Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

تأثیرات داروهای ضد قارچ آزول بر پاسخ سیتوکینی سلول‌های کراتینوسیت انسانی

دکتر کامیار زمردیان*
بیتا ترازوئی**
دکتر فرشید سعادت***
حسین خدادادی****

*دکترای قارچ شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی
**دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی
***دکترای ایمونولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی و انگل‌شناسی
****کارشناس ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی

تاریخ وصول:۱۳۸٦/۱۲/۱
تاریخ پذیرش:۱۳۸۷/٤/۲٦

مؤلف مسئول:دکتر کامیار زمردیان
پست الکترونیک: zomorodian@sums.ac.ir

چکیده :

مقدمه و هدف: امروزه ترکیبات آزول به صورت موفقیت‌آمیزی در درمان عفونت‌های قارچی به کار می‌روند. اخیراً نقش برخی از ترکیبات آزول در القا یا سرکوب پاسخ‌های سیستم ایمنی مشاهده شده است. کراتینوسیت‌ها به عنوان یکی از فراوان‌ترین سلول‌های پوست، نقش مؤثری در پاسخ ایمنی ذاتی علیه عوامل پاتوژن ایفا می‌نمایند. نظر به فقدان مطالعه جامع در خصوص تأثیر آزول‌ها بر پاسخ‌های ایمنی، هدف از این مطالعه تعیین تأثیر این ترکیبات بر تولید سیتوکین‌های التهابی از کراتینوسیت‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت یک مطالعه تجربی در واحد بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران و بخش ایمونودرماتولوژی دانشگاه وین در سال ۱۳۸۵ انجام گرفته است. سلول‌های اولیه کراتینوسیت کشت داده شده و با غلظت‌های مختلف کتوکونازول، ایتراکونازول، فلوکونازول و گریزئوفولوین تیمار شدند. سپس میزان اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶ و تومورنکروتیک فاکتور آلفا ترشح شده در محیط کشت به وسیله تکنیک آنزیم ایمونواسی کمی و میزان بیان ژن‌های کدکننده اینترلوکین‌های ۱ و۸ با روش سینتیکی واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز سنجیده شد. داده‌های به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی زوج تحلیل شدند.

یافته‌ها: تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف فلوکونازول و غلظت پایین کتوکونازول باعث کاهش معنی‌دار ترشح اینترلوکین ۱ گردید، اما ایتراکونازول و گریزئوفولوین در غلظت‌های مشابه چنین تأثیری را از خود نشان ندادند. همچنین غلظت‌های مختلف ترکیبات مذکور در ترشح تومورنکروتیک فاکتور آلفا و اینترلوکین ۶ تأثیری نداشت. بررسی کمی بیان ژن کد کننده اینترلوکین‌های ۱ و ۸ نشان داد که نسخه‌برداری از ژن‌های مذکور به دنبال تیمار سلول‌ها با فلوکونازول و کتوکونازول کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: ترکیبات ضد قارچ آزول ممکن است با سازوکارهای مختلف موجب تعدیل بیان و ترشح اینترلوکین‌های ۱ و ۸ شده و بدین ترتیب اثرات خود را در جهت‌دهی پاسخ‌های ایمنی به وسیله سلول‌های کراتینوسیت اعمال نمایند.

واژه‌های کلیدی: سیتوکین‌های التهابی، کتوکونازول، فلوکونازول، ایتراکونازول

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

مقدمه

آزول‌ها بزرگترین خانواده داروهای ضد قارچی بوده که با ممانعت از متیلاسیون لانسترول موجب اختلال در سنتز ارگوسترول می‌شوند(۱). تأثیر بالینی مناسب و بی‌خطر بودن این داروها در درمان عفونت‌های سطحی و منتشره قارچی، موجب مصرف روز افزون آنها در سرتاسر جهان شده است(۲ و ۱).

اثرات درمانی مثبت کتوکونازول خوراکی در درمان ضایعات اگزمایی سر و گردن اولین بار در سال ۱۹۸۳ به وسیله کلمنسن[1] گزارش شد(۳). گرچه در بررسی‌های بعدی کارایی و تأثیر مثبت استفاده از سایر ترکیبات آزول نظیر ایتراکونازول در درمان درماتیت سبورئیک و آتوپیک نشان داده شد(۵ و ۴)، اما مکانیسم دقیق عملکرد این ترکیبات کاملاً مشخص نگردید. در این رابطه دو نظریه متفاوت وجود دارد؛ برخی از محققین معتقدند که با توجه به اهمیت مخمرهای مالاسزیا در پاتوژنز بیماری‌های درماتیت سبورئیک و آتوپیک، داروهای آزول به صورت مستقیم با کشتن مخمرهای مالاسزیا در بهبودی ضایعات مذکور مؤثر می‌باشند(۷ و ۶). این دسته از محققین گزارش نموده‌اند که تیتر آنتی‌بادی‌های ضد مالاسزیا در مبتلایان به درماتیت سبورئیک و آتوپیک بیشتر از افراد سالم بوده(۹ و ۸) و احتمالاً حساسیت تماسی و ازدیاد حساسیت فوری به آنتی‌ژن‌های مالاسزیا مکانیسم احتمالی ایجاد ضایعات پوستی درماتیت سبورئیک به وسیله این مخمرها می‌باشد(۱۱ و ۱۰). این در حالی است که سایر محققین افزایش مخمرهای مالاسزیا در مبتلایان به درماتیت سبورئیک و آتوپیک را ثانویه به بیماری زمینه‌ای درماتیت دانسته و در بررسی‌های آنها تفاوت معنی‌داری در تیتر آنتی‌بادی‌های ضد مالاسزیا بین افراد سالم و مبتلایان به درماتیت سبورئیک مشاهده نشده است (۱۳ و ۱۲). با توجه به تأثیرات ضد التهابی برخی از این ترکیبات نظیر کتوکونازول که به صورت بالینی و آزمایشگاهی به اثبات رسیده (۱۵ و۱۴)، این دسته از محققین معتقدند که تأثیر ترکیبات آزول در بهبودی علایم بالینی درماتیت‌ها به صورت غیر مستقیم ناشی از خصوصیت مهارکنندگی پاسخ‌های التهابی به وسیله آنها می‌باشد(۱۵).

سلول‌های کراتینوسیت به عنوان سلول‌های اصلی اپیدرم علاوه بر نقش مهم ساختاری در ایجاد سد فیزیکی علیه میکروارگانیسم‌ها، دارای عملکرد مهمی در ایجاد واکنش‌های ایمونولوژیک جلدی می‌باشند. این سلول‌ها قادر به ترشح سیتوکین‌هایی نظیر؛ اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶ و تومورنکروتیک فاکتور آلفا در مواجهه با میکروارگانیسم‌ها می‌باشند(۱۶). از آنجایی که تا کنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه تأثیر داروهای ضد قارچ آزول شامل؛ فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازول بر تولید سیتوکین‌های التهابی در سلول‌های کراتینوسیت انسانی صورت نگرفته، این مطالعه با هدف تعیین

1-Clemensen

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

نقش آزول‌ها در پاسخ ایمنی کراتینوسیت‌ها انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت یک مطالعه تجربی در واحد بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران و بخش ایمونودرماتولوژی دانشگاه وین در سال ۱۳۸۵ انجام گرفته است. سلول‌های اولیه کراتینوسیت انسانی تهیه شده از کمپانی کلونتیکس[۱] در بطری‌های کشت سلولی حاوی محیط پایه کراتینوسیت[۲] با موفقیت کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری گردیدند. بعد از پاساژ دوم تا چهارم به پلیت‌های ۶ خانه‌ای جهت بررسی پروتئین‌ها و ۱۲ خانه‌ای جهت جداسازی آر ان آ[۳] منتقل شده و بعد از رسیدن به سطح پوشش[۴] حدود ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیبات آزول و گریزئوفولوین جهت بررسی میزان بیان ژن (میزان نسخه برداری ـ ام آر ان آ[۵]) به مدت ۶ ساعت (۱۸ و ۱۷) و جهت بررسی پروتئین تولید شده (اینترلوکین) به مدت ۲۴ ساعت (۱۹ و ۱۸) تیمار شدند. برای بررسی تأثیر مداخله، از گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده و فاقد دارو) و جهت حذف تأثیر حلال مورد استفاده، از کنترل حلال با اضافه نمودن حجم برابر حداکثر میزان حلال اضافه شده، اتانل جهت کتوکونازول و گریزئوفولوین و دی‌متیل‌سولفوکساید به عنوان حلال ایتراکونارول استفاده شد. با توجه به این که فلوکونازول در آب محلول می‌باشد، کنترل فلوکونازول تنها حاوی محیط کشت و فاقد هر گونه دارو یا حلال بود. در تمامی موارد قبل از استخراج آر ان آ یا سنجش پروتئین، سلول‌ها به وسیله استریومیکروسکوپ بررسی شده و نسبت به سلول‌های چاهک‌های کنترل مقایسه می‌شدند. در هیچ یک از آزمایش‌ها، مرگ سلول‌ها (سیتوتوکسیسیتی) در غلظت‌های مورد استفاده داروها یا حلال‌ها مشاهده نشد. لازم به ذکر است که تمامی‌آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام گرفت.

سلول‌های تیمار شده و کنترل، بعد از ۶ ساعت جهت بررسی آر ان آ جمع‌آوری شدند. بدین منظور بعد از خارج نمودن محیط کشت از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای، سلول‌ها را به وسیله بافر فسفات سالین شسته و آنها را با اضافه نمودن یک میلی‌لیتر محلول تریزول لیز نموده و به تیوپ‌های اپندورف منتقل گردید. تیوپ‌های اپندورف را تا زمان استخراج آر ان آ در دمای ۲۰ـــ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محیط کشت رویی پلیت‌های ۶ خانه‌ای که حاوی پروتئین‌های ترشحی سلول می‌باشند بعد از ۲۴ ساعت جهت بررسی پروتئینی جمع‌آوری شدند. همچنین لیزات سلول‌ها تیمار شده و کنترل جهت مواردی که غلظت پروتئین‌های ترشحی کمتر از محدوده قابل سنجش به وسیله کیت باشد جمع‌آوری گردید. بدین

1-Clonetics
2-KC Basal Medium (KBM)
3-RNA
4-Confluency
5-mRNA

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

منظور بعد از خارج ساختن محیط کشت رویی و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات سالین ، با اضافه نمودن بافر لیز به چاهک‌ها، پروتئین‌های درون سلولی آزاد گردید و لیزات مذکور در در دمای ۲۰ــ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میزان اینترلوکین‌های ۱، ۶ و تومورنکروتیک فاکتور آلفا ترشح شده به وسیله سلول‌های کراتینوسیت در محیط کشت و در صورت لزوم میزان پروتئین‌های مذکور در درون سلول به وسیله تکنیک کمی ساندویچ آنزیم ایمونواسی[۱] و با استفاده از کیت کوانتیکین[۲] سنجیده شد. نمونه‌ها و استانداردها به چاهک‌های پوشیده شده به وسیله آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی علیه سیتوکین مورد نظر اضافه شدند. در صورت وجود سایتوکین در نمونه‌ها، این سایتوکین به آنتی‌بادی‌های متصل به چاهک باند می‌گردد. در مرحله بعد با شستشوی چاهک‌ها مواد اضافی و غیر متصل حذف شده و آنتی‌بادی پلی کلونال متصل به آنزیم پراکسیداز علیه سیتوکین به چاهک‌ها اضافه گشت. سپس کمپلکس‌های آنتی‌بادی ــ آنزیم غیر متصل با شستشوی مجدد حذف شده و با اضافه نمودن سوبسترا حاوی ماده کروموژن تترامتیل بنزیدین و پراکسید هیدروژن به چاهک‌ها، واکنش رنگی به وسیله دستگاه الیزا ریدر (مدل اپ سیستم)[۳] در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. میزان سیتوکین‌های ترشح شده به وسیله مقایسه میزان رنگ تولید شده در واکنش شیمیایی (نمونه) با میزان رنگ تولید شده در غلظت‌های مشخص سیتوکین مورد بررسی(استاندارد) تعیین شد. در این بررسی با توجه به این که غلظت سیتوکین‌های ترشحی اینترلوکین ۶ و تومورنکروتیک فاکتور آلفا در محیط کشت کمتر از مقدار قابل اندازه‌گیری بود، از لیزات سلول‌ها جهت سنجش پروتئین‌های مذکور استفاده شد. بدین منظور بعد از خارج ساختن محیط کشت رویی، سلول‌ها را با بافر فسفات سالین شستشو داده و سپس با افزودن بافر لیز به چاهک‌ها، پروتئین‌های درون سلولی آزاد گردید. سپس میزان پروتئین‌های مذکور به وسیله روش الیزا مورد سنجش قرار گرفت.

سلول‌های کراتینوسیت به وسیله اضافه نمودن محلول تریزول لیز شدند و آر ان آ آزاد شده با اضافه نمودن کلروفرم استخراج گردید و در ادامه به وسیله الکل ایزوپروپانل و اتانل و سرما رسوب داده شد. رسوب آر ان آ در آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر حل شد و در ۸۰ـ درجه سانتی‌گراد تا مرحله ساخت دی ان آ مکمل[۴] نگهداری گردید.

در مرحله بعد، از آر ان آ استخراج شده به عنوان الگو جهت ساخت دی ان‌آ مکمل به وسیله آنزیم ترانس کریپتاز معکوس[۵] استفاده شد و سی دی ان آ با استفاده از کیت ژن آمپ آر ان ای[۶] تهیه شد.

میزان بیان ژن کد کننده اینترلوکین‌ها با استفاده از روش ریل تیم پی سی ار[۷] مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور به وسیله دستگاه

1-Quantitative Enzyme Immunoassay
2-Quantikine(R&D systems Inc., USA)
3-ELISA reader (OpSys MR – Dyner technologies)
4-Complementary DNA (cDNA)
5-Reverse Transcriptase
6-Gene Amp RNA (Applied Biosystems, Foster City, CA)
7-Real Time-PCR

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

لایت سایکلر[۱] و با استفاده از برنامه استاندارد (۱۰ دقیقه مرحله جدا شدن دو رشته، ۵۵ سیکل شامل ۵ ثانیه ۹۵ درجه سانتی گراد، ۵ ثانیه ۶۵ درجه سانتی گراد و ۱۵ ثانیه ۷۵ درجه سانتی‌گراد، آنالیز نقطه ذوب با ۰/۱ درجه سانتی گراد و مرحله خنک نمودن نهایی) میزان نسخه‌برداری از آر ان آ سنجیده شد.

هر ویال شیشه‌ای موئینه به وسیله ۱/۵ میکرولیتر از ماسترمیکس سایبرگرین، ۱/۸ میکرولیتر کلریدمنیزیم (۲۵ میلی مولار)، ۱۰/۱ آب مقطر و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر پر شد و در انتها به آن ۱/۵ میکرولیتر از سی دی ان آ اضافه شد. سنجش نیمه کمی‌ژن هدف به وسیله مدل ریاضی توصیف شده به وسیله فافل صورت گرفت (۲۰). در تمامی آزمایش‌های میزان بیان ژن هدف نسبت به بیان ژن ۵ آمینولولینیک اسید سنتتاز[۲] به عنوان ژن دارای بیان ثابت[۳] و با استفاده از پرایمرهای alas_r (5'-accctccaacacaaccaaag-3') و alas_f(5'-ccactggaagagctgtgtga-3') به وسیله ریل تیم پی سی ار سنجیده و به صورت نیمه کمی محاسبه گردید. برای ارزیابی کمی‌بیان ژن از سخت‌افزار لایت سایکلر [۴] و نرم افزار مربوطه [۵] استفاده شد. بیان ژن‌های مورد بررسی به وسیله پرایمرهای طراحی شده با نرم افزار PRIMER3 [۶] مورد سنجش قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده به شکلی انتخاب شدند که حداقل یک یا دو اینترون بزرگ را در توالی ژنومی در بر گیرند و با این کار از تکثیر همزمان دی ان آ ژنومی با سی دی ان آ جلوگیری گردد. از پرایمرهای IL1a-1406f(ATCAGTACCTCACGGCTGCT) و IL1a-1594r (TGGGTATCTCAGGCATCTCC) جهت سنجش بیان اینترلوکین ۱ و پرایمرهای IL8-126f (CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT) و IL8-212r (TATGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA جهت سنجش بیان اینترلوکین ۸ استفاده شد. بررسی اختصاصیت پرایمرها به وسیله آنالیز درجه ذوب، الکتروفورز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز محصولات بر روی ژل و همچنین تعیین توالی صورت گرفت.

تأثیر تیمار سلول‌های کراتینوسیت با ترکیبات آزول بر بیان سیتوکین‌ها در سلول‌های کراتینوسیت به وسیله آزمون آماری تی زوجی[۷] و نرم افزار SPSS [۸]با فاصله اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید.

یافته‌ها

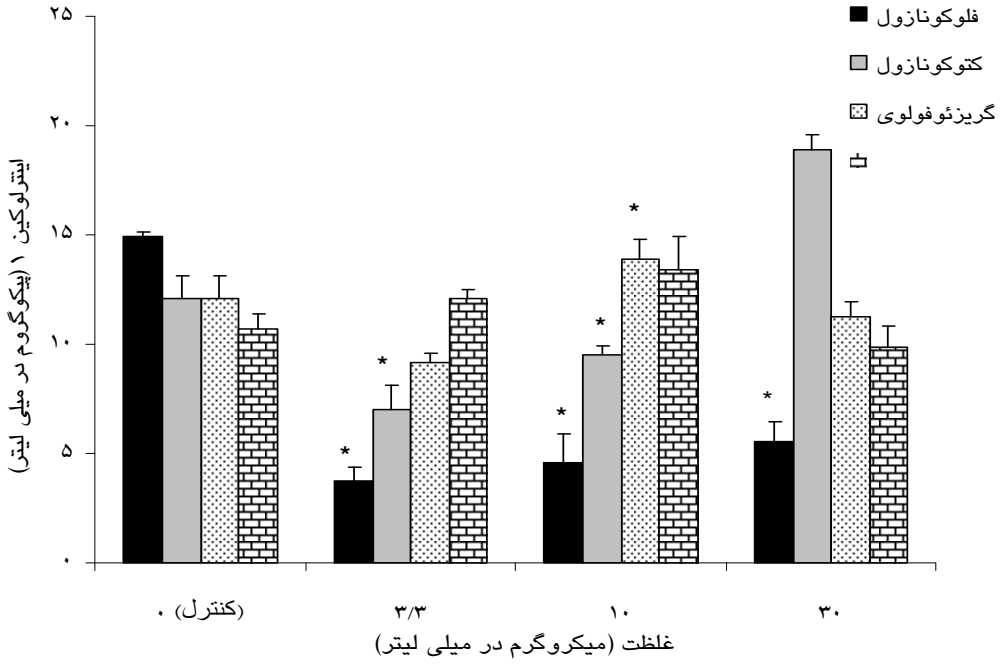
میزان اینترلوکین ۱ ترشح شده به وسیله سلول‌های کراتینوسیت به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف فلوکونازول، ایتراکونازول و گریزئوفولوین در نمودار ۱ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، فلوکونازول باعث کاهش معنی‌دار ترشح اینترلوکین ۱ می‌گردد، اما ایترکونازول و گریزئوفولوین در غلظت‌های مشابه چنین تأثیری را از خود نشان نداند. کتوکونازول نیز در غلظت پایین

1-Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals)
2-5-Aminolevulinic Acid Synthase
3-House keeping Gene
4-Light Cycler II, Rouch
5-Light Cycler Software , Version 3-Idaho Tech. Inc. 1999
6-Primer3 Sofrware
7-Paired Sample T-Test
8-Statistical Package for Social Sciences

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

باعث کاهش میزان ترشح اینترلوکین ۱ شد، در حالی که تیمار سلول‌های کراتینوسیت با غلظت ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم موجب القا سنتز اینترلوکین ۱ گردید. همچنین در بررسی میزان ترشح تومورنکروتیک فاکتور آلفا و اینترلوکین ۶ از سلول‌های کراتینوسیت به دنبال تیمار با غلظت‌های مختلف فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازول مشاهده شد که میزان ترشح این سیتوکین‌ها بسیار پایین بوده و هیچ گونه تغییر معنی‌داری در میزان ترشح آنها به دنبال تیمار با ترکیبات آزول مشاهده نشد.

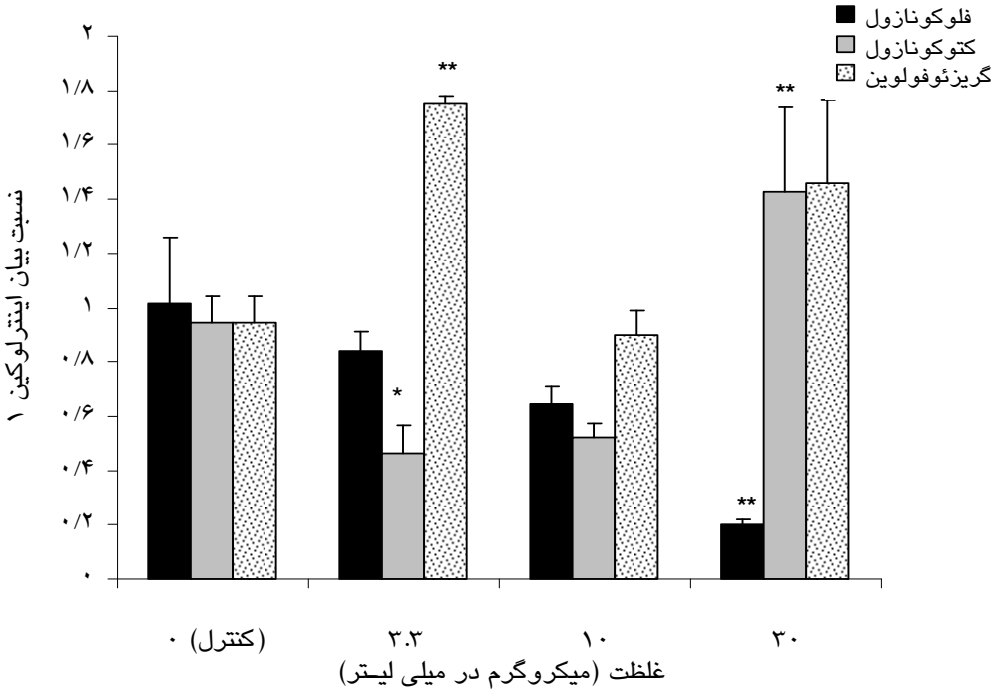
بررسی کمی بیان ژن اینترلوکین‌های ۱ و ۸ در نمودارهای ۲ و ۳ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از ریل تیم پی سی ار ، میزان نسخه برداری از ژن کد کننده اینترلوکین‌ها ۱ و ۸ به دنبال تیمار سلول‌ها با فلوکونازول به صورت وابسته به دوز کاهش یافت. این در حالی است که کتوکونازول در غلظت‌های پایین باعث کاهش بیان ژن‌های کد کننده اینترلوکین‌های ۱ و۸ شده و با افزایش غلظت باعث افزایش نسخه‌برداری از ژن‌های مذکور گردید.



*p <۰/۰۵, **p< ۰/۰۱

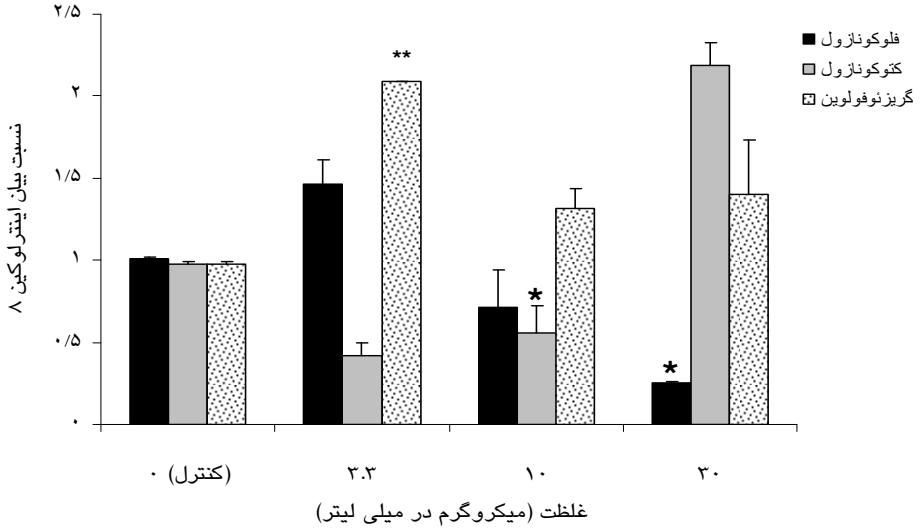
نمودار ۱: میزان اینترلوکین ۱ ترشح شده از سلول‌های کراتینوسیت در مجاورت غلظت‌های ۳/۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فلوکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول و گریزئوفولوین

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019



*p <۰/۰۵, **p< ۰/۰۱

نمودار۲: میزان بیان نسخه‌برداری ژن کد کننده اینترلوکین۱ در سلول‌های کراتینوسیت تیمار شده با غلظت‌های مختلف آزول نسبت به سلول‌های فاقد دارو



*p <۰/۰۵, **p< ۰/۰۱

نمودار ۳: نسبت بیان (نسخه‌برداری) ژن کد کننده اینترلوکین ۸ در سلول‌های کراتینوسیت تیمار شده با غلظت‌های مختلف آزول به سلول‌های فاقد دارو

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های بالینی نشان می‌دهند که درمان‌های موضعی یا سیستمیک با برخی از داروهای ضد قارچی مانند کتوکونازول در درمان بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک یا سبورئیک مؤثر می‌باشد(۵ و ۴). از آنجا که مخمرهای چربی دوست مالاسزیا به عنوان یک آلرژن برای پاسخ‌های آلرژیک وابسته به ایمونوگلوبین ای[1] عمل می‌نمایند(۲۱)، بخشی از این تأثیر می‌تواند مرتبط با اثر ضد قارچی کتوکونازول بر روی مخمرهای مذکور باشد(۲۳ و ۲۲). از سوی دیگر تأثیر داروهای آزول بر روی تغییرات پاسخ ایمنی، تنها معطوف به اثرات ضد قارچی آن نبوده و داروهای مذکور با ایجاد تغییرات مورفولوژیک در ماکروفاژها(۱۴) یا سرکوب تکثیر سلول‌های لنفوسیت نیز قادرند تأثیر درمانی خود را بر درماتیت‌ها بیان نمایند(۲۴). کراتینوسیت‌ها که از سلول‌های مؤثر در پاسخ ایمنی علیه پاتوژن‌ها می‌باشند، با شناسایی الگوی مولکولی وابسته به پاتوژن واسطه‌های التهابی از جمله سیتوکین‌های متعددی را ترشح می‌نمایند(۲۵). هدف از این مطالعه تعیین تأثیر داروهای ضد قارچ آزول بر پاسخ سیتوکینی سلول‌های کراتینوسیت انسانی بوده است.

در این بررسی تیمار سلول‌های کراتینوسیت با غلظت‌های مختلف فلوکونازول باعث کاهش بیان ژن‌های اینترلوکین‌های ۱ و ۸ و در نتیجه کاهش سنتز اینترلوکین‌های مربوطه گردید. اثر مشابهی به دنبال تیمار این سلول‌ها با غلظت‌های پایین کتوکونازول نیز مشاهده شد، این در حالی است که غلظت بالای کتوکونازول، خود باعث تحریک سلول‌های کراتینوسیت شده و با افزایش سنتز اینترلوکین‌های مذکور باعث القا پاسخ‌های التهابی در این سلول‌ها گردید.

در این بررسی تیمار کراتینوسیت‌ها با ترکیبات آزول تغییری در میزان ترشح تومورنکروتیک فاکتور آلفا ایجاد ننمود که این نتیجه با مطالعه فریکسیوس و همکاران[2](۱۹۹۲) که عدم تغییر در بیان ژن سنتز کننده تومورنکروتیک فاکتور آلفا را به دنبال تیمار سلول‌های کراتینوسیت با ترکیبات آزول به روش نورتن بلات گزارش نمود مشابهت دارد(۲۴).

با توجه به این که کتوکونازول و فلوکونازول موجب کاهش سیتوکین‌های التهابی نظیر اینترلوکین‌های ۱ و ۸ می‌شوند، به نظر می‌رسد که این ترکیبات با کاهش ترشح کموکین‌های مختلف به وسیله کراتینوسیت‌ها بر بازگردش سلول‌ها تأثیر می‌گذارند که این امر می‌تواند تا حدودی توجیه‌گر نقش این ترکیبات در درمان درماتیت‌ها و تظاهرات آلرژیک باشد. نتایج به دست آمده با بسیاری از مطالعات بالینی در زمینه استفاده از ترکیبات آزول در درمان درماتیت‌های سبورئیک و آتوپیک نیز همخوانی دارد(۵-۳) و به نظر می‌رسد که ترکیبات آزول قادرند علاوه بر کاهش میزان ارگانیسم‌های قارچی در

1-IgE
2-Friccius et al

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

پوست، به صورت غیر مستقیم به وسیله کاهش سنتز اینترلوکین‌های التهابی، توقف سنتز لکوترین‌ها در گلبول‌های سفید چند هسته‌ای و رادیکال‌های فعال نیتریک اکسید در ماکروفاژها، تأثیر درمانی خود را بر درماتیت آتوپیک بیان نموده و موجب کاهش پاسخ‌های التهابی گردند(۱۴).

با توجه به این که در بسیاری از عفونت‌های قارچی سیستمیک پاسخ‌های لنفوسیت های تی کمک کننده تیپ یک[۱] نقش اصلی را در حذف و مقابله با عفونت دارند و سیستم ایمنی همورال نقش چندانی را در مواجه با اکثر عفونت‌های قارچی ایفا نمی‌کند، بررسی تأثیر جانبی تجویز سیستمیک داروهای آزول در درمان عفونت‌های قارچی احشایی نیازمند مطالعات جامع و گسترده می‌باشد. گرچه در این بررسی تیمار سلول‌های کراتینوسیت با فلوکونازول و کتوکونازول باعث کاهش مختصر سیتوکین‌ها در آنها شد، اما نظر به این که این سلول‌ها فعالیت ترشحی و ایمونولوژیک قابل توجهی ندارند، به کارگیری و تعمیم این نتایج نیازمند مطالعات تکمیلی گسترده بر روی رده‌های مختلف سلولی می‌باشد. بررسی و سنجش سایر سیتوکین‌ها، استفاده از رده های مختلف سلول‌های مؤثر در پاسخ‌های ایمنی، آزمایش‌های مختلف نظیر میکروارری[۲] جهت بررسی همزمان افزایش یا کاهش بیان ژن‌های مختلف به دنبال تیمار سلول‌ها با ترکیبات آزول، انجام آزمایش‌های تکمیلی در زمینه تأثیر ترکیبات آزول بر ترشح سیتوکین‌ها در رده‌های مختلف سلولی به وسیله وسترن بلات و همچنین مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند در این زمینه راهگشا باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه اجرای این پژوهش بر اساس گرانت پژوهشی جشنواره ابن سینا، اعطا شده به وسیله معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران تأمین شده است که بدین وسیله از معاونت محترم تقدیر و تشکر می‌شود.

1-T helper 1 (Th1)
2-Micro-Array

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

The Effects of Antifungal Azoles on Inflammatory Cytokine Production in Human Keratinocytes

Zomorodian K[*], Tarazooie B[**], Saadat F[***], Khodadadi H[****].

[*]Assistant Professor of Medical Mycology, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[**]PhD Student in Medical Mycology, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[***]Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology and Parasitology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[****]MSc in Medical Mycology, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

KEYWORDS:
Inflammatory cytokines,
Ketoconazole,
Fluconazole,
Itraconazole

Received: 1/12/1386
Accepted:26/4/1387

CorrespondingAuthor:Zomorodian K
Email: zomorodian@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Azoles drugs are being used successfully in treatment of fungal infections. Recently, immunosuppressive effects of some of these agents have been reported. Keratinocytes, as the major cells of the skin, have an important role in innate immunity against pathogenic agents. Considering the scanty of information about the effects of azoles on immune responces, this study was conducted to assess the expression and secretion of inflammatory cytokines in keratinocytes following treatment with azole drugs.

Materials & Methods: This is an exprimental study conducted in in molecular biology division in Tehran University of Medical Sciences and Immunodermatology Department in Vienna Medical University. Primery keratinocytes were cultured and treated with different concentrations of fluconazole, itraconazole, ketoconazole and griseofulvin. Secreted IL1, IL6 and TNF-α by keratinocytes in culture supernatant were measured by quantitative enzyme immunoassay technique. Moreover, expression of the genes encoding IL1 and IL8 was evaluated by Real Time-PCR.

Results: Treatment of keratinocytes with different concentrations of fluconazole and low concentration of ketoconazole resulted in decrease in IL1 secretion, but Itraconazole and griseofulvin did not show such an effect at the same concentrations. In addition, none of the examined drugs had an effect on secretion level of IL6 and TNF-α. Quantitative analysis of IL1 and IL8 encoding genes revealed that transcription on these genes might be suppressed following treatment with fluconazole or ketoconazole.

Conclusion: Fluconazole and ketoconazole might modulate the expression and secretion of IL1 and IL8 and affect the direction of immune responses induced by keratinocytes.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:36 +0430 on Saturday September 21st 2019

REFERENCES:

1.Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibly CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 40-79.
2.Warnock SW. Itraconazole and fluconazole: new drugs for deep fungal infection. J Antimicrob Chemother 1989; 24: 275-7.
3.Clemmensen OJ, Hjorth N. Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type I sensitivity to Pityrosporum orbiculare. Semin Dermatol 1983; 2: 26–29.
4.Baysal V, Yildirim M, Ozcanli C, Ceyhan AM. Itraconazole in the treatment of seborrheic dermatitis: a new treatment modality. Int J Dermatol 2004; 43: 63-6.
5.Ikezawa Z, Kondo M, Okajima M, Nishimura Y, Kono M. Clinical usefulness of oral itraconazole, an antimycotic drug, for refractory atopic dermatitis. Eur J Dermatol 2004; 14: 400-6.
6.Pierard Franchimont C, Pierard GE, Arrese JE, De Doncher P. Effect of ketoconazole 1% and 2% shampoos on severe dandruff and seborrhoeic dermatitis: clinical, squamometric and mycological assessments. Dermatology 2001; 202: 171-6.
7.Heng MC, Henderson CL, Barker DC, Haberfelde G. Correlation of Pityrosporum ovale density with clinical severity of seborrhoeic dermatitis as assessed by a simplified technique. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 82–7.
8.Midgley G, Hay RJ. Serological responses to Pityrosporum (Malassezia) in seborrhoeic dermatitis demonstrated by ELISA and Western blotting. Bull Soc Fr Mycol Med 1988; 17: 267–76.
9.Nordvall SL, Johansson S. IgE antibodies to Pityrosporum orbiculare in children with atopic diseases. Acta Paediatr Scand 1990; 79: 343–49.
10.Ashbee HR, Ingham E, Holland KT, Cunliffe WJ. Cell-mediated immune responses to Malassezia furfur serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. Exp Dermatol 1994; 3: 106–12.
11.Rosenberg EW, Belew P, Bale G. Effect of topical applications of heavy suspensions of killed Malassezia ovalis on rabbit skin. Mycopathologia 1980; 72: 147–54.
12.Bergbrant IM, Johansson S, Robbins D, Scheynius A, Faergemann J, Soderstrom T. An immunological study in patients with seborrhoeic dermatitis. Clin Exp Dermatol 1991 ; 16: 331–8.
13.Bergbrant IM, Johansson S, Robbins D, Bengtsson K, Faergemann J, Scheynius A, et al. The evaluation of various methods and antigens for the detection of antibodies against Pityrosporum ovale in patients with seborrhoeic dermatitis. Clin Exp Dermatol 1991 ; 16: 339–43.
14.Ochi H, Ishijima SA, Abe S, Tmeike A, Yamaguchi H, Osumi M. Morphological effects of itraconazole on murine macrophage. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 20: 181-9.
15.Beetens JR, Loots W, Somers Y, Coene MC, De Clerck F. Ketoconazole inhibits the biosynthesis of leukotrienes in vitro and in vivo. Biochem Pharmacol 1986; 35: 883-91.
16.Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-κB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med 1997; 336: 1066–71.
17.Rothfuchs AG, Trumstedt C, Wigzell H, Rottenberg ME. Intracellular bacterial infection-induced IFN-gamma is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN-alpha beta-STAT1 signaling. J Immunol 2004; 172: 6345-53.
18.Sumikawa Y, Asada H, Hoshino K, Azukizawa H, Katayama I, Akira S, et al. Induction of beta-defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. Microbes Infect 2006; 8: 1513-21.
19.Nickel TJ, Kabir MH, Talreja J, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Constitutive Expression of Functionally Protease-Activated Receptors Conjunctival Epithelial Cells. Mediators Inflamm 2006; 3: 61359.
20.Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: 45.
21.Young E, Koers WJ, Berrens L. Intracutaneous test with Pityrosporum extract in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl(Stockh)1989; 144: 122–5.
22.Van Der Wyk RW, Hechemy KE. A comparison of the bacterial and yeast flora of the human scalp and their effect upon dandruff production. J Soc Cosmet Chem 1967; 18: 629–39.
23.Gupta AK, Kogan N. Seborrhoeic dermatitis: current treatment practices. Expert Opin Pharmacother 2004; 5: 1755-65.
24.Friccius H, Pohla H, Adibzadeh M, Siegels-Hubenthal P, Schenk A, PawelecG. The effects of the antifungal azoles itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on cytokine gene expression in human lymphoid cells. Int J Immunopharmacol 1992; 14: 791-9.
25.Pivarcsi A, Kemeny L, Dobozy A. Innate immune functions of the keratinocytes. A review. Acta Microbiol Immunol Hung 2004; 51: 303-10.