

## ***Histological Analysis Antimetastatic Effect of Intra-venous Injection of Staphylococcal Enterotoxin B and Monophosphoryl Lipid A Against Fibrosarcoma in Lung Tissue***

***Imani Fooladi A.A., Ph.D. , Nourani M.R., Ph.D.\****

***\*\* P.O.Box: 19945-581, Chemical Injury Research Center, Baqiyatallah University Medical of Sciences, Tehran, Iran***

### ***Abstract***

**Purpose:** Staphylococcal enterotoxin B (SEB) is a potent inducer of cytotoxic T-cell activity, cytokine production and necrosis induction in vivo. Monophosphoryl lipid A (MPL) is an adjuvant derived from the lipopolysaccharide of E.coli, Salmonella Minnesota Re595 and other gram negative bacteria.

**Materials and Methods:** In this research, The antitumor and antimetastatic effect of intra-venous injection of Monophosphoryl Lipid A (MPL), staphylococcal enterotoxin B (SEB) and SEB+ MPL was evaluated using Balb/C male mice bearing inoculable mice Fibrosarcoma. The anti tumor effect of SEB+ MPL, SEB and MPL in mice with inoculated fibrosarcoma tumor (Wehi-164) was examined by IV injection and the sizes of the inoculated tumors were determined. The inoculated tumors were also examined histologically. Moreover, histopathologic study in lung tissue didn't showed any metastasis.

**Results:** In the mice IV injected group with SEB+ MPL, reduction of tumor size show a significant difference compared with mice in the SEB and MPL injected and negative control group. A significantly higher frequency of necrosis in tumor tissues was also observed in mice in the IV (SEB+ MPL)-injected group in comparison with other group. Moreover, histopathologic study in lung tissue didn't show any metastasis

**Conclusion:** Our findings suggest that tumor cell death and the prevention of metastasis be caused by increased Cytotoxic T-cell activity in response to IV injection of SEB+ MPL that need to more investigation.

**Key words:** Staphylococcal Enterotoxin B (SEB), Monophosphoryl Lipide A(MPL), Fibrosarcoma, Lung metastasis

## بررسی بافت‌شناسی آثار ضد متاستازی ترکیب انتروتوکسین تیپ B استافیلوکوکوس اورئوس (SEB) به همراه منوفسفوریل لیپید A (MPL) علیه فیبروسارکوما در بافت ریه

عباسعلی ایمانی فولادی \* Ph.D.، محمدرضا نورانی \*\* Ph.D.

\* مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران  
\*\* مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران  
تاریخ وصول: مرداد ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: آبان ماه ۸۸

### چکیده

**هدف:** بررسی آثار ضد متاستازی و توموری منوفسفوریل لیپید A (Monophosphoryl lipid A) و انتروتوکسین تیپ B (Staphylococcus aureus Enterotoxin B) به تنهایی و باهم روی موش‌های Balb/C دارای تومور فیبروسارکوما **مواد و روش‌ها:** آثار ضد توموری SEB، MPL و SEB+MPL به صورت تزریق درون وریدی در موش‌هایی که با فیبروسارکوما (Wehi-164) توموری شده بودند، مطالعه و تومورها از نظر بافت‌شناسی نیز بررسی شد. همزمان بافت ریه نیز مورد مطالعه بافت‌شناسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** در موش‌های توموری که SEB+MPL به صورت درون وریدی تزریق شده بود، اندازه تومور در مقایسه با موش‌هایی که فقط SEB یا MPL گرفته بودند از کاهش معنی‌داری برخوردار بود. میزان نکروز ایجاد شده در گروه دریافت‌کننده SEB+MPL در مقایسه با دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. به علاوه، مطالعات هیستوپاتولوژیکی نشان داد که در بافت ریه هیچ‌گونه متاستازی مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های تحقیق حاضر پیشنهاد می‌کند که مرگ سلول تومور و جلوگیری از متاستاز ناشی از فعالیت سلول‌های T در پاسخ به تزریق درون وریدی SEB+MPL است که مستلزم تحقیقات بیشتری است.

**کلیدواژه‌ها:** انتروتوکسین تیپ B، استافیلوکوکوس اورئوس، منوفسفوریل لیپید A، فیبروسارکوما، متاستاز ریوی

### مقدمه

سلول‌های T (TCR) متصل شده و در کنار مولکول MHC-II عرضه می‌شود. از جمله سوپر آنتی‌ژن‌های مهم باکتریایی، انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، توکسین سندرم شوک سمی (TSST-1)، توکسین‌های اکسفولیاتیو و توکسین‌های تب‌زای استرپتوکوکی و مایکوپلاسما آرتریتیدیس است که تکثیر سلول‌های T را تحریک می‌کند [۲] و باعث آزاد سازی مقادیر زیادی سایتوکاین‌های مربوط به  $Th_1$  (IL-2) و  $INF-\gamma$  و TNF می‌شود [۳ و ۴].

سال‌هاست که مشخص شده سوپر آنتی‌ژن‌ها دارای آثار ضد توموری‌اند، با تجویز پلاسمای حاوی سویه COWAN-I استافیلوکوکوس اورئوس غیرفعال شده با حرارت و پایدار شده با فرمالین اثر ضد توموری آن را در بیماران دارای کارسینومای کولون ثابت شده است [۱]. سوپر آنتی‌ژن‌های باکتریایی مولکول‌هایی است که به رسپتور  $V\beta$  موجود در

آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، صندوق پستی: ۵۸۱-۱۹۹۴۵  
E-mail: nourani.mr@gmail.com hajati

ایمونوگلوبولین را افزایش می‌دهد. در داوطلبانی که واکسن MPL را به‌تنهایی و ترکیبی با سایر ادجوانت‌ها استفاده شد، سطح بالاتری از تحریک ایمنی سلولی و همورال دیده شده است [۹-۱۳]. ارگان‌های مختلفی از قبیل پوست، عضلات، اندو تلیوم، فیروبلاست و... دچار سرطان سارکوما می‌شوند، که در کل به آن سارکومای بافت نرم می‌گویند. ایجاد تومور در فیروبلاست به فیروسارکوما معروف است. تحقیقات کمی در مورد علت ایجاد این سرطان انجام شده است. دلایل پیدایش فیروسارکوما در دو دسته طبقه‌بندی می‌شود. (۱) خصوصیات ژنتیکی مثلاً تغییر در ژن سرکوبگر سرطان به نام  $p53$ ، (۲) نقص سیستم ایمنی، عفونت‌های ویروسی و رادیوتراپی (۳) عوامل محیطی از قبیل انواع تروماها و پروتزهای مصنوعی مثل دریچه قلب و مفصل زانو [۱۶-۱۴]. از آنجایی که فیرو سارکوما الگوی شیوع مشخصی ندارد، آمارهای ارایه شده نیز متفاوت است. در سال ۱۹۹۳ میزان شیوع ۶۰۰۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر تخمین زده شد که با دقیق‌تر شدن عوامل ایجاد کننده تومور به ۱۱۴۰۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر افزایش یافت [۱۷]. مطالعات در خصوص بازگشت مجدد تومور فیروسارکوما نیز متفاوت است و از ۴۲ تا ۵۷ درصد بعد از درمان وحتىی در برخی موارد تا ۸۰ درصد بعد از عمل جراحی گزارش شده است. از خصوصیات مهم این تومور، متاستاز سریع و انفجاری آن از راه گردش خون است که در مقالات از ۴۳ تا ۸۲ درصد ذکر شده است. محل اصلی متاستاز، ریه است که خیلی سریع آلوده می‌شود، اما گره‌های لنفاوی به‌ندرت درگیر می‌شوند و میزان آلودگی بین ۰/۵ تا ۸ درصد گزارش شده است [۱۸]. با توجه به زیادی عود مجدد و متاستاز سریع فیروسارکوما بعد از درمان‌های رایج، به‌نظر می‌رسد که درمان‌های جایگزین یا همراه با درمان‌های رایج ضروری است. مطالعات نشان می‌دهد که در شرایط مناسب، سیستم ایمنی قادر به کنترل سرطان است یا حد اقل از عود مجدد و متاستاز سرطان جلوگیری می‌کند. تقویت سیستم ایمنی بر ضد سلول‌های سرطانی یکی از روش‌های مناسبی

از SEB جمله سوپر آنتی‌ژن‌های باکتریایی است که باعث تکثیر شدید لمفوسیت‌های T انسانی و موشی می‌شود [۶ و ۵] و از رشد سلول‌های توموری جلوگیری می‌کند. در شرایط *In vitro*، SEB با واسطه سلول‌های T باعث کشتار سلول‌های توموری می‌شود [۷]. از دیدگاه دیگر انترتوکسین‌ها علاوه بر نکروز و تخریب تومورها احتمالاً از متاستاز آن جلوگیری می‌کند. همان‌طوری که می‌دانیم جراحی اکثر تومورهای پانکراتیک باعث از بین رفتن تومور و بیماری می‌شود ولی از متاستاز آن جلوگیری نمی‌کند. درمان با اجوانت مثل شیمی درمانی، رادیوتراپی و... در کانسر پانکراتیک ارزش ضد متاستازی کمی دارد. اما انترتوکسین‌ها به‌ویژه انترتوکسین تیپ B استافیلوکوکوس (SEB)، لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTLs) را فعال کرده و منجر به پاکسازی خودبه‌خودی سرطان پانکراتیک می‌شود. از جمله روش‌های موثر برای جلوگیری از متاستاز روشی برمبنای استفاده از سوپر آنتی‌ژن‌ها از جمله SEB بصورت تنها یا ترکیب با سایر ترکیبات باکتریایی و سلولی است. واکسن‌هایی که بصورت ترکیبی با SEB تجویز شد (از قبیل ترکیب SEB با آنتی ژن اختصاصی موسین اپی تلیال Muc-1 موجود در سرطان پانکراس) در مقایسه با SEB تنها دارای اثربخشی مطلوب‌تری بود و به‌نحو موثرتری CTLs را فعال کرده است که پاسخ CTLs اختصاصی تومور است. در واقع کاربرد این واکسن بعد از عمل جراحی تومور برای جلوگیری از متاستاز است و مشاهده شد که این واکسن اولاً یک پاسخ ایمنی سلولی CTLs خوبی ایجاد می‌کند. ثانیاً به‌طور مطلوبی مانع از رشد تومور به‌صورت متاستازی می‌شود [۸]. منوفسفوریل لیپید A یک اجوانت مشتق از لیپوپلی ساکارید موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی از قبیل *E. coli* و سالمونلا است که با جداسازی گروه فسفات و اسید چرب سمیت آن بسیار کاهش یافته و تبدیل به MPL می‌شود. این ترکیب فعالیت ادجوانتی بسیار بالایی دارد و سلول‌های T به‌ویژه  $TH_1$  را فعال می‌کند و تولید گاما ایتترفرون و

درصد فلاسک توسط سلول‌ها پوشیده شده باشد. مراحل پاساژ به ترتیب زیر است:

- محیط سلول‌های WEHI-164 ۱ تا ۲ ساعت قبل از پاساژ تعویض شد. همچنین سلول‌ها از نظر کیفیت و سلامت قبل از تعویض محیط بررسی شد.

- بعد از گذشت زمان ذکر شده، محیط روی سلول‌های WEHI - 164 خارج شد.

- سلول‌ها دوبار با PBS شسته شد.

- یک میلی‌لیتر Trypsin /EDTA به سلول‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۱/۵ دقیقه دو ضربه به کنار فلاسک زده شد و در ۱/۵ دقیقه باقی‌مانده سلول‌ها پیپت شد تا سوسپانسیون تک سلولی حاصل شود (البته از روش پیپتاژ با PBS بدون تریپسین نیز سلول‌ها به خوبی از کف فلاسک جدا شده و به این ترتیب عوارض ناشی از تریپسین روی سلول نیز حذف می‌شود).

- برای خنثی شدن عمل آنزیم، ۲ ml محیط دارای FBS به سوسپانسیون سلولی اضافه شد.

- سلول‌ها به هر فلاسک اضافه شد و در انکوباتور  $5CO_2$  در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

- سلول‌ها هر روز برای تعویض محیط کشت مورد بررسی قرار می‌گرفت.

### آماده‌سازی رنگ تریپان بلو و شمارش سلولی

#### به‌منظور تعیین درصد سلول‌های زنده (viability)

در یک ظرف شیشه‌ای درپوش دار حدود ۰/۲ گرم تریپان بلو ریخته شد و ۰/۰۰۵ گرم سدیم آزاید و ۵۰ میلی‌لیتر سالین به آن افزوده شد. پس از حل شدن با استفاده از کاغذ واتمن صاف شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۵۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو در یک حفره از پلیت ۹۶ خانه‌ای مخلوط شد. بعد از گذشت یک تا دو دقیقه مقداری از مخلوط فوق بین لام نئوبار و لامل قرار گرفت و شمارش سلولی صورت گرفت. در اثر مرگ سلولی نفوذپذیری انتخابی

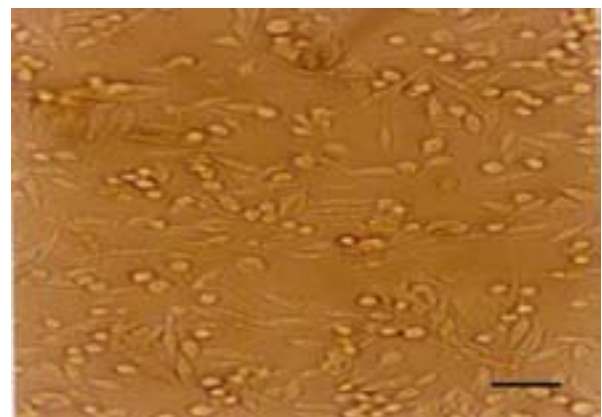
است که امروزه مورد توجه است. از آنجایی که یکی از علل ایجاد سرطان فیروسارکوما، نقص ایمنی است، می‌توان با تقویت سیستم ایمنی حداقل از عود مجدد و متاستاز آن جلوگیری نمود. هدف از این مطالعه بررسی مرفولوژیکی بافت ریه در مواجهه با قدرت ضد متاستازی دو ترکیب باکتریایی SEB و MPL به صورت تکی و ترکیبی در موش‌های مبتلا به تومور فیروسارکوما موشی است.

## مواد و روش‌ها

### کشت، تکثیر و پاساژ سلولی فیروسارکوما

#### موشی (WEHI - 164)

رده سلولی فیروسارکوما موشی (WEHI - 164) از آزمایشگاه گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. شرایط سلول‌های WEHI - 164 موجود در فلاسک به صورت روزانه مشاهده و وضعیت آن‌ها ثبت شد. سلول‌ها از نظر مرفولوژی و احتمال آلودگی ارزیابی شد. مرفولوژی سلول‌ها به صورت دوکی شکل است. محیط قبلی سلول‌ها به آهستگی حذف و محیط جدیدی که دمای آن به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، هر دو روز جایگزین گردید (شکل ۱).



شکل ۱. سلول‌های نرمال WEHI-164 به صورت دوکی شکل مشاهده می‌شود (بار: ۱۰۰ میکرومتر).

پاساژ این نوع سلول‌ها براساس سرعت تقسیم آن‌ها انجام می‌شود. مناسب‌ترین شرایط برای پاساژ زمانی است که ۸۰

### گروه‌بندی موش‌های توموری

زمانی که اندازه تقریبی تومورها به ۵ میلی‌متر رسید طبق مطالعات *In vitro* و منابع موجود، تزریق وریدی به میزان ۱۰ نانوگرم به هر موش که پایین‌تر از دوز کشندگی است (۱ میکروگرم به هر موش) و هر ۷۲ ساعت به مدت دو هفته در گروه‌های زیر انجام شد [۱۹].

الف) تزریق SEB، ب) تزریق MPL، ج) تزریق SEB+MPL، د) تزریق PBS، ه) گروه موش‌های بدون تومور با تزریق SEB+MPL

### تهیه و آماده‌سازی SEB و MPL

SEB و MPL از شرکت سیگما (مونخ، آلمان) تهیه شد و با استفاده از فسفات بافر استریل سریال رقت‌های ۱-۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میکرو لیتر آماده و تزریق شد.

### اندازه‌گیری اندازه تومور

به منظور بررسی روند رشد تومور پس از اینکه اندازه آن به ۵ میلی‌متر رسید، همزمان با شروع تزریق، هر ۴۸ ساعت، طول، عرض، قطر و اندازه تومور با کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد [۲۰].

### جداسازی بافت تومور به منظور انجام

#### آزمایش‌های ریخت‌شناسی

پس از طی دو هفته بعد از تزریقات، موش‌های تحت آزمایش را نخاعی نموده و بافت توموری آن‌ها پس از تثبیت کردن موش روی یک بستر مناسب به وسیله پنس و قیچی جدا شد و داخل بافت چربی اطراف تومور به دقت حذف شد و تومور به کمک قیچی به قطعات کوچکتر تقسیم شد. مناطق کاملاً سفت و سخت برای انجام آزمایش‌های بافت‌شناسی انتخاب شد [۲۱]. بعد از جداسازی تومور با توجه به اینکه بخش مرکزی تومور ممکن است در اثر عدم خون‌رسانی دچار نکروز خود به خودی شود، از نقاط

غشاء از بین رفته و رنگ به درون سلول‌های مرده نفوذ می‌کند. بنابراین سلول‌های مرده به رنگ آبی دیده می‌شوند، در حالی که سلول‌های زنده رنگ نگرفته و شفاف دیده می‌شوند. برای محاسبه تعداد سلول‌های زنده و مرده و تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها از فرمول زیر استفاده شد.

حجم سوسپانسیون  $\times 2 \times 10^6 \times$  ضریب رقت  $\times$  تعداد سلول در ۱۶ خانه = تعداد سلول در سوسپانسیون

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد سلول‌های زنده و مرده در ۱۶ خانه}} = \text{درصد زنده بودن}$$

### توموری کردن موش‌ها

ابتدا سلول‌های فیروسارکوما موشی طبیعی و عاری از هر گونه دستکاری ژنتیکی و ویروسی در ۱۵ فلاسک ۷۵۰ml کشت داده شد. تعداد ۷۰ سر موش Balb/C نر با سن ۶-۴ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران تهیه و به مدت یک هفته در حیوان‌خانه با شرایط موجود سازگار شدند. پس از رشد سلول‌ها در فلاسک‌ها و پر شدن کف فلاسک، سلول‌ها جمع‌آوری شد، پس از تعیین میزان زنده بودن سلول‌ها و شمارش، میزان کل سلول ( $10^7 \times$  Cell) محاسبه شد. پس از بیهوشی موش‌ها با کتامین و زایلین، به هر موش تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در ناحیه راست پشت موش، مجاور ستون فقرات (Flank) تزریق شد (شکل ۲).



شکل ۲. تومور فیروسارکومای ایجاد شده در ناحیه Flank موش و اندازه‌گیری اندازه تومور با کولیس دیجیتالی

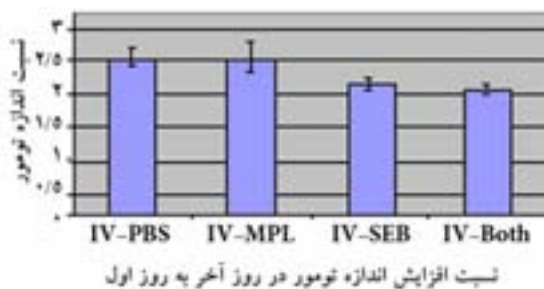
## یافته‌ها

### کشت سلول‌های فیبروسارکوما موشی (Wehi-164)

سلول‌های فیبروسارکوما موشی بعد از ۷۲ ساعت کاملاً به صورت دوکی شکل، تقریباً تمام کف فلاسک‌های کشت سلول را پوشاند و آماده تلقیح به موش شد (شکل ۱).

### توموری شدن موش‌ها و اندازه‌گیری اندازه تومور

تقریباً بعد از گذشت دو هفته تومورها به اندازه ۵ میلی‌متر رسید و تزریق درون وریدی آغاز شد (شکل ۲). اندازه تومور در هر ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد و نسبت اندازه تومور در روز آخر به روز اول در دو گروه IV و IT محاسبه شد. در گروه IV ترکیبات SEB و SEB+MPL در مقایسه با PBS کاهش محسوسی در روند رشد تومور ایجاد کردند و از نظر آماری این اختلاف کاهش، در مقایسه با گروه PBS برای SEB با  $p < 0/028$  و برای SEB+MPL با  $p < 0/009$  معنی‌دار است. اما ترکیب MPL در مقایسه با PBS کاهش محسوسی در روند رشد تومور ایجاد نکرد و از نظر آماری در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نیست ( $p < 0/05$ ) و روند کاهش اندازه تومور ناشی از SEB+MPL در مقایسه با SEB بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی روند افزایش رشد تومور در گروه موش‌های توموردار با تزریق داخل وریدی. اختلاف رشد تومور در گروه‌های مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد منفی و گروه MPL معنی‌دار است.

### ۱- نتایج آزمایش‌های هیستوپاتولوژی

الف) هیستوپاتولوژی تومور: بعد از جداسازی تومور با توجه به اینکه بخش مرکزی تومور ممکن است در اثر عدم خون‌رسانی دچار

سفت و محیطی تومور به منظور مطالعات پاتولوژی استفاده شد.

بعد از جداسازی، قطعات توموری در فرمالین ۱۰ درصد (حجم فرمالین باید ۱۰ برابر بافت تومور باشد) قرار داده شد. پس از شماره‌گذاری به سبد مخصوص بافت شناسی منتقل شد و به مدت ۱۲ ساعت در دستگاه پروسیسینگ قرار گرفت. بعد از اتمام عمل آماده‌سازی، با پارافین در قالب‌های مخصوص تثبیت شد و با دستگاه میکروتوم (Leica, Germany) برش‌های ۴ میکرومتر روی لام‌های شیشه‌ای آغشته به پلی‌ال لیزین تهیه شد [۲۲].

به‌منظور مطالعات بافت شناسی و بررسی میزان نکروز ایجاد شده در بافت‌های توموری از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین استفاده شد [۲۳].

### جداسازی بافت ریه به‌منظور بررسی فعالیت

#### ضد متاستازی SEB و MPL

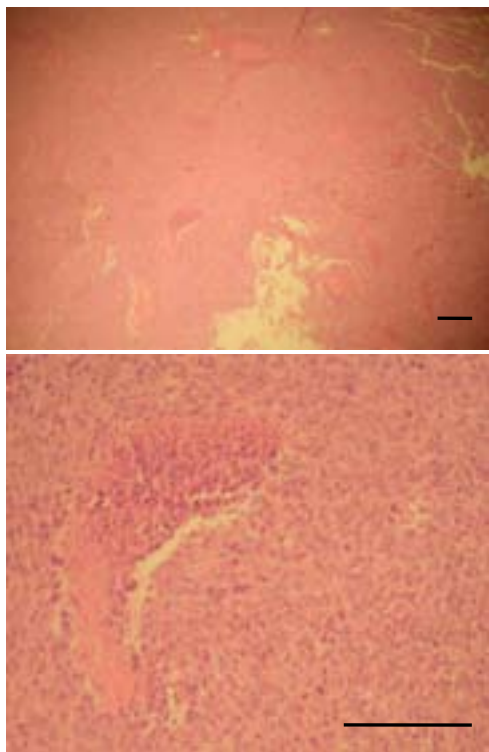
از آنجایی که بافت ریه اولین ارگانی است که در سرطان فیبروسارکوما دچار متاستاز می‌شود [۲۴]، همزمان با جداسازی بافت توموری، ریه موش‌ها نیز جداسازی شد و داخل PBS استریل قرار گرفت و عروق خونی و بافت چربی اطراف تومور به دقت حذف شد. بافت ریه به قطعات کوچک تقسیم شده و در فرمالین ۱۰ درصد (حجم فرمالین باید ۱۰ برابر بافت تومور باشد) قرار داده شد. پس از شماره‌گذاری به سبد مخصوص بافت‌شناسی منتقل شد و به مدت ۱۲ ساعت در دستگاه پروسیسینگ قرار گرفت. بعد اتمام عمل آماده‌سازی، با پارافین در قالب‌های مخصوص تثبیت شد و با دستگاه میکروتوم برش‌های ۴ میکرومتر روی لام‌های شیشه‌ای آغشته به پلی‌ال لیزین تهیه شد [۲۱].

به منظور مطالعات بافت شناسی و بررسی میزان نکروز ایجاد شده در بافت‌های توموری از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین استفاده شد [۲۳].

### ۹- آزمون آماری

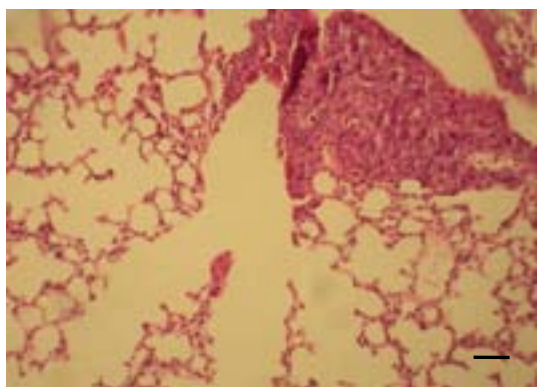
به دلیل کم بودن حجم نمونه از روش‌های غیر پارامتریک استفاده شد و با آنالیز Mann whitney داده‌ها تجزیه و تحلیل شد. حدود اطمینان ۹۵٪ بوده و آنالیز با واریانس دو طرفه انجام شد و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

کشیده فیروبلاستی و میتوز چندتایی با دو بزرگنمایی (بار: ۲۰ میکرومتر).

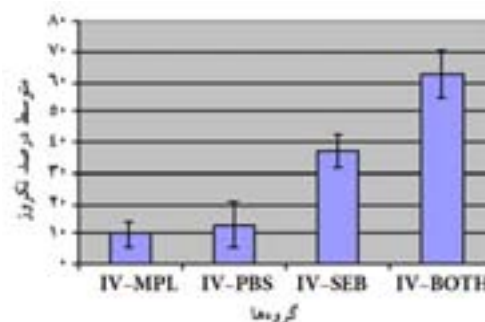


شکل ۶. نکروز به صورت چند کانونی در بافت توموری بعد از تزریق با دو بزرگنمایی (بار: ۲۰ میکرومتر).

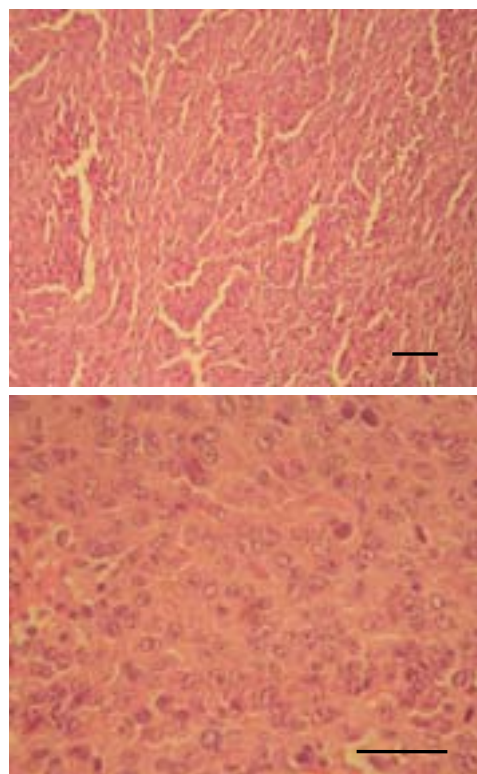
ب) **هستوپاتولوژی بافت ریه:** به منظور بررسی میزان متاستاز ناشی از فیروسارکوما، بافت ریه موش به روش H&E مطالعه شد. نتایج نشان داد که تزریق SEB و SEB+MPL در مقایسه با گروه MPL و شاهد از متاستاز فیروسارکوما به ریه جلوگیری کرده است و هیچ گونه سلول متاستاتیک فیروسارکومایی در بافت ریه موش ها مشاهده نشده است (شکل ۷)



نکروز خود به خودی شوند، با نظر متخصص پاتولوژی از نقاط سفت و محیطی تومور به منظور مطالعات پاتولوژی و رنگ آمیزی H&E استفاده شد. درصد افزایش نکروز ناشی از تزریق SEB+MPL در مقایسه با گروه شاهد با اختلاف  $p < 0/001$  معنی دار است و درصد افزایش نکروز ناشی از تزریق SEB در مقایسه با گروه شاهد با اختلاف  $p < 0/009$  معنی دار است. مشخص شد که ترکیب SEB+MPL در مقایسه با SEB نکروز بیشتری ایجاد می کند و از اختلاف معنی داری برخوردار است ( $p < 0/035$ ) (شکل های ۴ تا ۶).



شکل ۴. نتایج پاتولوژی مربوط به بافت تومور بعد از تزریق داخل وریدی، میزان نکروز ایجاد شده در گروه های مورد آزمایش در مقایسه با شاهد منفی و گروه MPL از اختلاف معنی داری برخوردار است.

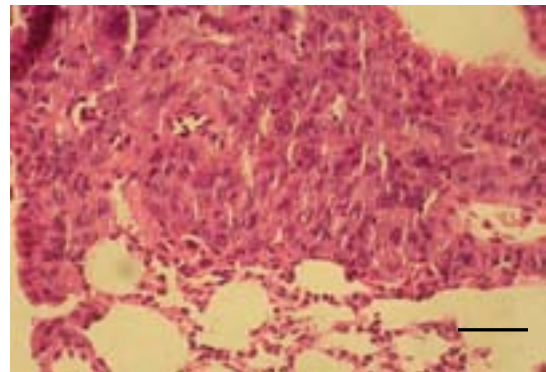


شکل ۵. سلول های نرمال فیروسارکومای موشی (WEHI-164) با نمای

یافته و رشد تومور را متوقف و از متاستاز آن جلوگیری می‌کند [۲۵ و ۲۶]. یکی از اهداف اصلی درمان تومور به واسطه سیستم ایمنی تولید سلول‌های T، مسئول پاکسازی تومور است. زیرا سلول‌های توموری در سطح بسیار ضعیفی آنتی ژن‌هایشان را به سلول‌های T عرضه می‌کنند [۲۷]. روش‌های نوین تلاش می‌کنند تا پاسخ‌های ضد توموری سلول‌های T را به شدت تحریک کنند. سوپر آنتی‌ژن‌ها به ویژه پروتئین‌های باکتریایی و ویروسی قادرند تعداد زیادی از سلول‌های T و منوسیت را با اختصاصیت آنتی‌ژنیک بسیار بالا تحریک کنند، و منجر به تولید حجم وسیعی از سایتوکاین‌های مختلف شوند [۲۸ و ۲۹].

در مطالعه حاضر اثر سینرژسمی یکی از قوی‌ترین سوپر آنتی‌ژن‌های باکتریایی SEB با MPL روی تومور فیبروسارکوما موشی بررسی شد [۳۰]. از آنجایی که سلول‌های سرطانی فیبروسارکوما به سرعت از راه جریان خون متاستاز می‌دهند و به ارگان‌های متعددی از جمله ریه دست‌اندازی می‌کنند [۳۱]، و از طرف دیگر، این سلول‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های سرطانی در مقابل سیستم ایمنی از مقاومت بیشتری برخوردارند و از همه مهمتر این‌که در مقایسه با سایر سلول‌های توموری سریع‌تر رشد می‌کنند، می‌تواند گزینه مناسبی برای ارزیابی سیستم ایمنی تحریک شده با SEB+MPL باشد [۳۲]. به همین منظور در مطالعه حاضر اثر SEB و MPL به صورت تکی و با هم روی سلول‌های سرطانی فیبروسارکوما موشی (Wehi-164) در شرایط *In vivo* به روش تزریق داخل وریدی بررسی و میزان متاستاز در برش‌های بافت‌شناسی ریه مقایسه شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سایز تومور (شکل ۳)، بررسی میزان نکروزیس ایجاد شده در بافت توموری (شکل‌های ۲ و ۴) نشان می‌دهد که رشد تومور در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل منفی از کاهش معنی‌داری برخوردار است ( $p < 0.001$ ) (شکل ۳). از آنجایی که MPL باعث افزایش



شکل ۷. سلول‌های بافت ریه در موش توموری با دو بزرگنمایی (بار: ۲۰ میکرومتر).

## بحث

حذف ویروس‌ها و درمان تومور محققین را وادار کرد که به دنبال درمان‌های بهتر و جایگزین باشند. از پر امیدترین روش‌ها، بررسی خصوصیات تحریک‌کنندگی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در افزایش پاسخ‌های ضد توموری و ضد ویروسی توسط سیستم ایمنی است. مشخص شد که فعال‌سازی سلول‌های لنفوسیتی بعد از درمان با آنتی‌بادی مونوکلونال در شرایط *In vivo* منجر به سرکوبی تومورهای بدخیم در موش می‌شود [۲۴]. درمان‌های رایج در بیماری سرطان شامل جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی است. در بسیاری از موارد پس از یک جراحی موفق مجدداً تومور برگشت می‌کند که ناشی از متاستاز یا پاکسازی ناقص تومور است. علاوه بر این، روش‌های فوق از درجه خطرپذیری بالایی برخوردار است؛ ضمن اینکه در جلوگیری از متاستاز سرطان تأثیر کمی دارند. مطالعات نشان می‌دهد که در شرایط مناسب، سیستم ایمنی قادر به کنترل سرطان است و از متاستاز آن جلوگیری می‌کند. استفاده از سیستم ایمنی بدن بر ضد سلول‌های سرطانی یکی از روش‌های مناسبی است که امروزه مورد توجه است. معمولاً بیماران با سلول‌های توموری بدخیم نسبت به فعالیت‌های ضد توموری سیستم ایمنی از قبیل آپوپتوزیس و نکروزیس و... مقاومت، بنابراین با استفاده از موادی از قبیل سوپر آنتی‌ژن‌ها فعالیت ضد توموری سیستم ایمنی افزایش



با استفاده از اثر همزمان SEB و منوفسفوریل لپید A، از متاستاز فیروسارکوما در بافت ریه جلوگیری شده و اندازه تومور به طور معنی داری کاهش یافت. پولاسکی (Pulaski) و همکارانش از انتروتوکسین B به همراه CD80 علیه سرطان سینه [۳۳] و هان (Huan) و همکارانش از ترکیب انتروتوکسین B و کلون 19-peptide به عنوان سرکوبگر تومور در سرطان معده استفاده کرد [۳۴]. استفاده از اثر سینرژیک SEB و MPL در کاهش تومور فیروسارکوما و جلوگیری از متاستاز آن یک ترکیب کاملاً جدید است. البته ممکن است که MPL و SEB در تولید سایر فاکتورهای نکروتیک در بدن نقش داشته باشد که مستلزم تحقیق بیشتری است. ارزیابی حاضر نشان می دهد که استفاده این دو ترکیب در نتیجه جدیدی را به سوی درمان سرطان فیروسارکوما باز می کند. تحقیقات در شرایط *In vivo* نشان می دهد که تزریق درون وریدی SEB+MPL در درمان این تومور مؤثر است. از طرف دیگر، نتایج هیستوپاتولوژیک مربوط به بافت ریه نشان داده است که از متاستاز نیز جلوگیری می کند و هیچ کدام از موش های توموری در گروه با تزریق SEB+MPL دچار متاستاز ناشی از فیروسارکوما نشده اند.

در این تحقیق، برای اولین بار از ترکیب SEB+MPL به عنوان سرکوب کننده تومور علیه فیروسارکوما در بافت ریه استفاده شد و نتایج تحقیق نشان می دهد که این ترکیب علاوه بر نکروز و تخریب تومورها از متاستاز آن نیز جلوگیری می کند.

مولکول MHC-II در سطح سلول های T می شود، انتظار می رفت که تزریق درون وریدی SEB+MPL نسبت به تزریق تکی هر یک از آن ها تأثیر بیشتری داشته باشد. نتایج آزمایش ها هیستوپاتولوژی این نکته را ثابت کرده است.

نتایج حاصل از بررسی میزان نکروزیس ایجاد شده در بافت توموری نشان می دهد که گروه با تزریق داخل وریدی در مقایسه با گروه کنترل منفی از اختلاف معنی داری برخوردار است ( $p < 0.05$ ) و میزان نکروز ایجاد شده مربوط به تزریق SEB به همراه MPL در مقایسه با هر کدام از ترکیبات SEB و MPL به تنهایی، بیشتر بود و با نتایج کاهش اندازه تومور مطابقت دارد ( $p < 0.05$ ). گزارش های متعددی درباره استفاده از انتروتوکسین B به تنهایی یا به همراه مواد نگهدارنده سوپر آنتی ژن یا مهارکننده افزایش سلول های سرطانی وجود دارد که ضمن کاهش اندازه تومور مانع از متاستاز به سایر قسمت ها می شود، اوکادا (Okada) و همکارانش از انتروتوکسین B و سفارانتین علیه تومور استئوسارکوما استفاده کردند و در زمان های مختلف پس از تیمار، مشخصات ظاهری تومور و ریه را جداگانه بررسی کردند. براساس نتایج این بررسی، اندازه تومور به صورت معنی داری کاهش یافته و آپوپتوز در ندول های متاستاتیک ریه در مقایسه با گروه کنترل و گروه هایی که فقط انتروتوکسین یا سفارانتین به تنهایی دریافت کرده اند، به طور معنی داری افزایش یافته است [۳۵]. نتایج Okada با یافته های تحقیق حاضر مطابقت دارد ولی در تحقیق حاضر به جای سفارانتین و SEB،

## References

1. **Terman DS.** Antitumor effect of immobilized protein A and staphylococcal products: linkage between toxicity and efficacy and identification of potential tumoricidal reagents. *Eurp J Cancer Clin Oncol* 1985; 21(10): 1115-22.
2. **Peavy D L, Adler WH, Smith RT.** The mitogenic effect of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells human peripheral lymphocytes. *J Immunol* 1970; 105: 1453-8.
3. **Carlsson R, Sjogren HO.** Kinetic of IL-2 and IFN- $\gamma$  production, expression of IL-2 receptor and cell proliferation in human mononuclear cells exposed to staphylococcal enterotoxin A. *Cell Immunol* 1985; 96: 175-83.

4. **Fischer H, Dohlston M, Andersson U.** Production Of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by staphylococcal enterotoxin A activated human T-Cells. *J Immunol* 1990; 144: 4663-9.
5. **Marrack P, Kappale J.** The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248: 705-11.
6. **White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P.** The v $\beta$ - specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T-Cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 1989; 56: 27-35.
7. **Lando PA, Dohlston M, Hedlund G, Akerblom E, Kalland T.** T- cell killing of human colon carcinomas by monoclonal antibody – targeted superantigens. *Cancer Immunother* 1993; 36: 223-8.
8. **McConnell EJ, Pathangey LB, Madsen CS, Gendler SJ, Mukherjee P.** Dendritic cell Tumor cell fusion and Staphylococcal Enterotoxin B Treatment in a Pancreatic Tumor Model. *Journal of surgical Research* 2002; 107: 196-202.
9. **Thompson HSG, Davies ML, Watts MJ, Mann AE, Holding FP, Neill TO, et al.** Enhanced immunogenicity of a recombinant genital warts vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A. *Vaccine* 1998; 16: 1993-9.
10. **Neuzil KM, Johnson JE, Tang YW, Prieels JP, Slaoui M, Gar N, et al.** Adjuvants influence the quantitative and qualitative immune response in BALB/c mice immunized with respiratory syncytial virus FG subunit vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 525–32.
11. **Moore A, McCarthy L, Mills KH.** The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and Q21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from TH2 to TH1. *Vaccine* 1999; 17: 2517–27.
12. **Sasaki S, Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kaneko T, et al.** Monophosphoryl lipid A enhances both humoral and cell-mediated immune responses to DNA vaccination against human immunodeficiency virus type 1. *Infect Immun* 1997; 65: 3520 -8.
13. **Fattom A, Li X, Cho YH, Burns A, Hawwari A, Shepherd S E, et al.** Effect of conjugation methodology, carrier protein, and adjuvants on the immune response to Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. *Vaccine* 1995; 13: 1288–93.
14. **Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G.** Myofibroblast. In: Sternberg ss(ed) *Histology for Pathologists*, 2th ed. USA: Lippincott-raven, Philadelphia, 1997, p 129.
15. **Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G.** Myofibroblast: a quarter century after its discovery (editorial). *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 141.
16. **Stout AP.** Fibrosarcoma, the malignant tumor of fibroblasts. *Cancer* 1948; 1: 30-63.
17. **Jorge RT, Lois B T, Hongyu JW, Kangmin Z, Christopher DM F, Susan SD.** Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the Surveillance, Epidemiology and End Results program, 1978–2001: an analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer* 2006; 119: 2922–30.
18. **Andrew ER. Bons, Joints, and Soft tissue Tumor.** In: Robbins and cotran *Pathologic basis of disease*, 7th (ed), Elsevier Saunders 2005, pp 1320- 3.
19. **Mondal TK, Bhatta D, Biswas S, Pal P.** Superantigen- induced apoptotic Death of Tumor cell is mediated by cytotoxic lymphocytes cytokines and NO. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1336-42.
20. **Ma W, YU H, Wang Q, Jin H, Solheim J, Vinod AL.** A Novel Approach for Cancer Immunotherapy: Tumor Cellswith Anchored Superantigen SEA Generate Effective Antitumor Immunity. *J Clini Immunol* 2004; 24(3): 294-301.
21. **Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A.** Modulation of CD4+ and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes by a fraction isolated from Shark cartilage: Shark cartilage modulates anti-tumor immunity. *International Immunopharmacology* 2003; 3: 921-92.

22. **Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB.** Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119( 3): 493-501.
23. **Kawauchi S, Fukuda T, Oda Y, Saito T, Oga A, Takeshita M, et al.** Prognostic Significance of Apoptosis in Synovial Sarcoma: Correlation with Clinicopathologic Parameters, Cell Proliferative Activity, and Expression of Apoptosis-Related Proteins. *Modern Pathol* 2000; 13(7): 755-66.
24. **Kenneth A N, Joshua D I E, David S B, Jeffrey B.** In vivo T-Cell activation by staphylococcal enterotoxin B prevent out growth of a malignant tumor. *proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991; 88: 1074-1078
25. **Kreitman R J,** Immunotoxins for Targeted Cancer Therapy. *AAPS J*. 2006 Aug 18;8(3):E532-51.
26. **Fidler IJ, Kripke ML.** Tumor Cell Antigenicity, Host Immunity, and Cancer Metastasis. *Cancer Immunol Immunotherapy* 1980; 7: 201-5.
27. **Ostrand RS.** Tumor immunotherapy: The tumor cell as antigen-presenting cell. *Current Opin Immunol* 1994; 6: 722–27.
- Fischer H, Dohlsten M, Andersson U, Hedlund G, Ericsson P, Hansson J, et al.** Production of TNF $\alpha$  and TNF- $\beta$  by staphylococcal enterotoxin A activated human cells. *J Immunol* 1990; 144: 4663–9.
28. **Gjorloff A, Fischer H, Hedlund G, Hansson J, Kenney JS, Allison AC, et al.** Induction of interleukin-1 in human monocytes by the superantigen staphylococcal enterotoxin. *Cell Immunol* 1991; 137(1): 61-71.
29. **Proft T, Fraser JD.** Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:299–306.
30. **Poste G, Fidler IJ.** The Pathogenesis of Cancer Metastasis. *Nature* 1980; 283: 139-46.
31. **Shimizu M, Matsuzawa A, Takeda Y.** A Novel Method for Modification of Tumor Cells with Bacterial Superantigen with a Heterobifunctional Cross-Linking Agent in Immunotherapy of Cancer. *Mol Bacteriol* 2003; 25(1): 89-94.
32. **Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S.** Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res* 2000; 60(10): 2710-5.
33. **Huan Y, He Y, Liu M, Jin X, Li X, Liu X, et al.** A comparative study of tumor-suppression effects of enterotoxin B and Chalone 19-peptide on experimental gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2009; 56(89): 270-5.
34. **Okada K, Sakusabe N, Kobayashi A, Hoshi N, Sato K.** Prevention of Lung Metastasis by Intratumoral Injection of Cepharanthin and Staphylococcal Enterotoxin B in Transplantable Rat Osteosarcoma *Jpn. J Cancer Res* 1999; 90: 928–34.