بسمه تعالی

طرح فرصت مطالعاتی در جامعه و صنعت

عنوان طرح

فارسی:

ارزیابی پیش بالینی درمان سرطان پستان توسط سلولهای دندریتیک مجاور شده با لیزات سلول های توموری در مدل موش

انگلیسی:

Preclinical evaluation of breast cancer treatment using the dendritic cells loaded with tumor cell lysates in a mouse model

مشخصات عضو هیئت علمی

نام و نام خانوادگی : ساناز شیخ زاده تخصص اصلی : ایمنی شناسی

آخرین مدرک تحصیلی: دکتری تخصصی رتبهٔ دانشگاهی : استادیار

آدرس و تلفن تماس: ارومیه ، دانشکده دامپزشکی ، گروه میکروبیولوژی – تلفن تماس:۰۹۱۴۳۴۵۴۱۸۲– ۰۴۴۳۱۹۴۲۵۶۲

مشخصات شرکت

نام شرکت: پشتیبان زیست فناوری آروین پادتن

مدیر عامل و عضو هیئت مدیره : دکتر نوروز دلیرژ

آدرس و تلفن تماس: ارومیه ، جاده سرو، پارک علم و فناوری- تلفن تماس: ۰۹۱۴۴۴۳۲۶۵۰

هدف طرح:

انجام مرحله پیش بالینی تولید واکسن سرطان پستان بر پایه سلولهای دندریتیک

مدت اجرای طرح: ۱۲ماه به صورت پاره وقت

مقدمه و بیان اصلی تحقیق:

سرطان پستان شایع ترین نوع سرطان در زنان سراسر جهان است، به طوری که سالیانه حدود یک میلیون مورد جدید از این بیماری در دنیا تشخیص داده می شود (۱) و ۵۰۲۰۰۰ زن در سراسر جهان در اثر ابتلا به این سرطان جان خود را از دست می دهند (۲) . در ایران نیز این سرطان، شایع ترین بدخیمی زنان محسوب می شود و ۲۴/۴ درصد بدخیمی های شناسایی شده در زنان را تشکیل می دهد (۳) . طبق آمار جدید در ایران سالانه ۶۱۶۰ مورد ابتلا به سرطان پستان شناسایی می شوند که از این میان ۱۰۶۳ مورد منجر به مرگ می شود (۴) از طرفی پس از سالها پیشرفت در زمینه بهداشت، هنوز انواع سرطان و از جمله سرطان پستان از مشکلات اساسی در اغلب کشورهاست. در این میان مصرف گسترده داروهای رایج ضد سرطان از قبیل تاکسان و آنتراسیکلین ها باعث ایجاد مقاومت درمانی می شود به طوری که سایر گزینه های درمانی را نیز محدود می کند (۵). هرچند ایران یکی از کشورهایی است که میزان بروز سرطان پستان کمتری نسبت به بقیه کشورها دارد، افزایش میزان بروز آن در سال های اخیر، این بیماری را به عنوان رایج ترین بدخیمی در میان زنان

ایرانی نشان داده است. سن بروز این بیماری در ایران حدود یک دهه کمتر از کشورهای توسعه یافته است و بیش از ۳۰ درصد بیماران را افراد زیر ۳۰ سال تشکیل می دهند(۶).

روش‌های معمول درمان سرطان از جمله شیمی درمانی و پرتودرمانی، نه تنها سلول‌های توموری، بلکه همه سلول‌های در حال تقسیم و تکثیر سریع را بدون هیچ گونه تمایزی هدف قرار می‌دهند و قادر به مبارزه با متاستازهای اولیه و ثانویه نیستند. در نتیجه بیماران سرطانی اغلب از عوارض جانبی مخرب و کیفیت بسیار پایین زندگی رنج می‌برند. با توجه به این مشکلات، امروزه تمرکز عمده بر روی ایمونوتراپی به عنوان یک روش جدید و کارآمد برای مبارزه با سرطان می‌باشد. چرا که ایمونوتراپی، باعث القا پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضدتومور با حداقل عوارض جانبی می‌شود (۷). واکسیناسیون از جمله موضوعاتی است که در زمینه ایمونوتراپی سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. چندین کارآزمایی بالینی و پیش بالینی به تحقیق در زمینه واکسن‌های سرطانی مختلف از جمله آنتی‌ژن‌های خالص‌سازی شده، پپتیدهای سنتزی با توالی مشخص، ویروس‌های نوترکیب کدکننده آنتی‌ژن‌های توموری، استخراج RNA مشتق از سلول‌های توموری و هم چنین استفاده از سلول‌های کل توموری پرداخته‌اند (۸). سلول‌های کل توموری در واقع تمام آنتی‌ژن‌های اختصاصی[1] و آنتی‌ژن‌های همراه تومور[2] شناخته شده و ناشناخته را برای عرضه همزمان به هر دو نوع سلول‌های T CD4+ و T CD8+ بیان می‌کنند و باعث گسترش مخزنی از کلون‌های سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن‌های توموری برای فعال شدن می‌شوند و در نتیجه احتمال فرار تومور از دست سیستم ایمنی را کاهش می‌دهند (۸). یکی از روش‌های استفاده از کل آنتی‌ژن‌های همراه توموری، تهیه عصاره سلول‌های توموری می‌باشد. واکسیناسیون با عصاره سلول توموری نیاز به شناسایی و تخلیص آنتی‌ژن‌های توموری منفرد، قبل از شروع درمان را رفع کرده و باعث کاهش زمان بین تشخیص تومور و درمان می‌شود.

سلول‌های دندریتیک به عنوان آغازگر و تنظیم کنندهٔ قوی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضد آنتی‌ژن‌های توموری فعالیت می‌کنند. با توجه به نقش مهم این سلول‌ها، توجه خاصی به استفاده از آنها در ایمونوتراپی تومور معطوف شده است (۹). یکی از استراتژی هایی که مورد مطالعه قرار گرفته است، جداسازی پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک و سپس تمایز آنها به سلول‌های دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن‌های توموری در محیط آزمایشگاه و تزریق مجدد به بدن بیمار است (۱۰).

---

[1] Tumor Specific Antigen
[2] Tumor Associated Antigen

پالسینگ سلولهای دندریتیک در خارج از بدن فرایندی است که در آن سلولهای دندریتیک با منشا اتولوگ با آنتی ژن های مورد نظر بارگذاری شده و تحت شرایط مطلوب در خارج از بدن موجود زنده بالغ می شوند سپس DC حاصله برای شروع پاسخ ایمنی حفاظت کننده به بیمار تجویز می شود. در مقایسه با هدف گیری in vivo ، پالسینگ خارج بدنی سلولهای دندریتیک دارای ریسک کمتر، کارایی بیشتر و مشکلات فنی کمتری است. مزیت پالسینگ به روش ex vivo این است که سلولهای دندریتیک از ریز محیط سرکوب کننده سیستم ایمنی تومور در داخل بدن برداشته شده و تحت اثر کوکتیلهای مختلف سایتوکاینی در محیط کشت به زیر مجموعه های اختصاصی سلول دندریتیک بالغ می شوند که در این روش هم بالغ شدن سلولهای دندریتیک تسهیل می شود و هم بیان مولکولهای کمک تحریکی برای پرایم کردن لنفوسیتهای T افزایش می یابد، که معمولا این روندها در داخل بدن بیمار مبتلا به سرطان با اشکال روبرو هستند (۱۱).

پالسینگ DC ها با آنتی ژن های سرطانی، مرحله مهم در تهیه واکسن سلول دندریتیک می باشد. سلول دندریتیک معمولاً با آنتی ژنهای سلول کامل whole-cell antigen بدست آمده از نمونه های سرطانی اولترسونیکیت شده یا متناوبا منجمد و ذوب شده، عصاره سلولهای توموری، پپتیدهای آنتی ژنیک مصنوعی سرطان ، DNA یا RNA از سلولهای سرطانی و اگزوزومهای مشتق شده از سلولهای سرطانی؛ با/ بدون استفاده از ادجوانت مجددا به بدن بیمار تزریق می شوند (۱۱).

در طرح حاضر از عصاره سلول توموری کامل برای پالسینگ سلولهای دندریتیک استفاده خواهد شد. روش پالسینگ ex vivo سلولهای دندریتیک با عصاره سلول توموری کامل در آزمایشات مختلف مربوط به درمان سرطانهای تخمدان، پروستات، ملانوما، کارسینومای سلول کلیوی (RCC) و گلیوبلاستوماglioblastoma استفاده شده است. در برخی تومورها نظیر تومور پستان که آنتی ژنهای اختصاصی تومور خاصی ندارند، استفاده از سلول توموری کامل یا عصاره سلول توموری (نشان دهنده کل محتوای پروتئین سلول های توموری لیز شده است) نه تنها از نیاز به خالص سازی آنتی ژنهای توموری خواهد کاست (۱۲) بلکه از دست دادن آنتی ژن یا جهش در اپی توپ های مهم برای سلولT و در نتیجه فرار تومور از پاسخ سیستم ایمنی اتفاق نخواهد افتاد (۱۳). در حالیکه تعدد آنتی ژن ها در عصاره سلولی کامل از مزیتهای آن به شمار می رود. از سوی دیگر باید توجه داشت که رقابت بین آنتی ژنهای مختلف برای برداشته شدن و فرآوری توسط سلول دندریتیک، ممکن است بر تحریک پاسخ لنفوسیتهای T تاثیر منفی داشته باشد (۱۱). علاوه بر این، استرس سلولی ناشی از فرآیندهای لیتیک می تواند باعث ایجاد مکانیسمهای ایمنی اکتسابی مانند بیان پروتئین های شوک حرارتی (HSP)، که پس از نکروز اولیه یا ثانویه از سلولهای مرده آزاد می شوند، گردد. HSP ها ممکن است باعث شناسایی و برداشت بهتر سلولهای در حال مرگ توسط DC ها شوند؛ علاوه بر این، پپتیدهای آنتی ژنیک مشتق از تومور ممکن است به HSP ها متصل شوند و برای ارائه آنتی ژنیک به

شیوه ای کارآمدتری بازیافت شوند (۱۳). علاوه بر این مطالعات نشان داده اند که مبتلایان به تومور که با عصاره سلول توموری کامل واکسینه شده بودند، بطور قابل توجهی پاسخ بهتری از نظر کاهش حجم و اندازه تومور نسبت به مبتلایان واکسینه شده با یک آنتی ژن توموری مشخص داشتند (۱۳).

در مطالعه حاضر از رده سلولی سرطان پستان موش Balb/c به نام 4T1 استفاده می شود. این رده سلولی قابلیت تهاجمی زیادی دارد و از تومور خود به خودی ایجاد شده در موش BALB/c مشتق شده است. این رده سلولی دارای چندین ویژگی می باشد که آن را به عنوان مدل حیوانی سرطان پستان انسان مناسب می نماید. از جمله: ۱) سلولهای توموری به آسانی در غدد پستانی جای می گیرند، بنابراین تومور اولیه در مکان آناتومیکی صحیح خود رشد می کند. ۲) همانند سرطان پستان انسان، سرطان متاستاتیک پستان 4T1 به طور خود به خودی از تومور اولیه پیشرفت می کند. هم چنین پیشروی متاستاز 4T1 به عقده لنفاوی و سایر ارگانها از جمله گره لنفاوی، خون، کبد، ریه، مغز و استخوان بسیار مشابه سرطان پستان انسان می باشد (۱۴)

در مطالعه حاضر از عصاره سلول توموری کامل که از رده سلولی 4T1 تامین شده است برای پالسینگ سلولهای دندریتیک استفاده خواهد شد و سپس این سلولهای دندریتیک پالسینگ شده به موشهای مبتلا به تومور پستان تزریق خواهند شد تا اثرات واکسن مبتنی بر سلول دندریتیک هم بر روی عملکرد سیستم ایمنی موش مبتلا به تومور و هم پاسخ نسبی objective response تومور به واکسن مورد ارزیابی قرار گیرد.

نظر به اهمیت دندریتیک سلها به عنوان سلولهای حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن به هر دو نوع لنفوسیتهای TCD8+ وTCD4+ و اینکه قابلیت تحریک بهتر پاسخ ایمنی را دارا می باشند، دو استراتژی اصلی ایمونوتراپی شامل : ۱) واکسنهای سلول دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژنهای توموری در خارج از بدن جاندار (برون تن) Ex Vivo ۲) هدف گیری مستقیم TLR و سایر گیرنده های روی سطح سلول دندریتیک در داخل بدن جاندار، توسط واکسن، بصورت (درون تن) in vivo می باشند (۱۱).

روش های درمانی نوین، قبل از این که کاربرد عمومی و بالینی در مورد انسان پیدا کند می بایست در مدل های آزمایشگاهی و حیوانی مورد بررسی دقیق قرار گیرد. از آن جائی که مطالعات آزمایشگاهی مدل استفاده از سلول های دندریتیک در تحریک سیستم ایمنی قبلا توسط محققین مختلف از جمله دلیرژ و همکاران (۱۵) نشان داده شده است، لذا طرح حاضر بر اساس روش اول یعنی تولید دندریتیک سلهای بارگذاری شده با آنتی ژنهای توموری به روش in vivo در مدل موشی سرطان پستان انجام خواهد شد.

بیان مسأله

در حال حاضر یک نفر از هر ۸ زن در طول زندگی خود مبتلا به سرطان پستان می شود (۱۶). این سرطان به زودی با افزایش سن جمعیت و اتخاذ شیوه زندگی غربی و صنعتی به عنوان یک چالش مهم اقتصاد سلامت در کشورهای با درآمد کم تا متوسط از جمله ایران تبدیل خواهد شد (۱۷). بیماران سرطانی به روش های مختلف جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی درمان میشوند اما به علت عوارض جانبی و کاهش کیفیت زندگی بیماران تحت درمان با این روش ها، امروزه توجه زیادی به ایمونوتراپی به عنوان یک روش ایمن و اختصاصی شده است.

آنتی ژنهای توموری بر خلاف آنتی ژنهای مربوط به باکتریها و سایر عوامل بیماریزا، منشا خودی دارند و سیستم ایمنی اغلب نسبت به آنها دارای تحمل می باشد (۱۳) بر خلاف ملانوم و کارسینوم سلول کلیوی (RCC)، که بهتر در برابر ایمونوتراپی ها پاسخگو می باشند، سرطان پستان به طور ذاتی ایمنی زایی ضعیف دارد چرا که میزان بروز آن در افرادی که درمانهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت کرده اند، افزایش نمی یابد. از طرف دیگر ریز محیط تومور نیز عوامل سرکوب کننده سیستم ایمنی را آزاد می کند که با تأثیر منفی بر پاسخ ایمنی عرضه آنتی ژن را دشوار می کنند (۱۸). با این وجود حتی در انواع تومور که به طور ذاتی پاسخگو به ایمونوتراپی در نظر گرفته نمی شوند می توان با فعال سازی مناسب سیستم ایمنی، ایمنی زایی بوجود آورد. بنابراین ایمونوتراپی در حال حاضر به طور گسترده ای به عنوان یک عنصر کلیدی در درمان سرطان پستان شناخته شده است (۱۷). از میان روشهای ایمونوتراپی، مزیت روش واکسیناسیون، القای یک پاسخ حفاظت طولانی مدت ناشی از ایجاد خاطره ایمنی می باشد که علاوه بر نابودی توموراز عود مجددآن نیز جلوگیری خواهد نمود. ترکیبات مختلفی از جمله واکسن سلول کامل،واکسن پپتیدی و واکسن سلول دندریتیک به عنوان واکسن درایمونوتراپی مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۹).

از زمانی که Steinman و همکارانش برای اولین بار سلولهای دندریتیک را در بافتهای مختلف مورد شناسایی قرار دادند، مطالعات متعددی در خصوص مورفولوژی و عملکرد این سلولها به عمل آمده و در این رهگذر روشن گردیده که سلولهای دندریتیک به عنوان سلولهای حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن عمل می کنند. توانایی منحصر بفرد این سلولها در تحریک و فعال سازی سلولهای T دست نخورده آنها را به عنوان یک باور طبیعی در فعال سازی سیستم ایمنی مطرح ساخته است. از آنجائیکه حضور سلولهای توموری و عوامل مترشحه از آنها باعث تضعیف پاسخ ایمنی بیمار به آنتی ژنهای توموری می گردد، این فرضیه توسط پاره ای از محققین مطرح گردید که اگر سلولهای دندریتیک در خارج از بدن با آنتی ژنهای توموری به اشکال مختلف مجاور شوند به دلیل رهایی از محیط ظریف مهار کننده

تومور قادر به تحریک پاسخ ایمنی در خارج از بدن بیمار و در محیط in vivo خواهند شد (۲۰). در راستای آزمون این فرضیه عناصر سلولی سیستم ایمنی بویژه سلولهای T در خارج از بدن و در مدلهای حیوانی با سلولهای دندریتیک مجاور شده با آنتی ژن تحریک شدند. توانایی این سلولها در تحریک پاسخ ایمنی مبتنی بر سلول T در خارج از بدن و مدلهای حیوانی مشوق محققین در جهت استفاده از آنها برای واکسیناسیون بیماران مبتلا به سرطان گردید در این رابطه تا کنون مطالعات بالینی روی بیماران مبتلا به رابدومیوسارکوما، یوئینگ سارکوما، نوروبلاستوما، ملانوم، کارسینوم سلولهای کلیه، سرطان پروستات، کبد و سینه انجام گرفته و نتایج حاصل مبین سالم، بی خطر و مؤثر بودن این نوع واکسیناسیون بوده است (۲۰ و ۱۹).

در ابتدا مطالعات روی واکسن های اتولوگ مبتنی بر سلول cell- based vaccine، بر سلول های تومور غیر فعال شده متمرکز بود. این واکسنهای سرطان سلول کامل، whole-cell cancer vaccines در عمل بهره وری نسبتاً محدود داشتند (۱۹) در یکی از اولین آزمایشات کلینیکی انجام شده در این خصوص، سلولهای توموری استخراج شده از بیمار تحت تشعشع قرار گرفته و به همراه ادجوانت bacillus Calmette–Guerin (BCG) مجددا به بدن بیماری که تومور از آن جدا شده بود تزریق گردید (۱۱).

سلولهای توموری منبع غنی آنتی ژن و اپی توپ برای هر دو لنفوسیتهای TCD4+ و TCD8+ می باشند و مزیت این روش ایجاد پاسخ ایمنی بر علیه تمام آنتی ژنهای موجود در سلول توموری است و اتولوگ بودن آن امکان واکسینه شدن بیماران با آنتی ژنهای اختصاصی تومور را فراهم می آورد. عیب این روش نیاز به تهیه مقدار زیادی بافت توموری است. یک راه حل ارایه شده برای این مشکل، استفاده از یک یا چند لاین سلولی برای تهیه عصاره سلولی آلوژنیک برای استفاده در بیماران با تومورهای مشابه می باشد. اشکال بزرگ واکسنهای عصاره سلول کامل این است که علیرغم اینکه منبع غنی آنتی ژن هستند ولی اغلب فاقد محرک برای فراخوانی و فعالسازی سلولهای ایمنی می باشند (۱۱).

در واکسنهای سلول دندریتیک، از این سلولها برای القای پاسخ لنفوسیتهای T اختصاصی آنتی ژن استفاده می شود. علت استفاده سلولهای دندریتیک به عنوان واکسن این است که سلولهای دندریتیک، سلولهای حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن سیستم ایمنی هستند. آنها دارای سه ویژگی اصلی هستند که آنها را به سلول ایده آل برای القای پاسخ های سلول های T ضد تومور تبدیل می کند: ۱) آنتی ژن را عرضه می کنند ، ۲) می توانند سیگنال های برون زا را تشخیص داده و به تحریک کننده قوی سلول T تبدیل شوند و ۳) می توانند پاسخ T-helper را پلاریزه کرده و ماهیت پاسخ ایمنی را تعیین نمایند (۲۱). بنابراین برای نیل به حداکثر کارایی واکسن های سرطانی، آنتی ژن باید مستقیماً توسط DC ها برداشت شوند و این کار را می توان با پالسینگ سلولهای دندریتیک در خارج از بدن ex vivo pulsing

و یا هدف گیری DC ها در درون بدن(in vivo targeting) انجام داد.Sipuleucel-T ، واکسنی علیه مراحل آخر سرطان پروستات مقاوم در برابر اخته که به تایید سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا FDA رسیده است و اولین واکسن درمانی سلولهای دندریتیک علیه سرطان می باشد، عصر جدیدی را پیش روی ایمونوتراپی سرطان قرار داده است (۱۹).

پالسینگ سلولهای دندریتیک در خارج از بدن فرایندی است که در آن سلولهای دندریتیک با منشا اتولوگ با آنتی ژن های مورد نظر بارگذاری شده و تحت شرایط مطلوب در خارج از بدن موجود زنده بالغ می شوند سپس DC حاصله برای شروع پاسخ ایمنی حفاظت کننده به بیمار تجویز می شود. در مقایسه با هدف گیری in vivo ، پالسینگ خارج بدنی سلولهای دندریتیک دارای ریسک کمتر، کارایی بیشتر و مشکلات فنی کمتری است. مزیت پالسینگ به روش ex vivo این است که سلولهای دندریتیک از ریز محیط سرکوب کننده سیستم ایمنی تومور در داخل بدن برداشته شده و تحت اثر کوکتیلهای مختلف سایتوکاینی در محیط کشت به زیر مجموعه های اختصاصی سلول دندریتیک بالغ می شوند که در این روش هم بالغ شدن سلولهای دندریتیک تسهیل می شود و هم بیان مولکولهای کمک تحریکی برای پرایم کردن لنفوسیتهای T افزایش می یابد، که معمولا این روندها در داخل بدن بیمار مبتلا به سرطان با اشکال روبرو هستند (۱۱).

پالسینگ DC ها با آنتی ژن های سرطانی، مرحله مهم در تهیه واکسن سلول دندریتیک می باشد. سلول دندریتیک معمولاً با آنتی ژنهای سلول کامل whole-cell antigen بدست آمده از نمونه های سرطانی اولترسونیکیت شده یا متناوبا منجمد و ذوب شده، عصاره سلولهای توموری، پپتیدهای آنتی ژنیک مصنوعی سرطان، DNA یا RNA از سلولهای سرطانی و اگزوزومهای مشتق شده از سلولهای سرطانی؛ با/ بدون استفاده از ادجوانت مجددا به بدن بیمار تزریق می شوند (۱۱).

در مطالعه حاضر از عصاره سلول توموری کامل که از رده سلولی 4T1 تامین شده اند برای پالسینگ سلولهای دندریتیک استفاده خواهد شد و سپس این سلولهای دندریتیک پالسینگ شده به موشهای مبتلا به تومور سرطان پستان تزریق خواهند شد تا اثرات واکسن مبتنی بر سلول دندریتیک هم بر روی عملکرد سیستم ایمنی موش مبتلا به تومور و هم پاسخ نسبی objective response تومور به واکسن مورد ارزیابی قرار گیرد.

٤- اهداف پژوهش:

هدف کلی: تعیین اثر ایمونوتراپی در درمان سرطان پستان

اهداف اختصاصی : بررسی اثرات ایمونوتراپی سرطان پستان با استفاده از سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با عصاره سلولهای توموری پستان بر روی تغییر حجم تومور، بقای موش ها، میزان تکثیر لنفوسیت های طحالی، تولید سیتوکین های IL-2، IL-10، IL-4 و IFN-γ در موش های BALB/c مبتلا به سرطان پستان

اهداف کاربردی طرح :

۱. تولید واکسن بر علیه تومورهای مختلف
۲. افزایش طول عمر و میزان پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به سرطان

۵ – فرضیات:

۱) ایمونوتراپی سرطان پستان با استفاده از سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با عصاره سلولهای توموری پستان باعث تغییر در میزان تولید سیتوکین های IL-2، IL-10، IL-4 و IFN-γامی شود.
۲) ایمونوتراپی سرطان پستان با استفاده از سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با عصاره سلولهای توموری پستان باعث افزایش تکثیر لنفوسیت های طحالی می شود.
۳) ایمونوتراپی سرطان پستان با استفاده از سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با عصاره سلولهای توموری پستان باعث تغییر در حجم بافت تومور پستان می گردد.
۴) ایمونوتراپی سرطان پستان با استفاده از سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با عصاره سلولهای توموری پستان باعث افزایش طول عمر مبتلایان می شود.

روش انجام کار:

۱)جامعه مورد مطالعه، شامل موش های ماده خالص نژاد BALB/c با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته می باشد که از انیستیتو پاستور ایران خریداری خواهند شد.

موشهای خریداری شده در ۳ گروه ۱۰ تایی به صورت تصادفی و به ترتیب زیر تقسیم خواهند شد:

گروه A (گروه کنترل سالم) شامل حداقل ۱۰ موش نژاد خالص سالم خواهد بود که تحت هیچ تیماری قرار نخواهند گرفت.

گروه B (گروه درمانی) شامل حداقل ۱۰ موش نژاد خالص می باشد که در آنها تومور القا شده است. موشهای این گروه تحت حداقل ۲ بار تزریق واکسن حاوی سلولهای دندریتیک با فاصله یک هفته قرار خواهند گرفت.

گروه C (گروه کنترل توموری) شامل حداقل ۱۰ موش نژاد خالص می باشد که در آنها تومور القا شده است. موشهای این گروه تحت هیچ گونه درمانی قرار نخواهند گرفت.

۲) القای تومور پستان در موش BALB/c

کشت رده سلولی 4T1

تریپسینه کردن سلولهای چسبنده

توموری کردن موش ها: تزریق زیر جلدی $۱۰^{۵}$ سلول توموری زنده محلول در µL ۵۰ بافر PBS

معاینه روزانه موش ها از نظر وجود تومور قابل لمس

۳)تهیه عصاره سلولهای توموری به روش فریز/دفریز(Freeze/thawing): ۴ مرتبه لیز سلولهای توموری با روش انجماد در نیتروژن مایع و ذوب مجدد در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد.

۴) تعیین میزان پروتئین موجود در عصاره سلولهای توموری به روش برادفورد

۵) تولید سلولهای دندریتیک

خارج کردن مغز استخوان ران و درشت نی موش و استحصال سلولهای پیش ساز سلولهای دندریتیک و کشت آنها در محیط کشت و

پالسینگ و بلوغ آنها در مجاورت لیزات سلولهای توموری

۶) تیمار موش ها با واکسن حداقل دو بار با فاصله یک هفته یک بار.

الف) ارزیابی تغییرات حجم تومور در موشها با استفاده از روش اندازه گیری با کولیس ورنیه دار.

ب) ارزیابی تغییرات وزن موشها در مدت مطالعه

ج) بررسی میزان بقای موش ها: بدین منظور ۴ موش از هرگروه بعد از اتمام دوره درمان تا روز مرگ طبیعی در اثر رشد تومور در قفس های جداگانه نگهداری می شوند و روزانه مرگ و میر آنها ثبت خواهد شد.

۷) انجام نمونه گیری و آزمایشات در روز ۲۱ :

الف) کشتار موشها به شیوه انسانی بوسیله کتامین- زایلازین

ب) جداسازی سلولهای تک هسته ای از طحال موشها

ج) انتقال سلولهای تک هسته ای طحال به پلیتهای ۲۴ خانه ای و کشت آنها در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2

د) سنجش میزان سایتوکاین هایIL-4 ، IL-10 ،IL-2 و IFN-Y در سوسپانسیون سلول های طحال به روشELISA

ه) بررسی میزان تکثیر سلولهای ایمنی در تحریک با آنتی ژن توموری به روش MTT

۸) بررسی میزان التهاب ناشی ازDTH

روشهای جمع آوری اطلاعات:

آزمایشات سرولوژیک و معاینات بالینی انجام شده، استفاده از منابع کتابخانه ای، مجلات علمی معتبر، شبکه اطلاع رسانی

روش تجزیه و تحلیل داده ها:

اطلاعات به دست آمده از آزمایشات پارامتریک و غیرپارامتریک آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهند گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA، نرم افزار SPSS نسخه ۲۴) و آزمون Tukey استفاده خواهد شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Exel استفاده خواهد شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و حد معنی‌دار بودن $p<0/05$ در نظر گرفته خواهد شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرارخواهند شد.

چه گروهی از نتایج طرح می‌توانند منتفع گردند؟

بخش درمان (پزشک- بیمار) ، علوم پایه پزشکی، بخش غیر پزشکی نظیر صنعت

نتایج طرح در چه محدوده جغرافیایی کاربرد خواهد داشت؟

منطقه ای، کشوری و بین المللی

منابع و مأخذ قابل استناد

1-Bray, F., Mccarron, P. & Parkin, D. M. (2004). The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast cancer research, 6**,** 229-39.

2-Sharifian, A., Pourhoseingholi, M. A., Emadedin, M., Rostami Nejad, M., Ashtari, S., Hajizadeh, N., Firouzei, S. A. & Hosseini, S. J. (2015). Burden of Breast Cancer in Iranian Women is Increasing. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 152, 5049-6.

3-Kolahdoozan, S., Sadjadi, A., Radmard, A. R. & Khademi, H. (2010). Five common cancers in Iran. Archives of Iranian medicine, 13**,** 143-6.

4-Alizadeh Otaghvar, H., Hosseini, M., Tizmaghz, A., Shabestanipour, G. & Noori, H. (2015). A review on metastatic breast cancer in Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5**,** 429-433.

5- Moreno-Aspitia, A. & Perez, E. A. (2009). Treatment Options for Breast Cancer Resistant to Anthracycline and Taxane. Mayo Clinic Proceedings, 84**,** 533-545.

6- Mousavi, S. M., Montazeri, A., Mohagheghi, M. A., Jarrahi, A. M., Harirchi, I., Najafi, M. & Ebrahimi, M. (2007). Breast cancer in Iran: an epidemiological review .The breast journal, 13**,** 383-91.

7- Hamdy, S., Haddadi, A., Hung, R. W. & Lavasanifar, A. (2011). Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. Advanced drug delivery reviews. 53, 943-63.

8- Sheikhi, A., Jafarzadeh, A., Kokhaei, P., Farsangi, M.H. (2016). Whole Tumor Cell Vaccine Adjuvants: Comparing IL-12 to IL-2 and IL-15. Iranian. Journal of Immunology, 13 (3), 148-166.

9- Figdor, C.G., de Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., Melief, C.J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. Natural Medicine, 10 (5), 475-80.

10- Sehgal, K., Dhodapkar, K. M. & Dhodapkar, M. V. (2014). Targeting human dendritic cells in situ to improve vaccines. Immunology letters*,* 162**,** 59-٦٧.

11- Beatty, P.L. and Finn, O.J. (2016). Therapeutic and Prophylactic Cancer Vaccines. Encyclopedia of Immunobiology, 4, 231-38.

12- Sheikhzadeh, S., Delirezh, N. and Hobbenaghi, R. (2021). Mannosylated polylactic-co-glycolic acid (MN-PLGA) nanoparticles induce potent anti-tumor immunity in murine model of breast cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 142, 11962-6.

13- Rainone, V., Martelli, C., Ottobrini, L., Biasin, M., Borelli, M., Lucignani, G., Trabattoni, D., Clerici, M. (2016). Immunological Characterization of Whole Tumour Lysate-Loaded Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy. Plos One, 24, 230-41.

14- Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. Current protocols in immunology, 20, 23-34.

15- Delirezh, N., Moazzeni, S.M., Shokrgozar, M.A., Atri, M., Kokhaei, P. (2009). Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. Cellular Immunology, 257, 23–31.

16- Desantis, C., Ma, J., Bryan, L. & Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians, 64**,** 52-62.

17- Jazayeri, S. B., Saadat, S., Ramezani, R. & Kaviani, A. (2015). Incidence of primary breast cancer in Iran: Ten-year national cancer registry data report. Cancer epidemiology, 39**,** 519-27.

18- Gelao, L., Criscitiello, C., Esposito, A., Laurentiis, M., Fumagalli, L., Locatelli, M. A., Minchella, I., Santangelo, M., De Placido, S., Goldhirsch, A. & Curigliano, G. (2014). Dendritic cell-based vaccines: clinical applications in breast cancer. Immunotherapy, 6(3), 349–360.

19- Gu ,Y., Zhao , X. and Song, X. (2020). Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. ActaPharmacologica Sinica, 41, 959–969.

20- Sadeghzadeh, M., Bornehdeli, S., Mohahammadrezakhani, H., Abolghasemi, M., Poursaei, E., Asadi, M., Zafari, V., Aghebati-Maleki, L., Shanehbandi, D. (2020). Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art. Life Science, 254, 117580.

21- Bryant, C., Sutherland, S., Kong, B., Papadimitrious, M., Fromm, P. and Hart, D. (2019). Dendritic cells as cancer therapeutics. Seminars in Cell & Developmental Biology, 86, 77-88.

«هزینه های طرح »

فهرست مواد اولیه و لوازم عمده مصرفی مورد نیاز (در صورت وجود):

ردیف	نام ماده/ قطعه	مقدار یا تعداد مورد نیاز	شرکت سازنده	کشور	اعتبار مورد نیاز ریالی
۱	موش BALB/c	۳۰ عدد	–	ایران	۱۵۰۰۰۰۰۰
۲	محیط کشت RPMI 1640	پودر 5 لیتری	کاپریکورن	آلمان	۲۰۰۰۰۰۰۰
۳	Fetal Bovine Serum	ml۵۰۰	موسسه رازی	ایران	۴۰۰۰۰۰۰
۴	کیت الایزا IL-4	یک کیت	biolegend	آلمان	۱۳۵۰۰۰۰۰۰
۵	کیت الایزا IFN -γ	یک کیت	biolegend	آلمان	135,000,000
۶	کیت الایزا IL-10	یک کیت	biolegend	آلمان	135,000,000
۷	کیت الایزا IL-12	یک کیت	biolegend	آلمان	135,000,000
۸	DMSO	۱۰۰ ml	سیگما	آلمان	۱۰۰۰۰۰۰۰
۹	MTT	100 mg	سیگما	آلمان	۸۰۰۰۰۰۰
۱۰	وسایل مصرفی آزمایشگاه	سری کامل	داخلی	ایران	100,000,000
۱۱	غذای موش		–	ایران	۳۰۰۰۰۰۰
۱۲	GM-CSF	یک ویال	biolegend	آلمان	100,000,000
۱۳	IL-4	یک ویال	biolegend	آلمان	80,000,000
۱۴	LPS	یک ویال	biolegend	آلمان	60,000,000
۱۵	تریپسین	۱۰۰ ml	biolegend	آلمان	۱۰۰۰۰۰۰۰
۱۶	PE anti-mouse CD4 Antibody	50 ug	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰
۱۷	FITC anti-mouse CD8a Antibody	50 ug	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰
۱۸	PE anti-mouse CD11c Antibody	50ug	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰

۱۹	FITC anti-mouse CD80 Antibody	50ug	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰
۲۰	PE anti-mouse CD86 Antibody	50 ug	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰
۲۱	FITC anti-mouse CD40 Antibody	50 ug	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰
۲۲	FITC anti-mouse I-Ak (Aβk) Antibody	50 µg	biolegend	آلمان	۷۰۰۰۰۰۰۰
	جمع کل				۱۴۳۹۰۰۰۰۰۰