Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۶ مهر و آبان سال ۱۳۸۷ (۹-۱)

ارزیابی پرولیفراسیون سلولی و اندازه گیری سطح اینترلوکین چهار و اینترفرون گاما در موش‌های Balb/c دارای تومور تجربی فیبروسارکوما با استفاده از ترکیبات آنتی ژنی GP96-Tumor peptide و نالوکسان

عقیل تبار ملاحسن * نفیسه پاکروان * زهیر محمد حسن **+
علی مصطفائی *** سیدمحمدموذنی **** معصومه ابتکار *****
شهرام شهابی ****** عباس آزادمهر * سیدحمیدآقاجان‌زاده *******
آریو شاهین جعفری******** عراز محمد میرابی *********

چکیده

سابقه و هدف: با وجود پیشرفت های زیاد در زمینه درمان تومور با استفاده از روش های رایج مانند جراحی ، شیمی درمانی و غیره ، علم پزشکی همچنان در درمان تومور ناتوان مانده است. در این رابطه علم ایمونولوژی افق تازه ای را جهت ریشه کنی تومور ارائه نموده بصورتی که ایمونوتراپی تومور امروزه بعنوان یکی از استراتژی های پذیرفته شده در درمان بعضی از انواع تومورها حداقل در مدل‌های حیوانی نتایج قابل قبولی را ارائه نموده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرایمونوتراپی تراپئوتیک با استفاده از کمپلکس gp96-tumor peptide و نالوکسان به عنوان آنتاگونیست گیرنده های اپیوئیدی برای تقویت سیستم ایمنی خصوصاً سیستم ایمنی سلولی علیه تومور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق کمپلکس GP96 - Tumor peptide با استفاده از روش srivastava از رده سلولی WEHI 164 تخلیص شد . در مرحله بعد موش هایی را که از قبل با تزریق سلول‌های توموری سرطانی شده بودند به چهار گروه تقسیم شدند . به گروه کنترل فقط محلول بافر فسفات (PBS) ، به گروه تست یک نالوکسان، به گروه تست دوکمپلکس gp96-tumor peptide و به گروه تست سه کمپلکس gp96-tumor peptide همراه با نالوکسان تزریق شد. جهت ارزیابی اثربخشی واکسیناسیون بعد از روزهای معین اندازه تومور حاصله ثبت شد سپس موشها کشته و در شرایط استریل سلول‌های تک هسته‌ای از طحال آنها استخراج شدندکه در مرحله بر روی آنها آزمایش MTT جهت بررسی تکثیر سلول انجام شد و ازمحلول رویی حاصل از کشت سلول تولید سایتوکاین‌های اینترلوکین چهار و اینترفرون گاما با استفاده از کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها : نتایج حاصل از تخلیص پروتئین نشان داد که ایزوفرم حاصل از تخلیص، فرم ۶۶ کیلو دالتون پروتئین مورد نظر می باشد. نتایج حاصل از میزان حجم تومورنشان داد که در گروه تستها اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل وجود ندارد. نتایج آزمایش MTT نشان داد که در گروه تستها اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل وجود ندارد. نتایج حاصل از سنجش اینترلوکین چهار نشان داد در گروه تست یک و گروه تست دو اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل دیده نمی شود ولی در گروه تست سه کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل وجود دارد. نتایج حاصل از سنجش اینترفرون گاما در گروه تست یک اختلاف معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد ولی گروه تست دو و گروه تست سه افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند.

استنتاج : از یافته‌های تحقیق نتیجه گرفته می شود که کاربرد کمپلکس gp96-tumor peptide به تنهایی فقط سبب افزایش میزان اینترفرون گاما می شود ولی کاربرد این کمپلکس همراه با نالوکسان علاوه بر افزایش میزان اینترفرون گاما سبب کاهش میزان اینترلوکین چهار می شود که برای القاء پاسخ ایمنی سلولی علیه تومور ضروری می باشد.

واژه‌های کلیدی: نالوکسان ، کمپلکس gp96-tumor peptide ، ایمونوتراپی، فیبروسارکوما

+ **مولف مسئول: دکتر زهیر محمدحسن**- تهران، دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده علوم پزشکی ،گروه ایمونولوژی ص پ: ۱۱۱- ۱۴۱۱۵
E-mail:Hassan_zm@modares.ac.ir

*دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس
** دکترای ایمونولوژی استاد دانشگاه تربیت مدرس
*** دکترای ایمونولوژی دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
**** دکترای ایمونولوژی دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
***** دکترای ایمونولوژی استادیار دانشگاه تربیت مدرس
****** دکترای ایمونولوژی استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
******* مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران
******** کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۸۷/۶/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۶/۱۸ تاریخ تصویب: ۸۷/۷/۳

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های زیاد در علم پزشکی، سرطان هنوز هم یکی از معضلات اصلی بشر امروزی و قرن حاضر می‌باشد بطوری که هر سال ما شاهد قربانیان بی‌شماری در اثرسرطان هستیم. تا بحال علم پزشکی از راههای مختلفی مانند جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و غیره برای درمان سرطان اقدام نموده است ولی موفقیت زیادی حاصل نشده است. ایمونوتراپی تومور امکان جدیدی برای درمان سرطان فراهم کرده است که گرچه هنوز مراحل آغازین خود را می گذراند اما افق جدیدی برای درمان سرطان در آینده نزدیک می تواند باشد (۴،۳،۲،۱). در ایمونوتراپی تومورکه بیشتر به مفهوم ایمونوتراپی فعال تومور می‌باشد ومی‌تواند بصورت Therapeutic immunotherapy یا ایمونوتراپی درمان کننده و Prophylactic immunotherapy یا ایمونوتراپی پیش گیری کننده انجام شود سعی بر آن است که سیستم ایمنی بیمار علیه بافت توموری فعال شود لذا برای رسیدن به این هدف از استراتژی‌های مختلفی می‌توان استفاده کرد (۶، ۵) که یکی از آنها استفاده ازواکسن‌های بنام HSP based vaccine می باشد که اخیرا به عنوان واکسن به کار می روند. عوامل مختلفی به عنوان القاء کنندگان پروتئینهای شوک حرارتی می‌باشند که از این عوامل می‌توان به اشعه ،حرارت ، عفونت ها ، کنسر ها و غیره اشاره کرد. این مولکول‌ها نقش‌های مختلفی را در سلول برعهده دارند (۷). در پستانداران پروتئین های شوک حرارتی به انواع مختلفی تقسیم می‌شود در بین پروتئین شوک حرارتی دیده شده که مولکول gp96 یا گلیکو پروتئین ۹۶ کیلو دالتون نقش‌های ایمونولوژیک بسیار موثری دارد بطوری که به آن Immunochaprone می‌گویند. این پروتئین از نظر مکانی در سیتوزول و غشاء شبکه اندوپلاسمی قرار گرفته و بیشترین پروتئین متصل شونده به پپتید در شبکه اندوپلاسمی بوده و همیشه بصورت همودایمر می‌باشند. از نظر ساختمانی از قسمت Cترمینال به غشاء شبکه اندوپلاسمی و از قسمت N ترمینال در محل اسید امینه های ۶۳۰-۶۲۴ به پپتید متصل می شود با جدا کردن این پروتئین از سلول می توان پپتید های توموری متصل به آن را هم از سلول جدا کرد (۱۰، ۹، ۸). نقش ایمونولوژیک آن به این صورت است که این مولکول پس از ورود به بدن به مولکول CD91 موجود درسطح سلو لهای APC متصل می شود و از طریق اندوسیتوز وابسته به رسپتور وارد سلول عرضه کننده آنتی ژن می شود. در مرحله بعد مجموعه گلیکو پروتئین ۹۶ کیلو دالتون وپپتید متصل به آن وارد مسیرMHC-I می شود واز طریق عرضه متقاطع یا Cross presentation به سلول های T cell CD8+ یا Cytotoxic T Lymphocyte عرضه می شود که در نهایت می تواند پاسخ قوی را علیه تومور ایجاد نماید (۱۲، ۱۱). با وجود پیشرفت های زیاد در زمینه ایمونوتراپی تومور، در بسیاری از موارد ایمونوتراپی تومور با شکست مواجه می گردد چرا که تومورازنظر ایمونولوژیک یک بافت فعال نمی‌باشد وحتی می تواند سبب مهار سیستمیک پاسخ ایمنی Systemic immune (suppression) شود. به همین دلیل امروزه یکی از نکاتی که در واکسیناسیون خصوصا علیه تومور به آن توجه زیادی می گردد استفاده از ادجوان های مناسبی می‌باشد که بتواند بصورت سینرژیسم اثر بخشی واکسن را تقویت نماید. از ادجوانت هایی که جدیدا در واکسینولوژی به آنها توجه شده علاوه بر ادجوانت های بیولوژیک مانند سایتوکا ین ها ،ادجوانت های فارماکولوژیک می باشند که در این بین می توان به آنتاگونیست های گیرنده های سیستم اپیوئیدی اشاره کرد. اپیوئیدها ترکیباتی هستند که به دو دسته اندوژن و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

Archive of SID

اگزوژن تقسیم می گردند .اپیوئیدهای اندوژن در پاسخ به محرک درد زا در سیستم عصبی مرکزی و علاوه بر آن در بافت های محیطی هم سنتز می گردد بطوری که حتی توسط سلولهای سیستم ایمنی هم سنتز می شوند . گیرنده های مختلفی برای آنها وجود داردکه علاوه بر سلولهای عصبی در سطح سایر سلولهای بدن از جمله سلول‌های سیستم ایمنی هم یافت می شود (۱۳و۱۴و۱۵و۱۶). در تحقیقات زیادی ذکر شده که اپیوئیدها چه از نـوع اندوژن و چه از نوع اگـزوژن می توانند بر جنبه های مختلف سیسـتم ایمنی از جمله شیـفت Th0 (T helper0) به سمت Th2 تاثیر گذار باشند و از انجایی که در دفاع علیه تومور ما نیاز به تقویت بازوی Th1 داریم لذا منطقی به نظر می رسد که با استفاده از آنتاگونیست های گیرنده های سیستم اپیوئیدی مانند نالوکسان بتوان از شیفتTh0 به سمت Th2جلوگیری و سبب القاء Th0 به سمت پاسخ Th1 شد لذا با کاربرد همزمان آنتاگونیست های گیرنده های سیستم اپیوئیدی مانند نالوکسان همراه با کمپلکس GP96 - Tumor peptide شاید بتوان به یک واکسن ایده ال علیه تومور دسترسی پیدا کرد (۱۷، ۱۸، ۱۹).

مواد و روش ها

تخلیص GP96

در این تحقیق کمپلکس GP96 - Tumor peptid با استفاده از روش srivastava از رده سلولی WEHI 164 تخلیص شد(۲۰). به این صورت که ابتدا رده سلولی فیبروسارکوما کشت داده شد سپس برای لیز کردن سلول ها از روش سونیکه کردن استفاده شد. رسوب دهی پروتئین‌ها از مایع رویی با استفاده از سولفات آمونیوم انجام شد در محله بعد غلظت پروتئین حاصل از تخلیص با روش برادفورد محاسبه گردید. نمونه های حاصله از ستون کروماتوگرافی افینیتی عبور داده شده و در مرحله بعد عمل الکتروفورز انجام شد و در نهایت حضور پروتئین مربوطه با وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال تائید شد.

توموری کردن موش ها

برای توموری کردن موش راههای مختلفی وجود دارد که یکی از آنها استفاده از مواد شیمیایی مانند متیل کلانترین بعنوان یک ماده سرطانزای قوی و دیگری تزریق سلول های توموری به حیوان می باشد که در این تحقیق عمل توموری شدن با استفاده از تزریق سلول های توموری انجام شد به این صورت که موش‌های BALB/C ماده خریداری شده از انستیتو پاستور با سن شش هفته بوسیلهٔ تزریق ۱۰۰۰۰۰۰ هزار سلول توموری در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به صورت زیرجلدی، سرطانی شدند.

تزریق واکسن

بعد از توموری کردن، موش ها به چهار گروه تقسیم شدند. به گروه کنترل فقط PBS تزریق شد. (سه تزریق متوالی هرکدام به فاصله یک هفته یک بار و در حجم ۱۰۰میکرولیتر بصورت زیر جلدی). به گروه تست یک فقط نالوکسان خریداری شده از شرکت اورفا تزریق شد. (سه تزریق متوالی هر کدام به فاصله یک هفته یک بار با دوز ۰/۵ mg/kg از نالوکسان در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بصورت داخل جلدی). به گروه تست دو کمپلکس gp96-tumor peptide تزریق شد.(سه تزریق متوالی هر کدام به فاصله یک هفته یک بار با دوز ۵۰ میکروگرم gp96 -tumor peptide در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر بصورت زیر جلدی). به گروه تست سه کمپلکس gp96- tumor peptide و نالوکسان تزریق شد. (سه تزریق متوالی هر کدام به فاصله یک هفته یک بار با دوز ۵۰ میکروگرم از gp96 -tumor peptide در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

حجم ۱۰۰میکرولیتر و mg/kg ۰/۵ از نالوکسان در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بصورت زیر جلدی).

ارزیابی اثربخشی واکسیناسیون

الف) بررسی حجم تومور

جهت ارزیابی اثر واکسیناسیون بر روی اندازهٔ تومور ایجاد شده، بعد از تزریق سوم ، در انتهای هر هفته به مدت ۵ هفته ابعاد تومور حاصله با ابزار میکرو متر اندازه گیری شده و حجم تومور با استفاده از فرمول حجم تومور = W1×W2×W3×3.14/6 محاسبه و ثبت گردید.

ب) تست سنجش سایتوکاین

برای ارزیابی اثر واکسیناسیون بر جمعیت سلولهای ایمنی و پروفایل سیتوکاینی القاء شده ابتدا موش‌ها کشته شدند. سپس طحال از بدن حیوان خارج شده و گلبول‌های سفید آن استخراج گردید(۲۱). پس از شمارش سلولی و تعیین درصد زنده بودن ، سوسپانسیون سلولی ۲۰۰۰۰۰۰ در یک سی‌سی تهیه شد. محلول آنتی ژن حاوی ۶۰ میکروگرم در سی سی از کمپلکس gp96-tumor peptide تهیه و محلول میتوژن حاوی ۸ میکرو گرم در سی سی از فیتوهماگلوتینین خریداری شده از سیگما تهیه شد کشت سلول‌های طحالی به منظور تست سنجش سایتوکاین در محیط کشت RPMI-1640 خریداری شده از GIBCO حاوی سرم جنین گاو یا FCS خریداری شده از سیگما و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین خریداری شده از سیگما و در پلیتهای ۲۴ خانه انجام گردد و برای هر موش ۳ چاهک در نظر گرفته شد. ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰۰۰ سلول (درحجم ۵۰۰ میکرولیتر) به هر چاهک منتقل گردید. سپس به چاهک کنترل مثبت ۵۰۰ میکرولیتر از فیتوهماگلوتینین (۸ میکروگرم در سی سی) اضافه شد. به چاهک تست ۵۰۰ لاندا از آنتی ژن (۶۰ میکرو گرم در سی سی) اضافه شد. حجم نهایی چاهک کنترل منفی نیز با محیط کشت کامل به ۱۰۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. سپس پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند در انقضای مدت انکوباسیون محلول رویی کشت سلولها در لوله های مجزا جمع آوری و تا لحظه آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای اندازه گیری سایتوکاین های اینترفرون گاما و اینترلوکین چهار موجود در مایع رویی کشت سلولی از کیت الایزا با مارک Quantikine که دارای حساسیت کمتر از ۰/۲ پیکوگرم بر سی سی می باشد استفاده گردید.

ج) تست MTT

یکی از روش های ارزیابی میزان سلول های زنده در محیط کشت سلولی استفاده از روش نمک تترازولیوم زرد رنگ می باشد که براساس رنگ سنجی محصول نهایی استوار است . این نمک توسط سلول های زنده برداشت شده و در داخل آنها احیا شده و بلورهای نامحلول فورمازان بنفش رنگ تشکیل می دهد . برای رنگ سنجی باید ابتدا غشاهای سلولی را تخریب کرده و بلورهای نامحلول فورمازان را نیز باید به صورت محلول درآورد. برای این منظور از دی متیل سولفوکساید خریداری شده از سیگما استفاده می شود بدین ترتیب که محیط کشت بدون سلول از چاهک ها برداشته می شود و بر روی سلولهای باقی مانده از محلولهای فوق اضافه می گردد سپس محلول رنگی حاصل با دستگاه الایزا ریدر قرائت می گردد. به منظور بررسی میزان پاسخ تکثیری سلول های طحالی موش های واکسینه شده در اثر مواجهه با محرک آنتی ژنی (gp96) آزمایش MTT با استفاده از پلیت های ۹۶ خانه و به صورت زیر انجام گردید. ابتدا از سوسپانسیون سلول‌های طحالی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه (به صورت تریپلیکیت) منتقل گردید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

Archive of SID

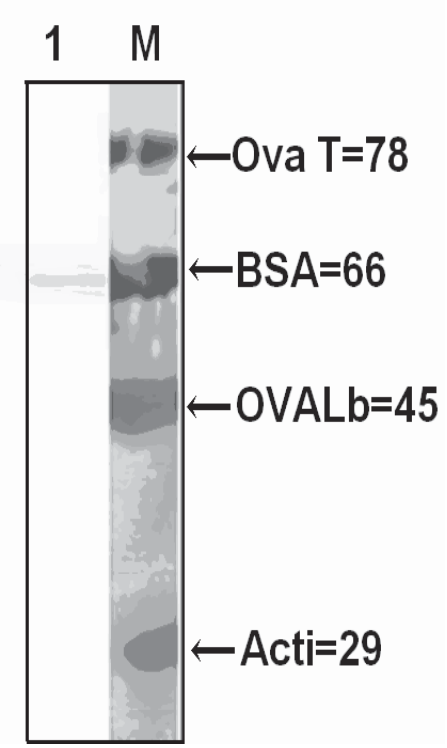
(برای هر موش ۹ چاهک در نظر گرفته شد) به چاهک های کنترل منفی۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و به چاهک‌های کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول میتوژن فیتوهماگلوتینین و برای چاهک‌های تست نیز ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی ژنی اضافه گردید. دانسیته سلولی و غلظت محلول آنتی‌ژن و میتوژن دقیقا برابر روش کشت سایتوکاینی به کار برده شدند با این تفاوت که حجم نهایی کشت در پلیت ۹۶ خانه برای هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر منظور گردید. سپس مجموعه را کشت داده و پاسخ دهی سلول های طحال موش های توموری در گروه های مختلف نسبت به tumor-gp96 peptide بعنوان آنتی ژن در مجاورت معرف MTT (به حجم ۲۵ میکرولیتر) که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است مورد ارزیابی قرار گرفت.شکل اکسید شده نمک تترازولیوم تولید بلور فورمازان بنفش رنگ می کند که در حلال مناسب حل شده و میزان رنگ تولید شده با الایزا ریدر با مارک ER- 500 اندازه گیری می شود.

آنالیز آماری

تجزیه وتحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و T- test انجام شده است.

یافته ها

در نتایج این تحقیق با وسترن بلات دیده شده که ایزوفرمی ازاین مولکول که دراین رده سلولی وجود دارد فرم ۶۶ کیلو دالتونی آن بوده برای اینکه که این مولکول بصورت یک خانواده مولکولی وجود دارد که دارای وزن مولکولی مختلف می باشند. در شکل یک تصویر وسترن بلات مروطه نشان داده شده است.



شکل شماره ۱: وسترن بلات از نمونه های حاصل از ستون کروماتوگرافی افینیتی Lane 1 ستون M مربوط به مارکر می باشد.

پس از تخلیص پروتئین و تزریق آن به موش ، با آزمایشات مختلفی ارزیابی سیستم ایمنی و اثر بخشی واکسیناسیون انجام شد و نتایج مختلفی را در روز های مختلف نشان داده است بطوری که در ارزیابی حجم تومور با استفاده از میکرومتر دیده شده که هفت روز بعد از تزریق سلول توموری، حجم تومورسیار کم بوده ولی با افزیش زمان حجم تومور بیشتر می شود. در گروه تستها می بینیم که در تست یک، دو و سه به ترتیب حجم تومورها در مقایسه با هم و در مقایسه با گروه کنترل کم می شود ولی این کاهش حجم تومور از نظر آماری معنی‌دار نمی باشد. نتایج مذکور در جدول شماره یک نشان داده شده اند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از حجم تومور(میلی مترمکعب)در گروه‌های کنترل و تست در روزهای متفاوت

روز	بافر(کنترل)	نالوکسان		Gp۹۶		Gp۹۶ با نالوکسان	
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	P value	انحراف معیار ± میانگین	P value	انحراف معیار ± میانگین	P value
۷	۱/۰۷ ± ۰/۷۱	۱/۰۸ ± ۰/۶۹	۰/۹۸	۱/۱۵ ± ۰/۱۹	۰/۸۱	۱/۱۱ ± ۰/۱۲	۰/۹۱
۱۴	۵۰/۲ ± ۲۹	۴۶/۸۷ ± ۲۰/۴۹	۰/۸۰	۴۸/۳۴ ± ۲۴/۰۷	۰/۸۸	۴۹/۷۲ ± ۲۳/۴۷	۰/۹۷
۲۱	۵۹۵/۵ ± ۲۱۷/۷۱	۶۰۹/۱۵ ± ۲۵۵/۲۳	۰/۹۱	۵۶۷/۷۸ ± ۲۵۲/۹۵	۰/۸۳	۵۰۲/۷۳ ± ۲۳۴/۳۶	۰/۴۸
۲۸	۳۰۳۰/۷۵ ± ۹۲۷/۳۹	۲۷۳۷/۹۶ ± ۸۶۵/۹۷	۰/۵۱	۲۵۸۵/۱۸ ± ۷۵۷/۶۷	۰/۳۲	۲۴۴۰/۹۰ ± ۷۳۶/۰۳	۰/۱۹
۳۵	۷۱۶۷/۰۹ ± ۱۲۲۷/۵۴	۶۴۶۱/۶۶ ± ۱۲۲۳/۸۵	۰/۳۰	۶۳۰۹/۴۸ ± ۱۲۱۲/۲	۰/۱۷	۵۹۴۵/۴۷ ± ۱۳۳۷/۰۸	۰/۰۸

در بررسی قدرت تکثیری سلولهای سیستم ایمنی با استفاده از آزمایش MTT نشان داده شده است که در گروه تستها به ترتیب در تست ۱، ۲ و ۳ میزان اندیس تحریکی در مقایسه با هم و در مقایسه با گروه کنترل افزایش دارد ولی این افزایش از نظر آماری معنی دار نمی باشد. نتایج مذکور در جدول شماره دو نشان داده شده اند.

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از پرولیفراسیون سلولی با آزمایش MTT در گروه‌های کنترل و تست

اندیس تحریکی(SI) گروه ها با استفاده از gp96 به عنوان محرک آنتی ژنی

گروه موش ها	بافر	نالوکسان		Gp۹۶		Gp ۹۶ با نالوکسان	
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	P value	انحراف معیار ± میانگین	P value	انحراف معیار± میانگین	P value
	۱/۸±۰/۹	۲/۲±۰/۸	۰/۸۳	۲/۸±۱/۲	۰/۵۰	۳/۳±۱/۷	۰/۱۳

نتایج حاصل از سنجش اینترلوکین چهار با استفاده از کیت الایزا نشان داد که فیتو هماگلوتینین بیشترین مقدار اینترلوکین چهار را برای هر گروه تولید می کند در اینجا دیده می‌شود که در گروه تست‌ها میزان اینترلوکین چهار تولید شده نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد اما در گروه تست یک و گروه تست دو اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل وجود ندارد ولی در گروه تست سه کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. نتایج مذکور در جدول شماره سه نشان داده شده‌اند.

جدول شماره ۳: نتایج حاصل از سنجش اینترلوکین چهار در گروه‌های کنترل و تست

گروه ها	فیتوهماگلوتینین	آنتی‌ژن	بدون محرک	
	انحراف معیار± میانگین	انحراف معیار± میانگین	انحراف معیار± میانگین	P value
بافر (کنترل)	۷/۲۹±۲/۴۶	۵/۱۶±۳/۵۱	۱/۳۸±۰/۹۸	۱
نالوکسان	۳/۴۳±۲/۱۵	۲/۲۰±۴/۳۳	۱/۷۷±۰/۹۶	۰/۱۱۹
Gp۹۶	۳/۸۸±۲/۷۳	۳/۰۸±۳/۳۸	۱/۳۲±۱/۲۵	۰/۲۸۶
Gp۹۶ با نالوکسان	۱/۶۵±۰/۹۸	۱/۱۵±۱/۰۸	۱/۵۷±۱/۳۰	<۰/۰۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از سنجش اینترفرون گاما با استفاده از کیت الایزا نشان داد که که فیتو هماگلوتینین بیشترین مقدار اینترفرون گاما را برای هر گروه تولید می کند در اینجا دیده می شود که در گروه تست ها میزان اینترفرون گاما تولید شده نسبت به گروه کنترل بیشتر می باشد اما در گروه تست یک، اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل وجود ندارد ولی در گروه تست دو و سه افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل دیده می شود. نتایج مذکور در جدول شماره چهار نشان داده شده اند.

جدول شماره٤: نتایج حاصل از سنجش اینترفرون گاما در گروه‌های کنترل و تست

گروه‌ها	فیتوهماگلوتینین انحراف معیار± میانگین	آنتی‌ژن انحراف معیار± میانگین	بدون محرک انحراف معیار± میانگین	P value
بافر (کنترل)	۱۰۷/۰۱ ± ۲۴/۲۳	۵/۶۰ ± ۳/۶۳	۱/۸۶ ± ۱/۱۷	۱
نالوکسان	۱۵۱/۳۶ ± ۳۳/۰۴	۳۰/۱۳ ± ۹/۶۸	۲/۳۳ ± ۱/۱۴	۰/۱۴۶
Gp ۹۶	۱۲۱/۰۴ ± ۲۱/۶۱	۱۲۹/۴۶ ± ۲۹/۴۱	۱/۷۹ ± ۱/۵۰	< ۰/۰۵
Gp۹۶ با نالوکسان	۱۵۹/۷۳ ± ۳۲/۱۳	۱۹۵/۳۹ ± ۵۲/۵۸	۲/۱۹ ± ۱/۱۷	< ۰/۰۵

بحث

باتوجه به اهمیت سرطان محققین توجه زیادی برای درمان آن داشته اند و از جمله درمان سرطان با استفاده از واکسن‌های مبتنی بر پروتئین های شوک حرارتی، مطالعات بسیاری انجام شده است. عوامل متعددی در روند رشد تومور اثر دارند در این رابطه می توان به عامل ایجاد کننده تومور،Tumor Stage ، حضور سلول‌هایی بنام Regulatory T cell یا سلول های T تنظیم کننده، و ریز محیطی که تومور در آن زندگی می کند اشاره کرد. طبیعی است که برای غلبه بر رشد تومور باید بر همه این عوامل و سایر عوامل دیگر که در این رابطه نقش دارند غلبه کرد. در این تحقیق از کمپلکس Gp96-tumor peptide بعنوان عامل ایمنی بخش و از نالوکسان که یک آنتاگونیست گیرنده های اوپیوئیدی می باشد بعنوان یک ادجوانت فارماکولوژیک برای شیفت سیستم ایمنی به سمت ایمنی سلولی که نقش مهمی در دفاع علیه تومور دارد استفاده شده است. دراین مطالعه نشان داده شده که مولکول های GP96 بصورت یک خانواده مولکولی با وزن ها ی مولکولی متفاوتی وجود دارد (۲۰) چرا که ایزوفرمی از این مولکول که در این مطالعه شناخته شده است دارای وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون می باشد که با روش وسترن بلات هم تائید شده است. پس از تخلیص پروتئین مربوطه ،به موش های که از قبل با تزریق سلول‌های توموری سرطانی شده بودند واکسن های مورد نظر تزریق گردید. در مرحله بعد پس از مدت زمان معین با اندازه گیری حجم تومور، انجام تست MTT و سنجش اینترلوکین چهار و اینترفرون گاما تولید شده ، به بررسی میزان اثر بخشی کمپلکس Gp96-tumor peptide در پاسخ ایمنی مناسب علیه تومور پرداخته شد. در این تحقیق نشان داده شده که تزریق نالوکسان به تنهایی تاثیری بر مقدار اینترفرون گاما تولید شده در محیط کشت ندارد به همین دلیل شاید منطقی به نظر می رسد که تزریق نالوکسان تنها نتواند بر میزان حجم تومور اثر مهاری داشته باشد چرا که یکی از فاکتورهایی که در شیفت سیستم ایمنی به سمت ایمنی سلولی نقش مهمی دارد حضور مقدار مناسب سایتوکاین هایی مانند اینترفرون گاما در محیط می باشد.. در مطالعه Alberto و همکارانش در سال ۲۰۰۲ دیده شده تزریق نالوکسان بصورت زیر جلدی در دوز 1mg/kg سبب افزایش مقدار اینترفرون گاما و کاهش مقدار اینترلوکین چهار در محیط کشت شده است و در مطالعه ایی دیگرکه در سال ۲۰۰۰ انجام شد مشاهده گردید که تزریق نالوکسان بصورت زیر جلدی در دوز

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

mg/kg ۵ سبب افزایش مقدار اینترفرون گاما می شود (۱۸). تفاوت مشاهده شده در نتیجه این تحقیق با نتایج سایر محققین شاید بدلیل تفاوت در دوز مصرفی نالوکسان باشد که در این تحقیق از دوز mg/kg ۰/۵ استفاده شده است. نتایج حاصل از تزریق Gp96-Tumor peptide نشان داد که تزریق Gp96-Tumor peptide به تنهایی و بصورت زیر جلدی تاثیری در میزان حجم تومور، تست MTT و میزان اینترلوکین چهار ندارد ولی بر میزان تولید اینترفرون گاما اثر تقویتی دارد($0.05>$) به طوری که سبب افزایش مقدار اینترفرون گاما می شود که با نتایج Filiberto که بر روی مدل انسانی کار کرده مطابقت دارد (۲۲). به نظر می رسد علت اینکه تزریق Gp96-Tumor peptide به تنهایی نمی تواند سبب کاهش حجم تومور شود شاید به این دلیل باشد که مقدار اینترفرون گاما تولید شده کمتر از مقدار لازم جهت شیفت Th0 به سمت Th1 باشد و یا اینکه نتواند سلول های +T CD8 را علیه تومور فعال نماید. در این تحقیق دیده شده که استفاده توام از کمپلکس Gp96-tumor peptide و نالوکسان می تواند علاوه بر افزایش مقدار اینترفرون گاما ($0.05>$)، سبب کاهش مقدار اینترلوکین چهار نیز شود ($0.05>$) که با توجه به بی اثر بودن استفاده از نالوکسان به تنهایی بر پارامترهای فوق شاید بتوان نتیجه گرفت که این یافته ها در گروه تست سه بخاطر کمپلکس Gp96-tumor peptide می باشد نه نالوکسان . از نتایج این تحقیق این چنین بر آورد می شود که تزریق Gp96-Tumor peptide به تنهایی و مصرف توام آن با نالوکسان برافزایش میزان اینترفرون گاما اثر تقویتی داشته ولی نتوانسته بر میزان حجم تومور اثرمهاری داشته باشد.

References

1. Steven A, Rosenberg, James C. Yang and Nicholas P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med 2004 ;10: 909–915.

2. Roden RB, Moonie A, Wu TC. Opportunities to improve the prevention and treatment of cervical cancer. Curr Mol Med 2007; August; 7: 490–503.

3. Stefania Croci, Giordano Nicoletti, Lorena Landuzzi, Carla De Giovanni, , Annalisa Astolfi, Chiara Marini,et al. Immunological prevention of a multigene cancer syndrome. Cancer Res 2004 ;(15);64: 8428–8434.

4. Koon, Henry B, Atkins, Michael B. Update on therapy for melanoma: opportunities for patient selection and overcoming tumor resistance. Expert Rev Anticancer Ther 2007; 7: 79–88 .

5. Leonora Houet and Hendrik Veelken. Active immunotherapy of multiple myeloma. European Journal of Cancer, 2006; 42(11):1653-1660

6. Vladia Monsurrò, Ena Wang, Monica C, Panelli, Dirk Nagorsen, Ping Jin et al.Active-specific immunization against melanoma: Is the problem at the receiving end? Seminars in Cancer Biology. 2003; 13(6) : 473-480.

7. Z Prohászka , G Füst. Immunological aspects of heat-shock proteins—the optimum stress of life . Mol Immunol 2004; 41 (1): 29-44.

8. Parmiani G, De Filippo A, Pilla L, Castelli C, Rivoltini L. Heat shock proteins gp96 as

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir

Archive of SID

immunogens in cancer patients. Int J Hyperthermia. 2006; 22(3):223-227.

9. Christopher V Nicchitta. Biochemical cell biological and immunological issue surrounding the endoplasmic reticulum chaperone GRP94/gp96. Curr Opin Immunol 1998; 10:103-109.

10. Sreyashi Basu and Toyoshi Matsutake. Heat shock protein–antigen presenting cell interactions. Methods. 2004; 32(1): 38-41.

11. Zihai Li, Antoine Menoret , Pramod Srivastava. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. Curr Opin Immunol 2002; 15 (9): 3235-3245.

12. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock proteingp96. Nat Immunol 2000 ;1(2):151-151.

13. Mousa SA. Morphological correlates of immune-mediated peripheral opioid analgesia. Adv Exp Med Biol 2003; 521:77-87.

14. Walker JS. Anti-inflammatory effects of opioids. Adv Exp Med Biol 2003; 521:148-160.

15. Despoina Vassou, Efstathia Bakogeorgou, Marilena Kampa, Helen Dimitriou, Anastassia Hatzoglou, Elias Castanas. Opioids modulate constitutive B-lymphocyte secretion. In Immuno 2008;8 (5) : 634-644.

16. Gayle G. Page, RN, DNSc, FAAN. Immunologic Effects of Opioids in the Presence or Absence of Pain. J Pain Symp Management 2005; 29 (55):526-531 .

17. Paola Sacerdote, Barbara Manfredi, Leda Gaspani, Alberto E, Pnerai.The opioid antagonist naloxone induces a shift from Type 2 to Type 1 cytokine pattern in BALB/cJ mice. Blood 2000; 95(6):2031-2036.

18. Alberto Loizzo, Stefano Loizzo Luisa lopez, Antonio d Amore, paolo Renzi, Santi Spampinato. Naloxone prevents cell-mediated immune alterations in adult mice following repeated mild stress in the neonatal period. Brit J Pharma 2002; 135: 1219-1226.

19. Timothy B. Saurer, Stephanie G. Ijames, Kelly A. Carrigan, etal.Neuroimmune mechanisms of opioid-mediated conditioned immunomodulation. Brain Behavior Immun, 2008; 22(1):89-97 .

20. Song-Dong Meng, Jian Song, Zihe Rao, Po Tien, George F. Gao. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. J Immun Meth 2002; 264: 29– 35.

21. Della Berhanu ,Frank Mortari , Stephen C. Rosa and Mario Roederer. Optimized lymphocyte isolation methods for analysis of chemokine receptor expression. J Immun Methods 2003; 279(1-2):199-207 .

22. Filiberto belli, Alessandro testori, licia rivoltini, Michele Maio, Giovanna Anderola, Mario Roberto Sertoli , etal. Vaccination of metastatic melanoma patients with Autolugouse tumor derived heat shock protein gp96- peptide complex. j of clini onco 2002; 20(20): 4169 – 4180.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-23]

www.SID.ir