Archive of SID.ir

مقاله پژوهشی

القای پسرفت تومور دهانه رحم ایجادشده با عفونت ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) در مدل موشی با روش درمان ترکیبی بر پایه اسپورهای باکتری *کلستریدیوم نویی* غیر سمی شده و سیس پلاتین از طریق کاهش بیان اونکوپروتئین E6

بهروز عبادی شرف‌آباد [۱]، آزیتا دیلمقانی [۲*]

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۲/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: علیرغم توسعه واکسن‌های ضدویروس پاپیلومای انسانی (HPV)، سرطان دهانه رحم هنوز یک بیماری شایع در زنان، به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه است. وجود یک ریز محیط هیپوکسیک باعث شکست درمان‌های سنتی می‌شود. در این مطالعه، یک روش درمانی ترکیبی مبتنی بر عامل شیمی‌درمانی سیس پلاتین و اسپورهای *کلستریدیوم نویی* غیر سمی (*Clostridium novyi*-NT) برای درمان سرطان دهانه رحم پیشنهاد شده است.

مواد و روش کار: رده سلولی TC-1 که قادر به بیان انکوپروتئین‌های HPV-16 E6/7 است به‌صورت زیر جلدی به پهلوی راست موش‌های ماده ۶-۸ هفته‌ای C57/BL6 پیوند زده شد. موش‌های حامل تومور به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند و پس‌ازآنتخاب گروه کنترل، با روش‌های مختلف ازجمله درمان ترکیبی بر پایه سیس پلاتین و اسپور باکتری، تحت درمان قرار گرفتند. از آنالیز وسترن بلات برای بررسی اثرات درمان ضد هیپوکسی و بیان پروتئین‌های سرکوبگر تومور P53، و از روش RT-PCR برای سنجش تغییرات بیان ژن‌های E6، Bax و Bcl-2 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج ما به وضوح نشان داد که تیمار ترکیبی مبتنی بر *C. novyi*-NT و سیس پلاتین به‌طور قابل‌توجهی بیان پروتئین سرکوبگر تومور p53 را در مقایسه با سیس پلاتین به‌تنهایی افزایش می‌دهد. درعین‌حال، این درمان ترکیبی باعث رگرسیون حجم تومور و کاهش بیان ژن سرطان‌زای E6 مربوط به ویروس پاپیلومای انسانی می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که توسعه یک روش درمانی ترکیبی بر اساس *C. novyi*-NT و سیس پلاتین در برابر سرطان دهانه رحم می‌تواند بر محدودیت‌های درمانی ناشی از وجود مناطق هیپوکسیک تومور غلبه کند.

کلیدواژه‌ها: سرطان دهانه رحم، کلستریدیوم نویی غیررسمی، تومور هایپوکسیک، ویروس پاپیلومای انسانی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره دوم، ص ۱۰۶-۹۳، اردیبهشت ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: دپارتمان بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران، تلفن ۰۴۱۳۳۳۷۲۲۵۶

Email: dilmaghania@tbzmed.ac.ir

مقدمه

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در بین زنان در سراسر جهان است. در سال ۲۰۲۰ میلادی، بیش از شش صد هزار مورد جدید از این بیماری به ثبت رسیده است. در این میان، حدود ۹۰ درصد از موارد مرگ‌ومیر ناشی از این نوع بدخیمی، مربوط به کشورهای کمتر توسعه‌یافته یا درحال‌توسعه است. زیر سویه‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) مهم‌ترین علت ضایعات پیش سرطانی و سرطانی ناحیه دهانه رحم هستند(۱). ویروس پاپیلومای انسانی با تأثیر بر ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، باعث تغییر شکل سلول‌های طبیعی و سرطانی شدن آن‌ها می‌شود. به‌خوبی مشخص شده است که پروتئین‌های E6 و E7 در انواع پرخطر HPV نقش برجسته‌ای در سرطان‌زایی سلول‌های آلوده میزبان دارند. انکوپروتئین E6 تخریب پروتئین p53 را تحریک می‌کند (یک عامل رونویسی حیاتی که بیان ژن‌های دخیل در توقف چرخه سلولی و آپوپتوز را تحریک می‌کند) و انکوپروتئین E7 با غیرفعال کردن pRb و دو پروتئین P106 و P130 تغییرات بیولوژیکی قابل‌توجهی در

[۱] دکترای تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، گروه زیست‌فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۲] دانشیار بیوتکنولوژی دارویی، گروه زیست‌فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

رشد سلولی اعمال می‌کند(۲). علیرغم توسعه روش‌های تشخیص و پیشگیری از طریق واکسیناسیون نوجوانان در برابر زیر واحدهای خطرناک HPV، این بیماری هنوز به‌عنوان یک چالش درمانی حیاتی در اکثر کشورهای فقیر یا درحال‌توسعه در نظر گرفته می‌شود(۳). امروزه شیمی‌درمانی، جراحی، رادیوتراپی، ایمونوتراپی یا روش‌های ترکیبی مبتنی بر این روش‌ها از درمان‌های معمول این بیماری محسوب می‌شوند. علیرغم این پیشرفت‌ها، بقای کلی بیماران مبتلا به این نوع بدخیمی کمتر از ۵۰ درصد است که عمدتاً به دلیل عود مجدد این بیماری پس از درمان است. در نتیجه برای بهبود شاخص بقای کلی لازم است تا حد امکان درمان‌ها شخصی‌سازی شود و با اصلاح روش‌های معمول درمان، احتمال عود و پیشرفت بیماری کاهش یابد(۴). یکی از نامطلوب‌ترین ویژگی‌های تومورهای جامد ازجمله تومورهای مربوط به ناحیه دهانه رحم، وجود نواحی کم اکسیژن یا هیپوکسیک است که غلظت اکسیژن در آن‌ها کمتر از ۱/۵ درصد است. صرف‌نظر از نوع روش درمانی، این شرایط نتیجه درمان را ضعیف می‌کند. بنابراین، راهبردهای درمانی برای مقابله با نواحی کم اکسیژن تومور ضروری است، به‌ویژه در مراحل پیشرفته بیماری که رادیوتراپی اغلب با مشتقات سیس پلاتین به‌عنوان گزینه درمانی اولیه در نظر گرفته می‌شود(۵). اخیراً نشان داده شده است که در شرایط هیپوکسیک، سلول‌های تومور آلوده به HPV، با قرار گرفتن در حالت سکون تکثیرپذیر همراه با برگشت‌پذیری، بیان E6/E7 را به‌شدت کاهش می‌دهند و باعث می‌شوند سلول از چنگ سیستم ایمنی میزبان فرار کند. اگر سلول‌های تومور در حالت تحویل اکسیژن مناسب قرار گیرند، بیان انکوپروتئین‌های E6/E7 به‌سرعت از سر گرفته می‌شود و پس از درمان، به‌عنوان منبع فراوان بیان انکوپروتئینی عمل می‌کند. این فعل‌وانفعال پیچیده، که درنهایت می‌تواند باعث فرار سلول تومور از پیری شود، از طریق مسیر سیگنالینگ Mtor/ PI3K / AKT / در شرایط هیپوکسیک، علیرغم کاهش انکوپروتئین E6 / E7 انجام می‌شود. HIF-1 به‌عنوان یک پروتئین با نقش قابل‌توجه در سازگاری سلول‌های سرطانی با شرایط هیپوکسیک عمل می‌کند و نقش آن در رگ زایی و توسعه سرطان‌های مختلف موردبحث قرار گرفته است. با تثبیت HIF-1α در شرایط هیپوکسیک در سرطان دهانه رحم، REDD1[1] فعال‌شده و mTORC1 را مهار می‌کند. در نتیجه، علی‌رغم مهار E6/E7 با واسطه AKT، سلول‌های سرطانی هیپوکسیک HPV مثبت از روند پیری جان سالم به در می‌برند. بنابراین، هدف قرار دادن سلول‌های تومور در مناطق هیپوکسیک می‌تواند برای یک رژیم درمانی موفق حیاتی باشد(۶، ۷).

تومورهای هیپوکسیک ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی خاصی را نشان می‌دهند که در تصاویر پزشکی قابل‌مشاهده است. هیپوکسی در تومورهای رخ می‌دهد که به‌طور ضعیفی رگ زایی دارند، جایی که منبع اکسیژن قادر به پاسخگویی به نیاز اکسیژن سلول‌ها نیست. بسته به توانایی سلول‌ها برای انطباق با نبود اکسیژن و شرایط محروم از مواد مغذی، ممکن است تحت هیپوکسی شدید و طولانی‌مدت نکروز ایجاد شود. ازاین‌رو، یک رابطه منفی بین کسری از نکروز و pO2 در تومورها مشاهده شده است. مطالعات متعددی به ارتباط بین هیپوکسی و نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی تأمین و نیاز به اکسیژن پرداخته است. تومورهای با ضعف عروقی یا مناطقی با pO2 کم در تومور با عود موضعی مجدد در ارتباط است. بنابراین پارامترهای عروقی ممکن است به‌عنوان نشانگر جانشین هیپوکسی در تومورها قبل از شروع درمان عمل کنند. بااین‌وجود، در مرحله اولیه تومور، درمان با رادیوتراپی نشان داده شده است که مرگ سلولی از تغییرات عروقی برای اکسیداسیون مهم‌تر است، احتمالاً به این دلیل که فقط تغییرات کوچکی در تراکم عروق در این مرحله اتفاق افتاده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که بافت سلولی تومور در وضعیت هیپوکسی را تحت تأثیر قرار می‌گیرد و به‌احتمال‌زیاد ناشی از اثر نیاز به اکسیژن هست(۸).

سیس پلاتین یکی از رایج‌ترین داروهای شیمی‌درمانی است که به‌عنوان خط اول درمان برای بسیاری از سرطان‌ها تجویز می‌شود. این ماده با ایجاد اتصالات برگشت‌ناپذیر به DNA سلول‌های تومور باعث مرگ سلولی ذاتی می‌شود. بااین‌حال، تحقیقات نشان داده است که وجود یک ریزمحیط هیپوکسیک در تومور، از طریق کاهش بیان پروتئین ضد تومور p53، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، افزایش ترشح اگزوزوم و افزایش بیان ناقل گلوکز ۱ (GLUT1) ممکن است مقاومت سلول‌های تومور هیپوکسیک را به این درمان افزایش دهد. بنابراین، ارائه درمان‌های مکمل مبتنی بر عوامل ضد هیپوکسی، که بیان و پایداری پروتئین محوری HIF-1α را که نقش مهمی در القای این مقاومت ایفا می‌کند، هدف قرار می‌دهند، عاملی امیدوارکننده در افزایش اثربخشی درمانی در نظر گرفته می‌شود(۹، ۱۰).

بیش از یک قرن پیش، دکتر ویلیام کولی پسرفت غیرمنتظره یک تومور غیرقابل جراحی را در یک بیمار که به‌طور ناخواسته به عفونت *استرپتوکوک پیوژنز* آلوده شده بود، مشاهده کرد. پس از این گزارش، بسیاری از محققان شروع به بررسی پتانسیل باکتری‌ها برای حمله به تومورها کردند(۱۱). در میان این باکتری‌ها، محققان از خانواده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت بی‌هوازی به نام *کلستریدیوم*

[1] regulated in development and DNA damage responses 1

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

برای درمان‌های ضد تومور استفاده کردند. مطالعات پیش بالینی روی حیوانات نشان داد که این باکتری‌ها می‌توانند در نواحی نکروزه/هیپوکسیک تومور رشد کنند. در بین این خانواده، *Clostridium novyi* بهترین عملکرد را از خود نشان داد. بااین‌حال، مشکل زمانی به وجود آمد که محققان مشاهده کردند که موش‌های مورد آزمایش به دلیل سمیت بیش‌ازحد اسپورهای جوانه زده این باکتری جان خود را از دست می‌دهند. پس از بررسی، محققان درنهایت با حذف ژن آلفا توکسین این باکتری از طریق فرآیندهای حرارتی، یک سویه غیر سمی با *Clostridium novyi*-NT ایجاد کردند و تحقیقات بر روی این سویه متمرکز شد(۱۲). این باکتری نتایج امیدوارکننده‌ای را در مطالعات حیوانی ازجمله در سگ‌های مبتلا به تومورهای طبیعی نشان داده است. هنگامی‌که هاگ‌های *Clostridium novyi*-NT به‌صورت داخل توموری تجویز می‌شوند، به‌طور انتخابی در نواحی هیپوکسیک تومورها ایجاد کلونی می‌کنند و تکثیر می‌یابند(۱۳). این کلونیزاسیون منجر به لیز سلول‌های تومور و آزاد شدن آنتی‌ژن‌های تومور می‌شود و پاسخ ایمنی را تحریک می‌کند(۱۴). کارآزمایی‌های بالینی برای ارزیابی ایمنی و اثربخشی *Clostridium novyi*-NT در درمان تومورهای جامد انجام شده است. یکی از این مطالعات شامل ۲۴ بیمار مبتلا به تومورهای جامد مقاوم به درمان بود. به‌طورکلی، ۴۱ درصد از بیماران کاهش اندازه تومور را به‌عنوان بهترین پاسخ کلی تجربه کردند. شناسایی و مدیریت عوارض جانبی بالقوه مانند سپسیس و قانقاریای گازی برای تجویز ایمن این درمان بسیار مهم است. علاوه بر این، تحقیقات بیشتری برای درک جامع فرآیندهایی لازم است که توسط آن‌ها *Clostridium novyi*-NT باعث تخریب تومور و ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود. مکانیسم‌های دخیل در این عملکرد مثبت ضد تومور به‌صورت کامل، مشخص نیست. به نظر می‌رسد که فرآیند ضد توموری این نوع باکتری به دلیل القای پاسخ ایمنی قوی در میزبان و ترشح چندین پروتئین خارج سلولی با قدرت لیز سلولی باشد(۱۵).

در این مطالعه، برای اولین بار، تلاش شد تا تأثیر درمان ترکیبی این نوع اسپور و عامل شیمی‌درمانی سیس پلاتین بر میزان بیان اونکوپروتئین E6 و عامل ضد توموری p53 در موش‌های مبتلا به تومور ناشی از رده سلولی TC-1 (بیان‌کننده اونکوپروتئین e6) موردبررسی قرار گیرد. انتظار می‌رود نتایج این تحقیقات راه را برای توسعه یک روش درمانی ترکیبی برای افزایش و بهبود عملکرد عامل شیمی‌درمانی سیس پلاتین هموار نماید، همان‌گونه که در قسمت مقدمه بحث شد، یکی از عوامل شکست درمان سرطان دهانه رحم در روش‌های معمول مبتنی بر عوامل شیمی‌درمانی، وجود نواحی هایپوکسیک یا کم اکسیژن است که عامل باکتریایی کلستردیوم نوویی غیر سمی می‌تواند در این نواحی جوانه زده و سلول‌های مقاوم به درمان موجود در این نواحی را از بین ببرد.

مواد و روش کار

فراهم‌سازی کشت سلولی و اسپورهای *Clostridium novyi*-NT:

برای ایجاد سرطان دهانه رحم مرتبط با HPV در مدل موش، رده سلولی TC 1 با قابلیت بیان انکوپروتئین‌های HPV 16 E6/7 از بانک ملی سلولی ایران وابسته به انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. بایستی بیان گردد که رده سلولی TC 1، رده سلولی سرطانی مشتق شده از سلول‌های اولیه اپیتلیال موش نوع C57BL/6 که با استفاده از وکتور رتروویروس آمفوتروپیک LXSN16E6E7 جاودانه شدند و متعاقباً با پلاسمید pVEJB که انکوژن فعال c Ha ras انسانی را بیان می کنند و در ایجاد مدل‌های موشی سرطان دهانه رحم ناشی از عفونت ویروس پاپیلومای انسانی به کار گرفته می شوند. رده سلولی TC 1 در محیط RPMI 1640 (سیگما، ایالات‌متحده آمریکا) با ۱۰درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco، ایالات‌متحده)، ۱درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین (سیگما، ایالات‌متحده)، ۲۵ میلی مولار HEPES (سیگما، ایالات‌متحده آمریکا) و ۱ درصد گلوتامین (سیگما، ایالات‌متحده آمریکا) معلق شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. ما از قبل موفق به تولید اسپورهای بدون ژن کشنده سم آلفاتوکسین از سویه وحشی *C. novyi* نوع B شده بودیم(۱۶). اما به‌اختصار می‌توان گفت که در ابتدا به دلیل سخت رشد بودن این باکتری در محیط‌های جامد، بهترین محیط کشت برای رشد سویه وحشی *Clostridium novyi* از طریق انجام آزمایش‌های کشت تعیین شد. در ادامه با بهره‌گیری از فرایندهای گرمایی ناشی از سیکل‌های دمایی، ژن آلفا توکسین *Clostridium novyi* به‌عنوان اصلی‌ترین عامل مرگ‌آوری باکتری حذف شد. سپس به روش کلنی PCR و استخراج پلاسمید از حذف فاژ حمل‌کننده توکسین نوع آلفا اطمینان حاصل شد. پیش از ایجاد و تزریق اسپور غیر سمی، آزمایش‌های مربوط به غیر سمی بودن اسپورهای حاصل در محیط درون تنی موشی موردسنجش قرار گرفت پس از پردازش، هاگ‌های *C. novyi* NT در قرص‌های لیوفیلیزه حاوی ۱۰ میلیون عدد هاگ، بسته‌بندی و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای استفاده در آینده ذخیره شدند.

طراحی مطالعه حیوانی و ایجاد مدل موش سرطان دهانه رحم مرتبط با HPV:

۲۴ سر موش ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای C57/BL6 با وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم از انستیتو پاستور (ایران، کرج) تهیه و طبق استانداردهای

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

آزمایشگاهی به مدت هفت روز در آزمایشگاه نگهداری و تغذیه شدند. این حیوانات در قفس‌های مخصوص نگهداری موش کوچک آزمایشگاهی نگهداری شدند. محیط ازلحاظ روشنایی به‌گونه‌ای بود که ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی اعمال شد. هوا نیز به‌صورت منظم سیرکوله گردید. این امر توسط دمنده و مکنده‌ای اتوماتیک صورت پذیرفت. دمای اتاق نیز به‌صورت مرتب چک می‌گردید تا دما در محدوده ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشته باشد. همچنین رطوبت هوای اتاق در بازه ۳۰ تا ۶۰ درصد تنظیم شد. پوشال جانوران هر ۴۸ ساعت یک‌بار با پوشال تمیز و ضدعفونی شده جایگزین می‌شد. دسترسی جانوران به غذا و آب به‌صورت نامحدود بود. علت انتخاب این تعداد موش برای رعایت مسائل اخلاقی در کار با حیوانات آزمایشگاهی بود. چراکه بایستی تلاش می‌شد که در عین رعایت بحث تکرارپذیری و معناداری آماری، اصل استفاده حداقلی از موجود آزمایشگاهی نیز رعایت می‌گردید. سپس حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه و شش موش در هر گروه (گروه = ۴ و تعداد = ۶) تقسیم شدند. ایجاد سرطان دهانه رحم مرتبط با HPV، یک‌میلیون سلول TC-1 در ۰/۲ میلی‌لیتر سالین بافر فسفات (PBS) (سیگما، ایالات‌متحده آمریکا) تعلیق شده و به‌صورت زیر جلدی به ناحیه پهلوی سمت راست هر موش تزریق شد. در این مدت موش‌ها روزانه تحت نظر بودند و با ظاهر شدن تومورهای قابل‌لمس، اندازه تومورها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. حجم تومورها با استفاده از فرمول استاندارد (طولانی‌ترین قطر تومور)×(کوتاه‌ترین قطر) ^{۲} × ۰/۵ تعیین شد.

فرایند درمان ترکیبی مبتنی بر هاگ‌های *Clostridium novyi*-NT و عامل شیمی‌درمانی سیس پلاتین:

سیس پلاتین (CAS 15663-27-1) از sigma Aldrich (سیگما، ایالات‌متحده آمریکا) خریداری شد. برای ارزیابی اثرات درمانی شیمی‌درمانی سیس پلاتین به‌تنهایی یا در ترکیب با اثرات ضد توموری اسپورهای *C. novyi*-NT، پس از رسیدن به حجم تومورهای موش در محدوده ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌متر مکعب، موارد زیر انجام شد. گروه ۱: هیچ درمانی دریافت نکردند و ۰/۱ میلی‌لیتر PBS استریل به‌صورت داخل توموری به آن‌ها تزریق شد. گروه ۲: سیس پلاتین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۰/۱ میلی‌لیتر PBS استریل حل شد و به‌صورت داخل صفاقی به هر موش تزریق شد. طبق تحقیقات گذشته، این دوز به‌عنوان دوز بهینه در تحقیقات مربوط به کارایی سیس پلاتین در مدل موشی C57BL/6 در نظر گرفته می‌شود. این تحقیقات نشان داده که تزریق تک‌دوز از این عامل شیمی‌درمانی به این نوع موش‌ها به‌صورت داخل صفاقی و در موارد بیشت از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان، باعث بروز آسیب‌های شدید کلیوی و مرگ حیوان می‌گردد(۱۷). گروه ۳: یک قرص لیوفیلیزه حاوی ۱۰ میلیون هاگ *C. novyi*-NT در ۰/۱ میلی‌لیتر PBS استریل تعلیق شد و به داخل تومور به قسمت‌های مختلف تومور تزریق شد. گروه ۴: این گروه یک گروه درمان ترکیبی است و در روز صفر ۱۰ میلیون اسپور *C. novyi*-NT سوسپانسیون در ۰/۱ میلی‌لیتر PBS دریافت کرد. متعاقباً ۸ ساعت بعد، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیس پلاتین محلول در ۰/۱ میلی‌لیتر PBS را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. طبق مطالعه قبلی ما، روز بیستم پس از شروع درمان به‌عنوان روز پایان درمان انتخاب شد. در این روز، همه حیوانات ۳۰ میکرولیتر محلول بیهوشی با ویژگی‌های زیر دریافت کردند: کتامین ۱۰درصد (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ مدیستار، اشبرگ، آلمان) و زایلازین ۲درصد (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ ریمسر، گریفسوالد، آلمان) در یک سرنگ انسولین منفرد (۲ قسمت کتامین و ۱ قسمت زایلازین) ترکیب شدند و به‌صورت صفاقی به موش‌ها تزریق شد. سپس حیوانات از طریق جابجایی مهره‌های گردن قربانی شدند. سپس بافت تومور به‌دقت جداشده و برای تجزیه‌وتحلیل ژن و بیان پروتئین در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد و برای بررسی هیستوپاتولوژیک در محلول فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

در مقایسه با RNA،DNA یک پلی نوکلئوتید تک‌رشته‌ای است که در برابر تجزیه بسیار حساس هست. کار با RNA به دلیل بی‌ثباتی شیمیایی مولکول‌های RNA و نیز حضور انبوه آنزیم ریبونوکلئاز ((RNase که برای فعالیت خود به یون‌های فلزی نیاز دارد و با حذف این یون‌ها توسط مواد جاذب (مانند EDTA، غیرفعال می‌شود،RNase هیچ نیازی به کوفاکتور یون فلزی ندارد و می‌تواند مدت‌ها همچنان فعال باقی بماند. میکروتیوپ یک‌بارمصرف استریل که به‌طور تجاری در دسترس می‌باشند، معمولاً عاری از RNase هستند و می‌توانند مورداستفاده قرار بگیرند، جهت استفاده از ظروف شیشه‌ای، اتوکلاو به‌تنهایی نمی‌تواند RNase را غیرفعال کند و قرار دادن آن‌ها به مدت حداقل چهار ساعت در ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد لازم است. ظروف پلاستیکی را می‌توان دو ساعت در محلول حاوی دی اتیل پیروکربونات ۱۳درصد DEPC قرار داد و سپس اتوکلاو نمود. این ماده با DNase و RNase موجود در محیط واکنش داده و آن‌ها را غیرفعال می‌کند. انجام اتوکلاو بعد از استفاده از DEPC موجب هیدرولیز DEPC آزاد خواهد شد. برای ساختن محلول‌ها باید حتی‌المقدور از مواد عاری از RNase و آب تیمار شده با DEPC اتوکلاو شده استفاده کردRNA . تام از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت سرطان دهانه رحم جداشده از هر موش استخراج شد. استخراج RNA با کیت ترموفیشر (Thermo Fisher Scientific, USA) (Cat no:K0731) انجام گرفت که به‌صورت خلاصه می‌توان گفت

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

رسوب سلولی در ۲۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون شده و در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری با دور g ۲۵۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. توده سلولی در ۶۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده حاوی بتامرکاپتواتانول به لوله جدید منتقل و به مدت ۱۰ ثانیه به‌آرامی ورتکس شد. ۳۶۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه گردید و پیپتاژ انجام شد. ۷۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به ستون تخلیص Gene Jet RNA purification column اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع داخل لوله دور ریخته شد و ستون تلخیص دوباره به روی لوله گذاشته شد. به مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از بافر شوینده اول به ستون تخلیص اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع داخل لوله دور ریخته شد و ستون تلخیص مجدداً به روی لوله گذاشته شد. به مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از بافر شوینده دوم به ستون تخلیص اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع داخل لوله دور ریخته و ستون تلخیص دوباره به روی لوله گذاشته شد. به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از بافر شوینده دوم به ستون تخلیص اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. لوله جمع کننده دور انداخته شد و ستون تخلیص به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل به مرکز غشای ستون تخلیص اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جهت بررسی خلوص RNA استخراج‌شده، میزان جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ موردسنجش قرار گرفت. محصول استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۲درصد برای بررسی یکپارچگی RNA مورد آزمایش قرار گرفت. ۵۰۰ میکروگرم RNA استخراج‌شده برای سنتز cDNA توسط پرایمر هگزامر تصادفی با استفاده از کیت رونویسی معکوس (Biotech Rabbit، آلمان) طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. در یک میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتری عاری از RNase، از هر یک از نمونه‌های RNA، ۵۰۰ نانوگرم برداشته شد و بر روی یخ انکوبه شد. ۱ میکرولیتر الیگو dT و ۱ میکرولیتر از random hexamer به هر یک از میکروتیوپ‌ها اضافه شد و با آب عاری از nuclease به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. به مخلوط فوق بافر X5 به میزان ۴ میکرولیتر، dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) به میزان ۲ میکرولیتر، ribonuclease inhibitor RiboLock به میزان ۱ میکرولیتر و آنزیم M-MuLV reverse ranscriptase RevertAid به مقدار ۱ میکرولیتر افزوده و حجم کل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط فوق به‌آرامی تکان داده و در دمای ۲۵ درجه به مدت ۵ دقیقه و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا فرآیند سنتز cDNA از روی mRNA صورت گیرد. درنهایت با قرار دادن میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد سبب غیرفعال شدن آنزیم گردید و واکنش خاتمه داده شد. سپس محصول cDNA به‌دست‌آمده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های E6، Bax و Bcl-2:

پرایمرها الیگونوکلئوتیدهایی با طول ۳۰-۱۵ باز هستند که با اتصال به نواحی مشخص روی قطعات DNA الگو، امکان عملکرد آنزیم پلیمراز و تکثیر این قطعات را فراهم می‌کنند. معمولاً غلظت پرایمرهای تهیه‌شده ۱۰۰ میلی مولار در میکرولیتر است که آن‌ها را به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر استریل، رقیق شد تا به غلظت ۲۰ میلی مولار در میکرولیتر برسد. از پرایمر ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. سطح بیان E6 توسط RT-PCR تعیین شد. ۲ میکرولیتر cDNA syntonies تحت سیکل PCR با SYBR Green 2x Master Mix (Amplicon، دانمارک) قرار گرفت. شرایط PCR شامل پیش دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دناتوراسیون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه به مدت ۴۰ سیکل بود. گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان ژن مرجع داخلی واکنش استفاده شد. آغازگرهای ویژه در جدول (۱) بیان شده است. تمامی پرایمرها توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. مقدار mRNA هدف با مقایسه با نمونه شاهد اندازه‌گیری شد، سپس از روش آستانه دوره مقایسه (ΔΔCt) برای محاسبه استفاده شد.

جدول (۱): توالی پیشرو و پسرو پرایمرها و وزن مولکولی آن‌ها

نام ژن	پرایمر	اندازه محصول	توالی پرایمر	ژن رفرانس در بانک جهانی
E6	پیشرو	۳۹۹	5- ATGCACCAAAAGAGAACTG –3	NC_001526.4
	پسرو		TTCTTCTCCCGCATCATCTG -3 5-	
Bax	پیشرو	۱۳۶	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT-3 5-	NM_007527
	پسرو		AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT-3 5-	

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نام ژن	پرایمر	اندازه محصول	توالی پرایمر	ژن رفرانس در بانک جهانی
Bcl2	پیشرو	۱۱۸	5- GAACCCTAAGGCCAACCGTG -3	NM_009741
	پسرو		5- AGGCATACAGGGACAACACAGC -3	
GAPDH	پیشرو	۲۰۹	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG -3 5-	NC_005103.4
	پسرو		5- ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG -3	

اندازه‌گیری میزان بیان پروتئین p53 با استفاده از فن وسترن بلات (Western blot):

پس از توزین بافت تومور، یک قطعه ۵ میلی‌گرمی از بافت گرفته شد و ۳۰۰ میکرولیتر از بافر لیز سرد به‌سرعت به لوله اضافه شد. بافت با هموژنایزر الکتریکی همگن شد. تیغه دومرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شسته شد. پس‌ازآن به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با هم زدن مداوم نگهداری شد. اجزای لیز شده با سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حذف شدند. طبق دستورالعمل سازنده، از کیت کمی پروتئین BCA برای تعیین غلظت پروتئین لیزات اگزوزوم استفاده شد. لیزات اگزوزوم با حجم مساوی از بافر نمونه Laemmli 2X مخلوط شدند. لیزات (۱۵ میکروگرم) پس از جوشاندن به مدت ۵ دقیقه در معرض SDS-PAGE قرار گرفتند و متعاقباً به غشای ۰.۲ میکرومتری immune-Blot™ polyvinylidene difluoride (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) منتقل شدند. سپس غشاها با ۵درصد BSA (Cat No: A-7888؛ Sigma Aldrich, MO, USA) در ۰/۱درصد Tween 20 به مدت ۱ ساعت مسدود شدند. سپس غشاها با آنتی p53 (Abcam) همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد انکوبه شدند. سپس غشاها سه بار با TBST شسته و با آنتی بادی‌های ثانویه خرگوشی IgG H&L (HRP) (Abcam) انکوبه شدند. غشاها سپس با افزایش نورتابی شیمیایی (ECL) به مدت ۱-۲ دقیقه انکوبه شدند. بیان پروتئین به بتا اکتین نرمال شد. تراکم سنجی باندهای پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Gel Analyzer نسخه ۲۰۱۰(NIH, USA) a به‌گونه‌ای انجام شد که قسمت زیر منحنی هر باند بر درصد سطح زیر منحنی باند اکتین مربوطه تقسیم شد. و سپس مقادیر محاسبه شد. مقایسه بین گروه‌ها همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد انجام شد.

آنالیزهای آماری در نرم‌افزار Graph Pad Prism (version 9) و Microsoft Excel 2013 انجام شدند. داده‌ها با میانگین و خطای معیار خلاصه و گزارش شدند. تفاوت در گروه‌ها، با (ANOVA) one-way analysis of variance و تفاوت در گروه‌ها و زمان‌های مختلف، با two-way ANOVA، بررسی شد و در صورت معنی‌داری از آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه دو به دوی بین گروه‌ها استفاده شد. در آزمون‌های فوق، $P<0/05$، از نظر آماری، معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

کاهش حجم تومورها در موش‌های دریافت‌کننده درمان ترکیبی سیس پلاتین و اسپور های *Clostridium novyi*-NT:

پس از اطمینان از جوانه‌زنی هاگ‌ها در گروه موش‌های دریافت‌کننده هاگ، حجم تومورها هر دو روز یک‌بار با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که حجم تومورها در گروه موش‌های دریافت‌کننده هاگ از روز چهارم پس از شروع فرآیند درمان شروع به کاهش می‌کند. درنهایت، پس از جداسازی تومورها از چهار گروه موشی تیمار شده، مشخص شد که میانگین حجم تومورهای گروه سوم که درمان ترکیبی سیس پلاتین و اسپورهای باکتریایی را دریافت کرده بودند به‌طور معناداری ازلحاظ آماری نسبت به دیگر گروه‌های تحت آزمایش با کاهش همراه بوده است.

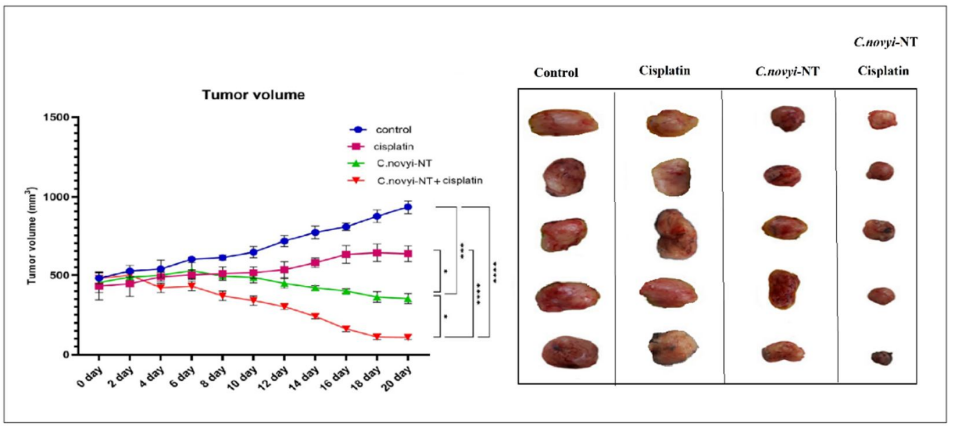
نتایج حاصل از آنالیز RT-PCR برای سنجش بیان ژن‌های E6، Bax و Bcl-2:

بیان ژن‌های مذکور با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد.. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Rest-RG 2009 آنالیز گردید. همان‌طور که در بخش مقدمه اشاره شد، انکوپروتئین‌های E6 و E7 انواع پرخطر HPV، به‌ویژه HPV16، مسیرهای معمول ضد تومور میزبان مانند آپوپتوز ذاتی را تغییر می‌دهند و سپس با ایجاد بی ثباتی ژنومی با هدف قرار دادن دو عامل سرکوب کننده تومور میزبان، p53 و پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) باعث ایجاد سرطان در سلول‌های میزبان می‌شوند. ازاین‌روی، کاهش بیان ژن مربوط به اونکوپروتئین E6 به‌عنوان یک شاخصه مطلوب در کارایی درمان‌های ضد سرطان‌های ایجاد شده در اثر عفونت ویروس پاپیلومای انسانی در نظر گرفته می‌شود.

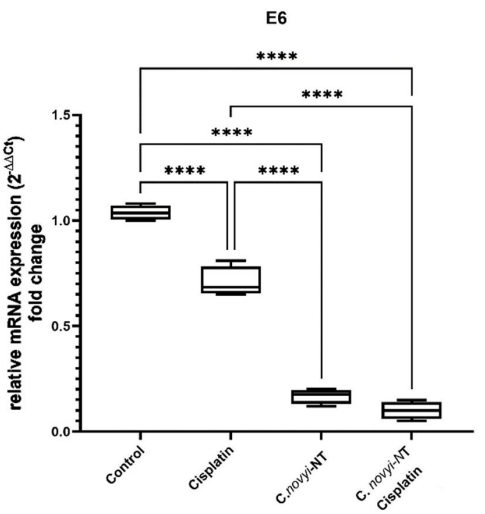
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

خوشبختانه طبق شکل ۲، به‌خوبی مشخص شد که میزان این اونکوپروتئین در گروه دریافت‌کننده درمان ترکیبی سیس پلاتین و اسپورهای *Clostridium novyi*-NT، در مقایسه با دیگر گروه‌های تحت آزمایش، به‌صورت معناداری کاهش پیدا کرده است (شکل ۲).



شکل (۱): مقایسه حجم تومورهای موشی چهار گروه تحت تیمار در طول دوره درمانی بیست روزه. کاهش معنادار حجم تومورهای دریافت‌کننده درمان ترکیبی سیس پلاتین و اسپورهای Clostridium novyi-NT (* P < 0.05, **P < 0.005, *** P = 0.0001, **** P< 0.0001)



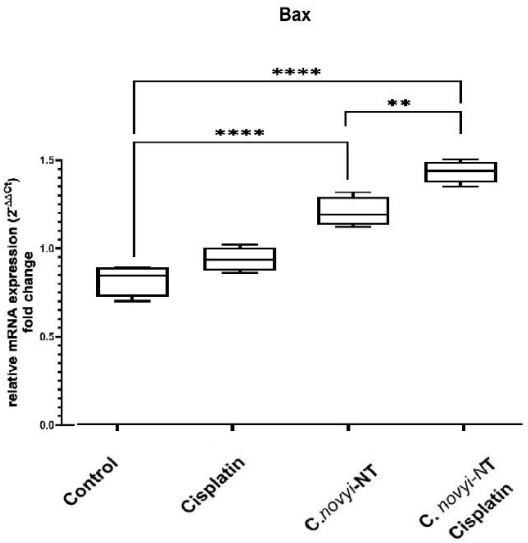
شکل (۲): نمودار مقایسه بیان اونکوژن E6 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ پس از اجرای تیمار موش‌های توموری در چهار گروه مورد آزمایش. (× P <0.05، **P <0.005، *** P = 0.0001، **** P<0.0001)

پروتئین‌های خانواده Bcl-2، فاکتورهای نکروز تومور و آنزیم‌های چرخه سلولی در تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز بسیار مهم هستند. برهمکنش بین میتوکندری و پروتئین‌های خاص خانواده Bcl-2 باعث آزادسازی سیتوکروم c و سایر عوامل القا کننده آپوپتوز می‌شود. حدود ۲۰ پروتئین خانواده Bcl-2 را تشکیل می‌دهند که در درجه اول به‌عنوان واسطه‌ای برای ترویج یا مهار آپوپتوز عمل می‌کنند. مطالعه گسترده رابطه بین پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و سرامیدها از دخالت مستقیم آن‌ها در آپوپتوز ناشی می‌شود. از طرفی بیان ژن Bax توسط ژن سرکوب‌گر تومور p53 تشدید می‌شود و این پروتئین در آپوپتوز وابسته به آن نقش مهمی دارد. نتایج حاصل

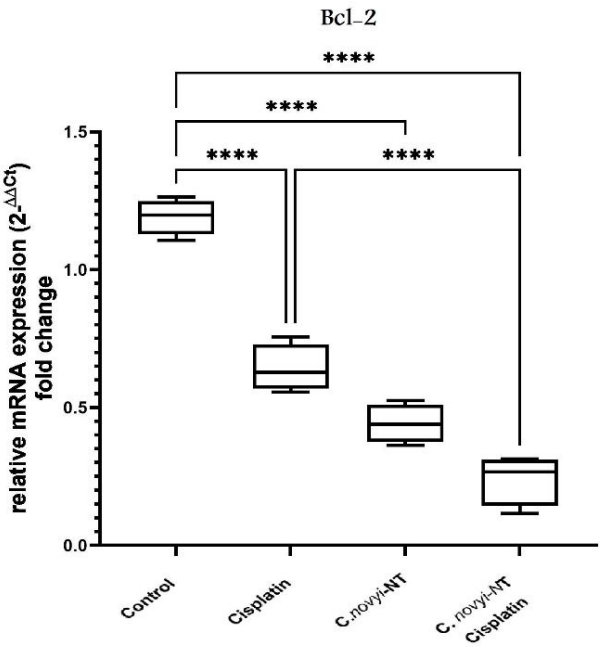
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

از آنالیز RT-PCR به‌خوبی نشان داد که به‌عنوان یک پاسخ مطلوب، میزان بیان ژن Bax در گروه موش‌های توموری دریافت‌کننده درمان ترکیبی سیس پلاتین و اسپور، در مقایسه با سایر گروه‌ها تحت تیمار، به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرده (شکل ۳)، درحالی‌که میزان بیان ژن Bcl-2 در این گروه نسبیت به سایر گروه‌ها، با کاهش معنادار ازلحاظ آماری همراه بوده است (شکل ۴).



شکل (3): نمودار مقایسه بیان ژن Bax پس از اجرای تیمار موش‌های توموری در چهار گروه مورد آزمایش. (× P <0.05، P <0.005 **، **** P<0.0001 ،*** P = 0.0001)



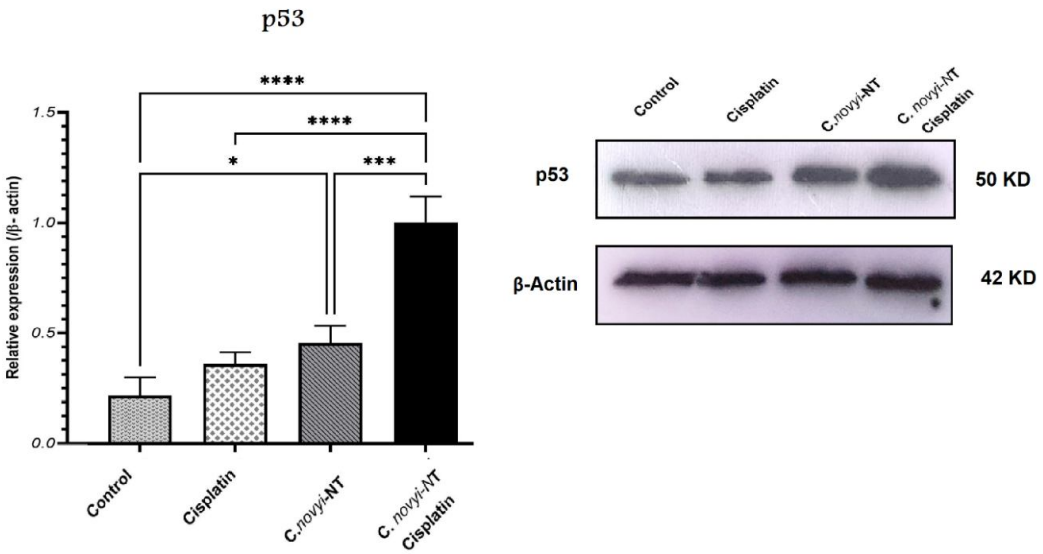
شکل (4): نمودار مقایسه بیان ژن Bcl-2 پس از اجرای تیمار موش‌های توموری در چهار گروه مورد آزمایش. (× P <0.05، P <0.005 **، **** P<0.0001 ،*** P = 0.0001)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نتایج آنالیز وسترن بلات برای سنجش میزان پروتئین سرکوب کننده تومور p53 در گروه‌های توموری تحت تیمار:

فرآیند آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی، یک روش محافظت شده تحت کنترل ژن‌هایی است که برای از بین بردن سلول‌های ناخواسته یا غیر ضروری موجودات زنده استفاده می‌شود. این فرایند ذاتی، در بسیاری از مکانیسم‌های سیستم ایمنی یا بیماری‌ها دخالت می‌کند. تفاوت اصلی این مسیر با نکروز سلولی که مسیر اصلی حذف سلول‌های ناخواسته است این است که آپوپتوز باعث التهاب نمی‌شود و اثر آن محدود به سلول‌های هدف است. آپوپتوز نقش حیاتی در فرآیندهای بیولوژیکی مهم مانند رشد طبیعی، هموستاز بافتی، حذف سلول‌های آسیب‌دیده یا آلوده به ویروس، و حذف سلول‌های ایمنی فعال در برابر آنتی‌ژن‌های خودی دارد این فرآیند در تنظیم سرعت رشد، تکثیر سلول‌ها، رشد و سلامت بدن ضروری است. بروز بسیاری از بیماری‌های خودایمنی، سرطان‌ها و عفونت‌های ویروسی نتیجه عملکرد ضعیف یا مهار پدیده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است. در این میان اونکوپروتئین E6 در زمان آلودگی میزبان به سویه‌های خطرناک ویروس پاپیلومای، با ایجاد اتصال با پروتئین سرکوبگر تومور p53 باعث تخریب این پروتئین شده و سلول‌ها را به سمت نامیرایی و بدخیمی سوق می‌دهند نتایج حاصل از بررسی میزان این پروتئین در گروه‌های موشی تحت تیمار با روش وسترن بلات نشان داد که مقدار آن به‌طور معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده درمان ترکیبی اسپور و سیس پلاتین بیشتر از سایر گروه‌های مورد آزمایش بوده است (شکل ۵).



شکل (5): بررسی و مقایسه میزان پروتئین سرکوبگر p53 در گروه‌های چهارگانه تحت تیمار. (× P <0.05، P <0.005 **، *** P = 0.0001، **** P<0.0001)

بحث

سرطان دهانه رحم یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در سنین باروری در کشورهای درحال‌توسعه و چهارمین بیماری بدخیم شایع زنان در جهان است. ۹۵ درصد سرطان‌های دهانه رحم مربوط به ویروس HPV است. با ۸۵ درصد موارد جدید و مرگ‌ومیر مرتبط با آن، سرطان دهانه رحم یک نگرانی عمده در کشورهای با درآمد کم و متوسط است(۱۸). اگرچه تلاش‌های مختلف پیشگیری ثانویه در کاهش بروز و مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه‌یافته موفق بوده است، سرطان دهانه رحم همچنان یکی از علل اصلی مرگ ناشی از سرطان در زنان است. بهبود روند درمان و کنترل سرطان دهانه رحم مستلزم شخصی‌سازی بیشتر درمان، شناسایی عواملی که باعث عود و پیشرفت می‌شوند و درنهایت بهبود و اصلاح روش‌های معمول درمان است(۱۹). مانند سایر تومورهای جامد، در سرطان دهانه رحم، هیپوکسی یک ویژگی شناخته شده و یک هدف درمانی ثابت است. اکسیژن رسانی کم تومور خطر تهاجم موضعی، متاستاز و شکست درمان را افزایش می‌دهد(۲۰). در طول توسعه سرطان، هیپوکسی به‌عنوان یک ویژگی پاتوفیزیولوژیک نقش اساسی ایفا می‌کند. مولکول‌های پاسخ‌دهنده به هیپوکسی، معروف به HIFs، نقش

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مهمی در پاسخ به هیپوکسی دارند. هنگام مواجهه با شرایط هیپوکسیک، ترکیب HIF-1α و زیرواحد HIF-1β رخ می‌دهد که منجر به تشکیل دایمر، فعال شدن بیان ژن در مناطق هدف، درگیری در تکثیر سلولی، رگزایی، فرآیندهای متابولیک، تضعیف پاسخ ایمنی در برابر سرطان و مقاومت سرطان نسبت به درمان‌های معمول می‌شود. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یک بازیگر با نقش حیاتی در نئوآنژیوژنز ناشی از شرایط هیپوکسیک است و ارتقاء آن توسط HIF-1α تسهیل می‌شود(۲۱). یکی از ترکیباتی که به‌طور گسترده در درمان بدخیمی‌های مختلف ازجمله سرطان دهانه رحم استفاده می‌شود، سیس پلاتین است(۲۲). سیس پلاتین از طریق تنظیم مجدد پروتئین سرکوبگر p53 باعث مرگ سلول‌های تومور می‌شود. بااین‌حال، در شرایط هیپوکسیک، HIF-1α به شدت سطح p53 را سرکوب می‌کند. در نتیجه مقاومت در برابر این درمان افزایش می‌یابد. درعین‌حال، با کاهش اکسیژن در شرایط هیپوکسیک تومور، نشت الکترون‌ها از زنجیره انتقال الکترون رخ می‌دهد که دلیل کاهش جریان الکترون از طریق مجموعه میتوکندری زنجیره انتقال الکترون است. این فرآیند ROS تولید می‌کند که می‌تواند تکه تکه شدن میتوکندری را افزایش دهد و بیان p-Drp1 و Mfn1 را بیشتر کاهش دهد و در نتیجه مقاومت به سیس‌پلاتین افزایش یابد(۱۰، ۲۳). بنابراین، ارائه رژیم‌های درمانی ترکیبی مبتنی بر سیس پلاتین و عوامل ضد هیپوکسیک تومور می‌تواند نویدبخش غلبه بر محدودیت‌های درمانی سیس پلاتین و تقویت مؤثر آن در شرایط هیپوکسیک باشد. اهمیت شکست درمان ناشی از ریزمحیط های هیپوکسیک در همه انواع تومورهای جامد، محققان را به ایجاد استراتژی‌های درمانی هدفمند علیه این نواحی سوق داده است. در این میان، وجود تفاوت‌های فیزیولوژیکی بین سلول‌های ناحیه هیپوکسیک و نورموکسیک تومور، ویژگی اصلی در طرح‌های درمانی جدید علیه تومورهای جامد است. این ویژگی مهم باعث احیای تحقیقات ضد تومور مبتنی بر توانایی باکتری‌های بی‌هوازی اجباری برای استعمار و ادامه تخریب نواحی هیپوکسیک بافت تومور از ابتدای قرن بیست و یکم شده است . باکتری بی‌هوازی *Clostridium novyi*-NT دارای توانایی منحصربه‌فردی برای هدف قرار دادن و رشد در مناطق هیپوکسی مطلق و نکروزه درون تومورهای جامد است. هاگ‌های این باکتری خاص، مهاجرت و جوانه‌زنی انتخابی را در مناطق هیپوکسیک-نکروزه درون تومورها نشان می‌دهند که منجر به پسرفت تومور می‌شود(۲۴). یکی از جذاب‌ترین کاربردهای این باکتری، امکان استفاده از آن به‌عنوان حامل ژن برای ژن‌درمانی هدفمند است. *Clostridium novyi*-NT، پس از حذف سم آلفا (توکسین-A) از سوش وحشی تیپ B به دست آمده است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که درمان ترکیبی، مانند ترکیب *Clostridium novyi*-NT با شیمی‌درمانی سنتی یا پرتودرمانی در بهبود نتایج درمان انواع مختلف سرطان مؤثر بوده است. به‌عنوان‌مثال، گزارش شده است که *Clostridium novyi*-NT در ترکیب با داروهای خاص برهمکنش با میکروتوبول اثرات چشمگیری بر تومورهای تجربی نشان داد و باعث نکروز هموراژیک و پسرفت تومور شد. پاسخ‌های درمانی بسته به مکانیسم اثر عامل برهم‌کنش میکروتوبول متفاوت است (۲۵). بنابراین، داروهای تثبیت‌کننده میکروتوبول منجر به بازگشت آهسته تومور می‌شوند، درحالی‌که بی‌ثبات کننده‌های میکروتوبول جریان خون را به تومورها کاهش می‌دهند و باعث نکروز سریع هموراژیک می‌شوند (۲۶). تزریق *Clostridium novyi*-NT در داخل تومور منجر به جوانه‌زنی اسپور و تخریب متعاقب آن توده‌های تومور تزریقی در ۱۰ بیمار از ۲۴ بیمار شرکت‌کننده در کارآزمایی شد که نشان‌دهنده میزان موفقیت ۴۲ درصد است (۲۷). حتی با تحقیقات گسترده انجام شده، درک ناقصی از مکانیسم‌های درمانی استفاده‌شده توسط این باکتری وجود دارد، اگرچه بدیهی است که این باکتری به‌طور مؤثر یک پاسخ ایمنی قوی را در میزبان ایجاد می‌کند. همچنین، پس از جوانه زدن در بافت تومور میزبان، هاگ‌های این باکتری ساختار لیپیدی غشای سلولی را تخریب کرده و با ترشح چندین پروتئین خارج سلولی ازجمله فسفولیپاز سی (PLC) (NT01CX0979) باعث پسرفت تومور می‌شوند. یک پروژه تحقیقاتی شامل سگ‌های مبتلا به نئوپلازی طبیعی نشان داد که تجویز اسپورهای *Clostridium novyi*-NT از طریق تزریق داخل تومور منجر به افزایش فاگوسیتوز و توسعه عملکرد سلول شبه NK می‌شود. تجویز اسپورهای *Clostridium novyi*-NT از طریق تزریق داخل وریدی باعث افزایش تولید TNF-α ناشی از LPS، افزایش تولید IL-10 ناشی از LTA، و توسعه عملکرد شبه سلولی NK پس از درمان می‌شود. تحقیقات کافی برای روشن کردن مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در تخریب سلول‌های تومور با استفاده از اسپورهای این باکتری انجام نشده است. باهدف بهبود روش‌های درمان ترکیبی مبتنی بر این اسپور، گروه ما برای اولین بار بر روی مکانیسم‌های لیز سلولی ناشی از فعالیت این باکتری در بافت تومور متمرکز شد (۲۸). همان‌طور که گفته شد، تحریک ایمنی میزبان در برابر تومور در طی تزریق اسپورهای *Clostridium novyi*-NT موردبحث قرار گرفته است. بر اساس مطالعه قبلی ما، پیش‌بینی کردیم که آنزیم فسفولیپاز C (PLC) (NT01CX0979) که در طول جوانه‌زنی هاگ‌های *Clostridium novyi*-NT در محل تومور ترشح می‌شود، می‌تواند نقش کلیدی در القای مرگ سلول‌های سرطانی داشته باشد. مطالعات مستقلی در مورد اثر ضد توموری این آنزیم مربوط به سویه *Clostridium novyi*-NT تاکنون گزارش

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نشده است (۲۹). خوشبختانه مشخص شده است که این پروتئین شباهت ساختاری زیادی با سم آلفا مربوط به *کلستریدیوم پرفرنجنس* دارد که اطلاعات خوبی در مورد آن وجود دارد. تخریب گسترده غشای پلاسمایی و القای نکروز با غلظت لیتیک فسفولیپاز C در خانواده کلستریدیوم‌ها (PLC) نشان داده شده استبرهمکنش بین میتوکندری و پروتئین‌های خاص خانواده Bcl-2 باعث آزادسازی سیتوکروم c و سایر عوامل القاکننده آپوپتوز می‌شود(۳۰). حدود ۲۰ پروتئین خانواده Bcl-2 را تشکیل می‌دهند که در درجه اول به‌عنوان واسطه‌ای برای ترویج یا مهار آپوپتوز عمل می‌کنند (۳۱). مطالعه گسترده رابطه بین پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و سرامیدها از دخالت مستقیم آن‌ها در آپوپتوز ناشی می‌شود . در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت سرآمید سنتاز (CerS) با اضافه شدن Bak نوترکیب پرو آپوپتوز به‌صورت خارجی افزایش یافت، درحالی‌که مهار پروتئین‌های ضد آپوپتوز Bcl-2 باعث سنتز C16-ceramide شد که قابل‌توجه است. در نتیجه می‌توان استنباط کرد که روش‌های جایگزین برای کنترل القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی از طریق سنتز سرآمید توسط گروه Bcl-2 وجود دارد(۳۲، ۳۳) . به دنبال این استدلال، نتایج RT-PCR برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن پرو آپوپتوز Bax نشان داد که میزان این عامل در گروه‌های دریافت‌کننده درمان ترکیبی هاگ *Clostridium novyi*-NT و عامل شیمی‌درمانی سیس پلاتین نسبت به سایر گروه‌های تحت درمان، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. در همان زمان، کاهش قابل‌توجهی در سطح بیان ژن پروتئین محدودکننده آپوپتوز Bcl-2 در این گروه دریافت‌کننده درمان ترکیبی در مقایسه با گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده سیس‌پلاتین مشاهده شده است. به‌طور خلاصه می‌توان گفت که هاگ‌های *Clostridium novyi*-NT می‌توانند پس از تزریق داخل توموری یا داخل وریدی در موش‌های مبتلا به سرطان دهانه رحم با HPV مثبت نفوذ کرده، کلونیزه و جوانه بزنند. پس از جوانه‌زنی، این هاگ‌ها در کمتر از چهار روز پس از تزریق شروع به القای پسرفت تومور می‌کنند. نتایج این تحقیق به‌وضوح نشان داد که استفاده از یک رژیم‌درمانی ترکیبی مبتنی بر هاگ *C. novyi*-NT و سیس پلاتین می‌تواند بر محدودیت‌های درمانی عامل شیمی‌درمانی سیس پلاتین در تومورهای دارای مناطق هیپوکسیک در سرطان دهانه رحم غلبه کند. همچنین کارایی درمان را افزایش می‌دهد و به‌عنوان یک گزینه مطلوب در توسعه روش‌های درمان ترکیبی برای تومورهای هیپوکسیک جامد در نظر گرفته می‌شود.

نتیجه گیری

تحقیقات ما نشان داد که ارائه یک روش درمانی ترکیبی مبتنی بر هاگ‌های *C. novyi*-NT و سیس پلاتین می‌تواند بر محدودیت‌ها و مقاومت درمانی ناشی از ریزمحیط‌های هیپوکسیک در سرطان‌های دهانه رحم HPV مثبت غلبه کند. اما مکانیسم این پدیده کاملاً مشخص نیست، اما با غلبه بر محدودیت‌های موجود، این روش دیدگاه مثبتی در توسعه روش‌های مؤثر درمان ضد تومور هیپوکسی دارد..

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه اساتید و کارکنان گروه بیوتکنولوژی دارویی مستقر در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی نماییم.

منابع مالی

این مقاله از پایان‌نامه دکتری تخصصی بهروز عبادی شرف‌آباد مستخرج شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، (شماره پژوهانه: ۶۴۳۷۱) تدوین شده است.

تضاد منافع

مؤلفین اظهار می‌دارند که هیچ منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

نویسندگان به‌صورت فعال در تمام مراحل اجرا و تحلیل نتایج مطالعه و همچنین تألیف مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی آن را مطالعه و تائید می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز (IR.TBZMED.VCR.REC.1398.434) بررسی و تأیید شد. این معاونت دارای یک کمیته اخلاقی است که با کمک‌هزینه تحصیلی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بر تمامی جنبه‌های اخلاقی پژوهش انجام شده (ازجمله مباحث اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و اخلاق در انتشار پژوهش) نظارت کامل دارد. علاوه بر این، تمام کارهای حیوانی تحت استانداردهای کمیته ملی اخلاق در زیست پزشکی ایران انجام شد.

References:

1. Wardak S. Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Med Dosw Mikrobiol 2016;68(1):73-84.
2. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. Mutat Res - Rev Mutat Res 2017;772:23-35. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.001
3. Spayne J, Hesketh T. Estimate of global human papillomavirus vaccination coverage: analysis of

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

country-level indicators. BMJ Open 2021;11(9):e052016. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-052016

4. Davies-Oliveira J, Smith M, Grover S, Canfell K, Crosbie E. Eliminating cervical cancer: progress and challenges for high-income countries. Clin Oncol 2021;33(9):550-9. https://doi.org/10.1016/j.clon.2021.06.013
5. Vaupel P. Pathophysiology of solid tumors. The impact of tumor biology on cancer treatment and multidisciplinary strategies: Springer; 2009. p. 51-92. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74386-6_4
6. Bossler F, Kuhn BJ, Günther T, Kraemer SJ, Khalkar P, Adrian S, et al. Repression of human papillomavirus oncogene expression under hypoxia is mediated by PI3K/mTORC2/AKT signaling. MBio 2019;10(1):10.1128/mbio. 02323-18. https://doi.org/10.1128/mBio.02323-18
7. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Lohrey C, Bulkescher J, Rösl F, Jansen L, et al. Induction of dormancy in hypoxic human papillomavirus-positive cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2017;114(6):E990-E8. https://doi.org/10.1073/pnas.1615758114
8. Narva SI, Seppänen MP, Raiko JR, Forsback SJ, Orte KJ, Virtanen JM, et al. Imaging of tumor hypoxia with 18F-EF5 PET/MRI in cervical cancer. Clin Nuc Med 2021;46(12):952-7. https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000003914
9. Devarajan N, Manjunathan R, Ganesan SK. Tumor hypoxia: The major culprit behind cisplatin resistance in cancer patients. Crit Rev Oncol Hematol 2021;162:103327. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103327
10. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol 2014;740:364-78. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025
11. Staedtke V, Roberts NJ, Bai R-Y, Zhou S. Clostridium novyi-NT in cancer therapy. Gen Dis 2016;3(2):144-52. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.01.003
12. Sharafabad BE, Abdoli A, Abdolmohammadi Khiav L, Meskini M, Jamur P, Dilmaghani A. Therapeutic Potential of Clostridium novyi-NT in Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. Curr Cancer Drug Targets 2023;23(9):682-96. https://doi.org/10.2174/1568009623666230413094253
13. Staedtke V, Bai R-Y, Sun W, Huang J, Kibler KK, Tyler BM, et al. Clostridium novyi-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats. Oncotarget 2015;6(8):5536. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3627
14. Krick EL, Sorenmo KU, Rankin SC, Cheong I, Kobrin B, Thornton K, et al. Evaluation of Clostridium novyi-NT spores in dogs with naturally occurring tumors. Am J Anim Vet Sci 2012;73(1):112-8. https://doi.org/10.2460/ajvr.73.1.112
15. Janku F, Zhang HH, Pezeshki A, Goel S, Murthy R, Wang-Gillam A, et al. Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores in patients with treatment-refractory advanced solid tumors. Clinl Cancer Res 2021;27(1):96-106. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2065
16. Sharafabad BE, Abdoli A, Panahi M, Khiav LA, Jamur P, Jafari FA, et al. Anti-tumor Effects of Cisplatin Synergist in Combined Treatment with Clostridium novyi-NT Spores Against Hypoxic Microenvironments in a Mouse Model of Cervical Cancer Caused by TC-1 Cell Line. Adv Pharmaceut Bull 2023;13(4):817. https://doi.org/10.34172/apb.2023.084
17. Sears SM, Sharp CN, Krueger A, Oropilla GB, Saforo D, Doll MA, et al. C57BL/6 mice require a higher dose of cisplatin to induce renal fibrosis and CCL2 correlates with cisplatin-induced kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol 2020;319(4):F674-F85. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00196.2020
18. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. Obstet Gynecol 2020;40(5):602-8. https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

19. Jalil AT, Karevskiy A. The cervical cancer (CC) epidemiology and human papillomavirus (HPV) in the middle east. Int J Env Eng Educ 2020;2(2):7-12. https://doi.org/10.55151/ijeedu.v2i2.29
20. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. Mol Cancer 2019;18:1-15. https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9
21. Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B, Molavi O, Ghesmati Z, Sabzichi M, et al. Up-down regulation of HIF-1α in cancer progression. Gene 2021;798:145796. https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145796
22. Federico C, Sun J, Muz B, Alhallak K, Cosper PF, Muhammad N, et al. Localized Delivery of Cisplatin to Cervical Cancer Improves Its Therapeutic Efficacy and Minimizes Its Side Effect Profile. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2021;109(5):1483-94. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.11.052
23. Han Y, Kim B, Cho U, Park IS, Kim SI, Dhanasekaran DN, et al. Mitochondrial fission causes cisplatin resistance under hypoxic conditions via ROS in ovarian cancer cells. Oncogene 2019;38(45):7089-105. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0949-5
24. Wang L, Wang Q, Tian X, Shi X. Learning from Clostridium novyi-NT: How to defeat cancer. J Cancer Res Therapeut 2018;14(Suppl 1). https://doi.org/10.4103/0973-1482.204841
25. Yaghoubi A, Ghazvini K, Khazaei M, Hasanian SM, Avan A, Soleimanpour S. The use of Clostridium in cancer therapy: a promising way. Rev Res Med Microb 2022;33(2):121-7. https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000281
26. Dang LH, Bettegowda C, Agrawal N, Cheong I, Huso D, Frost P, et al. Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents. Cancer Biol Ther 2004;3(3):326-37. https://doi.org/10.4161/cbt.3.3.704
27. Janku F, Zhang HH, Pezeshki A, Goel S, Murthy R, Wang-Gillam A, et al. Intratumoral Injection of Clostridium novyi-NT Spores in Patients with Treatment-refractory Advanced Solid Tumors. Clin Cancer Res 2021;27(1):96-106. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2065
28. DeClue AE, Axiak-Bechtel SM, Zhang Y, Saha S, Zhang L, Tung D, et al. Immune response to C. novyi-NT immunotherapy. Vet Res 2018;49(1):38. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0531-0
29. Sharafabad BE, Abdoli A, Abdolmohammadi Khiav L, Meskini M, Jamur P, Dilmaghani A. Therapeutic Potential of Clostridium novyi-NT in Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. Curr Cancer Drug Targets 2023;23(9):682-96. https://doi.org/10.2174/1568009623666230413094253
30. Czabotar PE, Garcia-Saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2023;24(10):732-48. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00629-4
31. Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. Saudi J Biol Sci 2015;22(6):760-72. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.005
32. Alizadeh J, da Silva Rosa SC, Weng X, Jacobs J, Lorzadeh S, Ravandi A, et al. Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy. Eur J Cell Biol 2023;102(3):151337. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151337
33. Albeituni S, Stiban J. Roles of Ceramides and Other Sphingolipids in Immune Cell Function and Inflammation. In: Honn KV, Zeldin DC, editors. The Role of Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 169-91. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21735-8_15

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Studies in Medical Sciences, Vol. 35(2), May 2024

Original Article

INDUCTION OF REGRESSION OF CERVICAL CANCER CAUSED BY HPV INFECTION IN A MOUSE MODEL USING COMBINATION THERAPY BASED ON CLOSTRIDIUM NOVYI-NT SPORES AND CISPLATIN THROUGH REDUCTION OF E6

Behrouz Ebadi Sharafabad[1], *Azita Dilmaghani*[2]*

Received: 20 February, 2024; Accepted: 18 May, 2024

Abstract

Background & Aims: Despite the development of anti-human papillomavirus (HPV) vaccines, cervical cancer is still a common disease in women, especially in developing countries. The existence of a hypoxic microenvironment causes the failure of traditional treatments. In this study, a combined treatment method based on cisplatin and Clostridium novyi-NT is proposed for the treatment of cervical cancer.

Materials & Methods: The TC-1 cell line, which is capable of expressing HPV-16 E6/7 oncoproteins, was transplanted subcutaneously into the right flank of 6–8-week-old female C57/BL6 mice. Tumor-bearing mice were randomly divided into four groups, and after selecting the control group, they were treated with different methods, including combined treatment based on cisplatin and bacterial spores. Western blot analysis was used to investigate the effects of antihypoxia treatment and the expression of P53 tumor suppressor proteins, and RT-PCR was used to measure changes in the expression of E6, Bax, and Bcl-2 genes.

Results: This study clearly showed that a combined treatment with C. novyi-NT and cisplatin significantly increased the expression of the p53 tumor suppressor protein compared with cisplatin alone. Simultaneously, this combined treatment causes regression of tumor size and decreased expression of the E6 carcinogenic gene related to human papilloma virus.

Conclusion: This study showed that the development of a combined treatment method based on C. novyi-NT and cisplatin against cervical cancer can overcome the treatment limitations caused by the hypoxic areas of the tumor.

Keywords: Cervical Cancer, Clostridium Novyi-NT, Human Papilloma Virus, Hypoxic Tumor

Address: Tabriz University of Medical Sciences, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Tabriz, Iran

Tel: + 984133372256

Email: dilmaghania@tbzmed.ac.ir, dilmaghani.a@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024: 35(2): 106 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] *Ph.D. in Pharmaceutical biotechnology, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[2] *Associate Professor of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*

Archive of SID.ir