مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۹/هفته‌ی اول شهریور ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۷

بررسی تأثیر داروی سیکلوفسفامایدبر میزان بیان ژن TLR2 در موش‌های Balb/c مبتلا به کاندیدیازیس منتشره

حمید مروتی[۱]، سپیده طلوعی[۲]، پروین دهقان[۲]، بهزاد برادران[۳]، امیر محمدی‌فرد[۴]، زهرا یوسفی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Toll like receptor-2 (TLR-2) نقش مهمی در فرایند شناسایی و راه‌اندازی پاسخ ایمنی علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله Candida albicans دارد. داروی سیکلوفسفامایدیکی از پرمصرف‌ترین داروهای شیمی درمانی است که موجب نوتروپنی شدید و سرکوب سیستم ایمنی می‌شود. در این مطالعه، پس از ایجاد بیماری Candidiasis منتشره و همچنین، تزریق سیکلوفسفامایدبه منظور ایجاد نوتروپنی در موش‌های Balb/c، میانگین بیان ژن TLR2 اندازه‌گیری شد.

روش‌ها: ۲۸ سر موش ماده تهیه و به ۴ گروه تقسیم شدند. سیکلوفسفامایدو Candida albicans به موش‌ها تزریق شد. پس از خونگیری از قلب و استخراج RNA و سنتز complementary DNA (cDNA)، بیان ژن TLR2 با روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) سنجیده شد. داده‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ و آزمون Kruskal–Wallis آنالیز شدند.

یافته‌ها: با وجود افزایش میانگین بیان ژن مورد مطالعه در گروه دریافت کننده‌ی Candida albicans و گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامایدبه همراه Candida albicans و از طرفی، کاهش میانگین بیان این ژن در گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفاماید، همچنان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در بیان ژن TLR2 بین گروه شاهد و سایر گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (P = ۰/۴۷۸).

نتیجه‌گیری: میانگین بیان ژن در گروه دریافت کننده‌ی Candida albicans و گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامایدو Candida albicans افزایش یافته و در گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامایدکاهش یافته بود، اما با این وجود، اختلاف معنی‌داری در بیان ژن TLR2 بین گروه شاهد و سایر گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (P = ۰/۴۷۸). با این حال، نتایج این مطالعه می‌تواند در انتخاب TLR2 و یا گیرنده‌ی آن به عنوان هدف درمانی با منوکلونال آنتی‌بادی و یا روش‌های ژن درمانی مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: Candidiasis منتشره، Toll like receptor-2، سیکلوفسفاماید، نوتروپنی، Balb/c

ارجاع: مروتی حمید، طلوعی سپیده، دهقان پروین، برادران بهزاد، محمدی‌فرد امیر، یوسفی زهرا. **بررسی تأثیر داروی سیکلوفسفامایدبر میزان بیان ژن TLR2 در موش‌های Balb/c مبتلا به کاندیدیازیس منتشره.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۹): ۷۷۴-۷۶۹

مقدمه

شایع‌ترین شکل عفونت منتشره‌ی قارچی Candidisis منتشره است. میزان مرگ و میر در اثر این بیماری هنوز هم چشمگیر می‌باشد (۲-۱). میزان مرگ و میر در آمریکا بین ۷۶-۲۹ درصد و به طور متوسط ۴۹ درصد است (۴-۳). متأسفانه، آمار دقیقی از میزان مرگ و میر در ایران در دست نیست، اما شیوع این بیماری در افراد بستری نگران کننده است (۶-۵). سرطان و به دنبال آن نوتروپنی، یکی از اصلی‌ترین عوامل ابتلا به Candidiasis منتشره است (۸-۷). از مهم‌ترین داروهایی که موجب نوتروپنی می‌شوند و در شیمی درمانی سرطان، کاربرد گسترده‌ای دارند، عوامل آلکیله کننده هستند که یکی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴- گروه اپیدمیولوژی وآمار زیستی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: پروین دهقان
Email: dehghan@med.mui.ac.ir

از پرکاربردترین آن‌ها سیکلوفسفامايد (Cyclophosphamide) می‌باشد. این دارو، موارد استفاده‌ی بالینی فراوانی دارد، در In vitro غیر فعال است و برای تبدیل شدن به شکل فعال، باید در کبد به وسیله‌ی آنزیم P_{450} متابولیزه گردد. سیکلوفسفامايد، اثر خود را از طریق انتقال گروه‌های آلکیله کننده به اجزای مختلف سلول اعمال می‌کند. احتمال می‌رود آلکیلاسیون DNA در داخل سلول، اصلی‌ترین بر هم‌کنشی باشد که موجب مرگ سلول می‌شود. این دارو، به صورت خوراکی و تزریقی است و در دوزهای بالا، به صورت وریدی استعمال می‌شود. مهم‌ترین عارضه‌ی حاصل از داروهای آلکیله کننده، تضعیف سیستم ایمنی است و سیکلوفسفامايد، قوی‌ترین عامل سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی است (۱۰-۹).

سیستم ایمنی در مقابله با عفونت‌هایی از نوع Candida، از دو بازوی ذاتی و اکتسابی خود بهره می‌برد (۱۲-۱۱). تشخیص Candida، از طریق الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن (PAMPs یا Pathogen-associated molecular patterns) که توسط الگوهای تشخیصی گیرنده‌ای (PRRs) شناخته می‌شوند، امکان پذیر می‌شود (۱۳-۱۲).

PAMPs، توسط چندین نوع PRR شناسایی می‌شوند که یک گروه از این گیرنده‌ها Toll like receptor (TLR) است (۱۴، ۱۱). TLR2 در شناسایی فسفولیپومانان (Phospholipomannan) و زایموزان (Zymosan) بسیار تخصص یافته است (۱۵، ۱۱). TLR2 با استفاده از مسیر MYD88، عوامل نسخه‌برداری Nuclear factor-kappa B (NF-κB) و AP1 را فعال می‌کند که سیتوکاین‌های التهابی (نظیر IL17 یا Interleukin17، TNF یا Tumor necrosis factor و IL1)، کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبان اندوتلیال (برای فراخوانی بیگانه‌خوارها) را بیان می‌کنند (۱۷-۱۶). همچنین، TLR2 به طور اختصاصی از طریق اعمال تغییرات در بیان ژن‌های IL10 و Regulatory T cells (Treg) در مقابله با پاسخ ایمنی علیه عفونت Candidiasis ایفای نقش می‌کند (۱۸). امروزه، استفاده از آگونیست‌های TLRها به عنوان ادجوانت در درمان سرطان و بیماری‌های عفونی از جمله بیماری‌های قارچی، رایج است (۲۰-۱۹). از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی قابلیت TLR2 و یا گیرنده‌ی آن، به عنوان گزینه‌ی درمانی مناسب در افراد نوتروپنی و مبتلا به Candidiasis منتشره انجام شد.

روش‌ها

موش: ۲۸ سر موش ماده‌ی Balb/c، ۱۲-۸ هفته‌ای به وزن تقریبی ۲۵ گرم از انستیتو پاستور کرج تهیه گردیدند. موش‌ها تا حد امکان در شرایط مناسب در لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی پزشکی نگهداری شدند و فرایند کار با حیوانات، مطابق با استانداردهای اخلاق حرفه‌ای کار با حیوانات انجام گرفت. موش‌ها به ۴ گروه ۷تایی به صورت تصادفی تقسیم شدند. گروه ۱، به عنوان شاهد هیچ گونه تزریقی نداشت. گروه ۲، برای مدل‌سازی بیماری Candidiasis منتشره، تنها عامل Candida albicans دریافت نمود. گروه ۳، برای مدل‌سازی بیمار نوتروپنی، تنها داروی سیکلوفسفامايد دریافت کرد. گروه ۴ نیز برای مدل‌سازی بیمار نوتروپنی مبتلا به Candidiasis منتشره، هر دو عامل عفونی و نوتروپنی را دریافت کردند.

Candida albicans: سوش استفاده شده در این مطالعه، از بیمار مبتلا به Candidiasis منتشره، جدا و در Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (۴۸ ساعت، ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) کشت داده شده بود و به روش اسپکتروفتومتری به تعداد لازم برای تزریق ($۱۰^۶$ × ۱ در ۰/۵ میلی‌لیتر سالین) تهیه شدند (روش تزریق درون صفاقی و حجم تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر بود).

سیکلوفسفامايد: برای ایجاد نوتروپنی، یک ویال داروی سیکلوفسفامايد (Sigma, St. Louis) تهیه شد و به صورت درون صفاقی و به مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفت.

تزریقات و جمع‌آوری نمونه‌ها: همه‌ی تزریقات درون صفاقی انجام شد. در گروه شاهد، بدون هیچ تزریقی، تنها از قلب موش‌ها خون‌گیری شد. در گروه ۲، ۴۸ ساعت پس از تزریق دوز عفونی Candida و در گروه ۳، ۷۲ ساعت پس از تزریق سیکلوفسفامايد، از قلب موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و در گروه ۴، ۷۲ ساعت پس از تزریق سیکلوفسفامايد، Candida تزریق گردید و ۴۸ ساعت بعد، اقدام به خون‌گیری شد. خون‌گیری، با سرنگ آغشته به ماده‌ی ضد انعقاد Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) انجام گرفت و نمونه‌ها در میکروتیوب‌های حاوی EDTA ریخته شدند و پس از سانتریفیوژ (۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) از ته نشست به دست آمده، استخراج RNA انجام شد. در تمام این مدت (۳۰ دقیقه)، نمونه‌ها روی یخ نگهداری شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real-time PCR: با استفاده از کیت استخراج RNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و دستورالعمل سازنده‌ی آن، ۳۰ میکرولیتر RNA از ته‌نشست سلول‌های خونی سانتریفیوژ شده استخراج گردید و نمونه‌های RNA در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شدند.

DNA complementary (cDNA) با استفاده از Random Hexamer و آنزیم RT و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo scientific) سنتز و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای

جدول ۱. توالی رفت و برگشت پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

ژن	توالی برگشت	توالی رفت
TLR2	AGAAGCATCACATGACAGAGACTC	CAGACAAAGCGTCAAATCTCAG
B2m	CACATGTCTCGATCCCAGTAG	GGAAGCCGAACATACTGAAC

TLR2: Toll like receptor2

GeneRunner و AlleleID 7 طراحی و توسط شرکت Bioneer کره‌ی جنوبی سنتز شدند. در این مطالعه، از ژن بتادومیکروگلوبولین (B2m) به عنوان ژن رفرنس استفاده شد (۲۱). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

سنجش بیان ژن به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) با استفاده از دستگاه ABI step one plus و کیت Amplicon sybergreen (Denmark) طبق دستورالعمل انجام شد. cDNA به نسبت ۱:۲ رقیق شده بود. هر کدام از نمونه‌ها به صورت سه بار تکرار بودند و حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. شرایط دمایی و زمانی Real-time PCR برای تکثیر ژن‌های مورد نظر، با اقتباس از مطالعات قبلی (۲۱) در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. شرایط اتخاذ شده در Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

واکنش (Reaction)	زمان	دما
مرحله‌ی ۱	۵ دقیقه	۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد
مرحله‌ی ۲	۱۵ ثانیه	۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد
	۳۰ ثانیه	۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

بیان ژن TLR2 به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ در برابر ژن B2m مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده، با استفاده از آزمون Kruskal–Wallis و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مقایسه و واکاوی شدند. در این مطالعه، $P < ۰/۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از سنجش بیان ژن TLR2 در گروه‌های مورد مطالعه، مقادیر ΔCT هر کدام از نمونه‌ها محاسبه گردید (جدول ۳). همچنین، میانگین ΔCT و میزان خطای استاندارد نیز محاسبه شدند. نتایج به دست آمده، حاکی از آن بود که با وجود افزایش میانگین بیان ژن مورد مطالعه در گروه دریافت کننده‌ی Candida albicans و گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفاماید به همراه Candida albicans و از طرفی، کاهش میانگین بیان این ژن در گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفاماید، همچنان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در بیان ژن TLR2 بین گروه شاهد و سایر گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($P = ۰/۴۷۸$).

جدول ۳. مقایسه‌ی میانگین بیان نسبی Messenger RNA (mRNA) ژن Toll like receptor2 (TLR2) در ۴ گروه مورد مطالعه

گروه	تعداد موش	میانگین نسبی بیان mRNA ژن TLR2	مقدار P
۱	۷	۱/۰۰ ± ۱/۳۲	۰/۴۷۸
۲	۷	۱/۲۳ ± ۰/۶۲	۰/۴۷۸
۳	۷	۰/۸۳ ± ۰/۶۸	۰/۴۷۸
۴	۷	۲/۰۰ ± ۱/۳۹	۰/۴۷۸

mRNA: Messenger RNA; TLR2: Toll like receptor2
گروه ۱: موش‌های گروه شاهد، گروه ۲: موش‌های دریافت کننده‌ی Candida، گروه ۳: موش‌های دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامید، گروه ۴: موش‌های دریافت کننده‌ی Candida و سیکلوفسفامید

بحث

هدف از انجام این مطالعه، مدل‌سازی بیماری Candidiasis منتشره در بیماران نوتروپنی و تعیین نقش ژن TLR2 در سیر عفونت و حتی مرگ و میر در چنین بیمارانی بود. با توجه به محدودیت‌های اخلاقی و نیز سختی روند مطالعه بر روی انسان، مدل‌سازی بر روی موش Balb/c انجام شد. با مقایسه‌ی آمار و ارقام جدول ۱، متوجه می‌شویم که با افزایش ΔCT نمونه‌های مورد آزمایش، میزان بیان ژن در نهایت کم می‌شود؛ به طوری که در گروه ۳ که تنها داروی سیکلوفسفاماید را دریافت کرده بودند، بیشترین مقدار میانگین ΔCT مشاهده شد. بنا بر این، میزان بیان ژن که طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به دست می‌آید، کمترین مقدار را دارد. با توجه به این که بارزترین اثر جانبی سیکلوفسفاماید سرکوب سیستم ایمنی است (۲۲)، این نتیجه که بیان ژن TLR2 در موش دریافت کننده‌ی سیکلوفسفاماید کاهش پیدا کرده است، منطقی به نظر می‌رسد؛ چرا که سیکلوفسفاماید در جهت کاهش شدید سلول‌های خونی به خصوص فاگوسیت‌ها (ماکروفاژ و نوتروفیل) عمل می‌کند (۲۲).

این در حالی است که در گروه ۴، وضعیت به طور کامل برعکس است؛ گروه ۴ هم عامل عفونی و هم عامل نوتروپنی را دریافت کرده بودند. میانگین ΔCT نمونه‌های این گروه کمترین مقدار را داشته و بیان ژن TLR2 در آن، دو برابر گروه شاهد است. داروی سیکلوفسفاماید، بیان ژن TLR2 را پایین می‌آورد و موش‌های آزمایش شده در این گروه، در ۷۲ ساعت اول سیکلوفسفاماید دریافت کرده بودند و Candida albicans که بعد از ۷۲ ساعت تزریق

می‌شد، بیان ژن TLR2 را بالا برد. با توجه به این که سیکلوفسفامايد سیستم ایمنی موش را سرکوب می‌کند و سیر بیماری Candidiasis منتشره را گسترده‌تر می‌کند، عفونت در مدت زمان کوتاه‌تری خود را بروز می‌دهد و بنا بر این، منطقی به نظر می‌رسد که تأثیر Candida albicans در جهت افزایش بیان ژن TLR2 بیش‌تر از تأثیر سیکلوفسفامايد در جهت کاهش بیان این ژن باشد.

Blasi و همکاران با بررسی اثرات بیولوژیک TLR2 و TLR4 در ماکروفاژهای مغزاستخوان موش آلوده به Candidiasis منتشره دریافتند که بیان ژن TLR2 بیشتر از TLR4 است. با توجه به این که در این مطالعه از سیکلوفسفامايد استفاده نشده بود، با مطالعه‌ی حاضر همخوانی ندارد، اما نتایج آن مانند مطالعه‌ی حاضر، اهمیت TLR2 را در عفونت Candidiasis منتشره نشان می‌دهد (۲۳). در مطالعه‌ی Villamon و همکاران، اهمیت TLR2 در موش مبتلا به Candidiasis منتشره و دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامايد با سنجش بیان ژن MIP-2 و TNF-α در موش فاقد TLR2 و شاهد بررسی و مشاهده شد که بیان ژن‌های MIP-2 و TNF-α در موش فاقد TLR2، کاهش فاحشی دارد که نشان دهنده‌ی اهمیت TLR2 در تحریک سیستم ایمنی و مقابله با ایمنی تعدیلی است که با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد (۲۴).

Netea و همکاران، به مطالعه‌ی اثر TLR2 در بیان ژن IL10 و Treg در موش مبتلا به Candidiasis منتشره پرداختند و دریافتند که میزان بیان این ژن‌ها پس از ابتلا به بیماری، افزایش معنی‌داری داشت که با نتایج به دست آمده در این مطالعه، تفاوت چندانی ندارد (۱۸). با این حال، مطالعه‌ای که در آن بیان ژن TLR2 در سلول‌های خونی موش نوتروپنیک و مبتلا به Candida albicans مورد سنجش قرار گیرد، یافت نشد.

با توجه به این که در مراحل پیشرفته‌ی شیمی درمانی، میزان مرگ و میر در بیماران تحت درمان و مبتلا به کاندیدمی بالا می‌باشد، این سؤال مطرح می‌شود که «آیا ممکن است این میزان بالای مرگ و میر، ناشی از نقص یا عدم عملکرد صحیح سیستم ایمنی ذاتی باشد؟». به همین جهت، TLR2 که یکی از شاخص های فعالیت سیستم ایمنی ذاتی در برابر Candida است، می تواند به عنوان یکی از گزینه های درمانی با آنتی بادی منوکلونال و یا ژن درمانی در چنین بیمارانی مورد هدف قرار گیرد. نتایج حاصل از این مطالعه، می تواند در مطالعات انسانی و همچنین، در یافتن اهدافی مناسب در چنین بیمارانی مورد مطالعه و بررسی بیشتری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر، برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد حمید مروتی به شماره‌ی طرح تحقیقاتی ۳۹۴۲۵۲ مصوب در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

References

1. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 74(4): 323-31.
2. Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol 2014; 31(1): 42-8.
3. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 73(1): 45-8.
4. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. Int J Antimicrob Agents 2014; 43(1): 78-81.
5. Louie A, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(12): 5058-68.
6. Moser SA, Domer JE. Effects of cyclophosphamide on murine candidiasis. Infect Immun 1980; 27(2): 376-86.
7. Deshpande A, Gaur S, Bal AM. Candidaemia in the non-neutropenic patient: a critique of the guidelines. Int J Antimicrob Agents 2013; 42(4): 294-300.
8. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Ther Clin Risk Manag 2014; 10: 95-105.
9. Colvin M, Hilton J. Pharmacology of cyclophosphamide and metabolites. Cancer Treat Rep 1981; 65 Suppl 3: 89-95.
10. Zhang J, Tian Q, Zhou SF. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. Curr Drug ther 2006; 1(1): 55-84.
11. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Cellular and Molecular immunology. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011.
12. Reales-Calderon JA, Sylvester M, Strijbis K, Jensen ON, Nombela C, Molero G, et al. Candida albicans induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. J Proteomics 2013; 91: 106-35.
13. Quintin J, Saeed S, Martens JH, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. Candida albicans infection affords protection against

reinfection via functional reprogramming of monocytes. Cell Host Microbe 2012; 12(2): 223-32.
14. Romani L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol 2011; 11(4): 275-88.
15. Moresco EM, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. Curr Biol 2011; 21(13): R488-R493.
16. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. J Immunol 2004; 172(5): 3059-69.
17. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun 2009; 388(4): 621625.
18. Netea MG, Sutmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, van der Meer JW, van Krieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells. J Immunol 2004; 172(6): 3712-8.
19. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. Vaccine 2011; 29(17): 3341-55.
20. Ferwerda G, Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Romani L, Kullberg BJ. The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against Candida albicans. Vaccine 2010; 28(3): 614-22.
21. Lawlor H, Meunier A, McDermott N, Lynch TH, Marignol L. Identification of suitable endogenous controls for gene and miRNA expression studies in irradiated prostate cancer cells. Tumour Biol 2015; 36(8): 6019-28.
22. Katzung B, Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology. 13th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2014.
23. Blasi E, Mucci A, Neglia R, Pezzini F, Colombari B, Radzioch D, et al. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with Candida albicans. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 44(1): 69-79.
24. Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against Candida albicans infections. Microbes Infect 2004; 6(1): 1-7.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 389, 1st Week, September 2016

Received: 02.05.2016

Accepted: 28.07.2016

The Effect of Cyclophosphamide on TLR2 Gene Expression in Balb/c Mice with Systemic Candidiasis

Hamid Morovati[1], Sepideh Tolouei[2], Parvin Dehghan[2], Behzad Baradaran[3], Amir Mohammadifard[4], Zahra Yousefi[5]

Original Article

Abstract

Background: Toll like receptor-2 (TLR2) plays an important role in the process of detection and launching the immune response against Candida albicans. Cyclophosphamide is one of the most widely used chemotherapy drugs, which causes severe neutropenia and suppression of the immune system. In this study Balb/c mice were infected to disseminated candidiasis and neutropenia and expression of TLR2 gene was measured in whole blood samples of each mice.

Methods: Twenty-eight mice were divided into 4 groups and injected with Cyclophosphamide and C. albicans. Blood samples were used for RNA extraction and cDNA synthesis, and expression of TLR2 gene was measured by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Findings: Gene expression was increased in the group receiving Candida albicans and also in group receiving both Cyclophosphamide and Candida albicans but decreased in the group just receiving Cyclophosphamide.

Conclusion: There was no significant difference between the control group and experimental groups for TLR2 gene expression (P = 0.478). However, the results of this study can be regarding in selecting TLR2 or its receptor as a therapeutic target with monoclonal antibodies or gene therapy techniques.

Keywords: Systemic candidiasis, Toll like receptor-2(TLR2), Cyclophosphamide, Neotropenia, Balb/c

Citation: Morovati H, Tolouei S, Dehghan P, Baradaran B, Mohammadifard A, Yousefi Z. **The Effect of Cyclophosphamide on TLR2 Gene Expression in Balb/c Mice with Systemic Candidiasis.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(389): 769-74.

1- MSc Student, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Medical Immunology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Parvin Dehghan, Email: dehghan@med.mui.ac.ir