Original Article

Study of Immunotherapy with Endogenous Opiod (Met-Enkephalin) Activated TILs in Fibrosarcoma Induced Balb/C Mice

Abbas Ali Amini, M.Sc.[1], Jamshid Hajati, Ph.D.[1], Mohammad Vodjgani, Ph.D.[1], Zahra Gheflati, B.Sc.[1], Afshin Namdar, M.Sc.[1], Marziyeh Holakuei, M.Sc.[2], Nematollah Khansari, Ph.D.[1]*

1. Immunology Department, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Immunology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 141761351, Immunology Department, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: nematkhansari@yahoo.com

Received: 18/Aug/2008, Accepted: 18/Mar/2009

Abstract

Objective: In this study the effects of met-enkephalin on tumor infiltrating lymphocytes for cancer treatment in fibrosarcoma bearing mice has been evaluated.

Materials and Methods: Initially, splenocytes were cultured with several doses of met-enkephalin to obtain the most effective dose and treating time on (for?) the induction of CD25. Flow cytometry was used to evaluate CD25 expression. The best dose and treating time were used to stimulate Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs). TILs were taken from tumors by enzymatic tissue disaggregation and purified by magnet bead cell separation in order to obtain pure CD4+ and $CD8^+$ cells. After TILs stimulation they were re-injected into three groups of other fibrosarcoma bearing mice. The first group received only $CD4^+$ TILs, whereas the second group received only $CD8^+$ TILs, and the third group received both $CD4^+$ and $CD8^+$ TILs. A fourth group that served as the control group received PBS. The effect of this treatment on tumor volume, mice survival, effector cells, regulatory T cells and Bcl-2 levels (?) were evaluated. One way ANOVA followed by the Tukey test was used to analyze data in both the experimental and control groups. P value below 0.05 was considered significant.

Results: Treatment with met-enkephalin at a dose of (?) 10^{-1}0M/6 hours (I don't understand this part about "hours"?) was most effective in CD25 induction on the splenocytes of Balb/C mice. There was a significant decrease in tumor growth in both the $CD8^+$ and $CD4^+$ activated TILs injected groups ($p=0.044$ and $p=0.017$, respectively). The result of the $CD4^+$ plus $CD8^+$ activated TILs injected group (group three?) was not significant ($p=0.661$). There was an improvement in survival amongst the mice in all treated groups ($p<0.001$ for all three groups). FoxP3 levels in all groups were significantly low ($p<0.001$, $p=0.002$ and $p<0.001$ for the $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+$ plus $CD8^+$ activated TILs injected groups, respectively). CD25 and Bcl-2 expressions were higher in the treated groups, but only the $CD4^+$ activated TILs injected group was significant ($p=0.002$ for CD25, $p<0.001$ for Bcl-2).

Conclusion: Met-Enk could be a potential new factor for activating lymphocytes *in vitro*.

Keywords: Met-Enkephalin, Fibrosarcoma, Tumor Infiltrating Lymphocytes, Bcl-2, Treg

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 408-417

بررسی ایمونوتراپی با لنفوسیت‌های ارتشاحی در تومور فعال شده به همراه مت- انکفالین در موش‌های Balb/C مبتلا به فیبروسارکوما

عباس‌علی امینی .M.Sc[1]، جمشید حاجتی .Ph.D[1]، محمد وجگانی .Ph.D[1]، زهرا غفلتی .B.Sc[1]، افشین نامدار .M.Sc[1]، مرضیه هلاکویی .M.Sc[2]، نعمت ا... خوانساری .Ph.D[1*]

۱. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی، تهران، ایران
۲. انستیتو پاستور ایران، گروه ایمونولوژی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق‌پستی: ۱۴۱۷۶۱۳۵۱، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: nematkhansari@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۷/۵/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۸

چکیده

* **هدف:** تعیین اثر فعال‌سازی لنفوسیت‌های ارتشاحی در تومور با مت- انکفالین به صورت *in vitro* و اثر آن بر رشد تومور تجربی

* **مواد و روش‌ها:** این تحقیق روی موش Balb/C ماده انجام شد. موش‌های توموری به طور توام، لنفوسیت‌های ارتشاحی در تومور خالص شده را بعد از فعال شدن با مت- انکفالین، در سه حالت $CD4^+$، $CD8^+$ و $CD4^+$+$CD8^+$ دریافت کردند. روند رشد تومور، بقای موش‌ها، سطح سلول‌های تنظیمی و سلول‌های عامل و سطح Bcl-2 برای هر گروه بعد از درمان اندازه‌گیری شد.

* **یافته‌ها:** مت- انکفالین باعث افزایش بیان CD25 در سطح سلول‌های طحالی موش‌ها با دوز 10^{-10} میکرون در ۶ ساعت گردید. سرعت رشد تومور در گروه‌های دریافت کننده (Tumor Infiltrating Lymphocytes; TIL)های $CD4^+$ و $CD8^+$ به شدت کاهش یافت (در هر گروه ۱۲ سر موش قرار داشت که ۶ سر برای تعیین روند رشد تومور و بقا و ۶ سر دیگر برای انجام تست‌های زیر مورد استفاده قرار گرفتند). همه گروه‌ها افزایش بقای معنی‌داری نشان دادند. سطح مارکر FoxP3 در سلول‌های طحالی همه گروه‌ها به طور معنی‌داری کمتر بود ($p<0/001$، $p=0/002$ و $p<0/001$ به ترتیب برای گروه‌های دریافت کننده TIL $CD4^+$، TIL $CD8^+$ و TIL $CD4^+$+$CD8^+$). سطح Bcl-2 در گروه‌های TIL $CD4^+$ و TIL $CD4^+$+$CD8^+$ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (به ترتیب $p<0/001$ و $p=0/017$). سطح مارکر CD25 فقط در گروه TIL $CD4^+$ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ($p=0/002$). نتایج با One Way ANOVA و آزمون Tukey آنالیز شده‌اند. $p<0/05$ به عنوان نتیجه معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

* **نتیجه‌گیری:** از نتایج فوق چنین برمی‌آید که می‌توان مت- انکفالین را به عنوان یک عامل ضد تومور بالقوه به حساب آورد.

* **کلیدواژگان:** مت- انکفالین، فیبروسارکوما، لنفوسیت ارتشاحی در تومور، Bcl-2، Treg

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ٤، زمستان ٨٨، صفحات: ٤١٧-٤٠٨

مقدمه

از قرن‌ها پیش، اپیوم برای کنترل درد، اسهال، سرفه و ایجاد نشاط مورد استفاده قرار گرفته است. اپیوم حاوی بیش از ۲۰ نوع آلکالوئید مختلف است. مورفین زودتر از بقیه کشف شد. اپیوییدهای درون‌زاد، ترکیباتی با ساختمان پپتیدی هستند که در بدن تولید می‌شوند و لیگاند طبیعی پذیرنده‌های اپیوییدی می‌باشند. این ترکیبات نقش مشابهی با برخی از فراورده‌های اپیوم دارد. در سال ۱۹۷۵ محققی به نام هوگس، یک فاکتور درون‌زاد را با خواص اپیوییدی کشف کرد و آن را انکفالین (Enkephalin) نامید (۱). پس از آن دو خانواده دیگر یعنی اندروفین‌ها و دینورفین‌ها نیز شناسایی شدند(۲). هر یک از سه خانواده اپیوییدی درون‌زاد، از یک پیش ساز مجزا منشا می‌گیرند. انکفالین‌ها (Methionin-Enkephalin و Leucine-Enkephalin) از Prepro-enkephalin، اندروفین‌ها(β-اندروفین) از Proopiomelanocortin و دی‌نورفین‌ها از Preprodynorphin مشتق می‌شوند. هر پیش ساز به وسیله یک ژن مجزا کد می‌شود. سه نوع پذیرنده کلاسیک برای اپیوئیدها شناسایی شده که به ترتیب μ، δ و K نامیده می‌شوند (۳) و به صورت KOR، MOR و DOR یا op2(K) ، op1(δ) و op3(μ) نیز نشان داده می‌شوند. هر سه پذیرنده به خانواده پروتیین‌های متصل شونده به GTP (G-Protein) تعلق دارند. اثرات اپیوییدها بر سیستم ایمنی اولین بار توسط ویبران در سال ۱۹۷۹ مورد مطالعه قرار گرفت. وی دریافت که مورفین، توانایی سلول‌های T را در تشکیل Roset با گلبول‌های قرمز گوسفند کاهش می‌دهد و نالوکسان این اثر را خنثی می‌کند (۴). در این مطالعه علاوه بر تاثیر اپیوییدها بر سیستم ایمنی، وجود پذیرنده‌های اپیوییدی بر سطح سلول‌های ایمنی نیز مورد تایید قرار گرفت. اپیوییدها به واسطه نقش تعدیلی که بر اعمال مختلف سلول‌های ایمنی اعمال می‌کنند در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها - که در آنها سیستم ایمنی نقش مراقبت را ایفا می‌کند - اهمیت ویژه‌ای دارند. برخی از اپیوییدها خواص ضدسرطانی دارند. مت - انکفالین در محیط کشت، رشد تومور پانکراس انسان و سلول‌های نوروبلاستومای انسان را مهار می‌کند (۵، ۶). مت - انکفالین در آزمایشات درون تنی نیز مانع رشد تومور مغزی و سبب افزایش

طول عمر حیوان می‌شود(۷). مطالعات متعددی تغییر سطح یا فعالیت اپیوییدهای اندوژن را در انواعی از سرطان‌ها نشان داده‌اند. بر اساس گزارش اسمیت و همکاران، در مبتلایان به سرطان پانکراس سطح مت – انکفالین تا ۷ برابر نرمال افزایش می‌یابد (۸). در تومورهای مغزی انسان و همین طور مایعات کیستی وابسته به آن نیز افزایش پپتیدهای اپیوییدی اندوژن گزارش شده است(۹). علاوه بر سطح اپیوییدها، فعالیت این ترکیبات نیز در سرطان‌ها سبب تغییر می‌شود (۱۰). لنفوسیت‌های T نقش کلیدی در ایمنی بر ضدتومور دارند. از این رو آنها ابزار مناسبی را برای ایمونوتراپی سرطان فراهم می‌کنند. در ایمونوتراپی غیرفعال، لنفوسیت‌های T با عملکرد ضدتوموری به میزبان حامل تومور انتقال داده می‌شوند. درمان موفق به نوع سلول T فعال شده به بیمار انتقال می‌یابد. عملکرد و توانایی آنها در رسیدن به مکان تومور و توانایی این سلول‌ها در غلبه بر هر نوع تحمل یا سرکوب ایمنی در میزبان بستگی دارد (۱۱). بررسی‌هایی که در میان دهه‌های گذشته انجام شده نشان داده‌اند که ایمنی بر اساس سلول T ممکن است پیشرفت تومور را محدود کند و حتی باعث عدم پیشرفت تومور گردد. در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که ارتشاح لنفوسیت‌های T که علیه تومور واکنش نشان می‌دهند، برای عدم رشد موثر تومور مورد نیاز است (۱۲). نوع سلول‌های T که در ایمونوتراپی مورد استفاده قرار می‌گیرند ممکن است پاسخ‌های ایمنی و به دنبال آن پاسخ‌های ضد توموری را تقویت نمایند. با توجه به اینکه در مطالعات قبلی اثر مت – انکفالین به صورت *in vivo* بررسی شده و مطالعات بسیاری اثر مستقیم این اپیوید را هم بر روی سلول‌های سرطانی (۱۶-۱۳) و هم بر روی لنفوسیت‌ها اثبات نموده‌اند؛ در مطالعه حاضر سعی شده است لنفوسیت‌ها به صورت *in vitro* با مت – انکفالین فعال شوند تا بدون تداخل با سیر طبیعی رشد تومور، توانایی لنفوسیت‌های فعال شده با مت – انکفالین در مقابله با تومور به صورت *in vivo* نشان داده شود.

مواد و روش ها

موش

موش‌های Balb/C ماده با سن ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. وقتی موش‌ها به سن ۱۴-۱۲ هفته‌ای رسیدند، مطالعه آغاز شد.

تومور

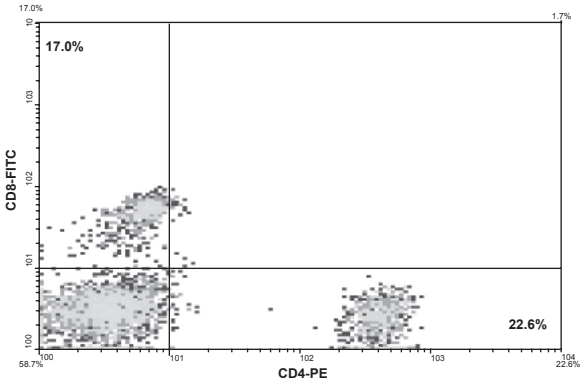
رده سلولی Wehi-164 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای ایجاد تومور به هر موش $2*10^6$cell/100µl به صورت زیر جلدی به پهلوی راست تزریق شد. بعد از مرحله درمان (که ۹ روز بعد انجام شد)، اندازه‌گیری ابعاد تومور شروع شد. طول یا بیشترین قطر (L) و عرض یا کمترین قطر (W) تومور با کولیس به صورت یک روز در میان اندازه‌گیری شد. برای نشان دادن روند رشد تومور از حجم تومور استفاده به عمل آمد. حجم تومور طبق فرمول $TV=(L\times W^2)/2$ محاسبه گردید(۱۷).

هضم تومور

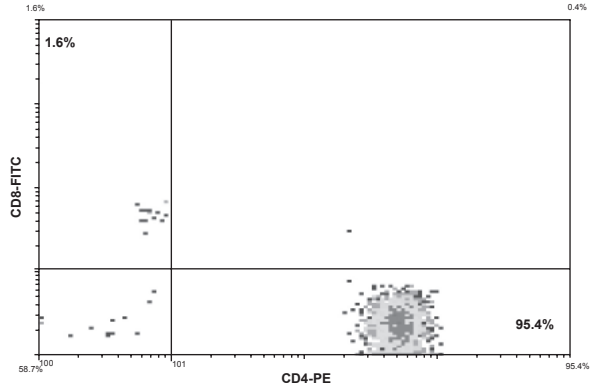
۳۰ روز بعد از توموری کردن موش‌هایی که باید لنفوسیت‌های ارتشاحی از آنها تهیه می‌شد، در شرایطی که قطر اکثر تومورها ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر بود، تومورها در شرایط استریل از موش‌ها خارج شده، با اسکالپل به قطعات کوچک خرد گردیده و به مدت ۲ ساعت در محلولی حاوی کلاژناز نوع یک (۰/۰۲۵درصد)، نوع چهار (۰/۰۲۵درصد)، و DNase I (۰/۰۰۲درصد) (هر سه از Sigma)، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند. سلول‌های به دست آمده دو بار با RPMI-1640 شست‌وشو داده شده و از مش ۴۰ میکرومتر عبور داده شدند. در این مرحله درصد زنده بودن سلول‌ها با تریپان‌بلو تعیین شد که در حدود ۸۵ درصد بود.

مگنت بید

از بید شرکت Macs برای خالص‌سازی لنفوسیت‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ ارتشاحی در تومور استفاده به عمل آمد. برای تعیین کیفیت کارکرد کیت Macs، از لنفوسیت‌های طحال استفاده شد. با تزریق محیط کشت به درون طحال، سلول‌ها آزاد گشته و گلبول‌های قرمز به کمک کلرورآمونیوم لیز شده و لنفوسیت‌ها با بید تخلیص شدند. درصد لنفوسیت‌های CD4 و CD8 قبل و بعد از جداسازی به کمک فلوسایتومتر تعیین شد که بالای ۹۵ درصد بود (شکل ۱).



درصد سلول‌های CD4 و CD8 قبل از خالص‌سازی با بید



درصد سلول‌های CD4 و CD8 بعد از جداسازی با بید

شکل ۱: برای تعیین کیفیت کارکرد کیت Macs، خلوص سلول‌های CD4 و CD8 طحال قبل و بعد از جداسازی مورد ارزیابی قرار گرفت. لنفوسیت‌ها به کمک آنتی‌بادی‌های منوکلونال برای مارکرهای CD4 و CD8 نشان‌دار شدند. با فلوسایتومتر درصد هر یک از سلول‌های فوق قبل و بعد از جداسازی تعیین شد (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).

مت– انکفالین

از مت – انکفالین تولید شده توسط شرکت Sigma استفاده شد.

تیمار با مت- انکفالین

برای به دست آوردن دوز و زمان بهینه تیمار با مت - انکفالین از بیان CD25 روی لنفوسیت‌های طحال استفاده به عمل آمد. سوسپانسیون سلولی طحال بعد از لیز شدن گلبول‌های قرمز به کمک کلرورآمونیوم، در محیط کشت (۳۷ درجه و CO_2 ۵ درصد)، در حضور دوزهای 10^{-5} تا 10^{-11} مول مت - انکفالین به طور جداگانه کشت داده شدند. در زمان‌های قبل از تیمار، ۱۲-۱، ۱۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت تیمار، از هر کدام تعدادی سلول (در حدود 10^5 سلول) برداشته و برای CD25 رنگ‌آمیزی شده و با فلوسایتومتر آنالیز گردید. بالاترین سطح بیان CD25 بعد از ۶ ساعت تیمار با 10^{-10} مول ایجاد گردید و بعد از آن روند نزولی به خود گرفت. مدت زمان و دوز بهینه مذکور به لنفوسیت‌های ارتشاحی در تومور تعمیم داده شد.

درمان موش‌ها

برای هر گروه ۱۲ سر موش در نظر گرفته شد. ۹ روز بعد از توموری کردن موش‌ها در شرایطی که تومورها قطری در حدود ۹-۴/۵ میلی‌متر داشتند، مرحله درمان موش‌ها با لنفوسیت‌های ارتشاحی آغاز شد. برای این منظور لنفوسیت‌های ارتشاحی در تومور $CD4^+$ و $CD8^+$ بعد از هضم تومور به کمک بید تخلیص شده و سپس TILهای خالص $CD4^+$ و $CD8^+$ جداگانه کشت داده شده، دو بار با RPMI-1640 شست‌وشو داده شده و در RPMI-1640 با غلظت $5*10^6$ cell/ml به حالت سوسپانسیون درآورده و به هر موش 10^6 cell/200µl به صورت زیرجلدی به پهلوی راست به ناحیه اطراف تومور تزریق شد؛ یک گروه فقط TILهای $CD4^+$، یک گروه فقط TILهای $CD8^+$ و گروه سوم به طور هم‌زمان TILهای $CD4^+$ و $CD8^+$ را دریافت کرد. البته به گروهی که TILهای $CD4^+$ و $CD8^+$ را به طور هم‌زمان دریافت می‌کرد، از هر کدام از سلول‌ها 10^6 سلول و در کل 2×10^6 سلول تزریق شد. گروه کنترل هم ۲۰۰ میکرولیتر، PBS دریافت کرد.

رنگ آمیزی مارکرهای سطحی سلول

Anti-mouse: CD4-FITC (eBioscience), CD25- PE (eBioscience)

برای آنالیزهای فلوسایتومتری، همه گروه‌ها ۱۰ روز بعد از تیمار با لنفوسیت‌های ارتشاحی، به دو قسمت تقسیم و از هر گروه ۶ سر موش خارج و برای بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. سوسپانسیون سلول‌های طحالی موش‌ها همانند روش گفته شده در قسمت تیمار با مت - انکفالین تهیه شد. از سلول‌های سوسپانسیون طحالی، 10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محلول به حالت سوسپانسیون درآورده و از رنگ‌های فوق به مقدار معین به آنها افزوده و به مدت نیم ساعت در سرما انکوبه و سپس شست‌وشو داده شد و با فلوسایتومتر (Becton Dickinson) به صورت دو رنگ آنالیز گردید.

رنگ‌آمیزی مارکرهای درون سلولی

الف. کیت Treg موشی (eBioscience)

(FITC CD4, PE-Cy5 FoxP3) طبق پروتوکل، ابتدا مارکر سطحی CD4 رنگ‌آمیزی شد. سپس غشای سلول‌ها با بافر تراوا کننده برای ورود آنتی‌بادی‌های FoxP3 به درون سلول، تراوا و تثبیت گردید. سپس مارکر FoxP3 رنگ‌آمیزی شد. بعد از شست‌وشوی رنگ اضافی، در حجم مناسب از بافر رنگ آمیزی فلوسایتومتری، به حالت سوسپانسیون درآورده و با فلوسایتومتر (Becton Dickinson) به صورت دو رنگ آنالیز شد.

ب. پروتیین ضد آپوپتوز FITC Bcl-2 (eBioscience)

همانند روش رنگ‌آمیزی FoxP3 عمل شد، ولی در این مدل مارکر سطح سلولی رنگ‌آمیزی نشد و به جای FoxP3، مارکر Bcl-2 رنگ‌آمیزی گردید. این مارکر به صورت تک رنگ و فقط برای Bcl-2 رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه Becton Dickinson آنالیز شد.

این طرح در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب شده است.

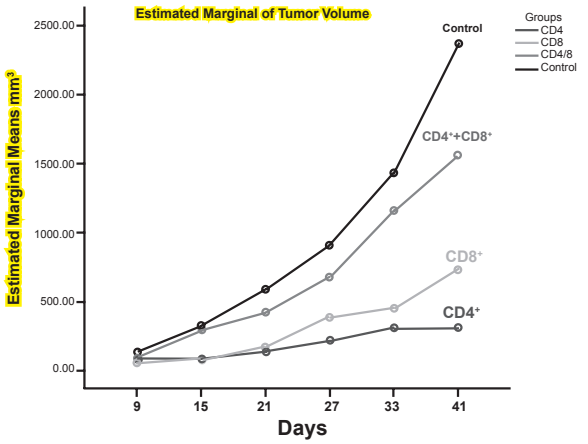
آنالیز آماری

از winMDI2.9 و SPSS برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. جهت مقایسه بین گروه‌ها از One Way ANOVA و آزمون Tukey و همچنین از Chi-Square Tests استفاده گردید. تعدادی از نمودارها با Excel طراحی گردید. نتایج با $p<0/05$ به عنوان نتایج معنی‌دار تلقی شده‌اند.

یافته ها

اندازه‌گیری تومور

مطابق نمودار ۱، گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده با مت - انکفالین و گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ فعال شده رشد تومور کمتری نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده TIهای $CD4^+$+$CD8^+$ فعال شده به طور هم‌زمان، داشتند.



نمودار ۱: تاثیر TILهای فعال شده با مت- انکفالین روی رشد تومور فیبروسارکوما. در هر گروه ۶ سر موش Balb/C قرار داشت که به صورت زیر جلدی با 2×10^6 سلول Wehi-164 توموری شده (روز صفر) و در روز ۹ به صورت زیر جلدی با TILهای فعال شده با مت- انکفالین درمان شدند. گروه اول 10^6 $CD4^+$ TILs فعال شده ، گروه دوم 10^6 $CD8^+$ TILs فعال شده، گروه سوم 10^6 $CD4^+$ TILs به همراه 10^6 $CD8^+$ TILs (روی هم رفته 2×10^6 TILs) فعال شده با مت- انکفالین و گروه چهارم PBS دریافت کرد. رشد تومور از روز ۹ تا ۵۳ اندازه‌گیری شد که در نمودار تا روز ۴۱ نشان داده شده است. نمودار متوسط تغییرات حجم تومور را برای گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که با فرمول $(W2)^2/2 \times L$ محاسبه شده است (مشاهده نمونه رنگی نمودار در انتهای مقالات).

گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ و گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ فعال شده با مت - انکفالین به طور معنی‌داری رشد تومور کمتری را در مقایسه با گروه کنترل داشتند (به ترتیب $p=0/017$ و $p=0/044$). بر خلاف اینکه گروه اول رشد تومور کمتری داشت، از نظر آماری اختلاف چندانی با گروه دوم نداشت ($p=0/970$). گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده با اینکه سرعت رشد آن نسبت به گروه $CD4^+$+$CD8^+$ به طور قابل توجهی کمتر بود، ولی معنی‌دار نبود

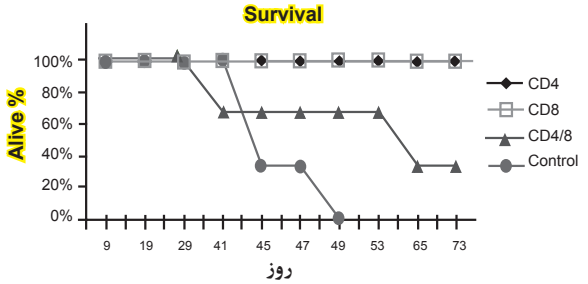
(p=۰/۱۷۰). جالب آنکه گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده با اینکه رشد تومور آن نسبت به گروه کنترل کاهش داشت، ولی برخلاف انتظار کاهش رشد تومور کمتر از از دو گروه درمان شده دیگر بود و کاهش رشد تومور آن معنی‌دار نبود (p=۰/۶۶۱). در کل اختلاف بین گروه‌های درمان شده، معنی‌دار بود (p=۰/۰۱۲). در ضمن در هر سه گروه درمان شده فوق، ۱ سر موش تحلیل کامل تومور را نشان دادند.

اثر درمان اعمال شده بر بقای حیوانات مبتلا به تومور

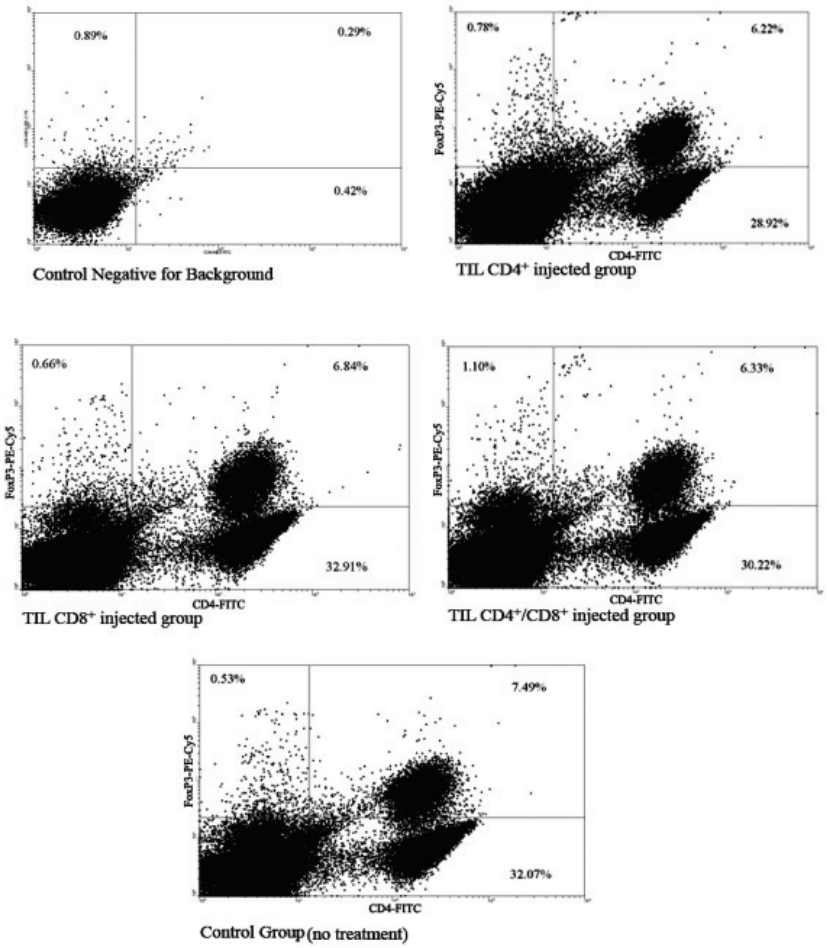
با توجه به اینکه مدل توموری به کار رفته ازنوع کشنده نبود، برای ارزیابی مدت بقای موش‌ها در گروه‌های مختلف، به طور قراردادی رسیدن قطر تومور به ۴۰۰ میلی‌متر مربع به عنوان زمان مرگ در نظر گرفته شد و در این زمان حیوان معدوم گردید.

بیشترین زمان بقا مربوط به گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده با مت – انکفالین و گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ فعال شده بود، گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده بقای کمتری نسبت به دو گروه اول داشتند (نمودار۲).

۴۰ روز بعد از توموری کردن موش‌ها که روز مرگ آخرین موش گروه کنترل (بدون درمان) بود، در گروه درمان شده با TIهای $CD4^+$ و $CD8^+$ همه موش‌ها (۱۰۰درصد) و در گروه درمان شده با $CD4^+CD8^+$ (۶۷درصد) زنده بودند (برای هر سه گروه نسبت به گروه کنترل، p> ۰/۰۰۱ بود).



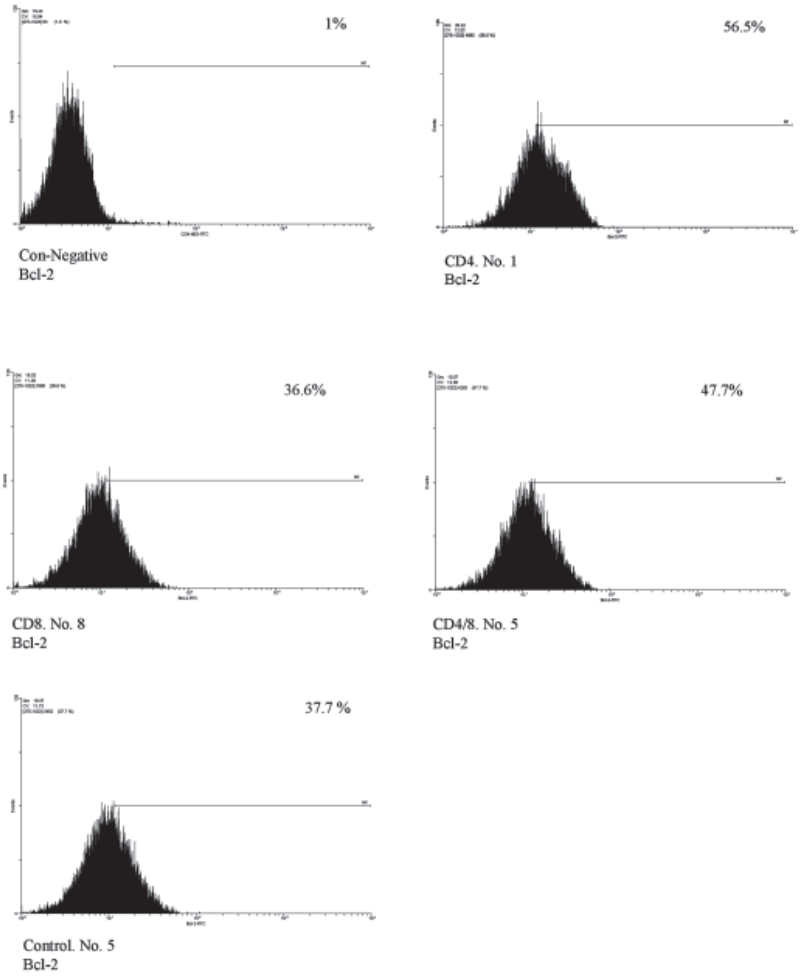
نمودار ۲: بقای موش‌ها در گروه‌های مختلف (برای همه گروه‌ها n=۶). ۴۵ روز بعد از تومورزایی، گروه‌های دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده با مت- انکفالین و TILهای $CD8^+$ فعال شده با مت- انکفالین میزان بقای ۱۰۰درصد داشتند در حالی که گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده بقای ۶۷درصد داشت. ۷۳ روز بعد، در دو گروه اول میزان بقا همچنان ۱۰۰درصد بود که در گروه سوم به ۳۳درصد کاهش یافته بود. موشی با اندازه تومور ۴۰۰mm2، مرده در نظر گرفته شده است (مشاهده نمونه رنگی نمودار در انتهای مقالات).



شکل ۲: نتایج فلوسایتومتری میزان سلول‌های تنظیمی در طحال موش‌های مورد مطالعه، سلول‌های $CD4^+FoxP3^+$ سلول‌های تنظیمی هستند. نمونه‌ها در گیت لنفوسیت در FSC و SSC آنالیز شده‌اند. برای هر نمونه ۱۰۵ سلول توسط فلوسایتومتر آنالیز شده است.

جدول ۱: درصد CD25، FoxP3 و Bcl-2 در گروه‌های مختلف به همراه انحراف معیار و P-value

گروه‌ها	FoxP3		CD25		Bcl-2	
	درصد FoxP3 ± انحراف معیار	P. Value	درصد CD25 ± انحراف معیار	P. Value	درصد Bcl-2 ± انحراف معیار	P. Value
گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$	۶/۶۰ ± ۰/۲۹	p<۰/۰۰۱	۲۹/۹۲ ± ۱/۸۲	p<۰/۰۰۲	۴۸/۸۷ ± ۶/۷۱	p<۰/۰۰۱
گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$	۶/۸۹ ± ۰/۳۲	p<۰/۰۰۲	۲۷/۵۲ ± ۱/۳۳	p<۰/۱۷۵	۳۸/۹۷ ± ۴/۱۴	p<۰/۹۵۲
گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$+$CD4^+$	۶/۵۹ ± ۰/۲۳	p<۰/۰۰۱	۲۶/۶۴ ± ۰/۵۷	p<۰/۵۵۴	۴۵/۵۷ ± ۱/۹۲	p<۰/۰۱۷
گروه کنترل	۷/۴۹ ± ۰/۰۱	p<۱/۰۰۰	۲۵/۱۹ ± ۲/۹۶	p<۱/۰۰۰	۳۷/۷۳ ± ۰/۸۵	p<۱/۰۰۰



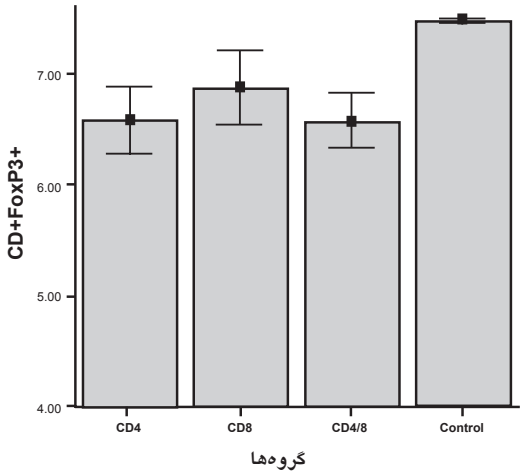
شکل ۳: نمودار هیستوگرام سطح Bcl-2 در گروه‌های مختلف. کنترل منفی ۱ درصد در نظر گرفته شده است. نمونه‌ها در گیت لنفوسیت در FSC و SSC آنالیز شده‌اند. برای هر نمونه 10^4 سلول طحالی به صورت تک رنگ توسط فلوسایتومتر آنالیز شده است.

میزان سلول‌های Treg در موش‌های مورد مطالعه

با توجه به اینکه سلول‌های تنظیمی نقش مهمی در بقای تومور دارند، میزان سلول‌های $CD4^+FoxP3^+$ در گروه‌های مورد مطالعه بررسی شد. مطابق جدول ۱ و نمودار ۳، گروه‌های دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده و TILهای $CD8^+$+$CD4^+$ فعال شده پایین‌ترین سطح فاکتور FoxP3 را داشتند (به ترتیب ۰/۲۹ ± ۶/۶درصد و ۰/۲۳ ± ۶/۵۹). در کل همه گروه‌های درمان شده به طور معنی‌داری سطح FoxP3 کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند (برای گروه

$CD4^+$ p<۰/۰۰۱، گروه $CD8^+$ p=۰/۰۰۲ و گروه $CD4^+CD8^+$ (p<۰/۰۰۱)، ولی بین سه گروه درمان شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کنترل منفی تست فوق ۰/۲۹درصد بود.

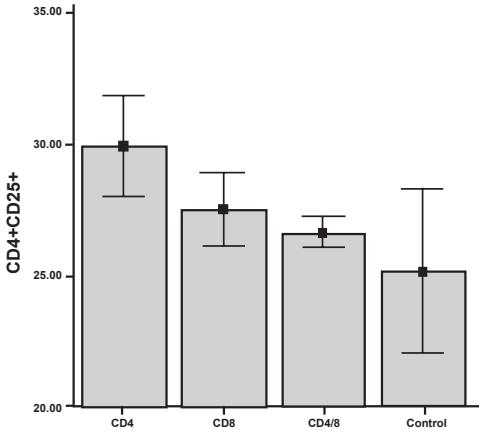
در شکل ۲ از هر یک از گروه‌ها، یک نمونه از دات پلات تست فوق نشان داده شده است. محور X مربوط به CD4-FITC و محور Y مربوط به FoxP3-PE-Cy5 می‌باشد.



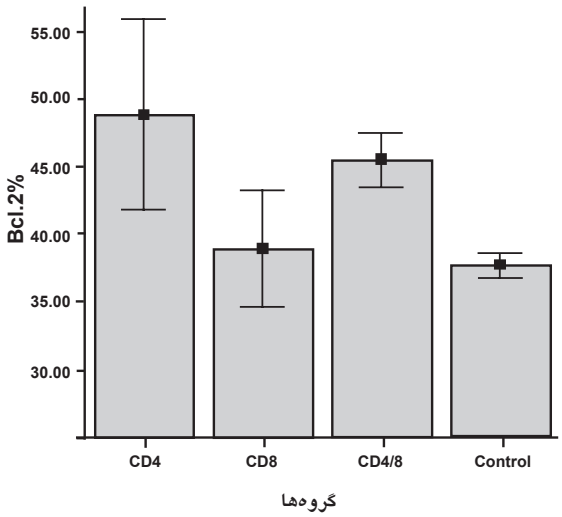
نمودار ۳: سطح FoxP3 در سلول‌های طحالی $CD4^+$ (برای همه گروه‌ها n=۶)

مارکر CD25

سطح مارکر CD25 فقط در گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال‌شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (p=۰/۰۰۲) (جدول ۱). سطح این مارکر در گروه فوق از سایر گروه‌های درمانی نیز بالاتر بود(۱/۸۲ ± ۲۹/۹۲ در مقایسه با ۱/۳۳ ± ۲۷/۵۲ گروه TILهای $CD8^+$ فعال شده و ۰/۵۷ ± ۲۶/۶۴ گروه TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده) و این اختلاف نسبت به گروه TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده معنی‌دار بود (p=۰/۰۲۹). در گروه‌های دریافت کننده TILهای $CD8^+$ و TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده، میزان افزایش مارکر فوق معنی‌دار نبود (به ترتیب p=۰/۰۱۷۵ و p=۰/۵۵۴)(نمودار۴).



نمودار ۴: سطح $CD4^+CD25^+$ در سلول‌های طحالی گروه‌های مورد مطالعه (برای همه گروه‌ها n=۶)



نمودار ۵: سطح Bcl-2 در سلول‌های طحالی گروه‌های مورد مطالعه (برای همه گروه‌ها n=۶)

مارکر Bcl-2

برای تعیین سطح Bcl-2، از سلول‌های طحالی گروه‌های مورد مطالعه استفاده شد. بالاترین سطح Bcl-2 مربوط به گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده (۶/۷۱ ± ۴۸/۸۷درصد) و پایین‌ترین آن مربوط به گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ فعال شده (۴/۱۴ ± ۳۸/۹۷درصد) بود. مطابق نمودار ۵ و جدول ۱ سطح فاکتور مزبور در گروه‌های دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده و $CD4^+CD8^+$ فعال شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۰۱ برای گروه $CD4^+$ و p=۰/۰۱۷ برای گروه $CD4^+CD8^+$).

سطح فاکتور مزبور در گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ فعال شده تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (p=۰/۹۵۲). اختلاف دو گروه فوق با گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ فعال شده نیز معنی‌دار بود (به ترتیب p=۰/۰۰۲ و p=۰/۰۵۰). در شکل ۳، از هر یک از گروه‌ها یک نمونه به صورت هیستوگرام آورده شده است.

بحث

لنفوسیت‌های T مهم‌ترین سلول‌های عامل در پاسخ ضدتوموری محسوب می‌شوند. در واقع قسمت عمده تلاش‌هایی که جهت ایمونوتراپی انجام می‌گیرد، برای افزایش توانایی و کارایی این سلول‌ها برای مقابله با سلول‌های توموری می‌باشد. از جمله روش‌هایی که برای افزایش کارایی این سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، می‌توان به استفاده از ترکیبات گوناگون مانند سایتوکاین‌های مختلف، همراهی با شیمی درمانی، پرتو درمانی و مهندسی ژنتیک سلولهای T اشاره کرد(۱۸-۲۳). در این مطالعه از یک اپیوید درون‌زاد، به نام مت- انکفالین برای افزایش توانایی سلول‌های T استفاده شد.

از آن جایی که پاسخ ایمنی اختصاصی غالب در برابر میکروارگانیسم‌های داخل سلولی و سرطان‌ها با واسطه لنفوسیت‌های TH1 و سلول‌های T سایتوتوکسیک صورت می‌پذیرد (۲۳)، این سلول‌ها تخلیص و مورد استفاده قرار گرفتند. پذیرنده IL-2 (CD25) که روی درصد کمی از سلول‌های TIL در اکثر انواع تومورها بیان می‌شود (۲۶-۲۴)، به عنوان نتیجه تحریک آنتی‌ژنی اخیر در نظر گرفته می‌شود (۲۷، ۲۸). از این رو با توجه

به توانایی مت – انکفالین در فعال کردن سیستم ایمنی (۳، ۲۹)، از CD25 به عنوان مارکری برای ارزیابی فعال شدن لنفوسیت‌ها بعد از تیمار با مت – انکفالین استفاده به عمل آمد. در این مطالعه نشان داده شد که تیمار لنفوسیت‌های T با مت – انکفالین موجب افزایش بیان CD25 در این سلول‌ها می‌گردد. سلول‌های توموری نیز روی فعالیت سیستم ایمنی تاثیر می‌گذارند و با تولید و ترشح انواع فاکتورها در مقابل سیستم ایمنی مقاومت می‌کنند. یکی از مکانیسم‌های حمله تومور به سیستم ایمنی، القای آپاپتوز در لنفوسیت‌های ارتشاحی می‌باشد (۳۵-۳۰). با توجه به اینکه نشان داده شده که بالا بودن سطح Bcl-2 در لنفوسیت‌هایی که برای ایمونوتراپی مورد استفاده قرار می‌گیرند نتایج بهتری دارد، سطح مارکر فوق به عنوان عاملی که نتیجه برایند نیروهای تقویتی و مهاری را نشان می‌دهد، اندازه‌گیری شد. بالاترین سطح Bcl-2 در گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده با مت – انکفالین بوده که با بالا بودن سطح CD25 تطابق داشت. این امر نشان می‌داد احتمالا لنفوسیت‌های گروه فوق علاوه بر توانایی بیشتر در اعمال وظایف عملکردی، در مقابل آپاپتوز نیز مقاوم هستند. یافته‌های فوق وقتی در کنار روند رشد تومور در گروه‌های درمان شده تحلیل شوند، نتیجه به دست آمده بیشتر جلب توجه می‌کند. گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+CD8^+$ فعال شده بر خلاف اینکه سطح Bcl-2 بالایی داشت، پایین‌ترین سطح CD25 را در بین گروه‌های درمان شده نشان داد. بیانگر این نکته است که احتمالا تعداد سلول‌های عامل در این گروه پایین می‌باشد، بنابراین موجب شده کارایی سلول‌ها در تحلیل تومور نسبت به سایر گروه‌ها ضعیف‌تر باشد.

به ظاهر در میان مارکرهای فعالیت سلول‌های HLA-DR، T و CD69 با شرایط واقعی فعال بودن TILها هم‌خوانی ندارند (۲۵، ۲۶) که ممکن است به این دلیل باشد که این مارکرها بعد از فعال شدن به مدت طولانی بیان می‌شوند. در مقابل CD25 که روی جمعیت کوچکی از TILها در بیشتر انواع تومورها بیان می‌شود، به عنوان نتیجه تحریک اخیر در نظر گرفته می‌شود و هم‌زمان نقش مهمی در تنظیم تکثیر سلول‌های T و عملکرد آنها ایفا می‌کند که برای ارزیابی اثرات پروتوکل‌های ایمونوتراپی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۷، ۲۸). در همین زمینه Andrea Ladányi و همکاران نشان داده‌اند که بیان مارکرهای فعالیت سلول T همانند CD25 و OX40(CD134) در سلول‌های لنفوییید ارتشاحی در ملانومای بدخیم در انسان، تاثیر چشم‌گیری بر بقای بیماران دارد (۳۶).

سلول‌های T تنظیمی $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ (Treg)، نقش مهمی در تنظیم و هوموستاز سیستم ایمنی دارد. سلول‌های Treg به شدت عملکرد و تکثیر سلول‌های $CD8^+$ T و $CD4^+CD25$ را سرکوب می‌کنند (۳۷). مکانیسم‌های درگیر در عملکرد سلول‌های تنظیمی ناشناخته مانده‌اند، ولی گمان می‌رود ترشح سایتوکاین‌های سرکوب کننده ایمنی از قبیل TGF-β و IL-10 در ایجاد اثرات این نوع سلول‌ها دخیل باشند (۳۸). در نتیجه با توجه به نقش بسیار مهم این سلول‌ها در تنظیم سیستم ایمنی، درصد لنفوسیت‌های $CD4^+FoxP3^+$ در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. گروه‌های دریافت کننده TILهای $CD4^+$ و $CD4^+CD8^+$ فعال شده به طور هم‌زمان، میزان پایین‌تری از مارکر فوق را نشان دادند. میزان این مارکر در گروه دریافت کننده TILهای $CD8^+$ اندکی بالاتر بود. جالب توجه آنکه گروهی که هیچ درمانی دریافت نکرد سطح بالاتری از FoxP3 داشته است. بر اساس یافته‌های ساکاگوشی، سلول‌های Treg $CD4^+CD25^+$ در انسان آنرژیک بوده، IL-2 تولید نمی‌کنند و به طور ذاتی تکثیر سلول‌های $CD4^+$ T را مهار می‌کنند (۳۹). موضوع جالب توجه این است که سلول‌های Treg $CD4^+CD25^+$ که به صورت برون‌تنی گسترش یافته‌اند، توانایی سرکوب‌گری خود را حتی در مقابل سلول‌های T خاطره فعال شده حفظ می‌کنند. این مشاهده که سلول‌های Treg می‌توانند در خارج از بدن گسترش یابند و پاسخ‌های سلول‌های T خاطره را تنظیم کنند، کاربردهای بالینی زیادی برای استفاده از این سلول‌ها برای درمان بیماری‌هایی که در آنها سلول‌های T مسبب بیماری بوده ایجاد می‌کند، همچنین القای تولرانس علیه بافت‌های پیوندی نیز از موارد عمده کاربرد این نوع سلول‌ها در آینده خواهد بود. نشان داده شده که سطح FoxP3 در گیرندگان پیوند که برای بافت پیوند شده تحمل داشتند، به طور تقریب ۱۰۰ برابر بیش از افرادی است که پیوند را رد کرده‌اند (۴۰). با این وجود، ممکن است این سلول‌ها از موانع اصلی عدم واکنش اصلی سیستم ایمنی علیه سلول‌های توموری باشند؛ چنانکه پینگ‌یو و همکاران نشان داده‌اند که تخلیه تومور از سلول‌های $CD4^+$ (که عمدتا سلول‌های تنظیمی هستند) در مرحله افکتور، باعث دفع پیوند حتی در مراحل نهایی و پیشرفته تومور می‌گردد (۴۱). ایچی ساتو و همکاران نشان داده‌اند که نسبت بالای سلول‌های $CD8^+$ به سلول‌های تنظیمی، با پیش‌آگهی بهتری در سرطان تخمدان همراه بوده و باعث افزایش طول عمر بیمار نیز می‌گردد (۴۲).

سرعت رشد تومور و طول عمر حیوانات در گروه دریافت کننده TILهای $CD4^+$ فعال شده مشابه گروه دریافت کننده TIL های $CD8^+$ فعال شده بوده و درجه بعد، گروه $CD4^+CD8^+$ قرار داشت. برخلاف انتظار، طول عمر گروه دریافت کننده TIL های $CD4^+CD8^+$ فعال شده کمتر بود. با توجه به اینکه تعداد سلول‌های تزریق شده به این گروه دو برابر گروه‌های دیگر بوده، همین امر سبب فعال شدن مکانیسم‌های هوموستازیس گردیده که باعث آپاپتوز سلول‌ها و کاهش نتیجه درمان شده است. به احتمال زیاد کم بودن تعداد سلول‌های $CD25^+$ در سلول‌های طحالی این گروه در این راستا می‌باشد که البته نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

درمجموع از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که می‌توان مت – انکفالین را به عنوان یک فعال‌کننده بالقوه سیستم ایمنی در ایمونوتراپی تلقی کرد و در این نوع درمان‌ها به کار گرفت. عوامل مختلفی برای فعال کردن سیستم ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند که انتخاب یک گزینه از بین سایر گزینه‌ها، می‌تواند بر نتیجه درمان تاثیرگذارد. در مطالعه حاضر برای اولین بار از یک اپیوید آندوژن به صورت برون‌تنی برای فعال کردن لنفوسیت‌ها استفاده شد. در راستای نتایج به دست آمده دوزهای پایین مت – انکفالین باعث فعال شدن لنفوسیت‌ها می‌شود، ولی برخلاف مطالعات قبلی نشان داده بودند که مدت زمان‌های کوتاه تیمار، باعث مهار سیستم ایمنی و زمان‌های طولانی تیمار باعث تقویت سیستم ایمنی می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که زمان‌های طولانی تیمار با مت – انکفالین نه تنها باعث افزایش CD25 به عنوان یکی از فاکتورهای مهم فعال شدن لنفوسیت‌ها نمی‌شود، بلکه باعث کاهش آن نسبت به حالت

قبل از تیمار می‌گردد. زمان‌های کوتاه در تحریک القای فاکتور فوق موثرتر طی نتایج متفاوتی که در گروه‌های دریافت کننده TIL های +CD4 و TILهای +CD8 فعال شده با مت - انکفالین به دست آمده، باید در نحوه و میزان اثر مت - انکفالین روی زیر مجموعه‌های لنفوسیتی جستجو شود.

تقدیر و تشکر

این طرح با گرانت دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره‌های ۳۳۴۰ و ۵۹۸۸ انجام شده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های آقایان دکتر زهیر حسن، مهدی مهدوی و خانم طاهره ابوفاضلی بیان می‌دارند.

References

1. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature. 1975; 258(5536): 577-580.
2. Akil H, Shiomi HMJ. Induction of the intermediate pituitary by stress: synthesis and release of a nonopioid form of beta-endorphin. Science. 1985; 227(4685): 424-426.
3. Zorica Mančev Gordana Pešić, Stanislava Sanojević, Jelena Radulović. The Immunomodulating Effects of Specific Opioid Antagonists after their Intracerebroventricular Application. FACTA UNIVERSITATIS. 2000; 7(1): 26-30.
4. Wybran J, Appelboom T, Famaey JP, Govaerts A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. J Immunol. 1979; 123(3): 1068-1070.
5. Zagon IS, Smith JP, McLaughlin PJ. Human pancreatic cancer cell proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. Int J Oncol. 1999; 14(3): 577-584.
6. McLaughlin PJ, Zagon IS, Skitzki J. Human neuroblastoma cell growth in tissue culture is regulated by opioid growth factor. Int J Oncol. 1999; 14(2): 373-380.
7. Mascarenhas G, Quirico-Santos T. Inhibitory effect of tumor growth by methionine-enkephalin. Arq Neuropsiquiatr. 1992; 50(1): 84-90.
8. Smith JP, Conter RL, Demers TM, McLaughlin PJ, Zagon IS. Elevated levels of opioid growth factor in the plasma of patients with pancreatic cancer. Pancreas. 2000; 21(2): 158-164.
9. Gustin T, Bachelot T, Verna JM, Molin LF, Brunet JF, Berger FR, et al. Immunodetection of endogenous opioid peptides in human brain tumors and associated cyst fluids. Cancer Res. 1993; 53(19): 4715-4719.
10. Lissoni P, Barni S, Paolorossi F, Crispino S, Rovelli F, Ferri L, et al. Evidence for altered opioid activity in patients with cancer. Br J Cancer. 1987; 56(6): 834-837.
11. Michalek J, Buchler T, Hajek R. T lymphocyte therapy of cancer. Physiol. Res. 2004; 53: 463-469.
12. Stuhler G, Walden P. Cancer Immune Therapy: Current and Future Strategies. USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2002.
13. Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioids and differentiation in human cancer cells. Neuropeptides. 2005; 39: 495-505.
14. Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioid growth factor (OGF) inhibits anchorage independent growth in human cancer cells. Int J Oncol. 2004; 24: 1443-1448.
15. Lee YS, Wurster RD. Differential effects of methionine enkephalin on the growth of brain tumor cells. J Neuro Oncol. 1994; 19: 11-15.
16. McLaughlin PJ, Zagon IS, Skitzki J. Human neuroblastoma cell growth in tissue culture is regulated by opioid growth factor. Int J Oncol. 1999; 14: 373-380.
17. Rader Ch, Subhash CS, Popkov M, Lerner RA, Barbas CF. Chemically programmed monoclonal antibodies for cancer therapy: Adaptor immunotherapy based on a covalent antibody catalyst. PNAS. 2003; 100(9): 5396-5400.
18. Michalek J, Buchler T, Hajek R. T lymphocyte therapy of cancer. Physiol Res. 2004; 53: 463-469.
19. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hammerling GJ. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. Cancer Res. 2002; 62: 1462-1470.
20. Chakraborty M, Abrams SI, Camphausen K, Liu K, Scott T, Coleman CN, et al. Irradiation of tumor cells upregulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. J Immunol. 2003; 170: 6338-6347.
21. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GN, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med. 2007; 13: 54-61.
22. Loskog A, Giandomenico V, Rossig C, Pulen M, Dotti G, Brenner MK. Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. Leukemia. 2006; 20: 1819-1828.
23. Rankin EB, Yu D, Jiang J, Shen H, Edward J. Pearce, et al. An Essential Role of Th1 Responses and Interferon Gamma in Infection-Mediated Suppression of Neoplastic Growth. Cancer Biol Ther. 2003; 2(6): 687-693.
24. Lopez CB, Rao TD, Feiner H, Shapiro R, Marks JR, Frey AB. Repression of interleukin-2 mRNA translation in primary human breast carcinoma tumor-infiltrating lymphocytes. Cell Immunol. 1998; 190: 141-155.
25. Berd D, Maguire HC Jr, Mastrangelo MJ, Murphy G. Activation markers on T cells infiltrating melanoma metastases after therapy with dinitrophenyl-conjugated vaccine. Cancer Immunol. J Immunother. 1994; 39(3): 141-147.
26. Diederichsen AC, Zeuthen J, Christensen PB, Kristensen T. Characterization of tumour-infiltrating lymphocytes and correlations with immunological surface molecules in colorectal cancer. Eur J Cancer. 1999; 35: 721-726.
27. Whiteside TL, Letessier E, Hirabayashi H, Vitolo D, Bryant J, Barnes L, et al. Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res. 1993; 53: 5654-5662.
28. Armstrong CM, Durrant L, Robins R, Galvin A, Scholefield J, Hardcastle J. Increased activation of lymphocytes infiltrating primary colorectal cancers following immunizations with the anti-idiotypic monoclonal anti-

body 105AD7. ?????? 1999; 45(4): 593-598.
29. Hucklebridge FH, Hudspith BN, Lydyard PM, Brostoff J, Stimulation of human peripheral lymphocytes by methionine enkephalin and delta- selective opioid analogues. Immunopharmacology. 1990; 19(2): 87-91.
30. Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. J Immunol. 2000; 164: 6100-6104.
31. Grazia Maria S, Paola C, Alessandra D, Roberta C, Francesco P, et al. Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. Blood. 2002; 100: 4098-4107.
32. Hahne M, Rimoldi D, Schroeter M, Romero P, French LE, et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implication for tumor immune escape. Science. 1996; 274: 1363-1366.
33. Strand S, Galle PR. Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. Mol Med Today. 1998; 4(2): 63-68.
34. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, et al. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. J Immunol. 1998; 160: 5669-5675.
35. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-a mechanism of immune evasion? Nat Med. 1996; 2: 1361-1366.
36. Ladányi A, Somlai B, Gilde K, Fejös Z, et al. T-Cell Activation Marker Expression on Tumor-Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Factor in Cutaneous Malignant Melanoma. Clin Cancer Res. 2004; 10: 521-530.
37. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+ CD25+ immunoregulatory cells. J Immunol. 2001; 167: 1137-1140.
38. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. Immunol Rev. 2001; 182: 68-79.
39. Sakaguchi S, Regulatory T. Cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell. 2000; 101: 455-458.
40. Iris Lee, Liqing Wang, Andrew DW, Martin ED, et al. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. J Eviron Monit. 2005; 201(7): 1037-1044.
41. Ping Yu, Youjin Lee, Wenhua Liu, Thomas Krausz, Anita Chong, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. J Environ Monit. 2005; 204(5): 779-791.
42. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. PNAS. 2005; 18538-18543.