بر ضرورت وجود و حفظ ساختار این پروتئین‌ها به منظور حفظ عملکردهای طبیعی سلولی تأکید دارد و از طرف دیگر، امکانات جدیدی را برای استفاده‌های درمانی و پیشگیرانه فراهم می‌کند.

برخی از HSPها جزء پروتئین‌های ساختاری سلول محسوب می‌شوند و به صورت پایدار اما با سطح پایین در سلول‌های فاقد استرس بیان می‌شوند و در برخی دیگر فقط در هنگام دریافت استرس‌های گوناگون بیان آن‌ها تا حد چندین برابر افزایش می‌یابد. این پروتئین‌ها علاوه بر ایفای نقش در تخریب پپتیدهای درون سیتوپلاسمی (نظیر پپتیدهای خودی، سرطانی یا از منشأ عوامل بیماری‌زا) و آماده‌سازی آن‌ها برای تجزیه توسط پروتئوزوم، نقش مهمی در فرآوری و عرضه‌ی پپتیدهای تجزیه شده به سلول‌های اختصاصی از نوع B یا T دارند (۳۴-۲۷). Zugel و همکاران نشان دادند که gp96های گرفته شده از سلول‌هایی که با باکتری داخل سلولی آلوده شده‌اند، می‌تواند القاکننده‌ی خوبی برای سایتوتوکسیسته‌ی اختصاصی بر علیه آن باکتری باشند و پاسخ محافظت‌کننده‌ای را ایجاد می‌کنند که می‌تواند مبنایی برای تولید واکنش‌های جدید باشد (۳۵). Basu و همکاران نشان دادند که HSP90، HSP70 و HSP96 آزاد شده از سلول‌های نکروتیک موجب بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شوند و بیان مولکول‌های عرضه‌کننده‌ی آنتی‌ژن و مولکول‌های کمک محرک را در آن‌ها افزایش می‌دهند. آن‌ها نشان دادند که هر کدام از HSPها اثر نسبی دارند و به کارگیری توأم آن‌ها باعث تشدید اثر القا شده می‌گردد (۳۶).

در تحقیق حاضر ما نشان دادیم که شوک ناشی از تزریق دوز ۲۵۰ برابر LD<sub>50</sub> کاندیدای زنده منجر به افزایش HSP در سلول‌های طحالی می‌گردد و می‌توان HSPهای طحالی از موش‌های ایمن شده را، پس از تهیه، برای روشن شدن اثرات درمانی یا پیشگیرانه‌ی آن‌ها مورد ارزیابی بیشتر قرار داد.



در این تحقیق روش‌های ELISA، الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریلامید و Western blot برای ردیابی پروتئین‌های HSP سلول‌های طحالی استفاده شد. اگرچه روش ELISA حساسیت بالایی دارد، اما نتایج Western blot اختصاصی‌تر است. از طرفی با وجود هومولوژی بالا بین HSPهای سلولی، آنتی‌بادی واحدی که همه‌ی آن‌ها را مورد شناسایی قرار دهد، وجود ندارد. در این تحقیق با استفاده از هر سه روش، افزایش تراکم باندهای پروتئینی در لیزات سلول‌های طحالی گروه مداخله نشان داده شد. همچنین ماهیت باندهای معادل ۹۰ و ۷۰ کیلودالتون از طریق Western blot اثبات گردید و نتایج ELISA نیز با Western همخوانی داشت.

در این تحقیق از ادجوانت فروند و کاندیدای کشته شده و سپس از دوزهای پایین و غیر کشنده‌ی کاندیدا آلبیکنس زنده به صورت داخل صفاقی برای بالا بردن تحمل موش‌ها استفاده شد و نتیجه‌ی خوبی نیز گرفته شد؛ به طوری که در تزریق بار آخر تعداد  $4 \times 10^6$  واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی کاندیدای زنده از طریق داخل وریدی به موش‌ها تزریق گردید و با وجود این که این تعداد کاندیدا ۲۵۰ برابر دوز کشنده بود با تلفاتی همراه نبود. به صورت هماهنگ با یافته‌های این تحقیق، Mitchell و Hasenclever طی مطالعات خود نشان دادند که تزریق داخل صفاقی کاندیدا آلبیکنس در دوزهای پایین، ۶ روز قبل از تزریق داخل وریدی کاندیدا موجب ایجاد تحمل به عوارض توکسیک ناشی از تزریق بعدی کاندیدا می‌گردد. تزریق ادجوانت فروند یا لیپوپلی‌ساکارید نیز تا حدودی نقش محافظتی داشته است. همچنین، به کار بردن ادجوانت فروند یا لیپوپلی‌ساکارید توأم با عفونت خفیف (Sublethal) کاندیدا اثر محافظتی بیشتری نسبت به تک تک این

عوامل ایجاد کرده است (۱۰).

شمارش کل سلول‌های طحالی در گروه دریافت کننده‌ی کاندیدا آلبیکنس سیستمیک بیش از دو برابر تعداد آن در گروه شاهد بود. قسمت اعظم این افزایش مربوط به سلول‌های منوسیت و لنفوسیت بود. به نظر می‌رسد که تجمع معنی‌دار لنفوسیت‌ها در طحال پس از چندین مرحله‌ی تزریق سیستمیک کاندیدا ناشی از احتباس ساده‌ی این سلول‌ها نیست.

Anderson و همکاران از طریق روش الکتروفورز سلولی با استفاده از پروتئین‌های سطحی نشان دادند که لنفوسیت‌های تجمع یافته در طحال زیر گروه مجزایی از این سلول‌ها را تشکیل می‌دهند و این سلول‌ها از نظر حرکت الکتروفورزی با لنفوسیت‌های موجود در خون و غدد لنفی متفاوت می‌باشند (۳۷). با توجه به این که طحال یک عضو ایمنی است تجمع زیر گروه خاصی از لنفوسیت‌ها در آن به معنی وقوع یک پدیده‌ی ایمنی در جهت مقابله با عفونت ایجاد شده می‌باشد. از نظر ما، لنفوسیت‌های افزایش یافته در طحال در کنار افزایش ماکروفاژهای طحالی به منظور پاسخ‌گویی به عفونت کاندیدایی ایجاد شده، می‌باشد.

ماکروفاژهای ناحیه‌ی مارژینال زون طحال و ماکروفاژهای ناحیه‌ی زیرکپسولی غدد لنفاوی، گیرنده‌های خاصی را برای به دام انداختن کاندیدا بیان می‌کنند. معلوم شده است که مولکول مسؤول اتصال به این گیرنده‌ها، پروتئین مانان موجود در سطح کاندیدا است و بخش کربوهیدراتی (مقاوم به حرارت و هضم آنزیمی) آن مسؤول اتصال به گیرنده می‌باشد. همچنین این مطالعات نشان داد که کاندیدا به هنگام تزریق داخل وریدی بلافاصله در طی دو ساعت از گردش خون محیطی ناپدید شده (CFU منفی

### نتیجه گیری

در صورت مقاوم سازی قبلی حیوان، امکان تزریق سیستمیک دوز بالای کاندیدا آلبیکنس زنده به منظور افزایش پروتئین های شوک حرارتی در سلول های طحال بدون نگرانی از ایجاد ضایعات طحالی ناشی از کاندیدا وجود دارد. این افزایش در انواع مختلفی از HSPs رخ می دهد، اما بارزترین افزایش در مورد HSP70 و بعد از آن در مورد HSP90 مشاهده گردید.

می شود، در مارژینال زون طحال و ناحیه ی زیر کپسولی غدد لنفاوی تجمع می یابد. آزمایش CFU از طحال نیز بعد از دو روز منفی می شود، اما حضور پروتئین مانان حتی پس از ۹۴ روز در طحال نشان داده شده است (۴۰-۳۸، ۸). در تحقیق حاضر نیز آزمایشات اولیه مشخص نمود که کشت طحال در روز سوم بعد از تزریق سیستمیک کاندیدا منفی می گردد و بیشترین مقدار HSP70 در سلول های طحالی در روز هفتم بعد از تزریق مشاهده می شود.

### References

1. Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconcellos TC, Querido SM, Jorge AO, Reis AS, et al. Frequency of *Candida* spp. in the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathologia* 2009; 167(2): 81-7.
2. Maninder J, Usha A. Isolation, characterization and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV positive patients. *J Commun Dis* 2008; 40(3): 177-81.
3. de RL, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4): 729-59, table.
4. Antoniewicz L, Relijc D, Poitschek C, Presterl E, Geusau A. Mucosal *Candida* infection and colonisation as well as associated risk factors in solid organ transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(8): 945-57.
5. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D, Burleson J. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(3): 249-54.
6. Rogers TJ, Balish E. Immunity to *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 1980; 44(4): 660-82.
7. Tiron A, Vasilescu C. [Role of the spleen in immunity. Immunologic consequences of splenectomy]. *Chirurgia (Bucur)* 2008; 103(3): 255-63.
8. Kappe R, Muller J. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *J Clin Microbiol* 1991; 29(8): 1665-9.
9. Rogers T, Balish E. Experimental *Candida albicans* infection in conventional mice and germfree rats. *Infect Immun* 1976; 14(1): 33-8.
10. Hasenclever HF, Mitchell WO. Production of tolerance to the toxicity of *Candida albicans* by nonfungal materials. *J Bacteriol* 1962; 84: 1325-9.
11. Moghimi SM, Hedeman H, Muir IS, Illum L, Davis SS. An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1157(3): 233-40.
12. Kaufmann SH, Schoel B, van Embden JD, Koga T, Wand-Wurttenberger A, Munk ME, et al. Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol Rev* 1991; 121: 67-90.
13. Kligman I, Grifo JA, Witkin SS. Expression of the 60 kDa heat shock protein in peritoneal fluids from women with endometriosis: implications for endometriosis-associated infertility. *Hum Reprod* 1996; 11(12): 2736-8.
14. Jaattela M. Effects of heat shock on cytotoxicity mediated by NK cells, LAK cells, activated monocytes and TNFs alpha and beta. *Scand J Immunol* 1990; 31(2): 175-82.
15. Steinhoff U, Wand-Wurttenberger A, Bremerich A, Kaufmann SH. Mycobacterium leprae renders Schwann cells and mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells. *Infect Immun* 1991; 59(2): 684-8.
16. Steinhoff U, Zugel U, Wand-Wurttenberger A, Hengel H, Rosch R, Munk ME, et al. Prevention of autoimmune lysis by T cells with specificity for a heat shock protein by antisense

- oligonucleotide treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11): 5085-8.
17. Otaka M, Odashima M, Watanabe S. Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(1): 1-5.
  18. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1): 19-39.
  19. Srivastava PK, DeLeo AB, Old LJ. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(10): 3407-11.
  20. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14(3): 303-13.
  21. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 2000; 1(2): 151-5.
  22. Zhang Y, Zan Y, Shan M, Liu C, Shi M, Li W, et al. Effects of heat shock protein gp96 on human dendritic cell maturation and CTL expansion. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344(2): 581-7.
  23. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 1997; 186(8): 1315-22.
  24. Wang XH, Qin Y, Hu MH, Xie Y. Dendritic cells pulsed with gp96-peptide complexes derived from human hepatocellular carcinoma (HCC) induce specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54(10): 971-80.
  25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
  26. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1(2): 97-8.
  27. Cristau B, Schafer PH, Pierce SK. Heat shock enhances antigen processing and accelerates the formation of compact class II alpha beta dimers. *J Immunol* 1994; 152(4): 1546-56.
  28. DeNagel DC, Pierce SK. A case for chaperones in antigen processing. *Immunol Today* 1992; 13(3): 86-9.
  29. Jacquier-Sarlin MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT, Richard MJ, Polla BS. Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia* 1994; 50(11-12): 1031-8.
  30. Melnick J, Argon Y. Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. *Immunol Today* 1995; 16(5): 243-50.
  31. Pierce SK. Molecular chaperones in the processing and presentation of antigen to helper T cells. *Experientia* 1994; 50(11-12): 1026-30.
  32. Polla BS, Mariethoz E. More evidence for a case for chaperones in antigen processing. *Immunol Today* 1992; 13(10): 421-2.
  33. Schirmbeck R, Reimann J. Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur J Immunol* 1994; 24(7): 1478-86.
  34. Vanbuskirk A, Crump BL, Margoliash E, Pierce SK. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *J Exp Med* 1989; 170(6): 1799-809.
  35. Zugel U, Sponaas AM, Neckermann J, Schoel B, Kaufmann SH. gp96-peptide vaccination of mice against intracellular bacteria. *Infect Immun* 2001; 69(6): 4164-7.
  36. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12(11): 1539-46.
  37. Anderson LC, Nordling S, Hayry P. Electrophoretic fractionation of guinea pig lymphocytes: evidence for different subsets of T and B cells in spleen and lymph node. *J Immunol* 1975; 114(4): 1226-9.
  38. Kanbe T, Han Y, Redgrave B, Riesselman MH, Cutler JE. Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue. *Infect Immun* 1993; 61(6): 2578-84.
  39. Kanbe T, Jutila MA, Cutler JE. Evidence that *Candida albicans* binds via a unique adhesion system on phagocytic cells in the marginal zone of the mouse spleen. *Infect Immun* 1992; 60(5): 1972-8.
  40. Cutler JE, Brawner DL, Hazen KC, Jutila MA. Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. *Infect Immun* 1990; 58(6): 1902-8.

## The Effects of Systemic Injection of *Candida Albicans* on Total and Differential Splenocytes Counts and Electrophoretic Profile of the Cell Lysate in BALB/c Mice

Mohammadreza Shokouh Amiri MSc<sup>1</sup>, Mohammad Hossein Yadeghari PhD<sup>2</sup>,  
Zahir Mohammad Hassan PhD<sup>3</sup>

### Abstract

**Background:** Developing a new generation of vaccines based on heat shock protein (HSP) is a new emerging field of medical researches that makes new promises to effective prevention or eradication of infectious diseases and cancers. The current study was designed to evaluate the effects of systemic injection of live *Candida albicans* on counts and compositions of splenocytes. It also surveyed the electrophoretic profile of the cells lysates with special focus on HSP molecules.

**Methods:** A total number of 30 inbred BALB/c mice were purchased. After adaptation to the animal house, they were divided into 2 groups (a test and a control group). Following booster immunizations using the multistep injection protocol, the mice in the test group received a high dose of  $4 \times 10^6$  cells of live *Candida albicans* through the tail vein. All of the mice were killed on day 7, and the splenocytes suspensions were prepared aseptically. Total and differential counting of cells were performed using hematologic staining and microscopic observation. HSP90 contents of the splenocytes were assayed using a standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The cell lysates went under electrophoretic and western blot analysis using HSP70 and HSP90 specific antibodies.

**Findings:** Systemic *Candida* injection to mice led to increased total spleen cells and significant increment of monocyte differential counts. The splenocytes from the test group showed 13 folds increase in HSP70 contents (ELISA,  $P < 0.001$ ). Electrophoretic analysis followed by western blotting of the cells lysates showed 11 and 7.3 folds increments in HSP70 and HSP90 contents, respectively, compared to the controls.

**Conclusion:** Systemic injection of live *Candida albicans* leads to accumulation of the macrophages in the spleen. It also significantly increases the mean HSP70 and HSP90 contents of each splenocyte.

**Keywords:** *Candida albicans*, Electrophoretic profile, Splenocyte, BALB/c mouse

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Mohammad Hossein Yadeghari PhD, Email: yadegarm@modares.ac.ir