

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

عقيل تبار ملاحسن*
علي مصطفائي***
شهرام شهابي*****
آريو شاهين جعفري*****
نفيسه پاكروان*
سيد محمد مودني****
عباس آزاد مهر*
عراز محمد ميرابي*****
زهير محمد حسن**
معصومه ابتكار*****
سيد حميد آقا جان زاده*****

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 مدل های حیوانی نتایج قابل قبولی را ارائه نموده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرايمونوتراپی تراپئوتیک با استفاده از کمپلکس gp96-tumor peptide و نالوکسان به عنوان آنتاگونیست گیرنده های اپیویدی برای تقویت سیستم ایمنی خصوصاً سیستم ایمنی سلولی علیه تومور می باشد.

مواد و روش ها: 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 سلول های 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 دو کمپلکس 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 سلول های تک هسته ای از طحال آنها استخراج شدند که در مرحله بر روی آنها آزمایش MTT جهت بررسی تکثیر سلول انجام شد و از محلول رویی حاصل از کشت سلول تولید سایتوکاین های اینترلوکین چهار و اینترفرون گاما با استفاده از کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: 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 تومور نشان 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 یافته های 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.

واژه های کلیدی: نالوکسان، کمپلکس gp96-tumor peptide، ایمونوتراپی، فیبروسارکوما

*مؤلف مسئول: دکتر زهیر محمد حسن - تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی ص پ: ۱۱۱-۱۴۱۵

E-mail: Hassan_zm@modares.ac.ir

**دکترای ایمونولوژی استاد دانشگاه تربیت مدرس
***دکترای ایمونولوژی دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
****دکترای ایمونولوژی استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
*****کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
تاریخ تصویب: ۸۷/۷/۳

*دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس
***دکترای ایمونولوژی دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
****دکترای ایمونولوژی استادیار دانشگاه تربیت مدرس
*****مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران
تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱
تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۶/۱۸

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 اثر سرطان 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 می‌گذراند اما افق جدیدی برای درمان سرطان در آینده نزدیک می‌تواند باشد (۴،۳،۲،۱). در ایمونوتراپی تومور که بیشتر به مفهوم ایمونوتراپی فعال تومور می‌باشد می‌تواند بصورت Therapeutic immunotherapy یا ایمونوتراپی درمان کننده و Prophylactic immunotherapy یا ایمونوتراپی پیش‌گیری 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 (۵، ۶) که یکی از آنها استفاده از واکسن‌های بنام HSP based vaccine می‌باشد که اخیرا به عنوان واکسن به کار می‌روند. عوامل مختلفی به عنوان القاء کنندگان پروتئینهای شوک حرارتی می‌باشند که از این عوامل می‌توان به اشعه، حرارت، عفونت‌ها، کنسر‌ها و غیره اشاره کرد. این مولکول‌ها نقش‌های مختلفی را در سلول برعهده دارند (۷). در پستانداران پروتئین‌های 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 C-ترمینال به غشاء شبکه اندوپلاسمی و از قسمت N-ترمینال در محل اسید آمینه‌های ۶۳۰-۶۲۴ به پپتید متصل می‌شود با جدا کردن این پروتئین از سلول می‌توان پپتید‌های توموری متصل به آن را هم از سلول جدا کرد (۸، ۹، ۱۰). نقش ایمونولوژیک آن به این صورت است که این مولکول پس از ورود به بدن به مولکول CD91 موجود در سطح سلولهای APC متصل می‌شود و از طریق اندوسیتوز وابسته به رسپتور وارد سلول عرضه کننده آنتی ژن می‌شود. در مرحله بعد مجموعه گلیکو پروتئین ۹۶ کیلو دالتون و پپتید متصل به آن وارد مسیر MHC-I می‌شود و از طریق عرضه متقاطع یا Cross presentation به سلول‌های T cell CD8+ یا Cytotoxic T Lymphocyte عرضه می‌شود که در نهایت می‌تواند پاسخ قوی را علیه تومور ایجاد نماید (۱۱، ۱۲). با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه ایمونوتراپی تومور، در بسیاری از موارد ایمونوتراپی تومور با شکست مواجه می‌گردد چرا که توموراز نظر ایمونولوژیک یک بافت فعال نمی‌باشد و حتی می‌تواند 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 می‌گردد استفاده از ادجوان‌های مناسبی می‌باشد که بتواند بصورت سینرژیک اثر بخشی واکسن را تقویت نماید. از ادجوان‌هایی که جدیداً در واکسینولوژی به آنها توجه شده علاوه بر ادجوان‌های بیولوژیک مانند سایتوکا این‌ها، ادجوان‌های فارماکولوژیک می‌باشند که در این بین می‌توان به آنتاگونیست‌های گیرنده‌های سیستم اپیوئیدی اشاره کرد. اپیوئیدها ترکیباتی هستند که به دو دسته اندوژن و

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 تأیید شد.

توموری کردن موش ها

برای توموری کردن موش راههای مختلفی وجود دارد که یکی از آنها استفاده از مواد شیمیایی مانند متیل کلاترین 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 موش های BALB/C ماده خریداری شده از انستیتو پاستور با سن شش هفته بوسیله 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 هر کدام به فاصله یک هفته یک بار و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر 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 ۵/۰ 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

اگزوزن 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 دارد که علاوه بر سلولهای عصبی در سطح سایر سلولهای بدن از جمله سلول های سیستم ایمنی هم یافت می شود (۱۳و۱۴و۱۵و۱۶). در تحقیقات زیادی ذکر شده که اپیوئیدها چه از نوع اندوژن و چه از نوع اگزوزن می توانند بر جنبه های مختلف سیستم ایمنی از جمله شیفث 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 شیفث Th0 به سمت Th2 جلوگیری 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 فیروسارکوما کشت داده شد سپس برای لیز کردن سلول ها از روش سونیکه کردن استفاده شد. رسوب دهی پروتئین ها 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

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

ارزیابی اثربخشی واکسیناسیون

الف) بررسی حجم تومور

جهت ارزیابی اثر واکسیناسیون بر روی اندازه 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 $W1 \times W2 \times W3 \times 3.14/6$ محاسبه و ثبت گردید.

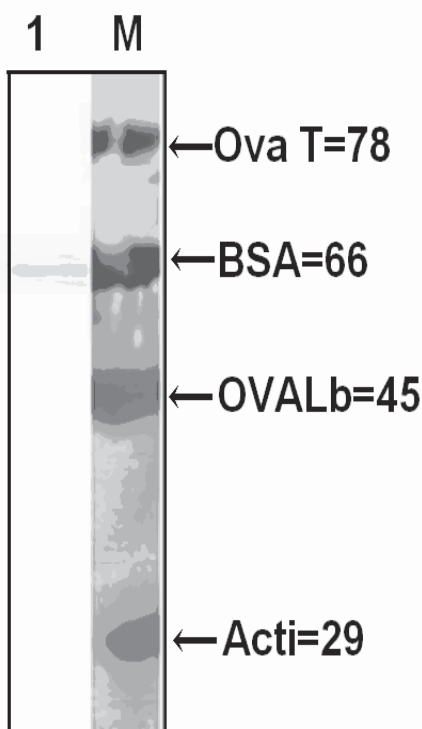
ب) تست سنجش سایتوکاین

برای ارزیابی اثر واکسیناسیون بر جمعیت سلولهای ایمنی و پروفایل سیتوکاینی القاء شده ابتدا موش ها 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 سی سی تهیه شد. محلول آنتی ژن حاوی ۶۰ میکروگرم در سی سی از کمپلکس gp96-tumor peptide تهیه و محلول میتوزن حاوی ۸ میکرو گرم در سی سی از فیتوهمگلوتنین 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 ۱۰۰۰۰۰ سلول (در حجم ۵۰۰ میکرولیتر) به هر چاهک منتقل گردید. سپس به چاهک کنترل مثبت ۵۰۰ میکرولیتر از فیتوهمگلوتنین (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 ترازولیوم 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



شکل شماره ۱: وسترن بلات از نمونه‌های 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 روزهای 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 تومور بسیار کم بوده ولی با افزایش 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 معنی دار نمی باشد. نتایج مذکور در جدول شماره یک نشان داده شده اند.

(برای هر موش ۹ چاهک در نظر گرفته شد) به چاهک های کنترل منفی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و به چاهک های کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول میتوزن فیتوهمگلوتنین و برای چاهک های تست نیز ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی ژنی اضافه گردید. دانسیته سلولی و غلظت محلول آنتی ژن و میتوزن دقیقاً 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 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 الیزا ریدر با مارک ER-500 اندازه گیری می شود.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل 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 از این مولکول که در این 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 مربوطه نشان داده شده است.

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

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

افزایش دارد ولی این افزایش از نظر آماری معنی دار نمی باشد. نتایج مذکور در جدول شماره دو نشان داده شده اند.

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

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

گروه موش ها	بافر	انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	P value	Gp ۹۶	انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	P value	Gp ۹۶ با تالوکسان	انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	P value
۱/۸ $\pm$ ۰/۹	۲/۲ $\pm$ ۰/۸	۰/۸۳	۲/۸ $\pm$ ۱/۲	۰/۵۰	۲/۳ $\pm$ ۱/۷	۰/۱۳	۲/۳ $\pm$ ۱/۷	۰/۱۳	۲/۳ $\pm$ ۱/۷	۰/۱۳	۲/۳ $\pm$ ۱/۷	۰/۱۳

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

گروه ها	فیتو همالوئینین	آنتی ژن	بدون محرک	P value
بافر (کنترل)	۷/۲۹ $\pm$ ۲/۴۶	۵/۱۶ $\pm$ ۳/۵۱	۱/۳۸ $\pm$ ۰/۹۸	۱
تالوکسان	۳/۴۳ $\pm$ ۲/۱۵	۲/۲۰ $\pm$ ۴/۳۳	۱/۷۷ $\pm$ ۰/۹۶	۰/۱۱۹
Gp ۹۶	۳/۸۸ $\pm$ ۲/۷۳	۳/۰۸ $\pm$ ۳/۳۸	۱/۳۲ $\pm$ ۱/۲۵	۰/۲۸۶
Gp ۹۶ با تالوکسان	۱/۶۵ $\pm$ ۰/۹۸	۱/۱۵ $\pm$ ۱/۰۸	۱/۵۷ $\pm$ ۱/۳۰	< ۰/۰۵

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

نتایج حاصل از سنجش اینترفرون گاما با استفاده از کیت الایزا نشان داد که که فیتو هماگلوتنین 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 شماره ۴: نتایج حاصل از سنجش اینترفرون گاما در گروه های کنترل و تست

گروه ها	فیتو هماگلوتنین	آنتی ژن	بلون محرک	P value
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	
بافر (کنترل)	107/01 ± 34/33	5/60 ± 3/63	1/86 ± 1/17	1
نالوکسان	151/36 ± 33/04	30/13 ± 9/68	2/33 ± 1/14	0/146
Gp 96	121/04 ± 21/61	129/46 ± 29/41	1/89 ± 1/50	< 0/05
Gp 96 با نالوکسان	159/83 ± 32/13	195/39 ± 52/58	2/19 ± 1/17	< 0/05

بحث

باتوجه به اهمیت سرطان محققین توجه زیادی برای درمان آن داشته اند و از جمله درمان سرطان با استفاده از واکسن های 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 سلول های 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 اویوئیدی 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. در این مطالعه نشان داده شده که مولکول های GP96 بصورت یک خانواده مولکولی با وزن های 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 سلول های 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 دیگر که در سال ۲۰۰۰ انجام شد مشاهده گردید که تزریق نالوکسان بصورت زیر جلدی در دوز

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 اثرمهراری 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

- 5 mg/kg 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 ۵ mg/kg 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

- 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, et al. 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 , et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with Autologous tumor derived heat shock protein gp96- peptide complex. *j of clini onco* 2002; 20(20): 4169 – 4180.