اثرتزریق عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، بر تکثیر سلول‌های طحالی و تولید نیتریک اکساید در موش BALB/c دارای تومور فیبروسارکوما

سید محمود هاشمی M.Sc.[1,2]، زهیر محمد حسن Ph.D.[2]*، طوبی غضنفری Ph.D.[3]، شهرام شهابی M.D.[2,4]
مریم خیراندیش Ph.D.[5]، سارا صعودی M.Sc.[1,2]

۱. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی
۳. دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی
۴. دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، ژنتیک و میکروب شناسی
۵. سازمان انتقال خون ایران

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس
پست الکترونیک: Email: hasan_zm@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۲/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۱

هدف: بررسی اثر افزایش HSP-70 (Heat Shock Protein-70) درعصاره سلول‌های شوک حرارتی دیده بر تکثیر سلول‌های طحال ، تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژ های صفاق و طحال و کاهش حجم تومور فیبروسارکوما در موش BALB/c

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برای ایجاد مدل موشی تومور فیبروسارکوما، سلول‌های WEHI164 به صورت زیر پوستی به موش‌های هم‌ژن BALB/c تزریق شد. عصاره سلول‌های شوک حرارتی دیده (۴۲درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت) و گروه کنترل عصاره (عصاره سلول‌های بدون شوک حرارتی) با ۵ بار انجماد و ذوب مجدد، تهیه شد. سپس موش‌های گروه تست با تزریق عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده ایمن شدند (در روز های صفر، هفت و چهارده). به گروه‌های کنترل نیز به ترتیب عصاره سلول‌های بدون شوک حرارتی و PBS تزریق شد. افزایش میزان پروتیین (HSP-70) با روش ایمونوبلات بررسی شد. حجم تومورها هر۵ روز یک بار اندازه‌گیری شد. همچنین با استفاده از تست MTT تکثیر سلول‌های طحال موش‌های گروه تست نشان داده شد. در این مطالعه اثر عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده بر تحریک تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی و همچنین سلول‌های طحالی موش‌های توموری واکسینه شده، بررسی شد.

یافته‌ها: افزایش HSP-70 در عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده در مقایسه با سلول‌هایی که حرارت ندیده بودند با روش ایمونوبلات نشان داده شد. کاهش معنی‌دار حجم تومور در گروه تست نسبت به گروه‌های کنترل مشاهده شد. همچنین افزایش تکثیر سلول‌های طحال موش‌های گروه تست و افزایش معنی‌دار تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی پس از مجاورت با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: عصاره سلول‌های توموری حرارت دیده در مقایسه با سلول‌های حرارت ندیده دارای آثار ضدتوموری بیشتری است. HSP علاوه بر کمک در عرضه آنتی ژن، توان فعال کردن سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی را دارد که با ارسال پیام، امکان برانگیختن بیشتر ایمنی سلولی را فراهم می‌آورد. این نتایج می‌تواند به عنوان رویکرد جدید در درمان تومور مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژگان: HSP-70، شوک حرارتی، فیبروسارکوما، عصاره سلول توموری، MTT، نیتریک اکساید

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات۱۱۳-۱۰۶

مقدمه

در سال‌های اخیر، ایمونوتراپی به عنوان یکی از راه‌های درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. این روش درمانی بر این اصل استوار است که سیستم ایمنی در صورت فعال شدن قادر به ایجاد پاسخ اختصاصی ایمنی ضد تومور است و بر بافت نرمال بی‌اثر است. مطالعات نشان می‌دهند ایمنی سلولی اهمیت بسیاری در کنترل تومور دارد. تا کنون استراتژی‌های مختلفی برای ساختن واکسن مناسبی که سیستم ایمنی سلولی را به طور اختصاصی و با قدرت بالا ضدتومور فعال کند، بررسی و آزمایش شده است. پروتیین‌های شوک حرارتی (HSPs) گروهی از استرس پروتیین‌ها هستند در سیتوزول و هسته حضور دارند و تحت استرس‌هایی ازجمله حرارت، اتانول، آنالوگ‌های اسیدهای آمینه، مواد اکسیدکننده، آنوکسی، فلزات سنگین و التهاب، شدیدا افزایش می‌یابند (۱). از آنجایی که HSPها در داخل سلول به پپتیدهای سلولی متصل می‌شوند، از این خاصیت HSPها می‌توان به عنوان منبع مناسبی از مجموعه پپتیدها و آنتی‌ژن‌های سلول مورد نظر استفاده کرد. با تلخیص مجموعه HSP و پپتید متصل به آن از هر سلول یا بافت،

مجموعه‌ای از انواع پپتیدهای آن سلول خاص را خواهیم داشت. مطالعات نشان داده‌اند که تخلیص HSP70، HSP90، gp96 از سلول‌های توموری موش و تزریق آن به موش‌های توموری باعث فعال شدن پاسخ ایمنی ضد تومور در موش می‌شود (۲، ۳). انواع مختلف HSPها از جمله HSP70، gp96، HSP110، HSP170 در مطالعات مختلف به عنوان واکسن توموری استفاده شده‌اند (۴، ۵). نوزنز و همکاران (۶) با استفاده از HSP70 تخلیص شده از سلول‌های توموری نشان داده‌اند که HSP70 سلول توموری که متصل به آنتی‌ژن‌های توموری است علاوه بر بالغ کردن سلول‌های دندریتیک (dendritic cells: DC)، توسط آن برداشته، پردازش و توسط آنتی‌ژن سازگاری نسجی نوع یک (MHC1) گروه I عرضه می‌شود.

مطالعات کوپنر و همکارانش (۷) نیز نشان داده است که HSP70 باعث بلوغ سلول‌های DC می‌شود.

زنگ و همکاران (۸) با استفاده از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ توانستند HSPهای عصاره سلول توموری را غنی‌سازی و آن را با DC مجاور کنند. آنها مشاهده کردند مارکرهای بلوغ DC افزایش یافته‌اند و این سلول‌ها IL12 تولید کرده‌اند. آنها از این واکسن DC در مدل موشی توموری استفاده کردند که در مقایسه با DC مجاور شده با عصاره سلول‌های توموری غنی‌سازی نشده HSP، پاسخ بسیار بهتری در کاهش حجم تومور و ایمنی اختصاصی ضدتومور مشاهده کردند. همانطور که گفته شد حرارت باعث افزایش HSPها در سلول می‌شود. از طرف دیگر بیشتر مطالعاتی که در زمینه استفاده از HSP به عنوان واکسن توموری انجام شده است از HSP تخلیص شده از سلول توموری استفاده کرده‌اند. به نظر می‌رسد اگر با استفاده از حرارت، میزان HSP سلول توموری را افزایش دهیم می‌توان کارایی واکسن را افزایش داد.

در مطالعه‌ای که ونگ و همکاران (۵) انجام دادند، ابتدا موش توموری را در محل تومور حرارت دادند؛ سپس سلول‌های توموری را جهت تهیه واکسن استفاده کردند و مشاهده کردند HSP تخلیص شده از سلول‌های توموری این موش‌ها بیشتر از گروه حرارت ندیده است.

اسکولر و همکاران (۹)، با استفاده از عصاره رده سلولی $HepG_2$ حرارت دیده توانستند سلول‌های دندریتیک را فعال و سلول‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ را با این سلول‌های دندریتک مجاور کنند. آن‌گاه مشاهده کردند پاسخ سایتوتوکسیک لنفوسیت‌ها علیه سلول‌های $HepG_2$ فزایش می‌یابد.

در مطالعه تودریک و همکاران (۱۰) از حرارت ۴۲ درجه به مدت یک ساعت برای افزایش HSP70 در سلول‌های توموری موش استفاده شد. آنها از این سلول‌ها حرارت دیده پس از اشعه دادن به عنوان واکسن استفاده و مشاهده کردند حجم تومور کاهش یافته و تولید IFNγ توسط سلول‌های طحالی افزایش پیدا کرده است.

با توجه به مطالعاتی که تا کنون انجام شده، استفاده از پروتیین‌های شوک حرارتی می‌تواند راهکار مناسبی برای ایمونوتراپی تومور باشد و گسترش این زمینه تحقیقاتی در کشور ما نیز لازم به نظر می‌رسد. از آن جایی که در روش تخلیص HSP نیاز به صرف زمان زیاد و استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مختلف است، به نظر می‌رسد استفاده از روشی که زمان تهیه واکسن و همچنین تداخلات و استفاده از مواد شیمیایی جهت تخلیص را کاهش دهد می‌تواند مفید باشد. این تحقیق در صدد پاسخ به این پرسش است که آیا بر خلاف سایر تحقیقاتی که در مورد واکسن تومور مبتنی بر HSP انجام شده می‌توان HSP را بدون تخلیص و با شوک حرارتی افزایش داد و با نکروز کردن سلول‌ها به وسیله انجماد و ذوب مجدد سلول‌ها، عصاره سلولی که غنی شده از انواع HSP متصل به طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌های توموری است را به عنوان واکسن به کار بریم؟

مواد و روش‌ها

کشت و تکثیر رده سلولی فیبروسارکومای موشی (WEHI 164)

رده سلولی فیبروسارکومای موشی (WEHI 164) از انیستیتوپاستور تهران تهیه شد. سلول‌های فیبروسارکومای موشی در محیط Gibco (RPMI1640) حاوی ۱۰درصد FBS (Gibco) ۲ میلی‌مولار ال‌گلوتامین (Gibco) و پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Gibco) در انکوباتور محتوی ۵ درصد Co_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شد و زمانی که ۸۰ درصد سطح فلاسک توسط سلول‌ها پوشیده شده بود پاساژ سلول‌ها انجام شد.

ایجاد شوک حرارتی در سلول‌ها و تهیه عصاره سلول‌های توموری

به منظور افزایش میزان استرس پروتیین‌های سلول‌های توموری، آنها تحت شوک حرارتی غیر کشنده (Sublethal shock) قرار گرفتند. سلول‌های WEHI 164 موجود در فلاسک به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بن ماری حرارت داده، سپس ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (این مدت زمان با استفاده از مطالعات اولیه به عنوان بهترین زمان انتخاب گردید). سلول‌های توموری با روش انجماد (در نیتروژن مایع) و ذوب مجدد با استفاده از بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد (چهار مرتبه) دچار نکروز و لیز شد. با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm، غشای سلول‌ها رسوب داده شد. مایع رویی که همان عصاره سلولی است جدا و عصاره به دست آمده از فیلتر ۰/۲ عبور داده و استریل شد. میزان پروتیین حاصل از لیز عصاره حاصل از یک میلیون سلول فیبروسارکوما در یک میلی‌لیتر با روش براد فورد اندازه گیری شد.

ارزیابی HSP70 با روش ایمونوبلات

میزان پروتیین عصاره سلول‌های فیبروسارکومای حرارت دیده (۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) بعد از انکوبه شدن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت با روش براد فورد اندازه‌گیری شد. پس از لودکردن مقادیر یکسانی (میزان پروتیین حاصل از لیز عصاره حاصل از یک میلیون سلول فیبروسارکوما در یک میلی‌لیتر، ۱/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از عصاره سلول‌های گروه‌های مختلف الکترو فورز انجام و

پس از انتقال به غشا، PVDF با استفاده از آنتی بادی ضد HsP70 (1/1000; R&D System) در سلول‌های شوک حرارتی دیده بررسی شد.

ایجاد تومور فیبروسارکوما در موش BALB/c

برای این کار تعداد ۵۰۰ هزار سلول WEHI 164 پس از دو بار شستشو با بافر PBS، به صورت زیرجلدی به موش‌های BALB/c ماده شش هفته‌ای تهیه شده از انیستیتوپاستور تهران تزریق شد. پس از مشاهده تومور (ده تا پانزده روز بعد) هرپنج روز یک بار تغییرات حجم تومور با استفاده از کولیس ارزیابی و ثبت شد. از فرمول زیر جهت تعیین حجم تومور استفاده شد (۸).

$(mm^3)=W_1XW_2xW_3x\pi/6$ حجم تومور (W_3، W_2، W_1 نشان دهنده سه قطر با اندازه‌های مختلف از تومور است).

تزریق واکسن به گروه‌های مورد آزمایش

دو هفته بعد از تزریق رده سلولی فیبروسارکوما به موش‌ها، دز مناسب از عصاره سلولی به صورت زیرجلدی به موش‌هایی که توموری شده بودند تزریق شد. عمل تزریق سه بار متوالی هر کدام به فاصله یک هفته به صورت زیرپوستی انجام شد. دز مورد استفاده عبارت است از عصاره حاصل از یک میلیون سلول فیبروسارکوما در یک میلی‌لیتر که میزان ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (صد هزار سلول) در هر بار به موش‌ها تزریق شد.

موش‌های توموری مورد آزمایش (در هرگروه هفت موش) عبارتند از :

گروه تست: سه بار تزریق عصاره سلول‌های فیبروسارکوما که قبلا به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ در سانتی‌گراد حرارت داده شده سپس ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شده بود.

گروه کنترل عصاره: سه بار تزریق عصاره سلول‌های فیبروسارکوما که از اول در ۳۷ درجه انکوبه شده بود.

گروه کنترل منفی: سه بار تزریق PBS

آزمون MTT

به منظور سنجش میزان پاسخ‌دهی سلول‌های سیستم ایمنی نسبت به یک آنتی‌ژن خاص می‌توان میزان تکثیر این سلول‌ها را در مجاورت آنتی‌ژن اندازه‌گیری کرد. معرف MTT (۳- (۴ و ۵- دی‌متیل تترازولیل-۲) -۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید) که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است جذب میتوکندری سلول‌های فعال متابولیک می‌شود و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز اشکال کاهشی NADH و NADPH تولید می‌کند. شکل اکسید شده نمک تترازولیوم تولید بلور فورمازان بنفش رنگ می‌کند. پاسخ‌دهی سلول‌های طحال موش‌های توموری در گروه‌های مختلف نسبت به عصاره سلولی پس از واکسیناسیون با عصاره سلول شده سنجیده شد. به این منظور از هر گروه سه موش BALB/c مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشتن موش‌ها به روش قطع نخاع، طحال موش‌ها جدا و در هموژنایزر به منظور جدا شدن سلول‌ها هموژن شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۷۰۰rpm سانتریفیوژ شد. به رسوب باقی‌مانده ۵ میلی‌لیتر بافر ACK برای لیز RBC اضافه شد و پس از شستشو و سانتریفیوژ، رسوب باقی‌مانده در ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI حاوی ۵ درصد FBS حل شده با تریپان بلو شمارش و در صد سلول‌های زنده تعیین شد. سپس سلول‌ها به میزان 1×10^5 cell/well در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از کشت سلول، آنتی‌ژن‌های محرک به شرح زیر به چاهک‌ها اضافه شد. از ۵ میکرو گرم در میلی‌گرم کانکاناوالین A(Can A) به عنوان کنترل مثبت، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به عنوان کنترل منفی و از ۱۰۰میکرولیتر عصاره حاصل از سلول‌های حرارت دیده و سلول‌های حرارت ندیده (عصاره حاصل از 1×10^5 سلول) استفاده شد. از طحال موش سالم (بدون تومور) جهت کنترل استفاده شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون ۷۲ ساعته میزان ۱۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT به هر چاهک اضافه و به مدت ۶-۴ ساعت در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی این زمان و به دنبال بررسی و تشکیل بلورهای بنفش رنگ با میکروسکوپ محلول رویی سلول‌ها به آرامی جمع‌آوری و میزان ۱۰۰میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد. آن‌گاه با پیپت کردن، کریستال‌ها حل شدند. پس از ۲۰ دقیقه میزان جذب در طول ۵۴۰ نانومتر بادستگاه الایزا خوان ثبت و عدد اندیکس تحریکی گزارش شد.

استخراج ماکروفاژهای صفاقی موش

از صفاق موش BALB/c نرمال، ۳ تا ۱۰ میلیون سلول هسته‌دار در هر میلی‌لیتر می‌توان استخراج کرد که حدود ۷۰درصد آن ماکروفاژ است. با استفاده از خاصیت چسبندگی ماکروفاژ به سطوح پلاستیکی، می‌توان ماکروفاژ را با خلوصی بیش از ۹۰ درصد به دست آورد. پس از کشتن موش BALB/c و استریل کردن با الکل ۷۰ درجه، پوسته رویی شکم موش طوری باز شد که پرده صفاق پاره نشود. سپس ۱۰میلی‌لیتر RPMI سرد به صفاق تزریق شد تا سلول‌های چسبیده آزاد شوند. این سلول‌ها با سرنگ خارج و در ۱۷۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. با رساندن حجم رسوب به یک میلی‌لیتر شمارش آغاز و درصد سلول‌های زنده تعیین شد. سپس تعداد 5×10^5 سلول در هر چاهک کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد واجد ۵ درصد co_2 قرار داده شد. پس از ۴ ساعت مایع رویی سلول‌ها برداشته و سطح سلول‌ها شسته شد. در صورتی که ماکروفاژگیری به خوبی انجام شود، بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها زنده خواهند بود.

سنجش تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی

در این آزمایش تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی در مجاورت با عصاره حاصل از 1×10^5 سلول‌های حرارت دیده، عصاره 1×10^5 سلول‌های حرارت ندیده، محیط کشت (کنترل منفی) و LPS ۱میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اینترفرون گاما

(کنترل مثبت). به این منظور محرک‌های موردنظر به کشت ماکروفاژ اضافه و پس از ۱۲، ۲۴و ۳۶ ساعت محلول رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد. هم حجم محلول رویی معرف گریس اضافه و تولید نیتریک اکساید با ایجاد رنگ توسط این معرف اندازه‌گیری شد. جذب حاصل از اثر معرف گریس در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس منحنی استاندارد میزان نیتریک اکساید به میکرومول محاسبه شد.

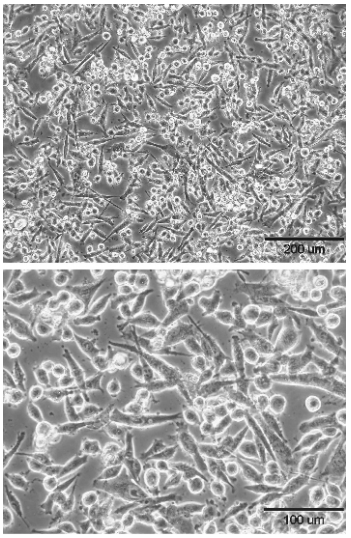
آنالیز آماری

آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 11.0 و آزمون‌های آماری Independent t-Test انجام شد و $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری به دست آمد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های فیبروسارکوما و ارزیابی میزان HSP70

مورفولوژی سلول‌های فیبروسارکومای موشی (WEHI-164) به صورت سلول‌های چسبنده و داری ظاهر دوکی شکل است (شکل ۱).

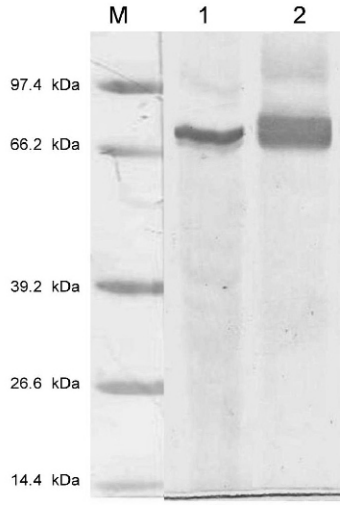


شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های فیبروسارکومای موشی (WEHI-164). سلول‌ها چسبنده وداری ظاهر دوکی شکل هستند.

عصاره سلول‌های فیبروسارکومای حرارت دیده (یک ساعت ۴۲ درجه سانتی‌گراد) که پس از شوک حرارتی به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بود، از نظر افزایش HSP70 با روش ایمونوبلات بررسی شد. نتایج، افزایش میزان HSP70 را در سلول‌هایی که به مدت یک ساعت شوک حرارت دیده بودند، در مقایسه با عصاره سلول‌های حرارت ندیده تایید کرد (شکل ۲).

بررسی تغییرات حجم تومور در گروه‌های مختلف

دو هفته بعد از تزریق رده سلولی فیبرو سارکوما به موش‌ها، دز مناسب از عصاره سلولی به صورت زیرجلدی به موش‌هایی که توموری شده بودند تزریق شد.



شکل ۲: نتایج حاصل از تست ایمونوبلات عصاره سلول‌های فیبروسارکومای موشی.
از سمت چپ، (M) مارکرهای وزن مولکولی، (۱) سلول‌هایی که پس از یک ساعت حرارت ۴۲درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۱۲ ساعت در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بودند، (۲) سلول‌هایی که بدون شوک حرارتی در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بودند (مقادیر یکسانی از عصاره سلولی در هر چاهک لود شده بود).

سه تزریق متوالی از (عصاره صدهزار سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر) هر کدام به فاصله یک هفته به صورت زیرپوستی انجام شد. هرپنج روز یک بار تغییرات حجم تومور با استفاده از کولیس بررسی و ثبت شد (شکل۳).

حجم تومور از روز پانزدهم به بعد در گروه تست که عصاره سلول‌های شوک حرارت دیده به موش‌های توموری تزریق شده بود، به طور معنی‌داری ($p<0/05$). از دو گروه کنترل عصاره (عصاره سلول‌های حرارت ندیده) و کنترل منفی (PBS) کمتر بود. در گروه کنترل عصاره تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل منفی مشاهده نشد (جدول ۱).

نتایج بررسی تکثیر سلول‌های طحال (آزمایش MTT)

پس از آماده‌سازی سلول‌های طحال موش‌های گروه‌های مختلف، سنجش میزان تکثیر سلول‌های طحال در گروه‌های آزمایش متفاوت در حضور محرک‌های ثانوی شامل (عصاره سلول‌های شوک حرارت دیده، عصاره سلول‌های حرارت ندیده و conA) انجام شد. ابتدا منحنی استاندارد MTT در غلظت‌های مختلف از سلول‌های طحال تهیه شد و نمودار، خط رگرسیون و معادله خط رسم شد. به این ترتیب محدوده تعداد مناسب سلول مشخص گردید. به کمک آزمون آماری t-test مقایسه آماری در هر گروه بین تیمارهای مختلف و بین گروه‌های مختلف واکسن انجام شد. اندیکس تحریکی در گروهی که عصاره سلول‌های شوک حرارت دیده به موش‌های توموری تزریق شده بود، به طور معنی‌داری ($p<0/05$) از دو گروه دیگر کنترل عصاره و کنترل منفی بیشتر بود. همچنین اندیکس تحریکی در گروهی که عصاره سلول‌های بدون شوک حرارت به موش‌های توموری تزریق شده بود نیز با گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌دار ($p<0/05$) داشت.

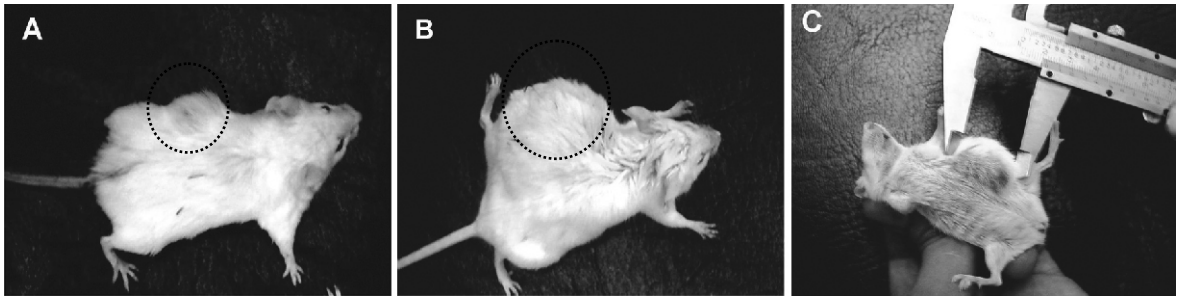
جدول ۱: میانگین ±SD تغییر حجم تومور در گروه های مختلف طی روزهای صفر تا سی و پنج، براساس میلی مترمکعب(mm^3)

زمان	میانگین ±SD تغییر حجم تومور							
	روز صفر	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم	روز بیستم	روز بیست و پنجم	روز سی‌ام	روز سی و پنجم
گروه واکسن								
عصاره سلول‌های شوک حرارت دیده (۴۲ درجه سانتی‌گراد)	۰/۰±۰/۰	۲/۴۱±۰/۴۴	۵۷/۲±۱۸/۶۷	۱۲۸/۴±۶۹/۷*	۴۸۳/۴±۷۵/۳*	۲۰۲۴/۲±۵۹۲/۴*	۳۲۹۱/۰±۵۳۲/۷*	۳۴۹۲±۳۸۸/۵*
عصاره سلول‌های شوک حرارت ندیده (۳۷ درجه سانتی‌گراد)	۰/۰±۰/۰	۲/۴۰±۰/۵۷	۵۶/۴۰±۱۵/۳۸	۳۵۴/۲±۱۱۱/۲**	۲۰۴۵/۴±۴۳۱/۶	۵۹۷۰/۸±۵۳۹/۶	۶۷۷۲/۸±۹۳۹/۶	۷۴۷۴/۸±۶۰۷/۳
کنترل (PBS)	۰/۰±۰/۰	۲/۷۶±۰/۸۸	۵۸/۸±۱۳/۱	۶۳۲/۰±۹۷/۳۵	۲۵۶۸/۲±۶۷۵/۴	۶۰۰۳/۰±۶۷۵/۴	۶۷۱۶/۸±۱۷۳۴	۸۳۵۷/۲±۱۴۸۲/۶

* تفاوت معنی‌دار ($p<0/01$) نسبت به گروه عصاره سلول‌های شوک حرارت ندیده و گروه کنترل منفی (PBS) .

** تفاوت معنی‌دار ($p<0/01$) نسبت به گروه عصاره سلول‌های شوک حرارت ندیده

(در هر گروه هفت موش توموری وجود داشت.)



شکل ۳ :تشکیل تومور در موش‌هایی که به آنها سلول های فیبروسارکوما تزریق شده (۳۰ روز پس از تزریق زیر جلدی سلول های توموری).
یکی از موش های گروه تست که واکسن مورد نظر سه بار به آن تزریق شده بود(A).
یکی از موش های گروه کنترل که به جای واکسن، به آن PBS تزریق شده بود(B).

جدول ۲: میانگین ±SD نتایج بررسی تکثیر لنفوسیت‌های گروه تست و کنترل به روش MTT با استفاده از محرک‌های مختلف (بر حسب SI)
(طبق فرمول SI کنترل منفی، ۱ در نظر گرفته شد)

محرک	کنترل + (PHA)	لایزیت سلول شوک حرارتی دیده (۴۲ درجه سانتی‌گراد)	لایزیت سلول (۳۷ درجه سانتی‌گراد)	کنترل منفی (PBS)
گروه واکسن				
عصاره سلول شوک حرارت دیده (۴۲ درجه سانتی‌گراد)	*۲۴/۴۶±۱/۹۳	*۲۷/۵۶±۰/۹۸	*۲۶/۵±۰/۴	*۲۴/۰۳±۰/۷۷
عصاره سلول حرارت ندیده (۳۷ درجه سانتی‌گراد)	**۱۸/۷±۱/۳۴	**۱۹/۸۶±۰/۹۸	**۱۸/۸۳±۱/۴۷	**۱۱/۵۳±۰/۳۵
کنترل (PBS)	۳/۴۹±۱/۱۳	۰/۱۷±۰/۲۸	۵/۰۳±۰/۱۵	۱/۰۰±۰/۰

* تفاوت معنی‌دار ($p<0/01$) نسبت به گروه عصاره سلول‌های بدون شوک حرارت (گروه کنترل عصاره) و گروه کنترل منفی (PBS).

** تفاوت معنی‌دار ($p<0/01$) نسبت به گرو ه کنترل منفی (PBS).

(از هر گروه سه موش‌توموریBALB/c بررسی شد و در مورد هر موش به صورت سه بار تکرار آزمایش ها انجام شد).

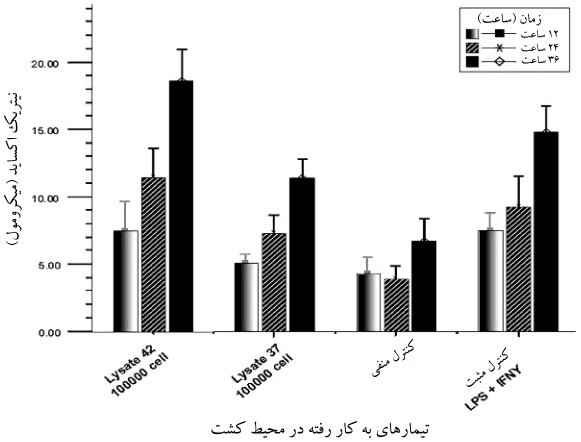
در بررسی اندیکس تحریکی سلول‌های طحال موش‌های هرکدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف (محرک‌های مورد استفاده) در همان گروه مشاهده نشد (جدول ۲).

نتایج تولید نیتریک اکساید

استاندارد $NaNo_2$ در غلظت‌های مختلف تهیه و سنجش نیتریت به عنوان شاخصی از نیتریک‌اکساید در استانداردها انجام شد. نمودار، خط رگرسیون و معادله خط محاسبه شد. سپس با قرار دادن جذب (OD) هر یک از نمونه‌های آزمایش شده در این معادله غلظت نیتریت نمونه‌ها محاسبه شد. در این مطالعه اثر تیمار با عصاره سلول‌های شوک حرارتی دیده در تحریک تولید نیتریک اکساید در شرایط In vivo و in vitro ارزیابی شد.

الف) سنجش میزان تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش نرمال در حضور تیمارهای ثانوی متفاوت

پس از جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش نرمال میزان تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش نرمال در حضور تیمارهای ثانوی متفاوت ارزیابی شد. تولید نیتریک اکساید توسط

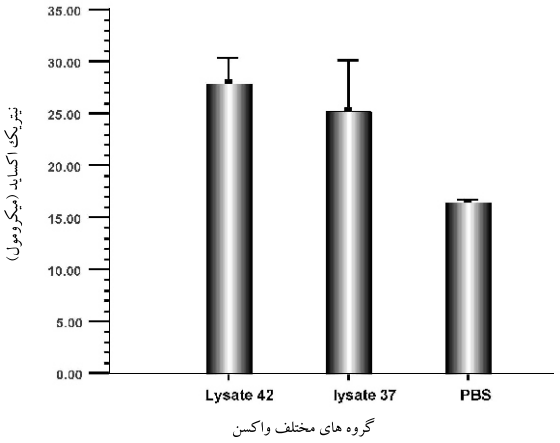


شکل۴: میزان تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاقی موش نرمال در حضور تیمارهای ثانوی متفاوت.
تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۱) نسبت به گرو ه عصاره سلول‌های بدون شوک حرارت (گروه کنترل عصاره) و گروه کنترل منفی (PBS). (ماکروفاژ های دو موش نرمال BALB/c بررسی شد و هر گروه به صورت سه بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفت).

ماکروفاژهای تیمارشده با عصاره سلول‌های حرارت دیده به طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) بیشتر از ماکروفاژهای تیمار شده با عصاره سلولی حرارت ندیده و کنترل منفی (بدون آنتی‌ژن) بود (شکل ۴).

ب) سنجش میزان تولید نیتریک اکساید توسط سلول‌های طحال موش‌های توموری در گروه‌های آزمایش متفاوت.

سلول‌های تک هسته‌ای طحال موش‌های کنترل و توموری به روش مشروح جدا سازی شد. تولید نیتریک اکساید در سه گروه موش‌های توموری مورد آزمایش، در حضور محرک‌های IFNγ و LPS بررسی شد (شکل ۵) و تفاوت معنی‌داری در تولید نیتریک اکساید در موش‌هایی که عصاره سلول‌های شوک حرارتی دیده (گروه تست) دریافت کرده بودند با گروهی که عصاره سلول‌های حرارت ندیده دریافت کرده بودند (گروه کنترل عصاره) مشاهده نشد. اما هر دوی این گروه‌ها در مقایسه با گروه موش‌های توموری که PBS دریافت کرده بود به طور معنی‌دار (p<۰/۰۱) نیتریک اکساید بیشتری تولید کرده بودند.



شکل ۵: میزان تولید نیتریک اکساید توسط سلول‌های طحال موش‌های توموری (گروه‌های مختلف واکسن) در حضور تیمار ثانوی (IFNγ+LPS)، (از هر گروه سه موش توموری BALB/c بررسی شد و در مورد هر موش به صورت سه بار تکرار آزمایش ها انجام شد).

بحث

با توجه به اهمیت درمان سرطان محققان توجه زیادی به راه‌های مختلف در مان داشته‌اند و از جمله، درمان سرطان با استفاده از واکسن‌های توموری در مطالعات بسیاری بررسی شده است. در سال‌های اخیر بحث HSP در طراحی واکسن تومور مطرح شده است. اما اکثر مطالعات مبتنی بر استفاده از HSP تخلیص شده از سلول توموری بوده است.

در این مطالعه از رده سلولی فیبروسارکومای موش BALB/c (WEHI-164) جهت ایجاد تومور در موش BALB/c درونزاد استفاده شده است. پس از یک بار تزریق زیرجلدی ۵۰۰ هزار سلول ، بعد از ۱۰ تا ۱۵ روز حدود ۶۰ درصد موش‌ها توموری شدند. دلیل استفاده از این رده سلولی این بود که اولا سلول WEHI-164 پس از تزریق به موش‌های BALB/c درونزاد دفع نمی‌شود و تومور مهاجم با تکثیر زیاد را در موش‌ها ایجاد می‌کند. ثانیا برای تهیه واکسن بهتر بود از جمعیت یکنواخت سلولی استفاده شود.

مطالعات مختلفی جهت تعیین دما و زمان مناسب برای افزایش HSP در سلول‌ها انجام شده است که با توجه به نوع سلول، تفاوت‌هایی در زمان حرارت دادن و زمان ریکاوری بعد از آن وجود دارد. مطالعاتی که در مورد سلول‌های توموری انجام شده است حرارت ۴۲ درجه را به مدت یک تا یک و نیم ساعت و به دنبال آن ۵ تا ۱۸ ساعت ریکاوری سلول‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد را پیشنهاد می‌کنند (۹، ۱۰).

یکی از نکات مهم این مطالعه نکروز کردن سلول‌ها است که با استفاده از چندین سیکل انجماد و ذوب انجام شده بود. همان طور که مشخص شده است نکروز شدن یک سلول توموری در بدن پاسخ ایمنی بسیار بهتری در مقایسه با آپوپتوز شدن سلول ایجاد می‌کند چرا که در نکروز آنتی‌ژن‌های مختلف توموری و HSPهای متصل به پپتیدهای آنتی‌ژنیک از سلول خارج می‌شود اما در آپوپتوز این اتفاق نمی‌افتد. این مساله توسط اسکولر و همکاران (۹) نشان داده شده است اما آنها اثر عصاره سلول‌های حرارت دیده را فقط در شرایط in vitro بر بلوغ و فعالیت سلول‌های دندریتیک بررسی کردند، همچنین نشان دادند که

عصاره سلول‌های نکروز شده بسیار موثرتر از سلول‌های آپوپتوز شده است.

حجم تومور از روز پانزدهم به بعد در گروه تست که عصاره سلول‌های شوک حرارت دیده به موش‌های توموری تزریق شده بود، به طور معنی‌داری ($p<0/05$) از دو گروه دیگر کنترل عصاره و کنترل منفی کمتر بود. مطالعاتی که با استفاده از HSP تخلیص شده انجام شده بود نیز کاهش حجم تومور را نشان داده است. از آنجایی که گروه کنترل عصاره کاهش حجم تومور ندارد می‌توان این کا هش را ناشی از اثرات حضور HSP در عصاره سلول‌های شوک حرارتی دیده دانست.

به منظور سنجش میزان پاسخ‌دهی سلول‌های سیستم ایمنی نسبت به یک آنتی‌ژن خاص می‌توان میزان تکثیر این سلول‌ها را پس از مجاورت آن آنتی‌ژن اندازه‌گیری کرد. بنابراین ما نیز میزان تکثیر سلول‌های طحالی موش‌های توموری گروه‌های مورد آزمایش را در پاسخ به تحریک با همان آنتی‌ژنی که با آن واکسینه شده بودند، سنجیدیم. اندیکس تحریکی در گروه تست به طور معنی‌داری ($p<0/05$) از دو گروه دیگر کنترل عصاره و کنترل منفی بیشتر بود. همچنین اندیکس تحریکی در گروه کنترل عصاره نیز با گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌دار ($p<0/05$) داشت. تفاوت معنی‌داری بین محرک‌های مختلف مورد استفاده در هر گروه مشاهده نشد (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد که نوع محرک به کار رفته تفاوتی در تست MTT در مورد سلول‌های طحالی هر گروه موش‌ها ایجاد نکرده بود. اما نتایج نشان می‌دهد سلول‌های طحالی در گروه تست دارای قدرت تکثیر بیشتری است که این امر نشان دهنده افزایش پاسخ ایمنی سلولی در طحال موش‌های توموری گروه تست، در اثر تزریق واکسن است.

نیتریک اکسید یک مولکول بیولوژیک مهم است که در صورت تولید شدن توسط ماکروفاژ ها بر سلول‌های توموری اثر سایتوتوکسیک دارد و این اثر را از طریق مهار تنفس سلولی در میتوکندری، مهار همانندسازی DNA و تخریب بعضی از آنزیم‌های موجود در سلول هدف اعمال می‌کند. بنا براین در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر عصاره غنی شده از HSP را در تولید NO در در شرایط *in vivo* و *in vitro* بررسی کنیم. ابتدا اثر عصاره غنی شده از HSP را بر تولید NO توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در شرایط *in vitro* بررسی کردیم که نتایج افزایش تولید NO در ماکروفاژهایی که با عصاره غنی شده از HSP مجاور شده بودند را نشان می‌داد. این مساله در مطالعاتی که با استفاده از HSP تخلیص شده انجام گرفته بود نیز گزارش شده است (۱۱، ۱۲). از آنجایی که ماکروفاژها دارای گیرنده HSP از جمله CD91, TLR هستند، اتصال HSP به این گیرنده باعث فعال شدن ماکروفاژها و و تولید NO و سایتوکاین‌هایی ازجمله TNFα و IL12 می‌شود (۱۱، ۱۲). در این مطالعه همچنین تولید NO توسط سلول‌های طحال موش‌های توموری بررسی شد که نتایج، نشان دهنده بالا بودن تولید NO توسط سلول‌های طحال موش‌های توموری گروه تست است که اثر عصاره غنی شده از HSP را بر فعال‌کردن ماکروفاژهای طحال، نشان می‌دهد. به طور کلی HSP دو خصوصیت مهم دارد که به طور خلاصه در ادامه ذکر می‌شود. اولا، HSP و پپتید متصل به آن اگرچه یک Ag خارج سلولی برای سلول APC حساب می شود اما پپتید متصل به HSP وارد مسیر MHC گروه یک می‌شود که به این روش می‌توان پاسخ ایمنی سلولی و سایتو توکسیک سلول‌های $CD8^+$ را به طور اختصاصی علیه Ag توموری فعال کند. ثانیا، HSP ها بر سلول‌های APC خصوصا ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک به طور غیراختصاصی اثر می‌کنند و این سلول‌ها را فعال می‌کنند .HSPها سلول APC را تحریک به تولید سایتوکاین‌ها ی پیش التهابی ایمنی ذاتی می‌کنند که باعث تقویت و تحریک بیشتر ایمنی ذاتی و اختصاصی می‌شود. به عنوان مثال HSPها باعث تولید TNFα، IL1، IL2، GM-CSF توسط ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌شوند.

استفاده از شوک حرارتی جهت افزایش HSP برای استفاده به عنوان واکسن توموری در مطالعات معدودی انجام شده است و تنها مطالعه‌ای که در آن از عصاره سلول‌های حرارت دیده استفاده شده بود توسط اوکاموتو و همکاران (۱۳) انجام شد که از سلول‌های آدنوما کارسینومای کلون موش استفاده کردند و کاهش حجم تومور و افزایش پاسخ سیتوتوکسیک را مشاهده نمودند. تودریک و همکاران (۱۰) رده سلولی ملانومای موشی را پس از شوک حرارتی با اشعه کشته و خود سلول‌ها را بدون لیزکردن به عنوان واکسن و قبل از توموری کردن موش‌ها استفاده کردند. تفاوت مطالعه حاضر در این است که اولا، در این مطالعه سلول‌های حرارت دیده نکروز و لیز شده‌اند. ثانیا، بعد از ایجاد تومور از واکسن استفاده شده است. ثالثا، نوع تومور مورد استفاده متفاوت بوده است.

در این مطالعه زمان تهیه واکسن و همچنین تداخلات و استفاده از مواد شیمیایی جهت تخلیص کاهش داده شده است و بر خلاف سایر تحقیقاتی که در مورد واکسن تومور مبتنی بر HSP انجام شده HSP تخلیص نشده است. بلکه با شوک حرارتی بیان آن افزایش داده شده و با نکروزکردن سلول‌ها انواع HSP متصل به طیف وسیعی از آنتی‌ژنهای توموری در اختیار سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه، فرضیه ما مبنی بر اثر شوک حرارتی و افزایش HSP70 در عصاره حاصل از نکروز این سلول‌های توموری در افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی ضد تومور را تایید کرد. استفاده از این روش ایمونوتراپی در آینده می‌تواند به عنوان یک روش کارآمد و ساده اما دارای مزیت‌هایی نسبت به سایر روش‌ها در درمان تومورهای انسانی مورد استفاده قرار بگیرد. اما رسیدن به این هدف نیازمند مطالعات و بررسی‌های بیشتر است.

References

1. Black AR, Subjeck JR. The biology and physiology of the heat shock and glucose-regulated stress protein

systems. Methods Achiev Exp Pathol, 1991; 15: 126-166
2. Srivastava PK, DeLeo AB, Old LJ. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. Proc Natl Acad Sci, 1986; 83: 3407-3411
3. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. J Exp Med, 1993; 178: 1391-1396
4. Basu S, Srivastava PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. J Exp Med, 1999; 189: 797-802
5. Wang XY, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. J Immunol, 2001;166:490-497
6. Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJ, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK, Issels RD. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. J Immunol, 2002; 169: 5424-5432
7. Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, Issels RD. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. Eur J Immunol, 2001; 31: 1602-1609
8. Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. Blood, 2003; 101: 4485-4491
9. Schueller G, Stift A, Friedl J, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Benkoe T, Jakesz R, Gnant M. Hyperthermia improves cellular immune response to human hepatocellular carcinoma subsequent to co-culture with tumor lysate pulsed dendritic cells. Int J Oncol, 2003; 22: 1397-1402
10. Todryk SM, Eaton J, Birchall L, Greenhalgh R, Soars D, Dalgleish AG, Melcher AA, Pandha HS. Heated tumour cells of autologous and allogeneic origin elicit anti-tumour immunity. Cancer Immunol Immunother, 2004; 53: 323-330
11. Gaston JS. Heat shock proteins and innate immunity. Clin Exp Immunol, 2002; 127:1-3
12. Baker-LePain JC, Reed RC, Nicchitta CV. ISO: a critical evaluation of the role of peptides in heat shock/chaperone protein-mediated tumor rejection. Curr Opin Immunol, 2003; 15: 89-94
13. Okamoto M, Tazawa K, Kawagoshi T, Maeda M, Honda T, Sakamoto T, Tsukada K. The combined effect against colon-26 cells of heat treatment and immunization with heat treated colon-26 tumour cell extract. Int J Hyperthermia, 2000; 16: 263-273