مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بهمن ۱۳۹۷، دوره ۷۶، شماره ۱۱، صفحه‌های ۷۳۱ تا ۷۳۵

ارزیابی اثر ادجوانت آلوم و نالوکسان در واکسن HPV بر فرآیند ویرایش ایمنی در ریز محیط توموری در موش

نازگل ملک‌زاده[۱]
فائزه کبیری[۲*]
رقیه آهنگری[۳]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
۳- گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

[*] نویسنده مسئول: قم، خیابان شهید لواسانی، دانشگاه علوم پزشکی قم. تلفن: ۰۲۵-۳۷۷۰۰۰۹۶
E-mail: kabiri_10@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۰۷ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۱/۱٤ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

زمینه و هدف: پاپیلوما ویروس، عامل بیش از نیمی از سرطان‌های حاصل از پاپیلوما از جمله سرطان دهانه‌ی رحم می‌باشد. اگرچه واکسن جهت پیشگیری از سرطان‌های حاصل از پاپیلوما ضروری است، اما هنوز عفونت این ویروس جزو مشکلات بهداشت جهانی محسوب می‌گردد. ادجوانت‌ها در کنار واکسن HPV16-E7d می‌تواند در ارتقای سیستم ایمنی مفید باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر ماده‌ی نالوکسان و آلوم به‌عنوان ادجوانت در کنار واکسن HPV16-E7d در ریز محیط توموری در موش‌های C57BL/6 بود.

روش بررسی: مطالعه توصیفی-مقطعی کنونی در بازه زمانی فروردین تا شهریور ۱۳۹۵ در انستیتو پاستور تهران بر روی ۸۰ موش ماده C57BL/6 انجام گرفت. موش‌های تومور شده، با واکسن HPV16-E7d به‌همراه ادجوانت نالوکسان و آلوم و گروه‌های کنترل واکسینه شدند. سنجش تومور انجام گرفت. هموژنات تومور تهیه شد و سپس سایتوکین‌های IL-17, IL-4, IFN-γ, TGF-β با روش Capture ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: این پژوهش نشان می‌دهد که در موش‌های مورد آزمایش با ادجوانت نالوکسان و هیدروکسید آلومینیوم (آلوم) به‌همراه واکسن HPV16-E7d در موش‌های C57BL/6 به‌طور معناداری باعث کاهش نسبی رشد تومور ($P\leq ۰/۰۰۰۱$) شده و پاسخ ایمنی سلولی در ریز محیط توموری را نسبت به گروه‌های کنترل تقویت می‌نماید.

نتیجه‌گیری: پژوهش کنونی بیانگر ایمنی‌زایی بیشتر واکسن ضد پاپیلومای ویروس HPV16-E7d فرموله شده با ماده‌ی نالوکسان و آلوم به‌عنوان ادجوانت، در مقایسه با گروه کنترل فسفات بافر سالین، در واکسن پاپیلومای ویروس در ریز محیط توموری در موش‌های ماده C57BL/6 می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس پاپیلوما انسانی، نالوکسان، نئوپلاسم‌ها، واکسن.

مقدمه

ویروس پاپیلوما، ویروسی فاقد پوشش می‌باشد که ژنوم آن دارای یک DNA دو رشته‌ای با اندازه‌ای حدود ۵۵ nm بوده و دارای کپسید با تقارن بیست وجهی می‌باشد.[۱] ویروس پاپیلوما عامل سرطان دهانه‌ی رحم می‌باشد، سرطانی که به‌عنوان دومین سرطان شایع در زنان در سرتاسر دنیا محسوب می‌شود.[۲] از فرآیندهایی که در این سلول‌های توموری اتفاق می‌افتد ویرایش ایمنی (Immunoediting) است. در این نظریه سلول‌های تومور قادر به انطباق خود با فشار اعمال شده توسط سیستم ایمنی واکسیناسیون است و سلول‌های تومورزا و شبه بنیادی افزایش یافته و همچنین ایمنی تضعیف می‌شود.[۳] ویرایش ایمنی سرطان به سه مرحله متوالی حذف، تعادل و فرار تقسیم می‌شوند: فرآیند حذف شامل پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی به سلول‌های تومور است که با توجه به افزایش بیان آنتی‌ژن تومور Major histocompatibility complex (MHC) کلاس I میزان Interferon (IFN)-a/b/g, IL-1, Interleukin 12 (IL-12), Tumor necrosis factor-α (TNF-α) در ریز محیط تومور

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

افزایش می‌یابد.[۴] مرحله‌ی تعادل در واقع یک فاز تعادل بین آنتی تومور مانند IL-4، IL-17 و IFN و سایتوکین‌هایی مانند IL-10، IL-23 است.[۴] در مرحله فرار ترشح سایتوکین‌هایی مانند Transforming growth factor β (TGF-β) و IL-10 زیاد می‌شود.[۵] یکی از راه‌های پیشگیری از گسترش تومورهای پاپیلوما ویروسی، واکسیناسیون می‌باشد که کشف واکسن‌ها به‌میزان زیادی مبتنی بر ایجاد آنتی‌ژن‌های محافظتی (Protective antigen) بوده است.[۶] اما به‌دلیل ضعف‌های موجود در واکسن‌ها مانند ایمونوژنیسیته‌ی پایین و یا مدت زمان کم حضور در بدن، استفاده از ادجوانت‌ها به‌همراه واکسن‌ها رواج گرفت. متداول‌ترین ادجوانت از جمله نالوکسان، یک آنتاگونیست اوپیوییدی، سبب ایجاد تغییر پاسخ ایمنی و سوق آن به‌سمت Th1 و همچنین افزایش قدرت ایمن‌سازی واکسن می‌شود.[۷] همچنین هیدروکسید آلومینیوم (آلوم) ادجوانتی است غیر روغنی است که موجب افزایش تمایل پاسخ سیستم ایمنی به‌سمت Th1 همچنین افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها و القای پاسخ‌های Delayed-type hypersensitivity (DTH)، IgG و Interferon gamma (IFNγ) می‌شود.[۸] هدف از انجام این مطالعه تاثیر بررسی ماده‌ی نالوکسان و آلوم به‌عنوان ادجوانت در کنار واکسن HPV16-E7d برای تغییر ریز محیط توموری به‌نفع سیستم ایمنی بود.

روش بررسی

مطالعه توصیفی-مقطعی کنونی در بازه زمانی فروردین تا شهریور ۱۳۹۵ در انستیتو پاستور تهران بر روی ۸۰ موش ماده انجام گرفت. ابتدا تعداد ۸۰ موش شش تا هشت هفته‌ای C57BL/6 ماده نژاد خالص که به‌عنوان معیار ورود در مطالعه بوده از انستیتو پاستور کرج خریداری شد و در دمای ۲۲-۲۰ °C و دارای تهویه مناسب در بخش اتاق حیوانات دانشگاه بقیه‌الله تهران نگهداری شد. سپس در انستیتو پاستور تهران، القای تومور با تزریق سلول‌های TC-1 جهت ساخت استوک توموری انجام گرفت. بدین‌منظور رده سلولی TC-1 کشت داده شده در بافر فسفات سالین (PBS, Sigma, Germany) سوسپانسیون گردید و سوسپانسیونی با تراکم ده میلیون سلول در میلی لیتر تهیه شد. جهت توموری نمودن موش‌های C57BL/6 مقدار ۱۰۰ µl از سلول‌ها به ۱۰ عدد موش تزریق شد تا در هفته‌های بعد تومور ایجاد شود. واکسن پروتیین نوترکیب ویروس پاپیلوما (E7d, Institute of Pasture, Tehran, Iran) با ادجوانت کامل آلوم و نالوکسان (Nlx-Alum, Sigma, Germany) مخلوط شد که در این حالت به هر موش ۲۰ µg از واکسن HPV16E7d و ۲۰۰ µg از ادجوانت فرموله شده در واکسن به‌صورت زیر پوستی تزریق شد. همچنین واکسن با ادجوانت نالوکسان مخلوط شد که در این حالت به هر موش دوز معادل ٦ mg/kg از ادجوانت نالوکسان در واکسن فرموله شده تزریق شد. بدین‌صورت که موش‌ها به شش گروه تقسیم و علامت‌گذاری شدند. تزریق سه بار و به فاصله دو هفته انجام شد. سپس سه روز پس از آخرین تزریق، موش‌های تجربی اصلاح شدند و قطعات ۳ mm تومور از موش‌های استوک به آن‌ها وارد شد.

جهت ساخت این مدل توموری با روش جراحی، موش‌های مورد مطالعه با استفاده از موبر اصلاح شدند تا منطقه پهلوی سمت راست به‌طور کامل فاقد مو گردد. سپس موش‌ها با تزریق ۲۰۰ µl از داروی کتامین ۱۰٪ (Ketamine, Rotexmedica, Germany) و زایلین ۲٪ (Xylenes, Sigma-Aldrich, USA) در بافر فسفات سالین بیهوش شدند. جهت تهیه قطعات توموری موش، استوک توموری که با تزریق سلول به‌وجود آمده بود، نخاعی شده و تومور در شرایط استریل از بدن آن‌ها خارج شده و سپس به‌کمک قیچی استریل بافت چربی و رگ‌های خونی اطراف تومور جدا شده و تومور باقیمانده به قطعات ۳ mm تقسیم شد و داخل فسفات سالین حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین سرد نگهداری شد. در مرحله بعد با استفاده از یک قیچی تیز یک شکاف کوچک در ناحیه پهلوی راست موش‌های بیهوش‌شده ایجاد شد و تومورهای ۳ mm زیر آن قرار داده شد و در نهایت به‌وسیله چسب مخصوص بخیه، بافت جراحی شده بخیه گردید و موش‌های جراحی شده در اتاق با دمای بالاتر از شرایط نگهداری موش قرار داده شد. تغییرات حجم تومور اندازه‌گیری شد. هموژنات تومور جهت بررسی سنجش سایتوکین‌ها تهیه شد. تعیین غلظت هموژنات تومور به‌روش برادفورد بوده که غلظت پروتیین در محلول‌هایی با غلظت پروتیین ۰/۰۱ تا ۱ mg/ml اندازه‌گیری شد.

منحنی استاندارد برادفورد با استفاده از Optical density (OD)های به‌دست‌آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) با جذب نوری ۵۹۵ nm رسم گردید. به‌منظور اندازه‌گیری سایتوکین‌های IFN-γ، IL-17 و IL-4 (Mabtech, Sweden) و TGF-β (eBioscience, USA) در ریز محیط تومور با روش الایزا

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

(ELISA Capture) از آنتی‌بادی اختصاصی سایتوکین‌های بیان‌شده (Capture antibody) استفاده شد. گروه‌های کنترل فسفات سالین، آلوم، نالوکسان و آلوم/نالوکسان در نظر گرفته شد. پس از گردآوری داده‌ها آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار Graph-pad prism v6.01 (Graph Pad Software In, La Jolla, California, USA) مورد بررسی قرار گرفت. روش آنالیز داده‌ها، آزمون تحلیل واریانس ANOVA و Mann-Whitney U test بود و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

این پژوهش نشان می‌دهد که در موش‌های مورد آزمایش با ادجوانت نالوکسان و آلوم به‌همراه واکسن HPV16-E7d به‌طور معناداری پاسخ ایمنی سلولی را در ریز محیط توموری را نسبت به گروه‌های کنترل فسفات سالین، آلوم، نالوکسان و آلوم/نالوکسان تقویت می‌نماید. نتایج سنجش سایتوکین‌های IFN-γ، IL-17 و IL-4 و TGF-β نشان داد سطح سایتوکین در گروه دریافت‌کننده کاندید واکسن در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشته است. نتایج تغییرات نسبی رشد تومور نشان می‌هد که تزریق واکسن فرموله شده با ادجوانت آلوم و نالوکسان (E7d-NLX-Alum) باعث کاهش نسبی رشد تومور شده است و این گروه نسبت به گروه‌های کنترل کاهش معناداری داشته است (P≤۰/۰۰۰۱). ناحیه زیر نمودار استاندارد برادفورد جهت تعیین غلظت پروتیین استفاده شد که این روش می‌تواند بین ۱۰ تا ۱۰۰۰ µg/ml غلظت پروتیین را تعیین کند. با بررسی این نمودار مشاهده گردید نمودار خطی است و غلظت پروتیین ۰/۹۷۳۸ µg/ml اندازه‌گیری شد.

بحث

در این پژوهش قدرت ایمنی‌زایی ادجوانت‌های نالوکسان به‌همراه ادجوانت آلوم در واکسن پاپیلوما ویروس HPV16-E7d در موش C57BL/6 مورد بررسی قرار گردید. مطالعات نشان دادند این ادجوانت‌ها می‌توانند هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولار و هومورال را در سطح بالاتر تحریک کند.[11] همچنین در دو مطالعه جداگانه مشخص گردید ادجوانت‌های آلوم و نالوکسان اثربخش‌ترین پاسخ ایمنی در برابر بیماری‌زاهای چندگانه را ایجاد می‌کنند.[12و13] Jazani و همکاران در مورد اثر ادجوانتی نالوکسان به این نتیجه رسید که داروی نالوکسان قادر است کارایی واکسن کشته‌شده‌ی *لیستریا مونوسیتوژنز* را افزایش دهد. فرمولاسیون باکتری کشته‌شده با داروی نالوکسان منجر به تقویت ایمنی سلولی، پاسخ‌های تکثیری مونوسیت‌ها و سطح IFNγ گردید و منجر به مقاومت به‌طور کامل معنادار نسبت به عفونت تجربی گردید.[14] همچنین یک مطالعه توسط Sáiz و همکاران انجام شد در این بررسی ترکیب آلوم–نالوکسان به‌عنوان ادجوانت در نظر گرفته شده بود و واکسن مورد مطالعه *سالمونلا تیفی موریوم* کشته شده با حرارت بود. پس از تزریق واکسن به موش‌های BALB/c سطح پاسخ ایمنی هومورال و سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش حاکی از آن بود که استفاده از آلوم–نالوکسان به‌طور همزمان به‌عنوان ادجوانت، موجب افزایش تمایل پاسخ ایمنی به‌سمت Th1، همچنین افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها، القای پاسخ IFN-γ و افزون‌برآن، افزایش پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شده است که در نهایت منجر به کاهش میزان مرگ‌ومیر شده است.[15] در این مطالعه، ریز محیط تومور کاندید واکسن E7d-NLX-Alum موجب افزایش سطح IL-17 در گروه دریافت‌کننده کاندید واکسن نسبت به گروه‌های کنترل (Alum, NLX, NLX-Alum, PBS) می‌شود. چنانکه مطالعه Fridlender و همکاران نشان می‌دهد که IL-17A می‌تواند نوتروفیل‌ها را فعال کند و هر دو فعالیت بهبود و همچنین مهارکنندگی تومور را دارد.[16] این مطالعات نتایج پژوهش کنونی را تایید می‌کند که افزایش IL-17 در ریز محیط تومور می‌تواند باعث افزایش ایمنی سلولی بر ضد تومور می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که نالوکسان و آلوم به‌عنوان ادجوانت، پاسخ‌های ایمنی ضد E7d را تحت تاثیر قرار داده است و اثر ضد توموری این واکسن را در ریز محیط تومور افزایش داده است. همچنین نشان داد که مخلوط نالوکسان و آلوم قادر هستند پاسخ‌های ایمنی سلولی را تحریک کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "ارزیابی اثر مخلوط آلوم و نالوکسان در واکسن HPV16-E7d بر فرآیند ویرایش ایمنی در ریز محیط توموری در موش‌های C57BL6" در سال ۱۳۹۵ در مقطع کارشناسی ارشد و با کد ۱۵۷۳۰۵۰۷۹۴۲۰۱۹ می‌باشد که با حمایت گروه علوم زیستی دانشکده تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی اجرا شده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

References

1. Ki EY, Park JS. Natural history of human papillomavirus infection. *Curr Obstet Gynecol Rep* 2014;3(2):123-7.
2. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7(1):11-22.
3. Mesa C, Fernández LE. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2004;82(6):644-50.
4. Teng MW, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res* 2012;72(16):3987-96.
5. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480(7378):480-9.
6. Pichichero ME. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. *Hum Vaccin* 2008;4(4):262-70.
7. Tsai RY, Tai YH, Tzeng JI, Cherng CH, Yeh CC, Wong CS. Ultra-low dose naloxone restores the antinociceptive effect of morphine in pertussis toxin-treated rats by reversing the coupling of mu-opioid receptors from Gs-protein to coupling to Gi-protein. *Neuroscience* 2009;164(2):435-43.
8. Jazani NH, Parsania S, Sohrabpour M, Mazloomi E, Karimzad M, Shahabi S. Naloxone and alum synergistically augment adjuvant activities of each other in a mouse vaccine model of Salmonella typhimurium infection. *Immunobiology* 2011;216(6):744-51.
9. Fazeli M, Soleimanjahi H, Ghaemi A, Farzanepour M, Amanzadeh A, Hashemi SR. Efficacy of HPV-16 E7 based vaccine in a TC-1 tumoric animal model of cervical cancer. *Cell J (Yakhteh)* 2011;12(4):483-8.
10. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010;31(6):220-7.
11. Jang SI, Kim DK, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Bertrand F, et al. Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG adjuvant during profilin vaccination against experimental coccidiosis. *PLoS One* 2013;8(4):e59786.
12. Casadevall A, Pirofski LA. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv Immunol* 2006;91:1-44.
13. Casadevall A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect Immun* 2003;71(8):4225-8.
14. Jazani NH, Karimzad M, Mazloomi E, Sohrabpour M, Hassan ZM, Ghasemnejad H, et al. Evaluation of the adjuvant activity of naloxone, an opioid receptor antagonist, in combination with heat-killed Listeria monocytogenes vaccine. *Microbes Infect* 2010;12(5):382-8.
15. Sáiz M, Núñez JI, Jimenez-Clavero MA, Baranowski E, Sobrino F. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect* 2002;4(11):1183-92.
16. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009;16(3):183-94.
17. Nohria A, Rubin RH. Cytokines as potential vaccine adjuvants. *Biotherapy* 1994;7(3-4):261-9.
18. Thompson ED, Enriquez HL, Fu YX, Engelhard VH. Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors. *J Exp Med* 2010;207(8):1791-804.
19. Pericle F, Giovarelli M, Colombo MP, Ferrari G, Musiani P, Modesti A, et al. An efficient Th2-type memory follows CD8+ lymphocyte-driven and eosinophil-mediated rejection of a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-4. *J Immunol* 1994;153(12):5659-73.
20. Neil JR, Galliher AJ, Schiemann WP. TGF-beta in cancer and other diseases. *Future Oncol* 2006;2(2):185-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2019; Vol. 76, No. 11: 731-735 Original Article

Evaluation of naloxone and alum adjuvants effect in HPV vaccine on immunoediting of mice in tumor microenvironment

Nazgol Malekzadeh Ph.D. Candidate[1]
Faezeh Kabiri Ph.D. Candidate[2*]
Roghaye Ahangari M.D.[3]

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.
2- Department of Microbiology, School of Dentistry, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
3- Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

* Corresponding author: Qom University of Medical Sciences, Shahid Lavasani St., Qom, Iran.
Tel: +98 25 37700096
E-mail: kabiri_10@yahoo.com

Abstract

Received: 27 Mar. 2018 Revised: 03 Apr. 2018 Accepted: 09 Feb. 2019 Available online: 19 Feb. 2019

Background: Papilloma viruses are pathogenic double-strand DNA viruses that genotypes 16 and 18 are the cause of more than 50 percent of cancers as cervical cancer. Although vaccination is one of the best options for the papilloma cancer prevention but that is the most of world healthy problem, it is attempted to evaluate both naloxone (NLX) and alum mixture used as adjuvants together with HPV16 E7d vaccine to change the tumor microenvironment for the benefit of the immune system. The aim of this study was to investigate the effect of naloxone and alum mixture as adjuvants in HPV16 E7d vaccine on C57BL/6 female mouse in tumor microenvironment.

Methods: This study is a descriptive and cross-sectional study type, which was conducted on 80 case of C57BL/6 female mouse in Pasteur institute of Iran, Tehran over a period of six months in 2016. In this study, mice were vaccinated with dose of vaccine containing naloxone and alum mixture and alum as adjuvants and proper phosphate buffered saline (PBS) as control groups are considered. Tumor bearing mouse vaccinated by vaccine containing naloxone and alum mixture as adjuvants and phosphate buffered saline (PBS) as control group. Tumor model created through surgery and then tumor measurement done, the homogenate was created and protein concentration measured by Bradford system. Finally, assessment of IL-17, IL-4, IFN-γ and TGF-β cytokines concentration were performed by capture ELISA kit (mybiosource company) according to the company manual.

Results: It was observed that utilization of naloxone and alum mixture as adjuvant in the HPV16-E7d vaccine formulation significant reduction in the tumor growth ($P \leq 0.0001$) and reinforced meaningfully the cellular immunity reaction in tumor microenvironment.

Conclusion: The results of our study show that vaccine formulated with the naloxone and alum mixture as adjuvant in the HPV16-E7d vaccine increase the cellular immunity reaction on C57BL/6 female mouse in tumor microenvironment compared to phosphate buffered saline (PBS) control group in this new formulation as a papilloma viruses vaccine on C57BL/6 female mouse.

Keywords: human papilloma virus, naloxone, neoplasms, vaccination.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-08]