

## اثر سینرژیک منوفسفوریل لیپید A و وروتوکسین ۱ در حذف فیبروسارکوما ایجاد شده در موش آزمایشگاهی

دکتر حسن حسین زادگان: استادیار میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

E-mail: asadzade\_2003@yahoo.com

دکتر مرتضی ستاری: دانشیار میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس  
دکتر زهیر محمد حسن: استاد ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس  
دکتر عبدالامیر علامه: استاد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۸۵/۸/۹، پذیرش: ۸۵/۱۲/۱۰

### چکیده

**زمینه و اهداف:** در سالهای اخیر از متابولیت‌های مختلف میکروبی از جمله انتروتوکسینها، پروتئینهای باکتریال، سموم نوترکیب و درمان ترکیبی به دلیل محدودیت درمانهای رایج سرطان از جمله شیمی درمانی و پرتودرمانی برای درمان انواع سرطانها استفاده شده است. وروتوکسینها سمومی هستند، که از سالها پیش اثر ضد توموری آنها شناخته شده است. این سموم توسط برخی سویه های اشرشیا کولی تولید می شوند. لذا در این تحقیق با توجه به اثرات ضد توموری وروتوکسین ۱ اثر همزمان این ترکیب را با منوفسفوریل لیپید (MPL) Monophosphoryl Lipid A (یکی از مشتقات غیر سمی لیپوپلی ساکراید باکتریها را که دارای خاصیت ادجوانتی و نکروز تومور است)، بر روی فیبروسارکوما ایجاد شده در موش آزمایشگاهی بررسی نمودیم.

**روش بررسی:** برای آزمایشهای حیوانی ابتدا وروتوکسین ۱ بصورت رقت سریال دو برابر در گروههای ۶ تایی موش آزمایشگاهی بصورت داخل صفاقی تزریق و تا ۷ روز تعداد موشهای مرده در رقتهای مختلف محاسبه شده، و مقدار ۵۰ درصد کشته سم با روش Reed & Munch در موشهای Balb/c تعیین شد. پس از آن با تزریق سلولهای WEHI-164 در ۱۶ موش (به تعداد ۳ میلیون سلول در هر موش) به صورت زیر جلدی تومورهای قابل مشاهده ایجاد شده و به چهار گروه ۴ تایی تقسیم شدند. به گروه اول ۲۵ نانوگرم وروتوکسین ۱، گروه دوم ۵۰ میکروگرم منوفسفوریل لیپید A، گروه سوم ۲۵ نانوگرم وروتوکسین ۱ و ۲۵ میکروگرم منوفسفوریل لیپید A بصورت داخل توموری تزریق نمودیم. در گروه چهارم به عنوان شاهد نیز وروتوکسین غیرفعال شده با حرارت را تزریق کردیم. اندازه تومورها روزانه با محاسبه طول و عرض آنها با کولیس و فرمول  $\frac{عرض \times طول}{۲}$  محاسبه شد. با استفاده از آنالیز واریانس تفاوتی بین گروههای مختلف ارزیابی شد.

**یافته ها:** وروتوکسین ۱ مشابه سلول استاندارد ورو اثرات سیتوتوکسیکی بر رده سلولی WEHI-164 نشان داد. تاثیر همزمان آن با منوفسفوریل لیپید A سبب حذف کامل تومورهای فیبروسارکوما بدخیم ایجاد شده در موشهای آزمایشگاهی شد. ۱۰۰ نانوگرم وروتوکسین ۱ به عنوان دز کشته ۵۰ درصد در موش آزمایشگاهی تعیین شد. تومورهای تزریق شده با منوفسفوریل لیپید A در مقایسه با گروه کنترل منفی (درمان نشده) بدون تغییر حجم و یا افزایش کمی در حجم تومورها نشان دادند. این اثر از نظر آماری معنی دار نبود. در حالی که تومورهای کنترل منفی (درمان نشده)، پس از کاهش وزن شدید سبب مرگ موشها شدند. موشهای گروه کنترل حداکثر در یک ماه پس از تزریق از بین می رفتند.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان می دهد که اگر چه اثر وروتوکسین ۱ بتهایی بر روی بسیاری از تومورهای انسانی ثابت شده است. لیکن به دلیل اثر هم افزایی با منوفسفوریل لیپید A و حذف کامل تومورهای بدخیم فیبروسارکوما، از توام آنها می توان در درمان فیبروسارکوما و سایر بیماریهای بدخیم مشابه استفاده نمود.

**کلید واژه ها:** وروتوکسین ۱، منوفسفوریل لیپید A، فیبروسارکوما

### مقدمه

فرسا می باشد. علاوه بر این در درمانهای طولانی مدت سرطانها یا درمانهای ناقص با استفاده از اشعه درمانی به عنوان روش کمکی

فیبروسارکوما توموری با منشاء سلولهای مزانشیال است. که بصورت اولیه در بافت نرم یا استخوانها تشکیل می شود (۱). مشابه بسیاری دیگر از تومورهای انسانی درمان فیبروسارکوما طاق

با توجه به اثرات سیتوتوکسیک سم وروتوکسین ۱ بر روی سلولهای WEHI-164 در شرایط آزمایشگاهی و پتانسیل تومورزایی این سلولها در موش Balb/c این موشها به عنوان مدلی برای تومورزایی و مطالعات حیوانی انتخاب شدند.

**تعیین دز کشنده ۵۰ درصد<sup>۳</sup> (LD50) وروتوکسین ۱ در موش Balb/C:**

در مطالعاتی که به منظور درمان سرطان از متابولیتهای میکروبی استفاده می شود، غلظتهای ۱/۱۰ از دز کشنده ۵۰ درصد را برای تیمار استفاده می کنند. بدین دلیل قبل از شروع درمان تومورهای حیوانات LD<sub>50</sub> سم با روش زیر تعیین شد. یک میلی گرم از وروتوکسین ۱ در بافر فسفات حل شده، و رفتهای ۱/۱۰ تا ۱/۱۰<sup>۱</sup> از آن در بافر فسفات تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر بصورت داخل صفاقی در ۵ موش تزریق شد. میزان مرگ تا دو هفته در همه گروهها ثبت شد. ابتدا در رقت بالا و پائین ۵۰ درصد مرگ موشها در گروهها تعیین شد. برای تعیین دقیق مقدار کشنده ۵۰ درصد با استفاده از فرمول زیر عدد اعشاری محاسبه شده، و عدد بدست آمده به توان رقت بالای مرگ ۵۰ درصد اضافه و مقدار ۵۰ درصد کشنده سم محاسبه شد.

۵۰ درصد - در صد مرگ بالای ۵۰ درصد

در صد مرگ در رقت پائین ۵۰ درصد - در صد مرگ بالای ۵۰ درصد

برای موشهای کنترل هم بافر فسفات نمکی استریل و وروتوکسین غیرفعال شده با حرارت تزریق شد و پس از ۲ هفته LD<sub>50</sub> سم با روش Reed&Munch تعیین گردید (۱۱).

#### پیش تیمار حیوانات و تزریق سلولها:

برای ایجاد تومور ابتدا ۱۶ موش Balb/c ماده ۴ هفته ای را مدت ۷ روز با آب و غذای استریل و فضای تمیز پیش تیمار نمودیم. پس از ۷ روز پشت حیوانات تراشیده شده و تعداد ۳×۱۰<sup>۱</sup> سلول در ۰/۲ میلی لیتر از محیط RPMI-1640 و بصورت زیر جلدی تزریق کردیم. وضعیت حیوانات از نظر وجود و رشد تومور بصورت روزانه بررسی شدند. بمحض رسیدن قطر تومورها به ۱-۰/۷ سانتی متر (بطور متوسط یک هفته پس از تزریق) موشها را به چهار گروه چهارتایی تقسیم کرده و در گروه اول ۲۵ نانوگرم وروتوکسین ۱، گروه دوم ۵۰ میکروگرم منوفسفوریل لیپید A، گروه سوم ۲۵ نانوگرم وروتوکسین ۱ و ۲۵ میکروگرم منوفسفوریل لیپید A بصورت داخل توموری تزریق نمودیم. در گروه چهارم به عنوان شاهد نیز وروتوکسین غیرفعال شده با حرارت را تزریق کردیم. اندازه تومورها روزانه با محاسبه طول و عرض آنها و فرمول

$\frac{\text{عرض} \times \text{طول}}{۲}$  محاسبه شد (۱۲). با استفاده از آنالیز واریانس تفاوتی بین گروههای مختلف ارزیابی شد. گروهی از موشها برای ارزیابی اثر منوفسفوریل لیپید A و تاثیر غیر توکسیک بودن آن با مقادیر مختلف تیمار شدند. برای اطمینان از تاثیر مواد در گروههای نامبرده نمونه ای از تومورها در فرمالین برداشته شده و

عوارض متعددی نیز مشاهده می شود. که کارآیی روشهای درمانی سرطانها را محدود می نماید (۲).

اثرات سمی وروتوکسین ۱ تولید شده از اشرشیا کلی های انتروهومورژیک از سالهای دور بر روی سلول های رده توموری انسانی شناخته شده است (۳). این سم با واسطه گیرنده اختصاصی به نام گلوبوتریا اوسیل سرامید<sup>۱</sup> بر روی سلولها اثر می نماید. به طوری که در مطالعه رده های مختلف توموری از جمله آستروسیتوما، مقاوم به درمان، منژیوما بدخیم، سرطان پستان، لنفوما، میلوما، کارسینوما، سارکوما، موشی، تخمدانی، سمنیوماها اثرات شدید سیتوتوکسیک انتخابی وروتوکسین ۱ نشان داده شده است (۷-۳) درمان موشهای توموردار Gb<sub>3</sub> مثبت با وروتوکسین ۱ مانع از متاستاز شده، و رده سلولهای کارسینوما تخمدانی مقاوم چند دارویی در برابر وروتوکسین ۱ بسیار حساس بوده و با سرعت از بین می روند (۸). در بسیاری از سرطانهای انسانی مقدار Gb<sub>3</sub> سطح سلولها نسبت به سلولهای طبیعی افزایش می یابد. حتی در سرطانهای رده سلولی زاینده از جمله کوریوکارسینوما و بیضه ها میزان افزایش Gb<sub>3</sub> از مارکرهای سرطانی شدن آنهاست (۶). افزایش بیان Gb<sub>3</sub> در سلولهای توموری بدنبال تغییرات تمایزی آنها سبب شده است که این ملکول به عنوان یکی از مارکرهای شناسایی تومورهای سمنیوما (شایعترین تومورهای بیضه) مطرح باشند (۹).

در مطالعه اثر ضد توموری وروتوکسین ۱ بر روی سرطانهای مقاوم به درمان مغز (آستروسیتوماها) درجات متفاوتی از حساسیت به وروتوکسین ۱ مشاهده شده است. طوریکه برخی از سلولهای دارای Gb<sub>3</sub> بالاتر، حساسیت کمتری به وروتوکسین ۱ دارند. که نشانه دخالت سایر عوامل غیر از Gb<sub>3</sub> در سیتوتوکسیسیته آن است. (۶). بوتیرات سدیم، ویتامین D<sub>3</sub> و ملکولهایی مانند LPS<sup>۲</sup> از عوامل شناخته شده ای هستند که در افزایش بیان گیرنده سم و حساس سازی سلولها به وروتوکسین نقش دارند. LPS یکی از ملکولهای مطرح میکروبی است که نقش آن در تحریک ترشح سیتوکینها و افزایش بیان Gb<sub>3</sub> و تشدید اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین ۱ شناخته شده است (۱۰). با توجه به مطالب ذکر شده پژوهش در مورد روشهای درمانی سریع و بدون عارضه و کم هزینه از موضوعات بسیار مهم در عرصه درمان انواع سرطانهای انسانی محسوب می شود. لذا با توجه به اثرات شناخته شده لیپولی ساکارید در تشدید سمیت وروتوکسین ۱ بر آن شدید تا اثر توام منوفسفوریل لیپید A (مشتق سمی لیپولی ساکارید) را بر روی تومور ایجاد شده در موش آزمایشگاهی بررسی نمائیم.

#### مواد و روش ها

رده سلولی WEHI-164 و موشهای Balb/c به ترتیب از بانک سلولی و مرکز حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

#### مطالعات حیوانی:

1. Globotriaocyl Ceramide, Gb<sub>3</sub>
2. Lipopolysaccharide, Lps
3. Lethal Dose 50

بوسیله ۳ پاتولوژیست مجزا با روش اتوزین هماتوکسیلین میزان پیشرفت اثر سیتوتوکسیسیته ارزیابی شد.

### یافته ها

#### دز کشته ۵۰ درصد وروتوکسین ۱ در موش Balb/c :

در ابتدا برای اطمینان از فعالیت بیولوژیک وروتوکسین ۱ سم بصورت داخل صفاقی در موشها تزریق شد. علائمی از قبیل شل شدن پاهای عقبی و کاهش شدید وزن و اسهال در حیوانات تزریق شده ایجاد شد. که نشانه فعالیت توکسیک سم بود. موشهای تزریق شده با وروتوکسین ۱ در محدوده ۳ تا ۷ روز از بین می رفتند و در همه آنها فلج پاهای عقبی و شل شدن دم حیوانات و اسهال خفیف قبل از مرگ مشاهده شد، که نشان دهنده اثرات نوروکسیک و انترتوکسیک وروتوکسین ۱ است. در بررسیهای به عمل آمده معلوم شد، که هر میلی گرم از سم خالص معادل ۱۰۰۰۰ دز کشته ۵۰ درصد در موش است. بنابراین این ۱۰۰ نانوگرم از وروتوکسین ۱ اثری معادل ۵۰ درصد در موش Balb/c ایجاد می کند. مقادیر سم در گروههای مختلف در جدول آورده شده است. اثر وروتوکسین ۱ و منوفسفوریل لیپید A و اثر توام آنها بر روی تومورهای ایجاد شده در موش:

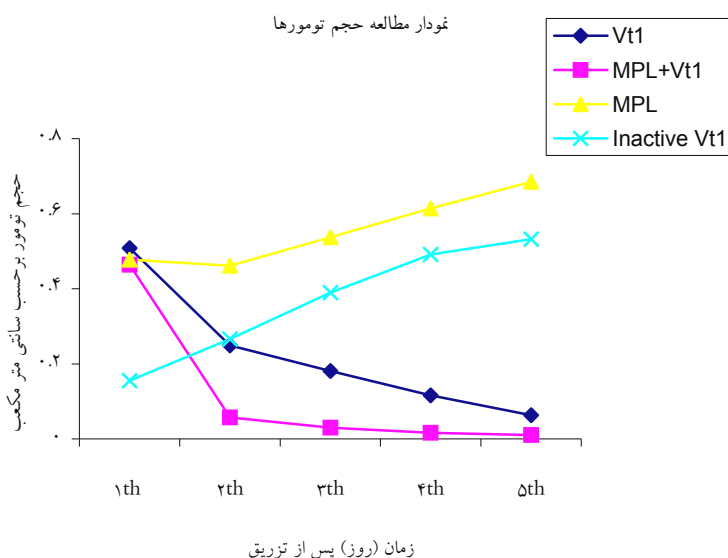
در موشهای تزریق شده با وروتوکسین ۱ و توام آن با منوفسفوریل لیپید A پسرقت شدید تومورها قابل مشاهده بود. به ویژه در روز اول پس از تزریق در گروه سوم که از توام سم با MPL استفاده شده بود. بیش از ۷۰ درصد حجم تومورها کاهش پیدا کردند. بعد از ۳ روز در تومورهای تزریق شده با توام سم و MPL به طور کامل تومورها از بین رفتند. ضمن اینکه با تزریق این مواد موشها به طور واضح افزایش وزن داشتند. در حالی که در موشهای تزریق شده با وروتوکسین ۱ غیر فعال شده با حرارت یا MPL نه تنها کاهش حجم تومورها مشاهده نشد، بلکه با افزایش تومورها مواجه بودیم.

در نمودار الگوی کاهش یا افزایش تومورها در گروههای مختلف نشان داده شده است. نمودار بر اساس میانگین حجم تومور ۴ موش تیمار شده در هر گروه است. و شکل نمونه ای از تومورهای تیمار شده در موشها را نشان می دهد.

مطالعه حجم تومورها تا روز پنجم پس از تزریق نشان داد که در موشهای تزریق شده با توام وروتوکسین ۱ و MPL به طور واضحی در مقایسه با سایر گروهها کاهش قابل ملاحظه ای در حجم تومورها مشاهده شد. که از نظر آماری با  $P < 0.0001$  معنی دار است. اعداد ذکر شده میانگین گروه  $\pm$  انحراف استاندارد هستند.

جدول: میزان مرگ در موشهای تیمار شده با رقتهای مختلف وروتوکسین ۱

| رقت وروتوکسین ۱   | تعداد موش مرده | تعداد موش زنده | فراوانی تجمعی موشهای مرده | فراوانی تجمعی موشهای زنده | درصد مرگ موشها در گروه |
|-------------------|----------------|----------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| ۱/۱۰              | ۵              | ۰              | ۱۷                        | ۰                         | ۱۰۰                    |
| ۱/۱۰ <sup>۲</sup> | ۵              | ۰              | ۱۲                        | ۰                         | ۱۰۰                    |
| ۱/۱۰ <sup>۳</sup> | ۵              | ۰              | ۷                         | ۰                         | ۱۰۰                    |
| ۱/۱۰ <sup>۴</sup> | ۲              | ۳              | ۲                         | ۳                         | ۶۰                     |
| ۱/۱۰ <sup>۵</sup> | ۰              | ۵              | ۰                         | ۸                         | ۰                      |
| ۱/۱۰ <sup>۶</sup> | ۰              | ۵              | ۰                         | ۱۳                        | ۰                      |



نمودار: اثر توام یا جداگانه منوفسفوریل لیپید A و وروتوکسین ۱ بر حجم تومورها

VT1= Verotoxin 1, MPL= Monophosphoryl Lipid A



شکل: موشهای بیمار نشده و بیمار شده

روشهای تخلیص سم و در نهایت میزان خلوص و ویژگی بیولوژیک آن بستگی دارد.

در سلولهای آستروسیتوما ۱/۵ ساعت پس از تیمار با وروتوکسین ۱ اثرات آپوپتوزیز از جمله چروکیده شدن هسته و تجمع کروماتینها مشاهده می شود، که بسیار سریعتر از داروهای ضدسرطانی است. عدم حساسیت سلولهای اندوتلیال سیستم عصبی بزرگسالان به وروتوکسین ۱ و عدم خونریزی مغزی بدنال عفونتهای ناشی از اشرشیا کلی های مولد وروتوکسین روده ای و عدم تأثیر سیتوکین ها در تحریک بیان Gb<sub>3</sub> در این سلولها، از مزایای استفاده از وروتوکسین ۱ در درمان تومورهای مغزی است (۶). جانسون و همکاران اخیرا با بررسی مکانیسم احتمالی القای آپوپتوزیز ناشی از وروتوکسین ۱ روی رده سلولی گلیومای انسانی نشان دادند، که وروتوکسین ۱ با تحریک کاسپاز ۹ در رده های سلولی بیان کننده Gb<sub>3</sub> سبب مرگ انتخابی آنها می شود (۱۳). Tetaud و همکاران نیز در مطالعه دیگری با تأثیر وروتوکسین ۱ روی سلولهای لنفوم بورکیت نشان دادند، که سم با تأثیر بر میتوکندری سلولها و رها شدن سیتوکروم C سبب مرگ آنها می شود (۱۴). آپوپتوزیز از مهمترین فرایندهای سلولی در تمایز و حفظ هوموستاز موجودات پر سلولی و اساس طراحی داروهای ضد نئوپلاستی است (۱۵).

در مطالعه Arab و همکاران تزریق داخل توموری وروتوکسین ۱ به تومور گزنگرافت سلولهای مقاوم درمان آستروسیتوما انسانی در موشهای برهنه سبب حذف آنها شده است. در این مطالعه که روی بابونها از وروتوکسین ۱ استفاده شده است، اثرات سوءناشی از سم گزارش نشده است. تنها در مقادیر بالاتر پاتولوژی مشابه با سندرم اورمی همولیتیک را ایجاد نموده است (۴). Ishitoya و همکاران با تزریق داخل توموری وروتوکسین ۱ در تومورهای القاء شده توسط رده سلولی ACHN در پشت موشهای SCID نشان دادند، که ۷-۵ روز پس از تزریق سم تومورها بطور کامل از بین رفتند (۱۵). Heath و Lingwood نیز

در سمت راست شکل تومور کنترل بدون تیمار و در سمت چپ شکل به ترتیب از بالا به پایین تومورهای تیمار شده با منوفسفوریل لیپید A، MPL با وروتوکسین ۱ بطور توأم، و وروتوکسین ۱ نشان داده شده اند. کاهش حجم تومورها در دو موش میانی و پائینی در مقایسه با موش تزریق شده با MPL قابل مشاهده است. در موشهای تزریق شده با MPL در مقایسه با کنترل منفی حجم تومورها افزایش نشان می داد. یکی از نکات بارز در مطالعات حیوانی این بود که در موشهایی که ابتدا MPL تزریق شده بود، چند روز بعد با تزریق ۲۰۰ نانوگرم از وروتوکسین ۱ حساسیت شدیدی ایجاد شده و همراه با کاهش شدید حجم تومورها همه موشهای گروه از بین رفتند.

## بحث

در بسیاری از سرطانهای انسانی سطح Gb<sub>3</sub> (گیرنده وروتوکسین ۱) در مقایسه با سلولهای طبیعی افزایش می یابد. حتی در سرطانهای رده سلولی زاینده از جمله کوریوکاریسینوما و بیضه ها میزان افزایش Gb<sub>3</sub> از مارکرهای سرطانی شدن آنهاست (۶). افزایش گیرنده سم در سطح سلولهای سرطانی سبب اثر انتخابی وروتوکسین ۱ بر روی انواع سلولهای توموری شده است. Himsley و همکاران در مطالعات پیگیر نشان دادند، که نوعی باکتریوسین نیمه خالص مشتق شده از E.coli HSC10 در شرایط آزمایشگاهی روی رده های مختلف توموری اثر آنتی نئوپلاستیک دارد (۳). همین محققین بعدا ثابت کردند که ماده فعال موثر در باکتریوسین نیمه خالص همان وروتوکسین ۱ است، که با تزریق داخل صفاقی آن مانع متاستازهای ریوی ناشی از تزریق سلولهای سارکوما KHT به صورت داخل رگی در موش می شود (۹). محققین نامبرده ۱۰۰-۸۰ میکروگرم از وروتوکسین ۱ را معادل LD50 در موش برآورد کرده اند. که طی یک هفته منجر به مرگ موشها شده است (۸). در حالی که در مطالعه حاضر ۱۰۰ نانوگرم وروتوکسین ۱ به عنوان LD50 تعیین شد. این اختلاف به

حساس سازی اولیه سلولها با MPL سبب تسهیل ورود سم به آنها و تشدید سیتوتوکسیسیته می شود. مدل توموری مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از سلولهای WEHI-164 در موشهای Balb/c نسبت به تومورهای ایجاد شده در موشهای برهنه و یا تزیف ایمنی شده (۱۸) دارای امتیازات زیر است: اول اینکه تومورهای مهاجم بوده و در نهایت موجب مرگ موش می شود. دوم اینکه با تزریق دقیق زیر جلدی سلولها، تومورهایی ایزوله در سطح زیر پوست ایجاد می شوند، که هر نوع دستکاری آنها را در دسترس قرار می دهد. علاوه بر اینها از نظر اقتصادی بسیار مقرون به صرفه بوده، و در نهایت به دلیل طول عمر زیادتر از تومورهای ایجاد شده در موشهای برهنه زمان انجام آزمایش نیز طولانی تر است. قابل ذکر است، که رده سلولی WEHI-164 در اثر تزریق زیر جلدی ۳-متیل کلاترن در موش Balb/c ایجاد شده است. از این رده سلولی به عنوان مدل برای بررسی اثرات ناشی از برخی عوامل سیستم ایمنی انسان مانند لنفوتوکسین و فاکتور نکروز تومور آلفا استفاده می شود (۱۹).

نتایج این تحقیق با بررسیهای قبلی در مورد سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ برای بسیاری از سلولهای سرطانی انسانی از جمله رده های توموری پستان همخوانی دارد (۷-۳). نتایج نشان می دهد، که وروتوکسین ۱ می تواند به عنوان یکی از مواد بالقوه سیتوتوکسیک انتخابی علیه طیف وسیعی از تومورهای انسانی مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این مشتق غیر سمی لیپولی ساکارید سبب تشدید اثر سیتوتوکسیک آن بر روی تومورهای فیروسارکوما در موش می شود. زیرا با توجه به افزایش بیان گیرنده سم به ویژه در سطح سلولهای متاستازی در مقایسه با انواع داروهای ضد توموری، تنها یکبار استفاده داخل توموری از این سم به همراه منوفسفوریل لپید A می تواند اثرات مفیدی در بر داشته باشد، که لازم است در الگوهای *in vivo* نیز مورد بررسی و مطالعه بیشتری قرار گیرد.

با القای تومورهای مهاجم گزینوگرافت توسط رده سلولی کارسینومای مثانه بر روی موشهای تزیف ایمنی شده نشان دادند، که طول عمر موشهای درمان شده با وروتوکسین ۱ در مقایسه با موشهای درمان نشده، بیشتر می شود. در این مطالعه بر اثرات ضد رگ زایی وروتوکسین ۱ نیز تاکید شده است (۱۶) حساسیت سلولها به وروتوکسین ۱ به سیکل رشد وابسته است. حداکثر حساسیت در مرحله بینایی G<sub>1</sub>/S مشاهده می شود. در سلولهای توموری با مقاومت چند دارویی عموماً ژن bcl-2 و پروتئین مربوطه به عنوان ضد آپوپتوتیک بیان می شود، که سبب نجات آنها از مرگ می شود. جالب توجه است که در سلولهای تیمار شده با وروتوکسین ۱ آپوپتوزیز با بیان bcl-2 متوقف نمی شود (۶). در بافتهای متعدد انسانی تومورزایی مستلزم تولید بیش از حد Bcl-2 است. بنابراین تولید Bcl-2 تومورزایی وپتانسیل متاستاز آنها را افزایش می دهد، یکی از نمونه سلولهای توموری رده سلولی MCF-7 است، که Bcl-2 در آن به شدت تولید می شود، و توان تومورزایی بالایی دارد، از طرفی گیرنده سم وروتوکسین ۱ در سطح آن به مقدار زیاد بیان می شود. (۱۷) به همین علت از این رده سلولی به عنوان مدل برای ایجاد تومورهای بدخیم و حساس به وروتوکسین ۱ در این مطالعه استفاده شده است. آنالیز آماری بین گروههای مختلف در این تحقیق نشان داد، که در موشهای تزریق شده با ترکیب MPL و وروتوکسین ۱ در مقایسه با گروههایی که MPL ویا وروتوکسین ۱ بتهایی تزریق شده اند، کاهش حجم تومورها تفاوت معنی داری نشان می دهند ( $P < 0.001$ ). تزریق MPL تا ۵۰ میکروگرم در موشها اثری سمی نداشت. در موشهایی که تومورهای آنها قبلاً با ۵۰ میکروگرم به صورت داخل توموری حساس شده بودند، پس از یک هفته با تزریق وروتوکسین ۱ اثرات کشنده شدیدی ایجاد شد، که پس از یک روز با فلج اندامهای عقبی و بروز اسهال و بی حالی شدید از بین رفتند. بنظر می آید تزریق اولیه MPL حیوانات را در برابر وروتوکسین ۱ حساس می کند، که احتمالاً به دلیل تولید سیتوکینهای التهابی است. یا اینکه

## References

1. Antonescu CR, Erlanson RA, Huvos AG. Primary fibrosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone--a comparative ultrastructural study: evidence of a spectrum of fibroblastic differentiation. *Ultrastruct Pathol* 2000; **24**(2):83-91.
2. Al- Mefty, Kersh JE, Routh A, Smith RR. The long-term side effects of radiation therapy for benign brain tumors in adults. *J Neurosurg* 1990; **73**(4): 502-12.
3. Hill R P, Farkas-Himsley H. Further studies of the action of a partially purified bacteriocin against a murine fibrosarcoma. *Cancer Research* 1991; **51**: 1359-65.
4. Arab S, Rutka J, Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in Nude mice. *Oncology Research* 1999; **11**: 33-39.
5. Salhia b, Rutka JT, Lingwood C, Nutikka A, Van Furth WR. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia*. 2002; **4**(4): 304-11
6. Arab S, Murakami M, Driks P, Boyd B, Hubbard S, Lingwood C A, Rutka J. Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J Neurol Oncol* 1998; **40**:137-50.
7. Arbus G S, Grisar S, Segal O, Dosch M, Pop M, Lala P, Nutikka A, Lingwood C A. Verotoxin targets lymphoma infiltrates of patients with post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Res* 2000; **24**(10): 857-64.

8. Farkas-Himsley H, Hill R, Rosen B, Arab S, Lingwood C A. The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:6996-7000.
9. Chikara O, yasuo F, Makoto S, Seiichi S, Seiichi O, Edward N, Mark S, Sen-itiroh H. Changes in glycolipid expression in human testicular tumor *Int J cancer* 1990; **45**:1040-44.
10. Lingwood C A, Khine A A, Sara A. Globotria osyl ceramide (Gb3) expression in human tumor cells: Intracellular trafficking defines a new retrograde transport pathway from the surface to the nucleus, which correlates with sensitivity to verotoxin. *Acta Biochim Pol* 1998; **45**(2):351-59.
11. Vince M, Wolski A M, Soltyk J, Brunton L. Mouse toxicity and cytokine release by verotoxin1 B subunit mutants. *Infection and Immunity* 2001; **69**(1): 579-83.
12. Gaspari A, Moro M, Curnis F, Sacchi A, Pagano S, Veglia F, Casorati G. Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor  $\alpha$  in mouse models. *Cancer Research* 1999; **59**:2917-23.
13. Johansson D, Johansson A, Grankvist K, Andersson U, Henriksson R, Bergstrom P, Brannstrom T, Behnam-Motlagh P. Verotoxin-1 induction of apoptosis in Gb3-expressing human glioma cell lines. *Cancer Biol Ther* 2006; **5**(9):1211-7.
14. Tetaud C, Falguieres T, Carlier K, Lecluse Y, Garibal J, Coulaud D, Busson P, Steffensen R, Clausen H. Two distinct Gb3/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb3/CD77 mAb and verotoxin-1. *J Biol Chem* 2003; **278**(46): 45200-8.
15. Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H, Nakamura E, Kamoto T, Habuchi T, Terai A, Ogawa O, Yamamoto S. Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice. *J urol* 2004; **3**:1309-13 .
16. Heath-Engel HM, Lingwood CA. Verotoxin sensitivity of ECV304 cells in vitro and in vivo in a xenograft tumor model: VT1 as a tumor neovascular marker. *Angiogenesis* 2003; **6**(2):129-41.
17. Eduardo V, Maximino R, Isabel R, Julian G, Eduardo A, Alfred M. Bcl-2 expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. *Tumor boil* 2000; **22**:137-45.
18. Lacase E C, Bary M R, Ptterson B, Lim W-M, Perampalam S, Radvanyi L G, et al. Shiga -Like toxin1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34+ hematopoietic stem cells: Implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation *Blood* 1999; **94** :2901-10.
19. Daniel H S, Lee J PM, Gareth R T, Elizabeth W, Richard K P. Tepoxalin enhances the activity of an antioxidant, pyrrolidine dithiocarbamate, in attenuating tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis in WEHI 164 cells. *The J Of Pharmacol & Experimental Therapeutic* 1999; **289**: 1465- 71.