

## تأثیر لیستریا مونوسایتوژنز بر ایمونوترابی مدل تجربی سرطان با سلول‌های دندریتیک

معصومه معتمدی **M.Sc.**<sup>۱</sup>، سمانه عرب **M.Sc.**<sup>۱</sup>، نعمت‌ا... خوانساری **Ph.D.**<sup>۱</sup>، سیدمحمد موذنی **Ph.D.**<sup>۲</sup>  
محمد وجگانی **Ph.D.**<sup>۱</sup>، عبدالحسین کیهانی **Ph.D.**<sup>۱</sup>، زهرا غفلتی **B.Sc.**<sup>۱</sup>، طاهره ابوفاضلی **B.Sc.**<sup>۱</sup>، جمشید حاجتی **Ph.D.**<sup>۱</sup>

۱. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

پست الکترونیک: [Email: hatij@sina.tums.ac.ir](mailto:hajatij@sina.tums.ac.ir)

### مکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۴/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۳۰

**هدف:** بررسی اثر لیستریا مونوسایتوژنز (یک میکروارگانیزم داخل سلولی) بر تقویت عملکرد سلول‌های دندریتیک جهت ایمونوترابی مدل تجربی سرطان

**مواد و روش‌ها:** برای القای تومور، سلول‌های WEHI 164 به صورت زیرجلدی به موش‌ها تزریق شد. سلول‌های مغز استخوان به مدت پنج روز در حضور GM-CSF, IL 4 کشت داده شدند. روز پنجم سلول‌های دندریتیک نابالغ حاصله با لیزات سلول‌های توموری و آنتی‌ژن‌های لیستریا مونوسایتوژنز یا سم وبا به مدت دو روز به کشت سلول‌ها اضافه شد. برای ایمونیزه کردن موش‌ها ۱۰<sup>۶</sup> سلول دندریتیک بالغ شده با سم وبا یا لیزات لیستریا مونوسایتوژنز به صورت زیرجلدی تزریق شد. از آزمون ۴ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها با سطح معنی دار  $p < 0.05$  استفاده شد.

**یافته‌ها:** آنتی‌ژن‌های لیستریا به طور معنی‌داری موجب افزایش تولید IL-12 در مقایسه با گروه کنترل و گروه سم وبا از سلول‌های دندریتیک شد ( $p < 0.0001$ ). همچنین استفاده از سلول‌های دندریتیک مواجه شده با لیستریا موجب تاخیر مشخصی در رشد تومور شد ( $p < 0.0001$ ).

**نتیجه‌گیری:** ترکیبات میکروبی نظیر لیستریا مونوسایتوژنز که پاسخ‌های TH1 را سبب می‌شوند، می‌تواند در ایجاد سلول‌های دندریتیک کارآمد برای ایمونوترابی سرطان مورد استفاده قرار گیرند.

**کلیدواژگان:** لیستریا مونوسایتوژنز، ایمونوترابی سرطان، سلول‌های دندریتیک، اینترلوکین ۱۲

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۲۵۷-۲۵۲

### مقدمه

با توجه به روند روبه رشد میزان سرطان در جهان، یافتن درمان موثر بر علیه این بیماری مورد توجه محققان قرار گرفته است. به علت عوارض سوء، درمان‌های در دسترس مانند رادیوتراپی و شیمی درمانی، استفاده از سلول‌های ایمنی به خصوص سلول‌های دندریتیک مورد توجه قرار گرفته است.

سلول‌های دندریتیک، سلول‌های عرضه‌کننده حرفه‌ای سیستم ایمنی هستند و عملکرد آنها برای ایجاد پاسخ ذاتی و اکتسابی بسیار مهم است. سلول‌های دندریتیک جمعیت بسیار هتروژنی هستند که برحسب مرحله بلوغ، عامل محرک بلوغ، زیرگروه و نسبت سلول‌های دندریتیک به لنفوسیت‌های T قادر به ایجاد طیف متنوعی از پاسخ‌های ایمنی از تولرانس تا ایجاد پاسخ ایمنی سلولی اند (۱، ۲، ۳).

با توجه به قابلیت بالای سلول‌های دندریتیک در ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی از این سلول‌ها به عنوان عوامل موثر در برانگیختن پاسخ‌های ضد توموری استفاده شده است (۴). در مطالعات مختلف معمولاً از آنتی‌ژن‌های توموری و ترکیبات مختلف سایتوکاینی به همراه سلول‌های دندریتیک استفاده شده است. ترکیبات سایتوکاینی با فراهم آوردن زمینه

بلوغ سلول‌های دندریتیک سبب بروز نقش موثرتر آنها در ایجاد پاسخ ضد توموری می‌شوند (۵، ۶).

سلول‌های دندریتیک نابالغ عمدتاً در بافت‌های محیطی مستقر هستند و با قدرت زیاد آندوسیتوز و بروز اندک مولکول‌های سطحی CD80, CD86, MHC II شناسایی می‌شوند.

سلول‌های دندریتیک نابالغ بعد از برخورد با ترکیبات و مشتقات میکروبی بالغ می‌شوند و جهت تحریک لنفوسیت‌های T به بافت‌های لنفاوی ثانویه مهاجرت و سطح بالایی از مولکول‌های کمک محرک CD80, CD86 و MHC II را بارز می‌کنند. این سلول‌ها برحسب نوع عامل محرک بلوغ به DC1 یا DC2 تمایز می‌یابند (۷، ۸).

سلول‌های دندریتیک محصولات ترشحی و متابولیزه شده توسط میکروب‌ها را از طریق (Patterns-Recognition Receptors: PRR) شناسایی می‌کنند (۹). یکی از این رسپتورها، (Toll Like Receptors: TLRs) هستند. شناسایی عوامل میکروبی از این طریق موجب ترشح سایتوکاین‌های التهابی، کموکاین‌ها، بروز مولکول‌های کمک محرک و MHC و از این طریق موجب القای پاسخ لنفوسیتی نوع ۱ یا ۲ (Th1/Th2) می‌شوند. برای مثال تولید اینترلوکین

برای القای فعالیت لنفوسیت T سائیتوتوکسیک (TCD8<sup>+</sup>) ضروری است منجمد (در ازلت مایع) و ذوب (در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد) شدند. سپس محلول فوق سانتریفوژ و سوپ رویی جدا و فیلتر شد. غلظت پروتیین محلول حاصله با روش لوری تعیین گردید و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

#### آنتیژن لیستریا مونوسایتوژنز

سویه لیستریا مونوسایتوژنز (ATCC 1060) به صورت لیوفلیزه از گروه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. بعد از کشت در محیط (Brain Heart Infusion medium: BHI) نوع باکتری با بررسی مورفولوژی کلونی، مورفولوژی میکروب، آزمایش حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد و آزمایش کمپ با استافیلوکوک آرئوس تایید شد. برای تهیه لیزات از سونیکاتور استفاده شد (۳ بار به مدت ۲ دقیقه با قدرت ۵ و سیکل ۵۰ درصد). پس از عبور محلول حاصله از فیلتر ۰/۲ میکرومتری، غلظت پروتیین محلول فوق با روش لوری محاسبه و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

#### تولید و بلوغ سلول‌های دندریتیک

برای تولید سلول‌های نابالغ دندریتیک از پیش‌سازهای مغز استخوان استفاده شد (۱۷). به طور خلاصه بعد از کشتن موش Balb/c استخوان ساق و ران جدا و با استفاده از محیط ناقص (RPMI1640 بدون سرم) محتویات داخل استخوان‌ها خارج شد و برای از بین بردن گلبول‌های قرمز از آب مقطر و بافر فسفات ۱۰× استفاده شد. این سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه چاهکی با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> در میلی‌لیتر در محیط RPMI1640 (Sigma) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماسین، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله (Gibco) و در حضور ۵ نانوگرم IL4 و ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر GM-CSF (Bender Medsystems) کشت داده شد. روز پنجم لیزات توموری به میزان ۱۰۰ میکروگرم به سلول‌های دندریتیک اضافه و جهت بالغ کردن سلول‌های دندریتیک از ۷۰ میکروگرم عصاره لیستریا مونوسایتوژنز ۱ میکروگرم سم وبا (Biomol research lab) به ازای هر میلی‌لیتر به مدت ۲ روز استفاده شد.

فنونتیپ سلول‌های دندریتیک توسط فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه شامل CD40 FITC، CD11C PE، MHCII FITC، CD80 FITC، CD86 FITC و ایزوتایپ کنترل (BD pharmingen) در روز پنجم و هفتم تعیین شد. به این منظور سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ با بافر فسفات شستشو داده شد و با آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و سرما مجاور شد. سپس برای خارج کردن آنتی‌بادی‌های اضافی سلول‌ها با بافر فسفات شسته و برای بررسی فنونتیپ سلولی با دستگاه فلوسایتومتری بررسی شد.

۱۲ از سلول‌های دندریتیک موجب فعال شدن Th1 می‌شود که خود (۱۰، ۱۱، ۱۲).

لیستریا مونوسایتوژنز نوعی باکتری داخل سلولی است که احتمالاً از طریق TLR2 و TLR9 شناسایی می‌شود. پاسخ ایمنی بر علیه این باکتری پاسخ لنفوسیتی نوع ۱ (Th1) (۱۳، ۱۴) است. در حالی که باکتری‌های خارج سلولی یا سم آنها مانند سم وبا، که انترتوکسین مترشحه از ویبریولا است، قادر به القای پاسخ لنفوسیتی نوع ۲ (Th2) هستند (۸، ۱۵، ۱۶).

با توجه به اطلاعات موجود، پاسخ ایمنی مناسب جهت درمان تومورها پاسخ سلولی و وابسته به سلول‌های Th1 است. در مطالعه حاضر توانایی ترکیبات حاصل از لیستریا مونوسایتوژنز به عنوان عامل جهت دهنده پاسخ‌های TH1 در افزایش توانایی سلول‌های دندریتیک برای مقابله با رشد سلول‌های سرطانی در مدل توموری فیبروسارکوما (WEHI 164) در موش Balb/c مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

##### حیوانات و رده سلولی

سلول‌های WEHI164 (فیبروسارکوما موش Balb/c) در محیط کشت RPMI1640 (Sigma) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماسین، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله کشت داده شد. حیوانات مورد آزمایش، موش‌های Balb/c ماده شش تا هشت هفته بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. حیوانات در سه گروه تقسیم شدند. در گروه لیستریا مونوسایتوژنز از سلول‌های دندریتیک بالغ شده با لیستریا، در گروه سم وبا از سلول‌های دندریتیک بالغ شده با سم وبا و در گروه کنترل از بافر فسفات برای ایمونوتراپی استفاده شد. هر گروه شامل ۵ سر موش بود. مطالعات تجربی بر اساس مجوز کمیته اخلاق دانشگاه انجام شد.

##### ایجاد تومور

۱۰<sup>۶</sup>×۵ سلول WEHI 164 در ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ناقص به صورت زیرجلدی به پهلو راست ۱۵ موش Balb/c تزریق و قطر تومور بر حسب میلی‌متر مربع (طول×عرض) یک روز در میان با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. زمان خاتمه آزمایش هنگامی که قطر تومور در حیوان به ۴۰۰ میلی‌متر مربع می‌رسید در نظر گرفته شد.

سرعت رشد تومور از طریق اندازه‌گیری و ثبت قطر و میزان بقا بر اساس درصد حیوانات در هر گروه درمانی که در زمان معین به نقطه پایانی نرسیده باشند مشخص شد.

##### تهیه آنتیژن‌های توموری

۲۱ روز پس از ایجاد تومور در موش‌ها تومورها خارج و به صورت مکانیکی خرد و له شدند. برای تهیه لیزات توموری پنج تا هفت بار

### ایمونوتراپی

در روز هفتم پس از تزریق سلول‌های توموری تعداد  $10^6$  سلول دندریتیک بالغ شده با لیزات لیستریا مونوسایتوژنز و سم وبا به صورت داخل توموری تزریق شد. به گروه کنترل نیز ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات تزریق شد.

### ارزیابی میزان سایتوکاین‌های تولید شده توسط سلول‌های دندریتیک

سوپ رویی سلول‌های دندریتیک روز هفتم جمع‌آوری و میزان تولید اینترلوکین ۱۲ با استفاده از کیت الیزا (Bender Medsystems) ارزیابی شد. تمام نمونه‌ها به صورت سه‌تایی انجام و غلظت اینترلوکین ۱۲ بر اساس منحنی استاندارد و بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر گزارش شد.

### روش‌های آماری

t-test برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 10 انجام شد و سطح معنی دار  $p < 0.05$  بود. برای ارزیابی آماری میزان بقا از روش  $\chi^2$  استفاده گردید.

### یافته‌ها

#### تاثیر عوامل میکروبی بر بلوغ سلول‌های دندریتیک

شکل یک بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های دندریتیک CD86، CD80، MHCII، CD11C، CD40 را نشان می‌دهد. شکل یک (a) میزان سلول‌های  $CD11C^+$  روز پنجم را نشان می‌دهد. بروز بالای CD11C و سطح پایین مولکول‌های کمک محرک CD86، CD80، MHCII، CD40 نشان دهنده فنوتیپ نابالغ سلول‌های دندریتیک است.

بعد از افزودن مواد بلوغ در روز هفتم، سلول‌های دندریتیک فنوتیپ بالغ را نشان دادند. شکل یک (b) سلول‌های دندریتیک بالغ شده با لیزات لیستریا و سلول‌های دندریتیک بالغ شده با سم وبا را نشان می‌دهد که در مقایسه با سلول‌های روز پنجم، MHCII، CD80، CD86، CD40 بالاتری را نشان می‌دهد. لیستریا مونوسایتوژنز در مقایسه با سم وبا موجب بروز بیشتر مارکر MHCII، CD86، CD40 می‌شود.

#### افزایش تولید IL12 توسط سلول‌های دندریتیک مجاور با لیستریا

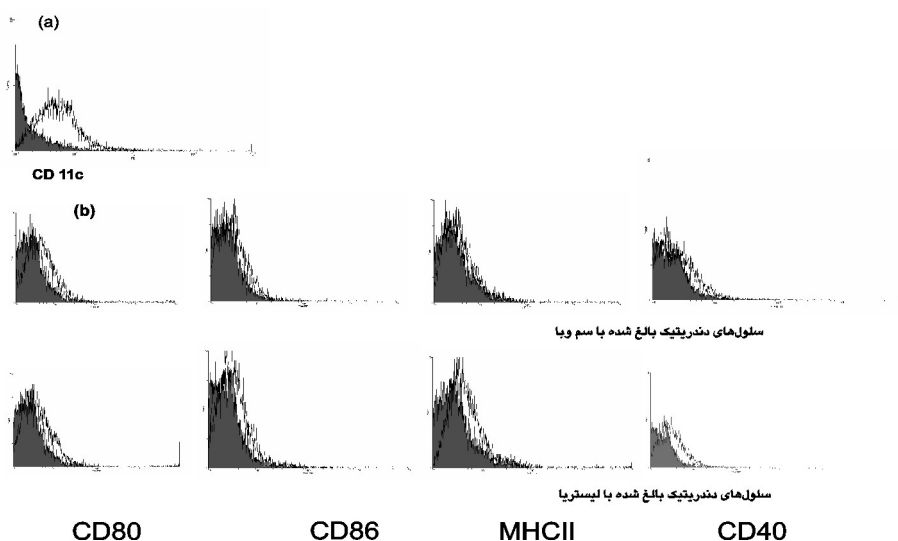
سوپ رویی کشت سلول‌های دندریتیک در روز هفتم جمع‌آوری شد و با استفاده از کیت الیزا میزان تولید اینترلوکین ۱۲ اندازه‌گیری شد. شکل دو غلظت IL12 را در سوپ رویی سلول‌های بالغ شده با لیزات لیستریا، سم وبا و سوپ رویی سلول‌های دندریتیک نابالغ (به عنوان کنترل) را برحسب پیکوگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد.

مطابق نتایج حاصله سلول‌های بالغ شده با لیستریا سطح بالاتری از IL12 را در مقایسه با گروه سم وبا و گروه کنترل ترشح می‌کند ( $p < 0.0001$ ).

#### کاهش سرعت رشد تومور تحت تاثیر لیستریا مونوسایتوژنز

برای محاسبه سرعت رشد تومور، تفاوت میانگین‌های قطر تومور در ۴۸ ساعت تعیین و سرعت برحسب میلی‌مترمربع در ۴۸ ساعت بیان شد. شکل سه میانگین سرعت رشد تومور را در گروه بالغ شده با لیستریا، گروه بالغ شده با سم وبا و گروه کنترل نشان می‌دهد.

در گروه لیستریا میانگین سرعت رشد به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه سم وبا و کنترل پایین‌تر است ( $p < 0.0001$ ). همچنین میانگین سرعت رشد تومور در گروه سم وبا در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است اما تفاوت آنها معنی‌دار نیست ( $p = 0.314$ ).



شکل ۱: بروز مارکر CD11c روی سطح سلول‌های دندریتیک نابالغ به صورت (توخالی) در مقایسه با ایزوتایپ کنترل (توپر) (a) و بروز مارکرهای بلوغ در سلول‌های دندریتیک بالغ (توخالی) در مقایسه با سلول‌های دندریتیک نابالغ (توپر) (b) را نشان می‌دهد.

گروه لیستریا حتی در مقایسه با گروه کنترل طول عمر کاهش یافته است.

### بحث

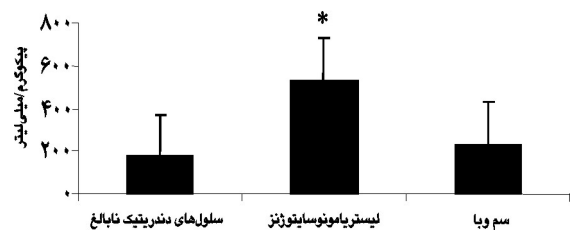
در حال حاضر توجه زیادی به کارآمد کردن سلول‌های دندریتیک برای برانگیختن پاسخ ضدتوموری موثرتر و دستیابی به نتایج مطلوب‌تر در ایمونوتراپی سرطان‌ها معطوف شده است. از جمله این روش‌ها استفاده از انواع سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در محل تومور برای فراخوانی و بلوغ سلول‌های دندریتیک (۱۸، ۱۹)، مجاور کردن سلول‌های دندریتیک با cDNA سلول‌های توموری (۲۰، ۲۱) و بالغ کردن آنها با انواع سایتوکاین‌ها و مشتقات میکروبی مختلف مثل LPS, CpG (۲۲، ۲۳) است. با توجه به این که سلول‌های دندریتیک برای برانگیختن دفاع ضدتوموری باید پاسخ‌های سلولی به ویژه با واسطه لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک و سلول‌های TH1 را تحریک کنند، نقش مولکول‌های سطحی به ویژه CD80, CD86 و عوامل محلول از جمله IL-12 و IFN $\gamma$  بر عملکرد این سلول‌ها جهت القای پاسخ مناسب ضدتوموری بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۲۴).

در مطالعه حاضر، افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک از طریق مواجهه و بالغ کردن آنها با آنتی‌ژن‌های لیستریامونوسایتوژنز مدنظر قرار گرفته است.

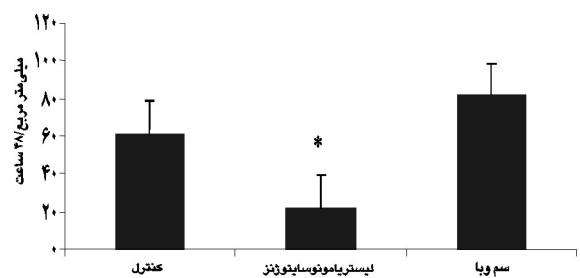
لیستریا مونوسایتوژنز باکتری داخل سلولی است که سلول‌های دندریتیک ترکیبات آن را از طریق TLR2,9 شناسایی می‌کند. TLR2 به ترکیبات دیواره سلولی، اسید لیپوتیکویک و پپتید و گلیکان باکتری متصل می‌شود و TLR9, CpG غیرمتیله را شناسایی می‌کند. اتصال این رستپورها به لیگاند خود موجب بلوغ سلول‌های دندریتیک و ترشح سایتوکاین‌هایی مانند IL-12 می‌شود (۱۱، ۱۲، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۶). با توجه به اینکه لیستریا موجب القای پاسخ به سمت TH1 می‌شود در برخی از مطالعات به تنهایی به عنوان حامل آنتی‌ژن‌های توموری و عامل تقویت کننده اثرات واکنش مربوطه به کار رفته است (۲۷، ۲۹، ۳۰). در این مطالعات استفاده از لیستریا سبب افزایش تولید سایتوکاین‌های مختلف در محیط تومور و همچنین بروز پاسخ ضدتوموری قابل توجهی شده است.

با توجه به اهمیت اینترلوکین ۱۲ در ایجاد پاسخ‌های نوع ۱ (Th1) و برانگیختن سلول‌های سیتولیتیک ضدتوموری در برخی از مطالعات از سلول‌های دندریتیک مجهز شده با ناقل ژن ویروسی حامل ژن اینترلوکین ۱۲ برای افزایش کارایی این سلول‌ها در ایمونوتراپی استفاده شده است (۳۱).

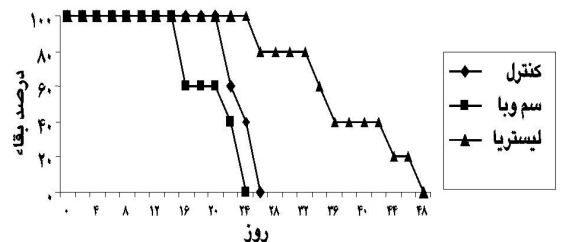
بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر مواجهه سلول‌های دندریتیک با آنتی‌ژن‌های لیستریا مونوسیتوژنز سبب افزایش بروز مولکول‌های کمکی CD80, CD86, MHCII و همچنین افزایش تولید اینترلوکین در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (شکل یک و دو). طول عمر حیواناتی که واکنش فوق را دریافت کرده بودند نیز به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (شکل چهار). این امر را می‌توان به تاثیرات آنتی‌ژن‌های لیستریایی بر تولید اینترلوکین ۱۲ و افزایش قابلیت سلول‌های T سایتوتوکسیک ضدتومور نسبت داد. بر اساس مطالعه برزوزا



شکل ۲: میزان تولید اینترلوکین ۱۲ توسط انواع سلول‌های دندریتیک. سوپ رویی سلول‌های دندریتیک نابالغ، بالغ شده با لیستریا مونوسایتوژنز و سم وبا جمع‌آوری و با کیت الیزا ارزیابی شد. میزان اینترلوکین ترشح شده از سلول‌های دندریتیک بالغ شده با لیستریا مونوسایتوژنز به طور معنی‌داری بالاتر از گروه سم وبا و سلول‌های دندریتیک نابالغ است ( $p < 0.0001$ ).



شکل ۳: سرعت رشد تومور در گروه‌های مختلف. در روز هفتم بعد از ایجاد تومور، به موش‌ها سلول‌های دندریتیک بالغ شده با لیستریا مونوسایتوژنز یا سم وبا و در گروه کنترل بافر فسفات تریزیک شد. قطر تومور یک روز در میان اندازه‌گیری شد. میانگین سرعت رشد در گروه درمان شده با لیستریا به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه سم وبا و کنترل بود ( $p < 0.0001$ ).



شکل ۴: میزان بقای موش‌ها در گروه‌های مختلف. همان گونه که در شکل مشخص شده است گروه موش‌های درمان شده با سلول‌های دندریتیک و آنتی‌ژن لیستریا به مدت طولانی‌تری (۴۸ روز) در مقایسه با گروه تحت تاثیر با سم وبا (۲۴ روز) و کنترل (۲۶ روز) به نقطه پایانی مطالعه رسیده‌اند.

### تاثیر ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک و لیستریامونوسایتوژنز بر طول عمر موش‌های مبتلا به تومور

شکل چهار میزان بقای موش‌ها را برحسب درصد در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. بر این اساس بالاترین زمان بقا مربوط به گروه لیستریا (تا روز ۴۸+) و کمترین مربوط به گروه سم وبا (تا روز ۲۴+) بوده است. همان گونه که در شکل مشخص است در روز ۲۶ که نقطه پایانی آزمایش گروه کنترل به شمار می‌رود میزان بقا در گروه لیستریا ۱۰۰ درصد بوده است. علاوه بر این در گروه سم وبا نه تنها در مقایسه با

یافته‌های شیموزو و همکاران تزریق سلول‌های دندریتیک حامل ژن اینترلوکین ۱۲ و مجاور شده با عصاره سلول‌های توموری، موجب بهبود نتیجه ایمونوترابی می‌شود (۳۵). در مطالعه حاضر نیز در گروه لیستریا مونوسایتوژنز تولید بالاتر اینترلوکین ۱۲ با پاسخ ضد توموری موثرتری همراه بود.

### نتیجه‌گیری

عوامل بلوغی که باعث تولید اینترلوکین ۱۲ بیشتر توسط سلول‌های دندریتیک می‌شوند کارآیی این سلول‌ها را در ایمونوترابی سرطان افزایش می‌دهند و سلول‌های دندریتیک بالغ شده با لیستریا مونوسایتوژنز در درمان سرطان کارآیی بهتری خواهد داشت.

بدیهی است شناسایی اجزای موثر موجود در ترکیبات این باکتری و جداسازی و تخلیص آنها زمینه را برای بررسی دقیق‌تر در مورد کارآیی این ترکیبات به عنوان عوامل تقویت‌کننده پاسخ‌های ضد توموری فراهم ساخته و به کارگیری این اجزا را در کارآزمایی‌های بالینی امکان‌پذیر خواهد ساخت.

### تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۱۳۲/۱۰۶۰۱ به مورخ ۸۳/۱۲/۲۶ است.

### References

1. Guernonprez P, Valladeau J. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cell. *Annu. Rev. Immunol* 2002; 20: 621-67
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
3. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T Cell Immunity by Dendritic Cells. 2001; 106: 263-266
4. Whiteside TL, Christine Odoux. Dendritic cell biology and cancer therapy *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53: 240-248
5. Asavaroengchai W, Kotera Y, Koike N, Pilon-Thomas N, Mule JJ. Augmentation of Antitumor Immune Responses after Adoptive Transfer of Bone Marrow Derived from Donors Immunized with Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells. *American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2004; 10: 524-533
6. Dong Kim K, Choi Sch, Noh YW. Impaired responses of leukemic dendritic cells derived from a human myeloid cell line to LPS stimulation. *Experimental and Molecular Medicine*. 2006; 38(1): 72-84
7. Moll H. Antigen delivery by dendritic cells *International Journal of Medical Microbiology*. 2004; 294(5): 337
8. De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JHN. Microbial Compounds Selectively Induce Th1 Cell-Promoting or Th2 Cell-Promoting Dendritic Cells *In Vitro*

و همکاران برداشت آنتی‌ژن‌های لیستریا توسط سلول‌های دندریتیک موجب بلوغ آنها و افزایش بروز سطحی مولکول‌هایی از قبیل CD40, CD86 و CD80 می‌شود که تولید مقادیر بالای اینترلوکین و برخی سایتوکاین‌های دیگر از این سلول‌ها را در پی خواهد داشت (۱۴). از طرف دیگر سم وبا با تاثیر بر سلول‌های دندریتیک مانع تغییر قابل توجه در بروز مارکرهای سطحی و تولید اینترلوکین ۱۲ شده است (شکل یک و دو).

مطالعات زیادی نشان داده است که سم وبا عامل القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک و قادر به جهت‌دهی پاسخ ایمنی به سمت ایجاد سلول‌های T تنظیمی یا Th2 است. مشخص شده است این سم باعث مهار تولید کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های التهابی مانند (Tumor Necrosis Factor: TNF $\alpha$ ) اینترلوکین ۱۲ و (Macrophage Inflammatory Protein 3: MIP3)، RANTES توسط سلول‌های دندریتیک تحریک شده با LPS یا CD40L می‌شود (۱۴، ۱۸، ۳۲، ۳۳).

همچنین سم وبا موجب ممانعت از بروز گیرنده‌های اینترلوکین ۱۲ بر سطح سلول‌های T می‌شود. تاثیر این سم بر تولید اینترلوکین ۱۲ و گیرنده‌های آن به عنوان یکی از دلایل اصلی ممانعت از بروز پاسخ‌های Th1 در نظر گرفته شده است (۳۳).

ترشح اینترلوکین ۱۲ از سلول‌های دندریتیک برای ایجاد پاسخ Th1 و تسهیل ایجاد پاسخ سایتوتوکسیک ضروری است (۳۴). بر اساس

with Diverse Th Cell-Polarizing Signals. *Journal of Immunology*. 2002; 168: 1704-1709

9. Schnare M, Barton GM, Czopik Holt A, Takeda K, Akira SH, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology* 2001; 2: 974-950
10. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto FD. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature America Inc*. 2000; 1: 311-316
11. Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ, Schumann RR. The role of Toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs): peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 25680-25686
12. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham SH, Sher A. CD40 Triggering of Heterodimeric IL-12 p70 Production by Dendritic Cells *In Vivo* Requires a Microbial Priming Signal. *Immunity*. 2000; 13: 453-462
13. Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol*. 2004; 4: 812-823
14. Brzoza KL, Rockel AB, Hiltbold EM. Cytoplasmic entry of *Listeria monocytogenes* enhances dendritic cell

- maturation and T cell differentiation and function. *J. Immunol.* 2004; 173: 2641-2651
15. Cristina Gagliardi M, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 2394-2403
  16. Anjuere F, Luci C, Lebens M, Rousseau M, Hervouet C. In Vivo Adjuvant- Induced Mobilization and Maturation of Gut Dendritic Cells after Oral Administration of Cholera Toxin. *Journal of Immunology.* 2004; 173: 5103-5111
  17. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1693-1702
  18. Vuylsteke RJCLM, Molenkamp BG, Gietema HA, Van Leeuwen Local PAM. Administration of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Increases the Number and Activation State of Dendritic Cells in the Sentinel Lymph Node of Early-Stage Melanoma. *Cancer Research.* 2004; 64: 8456-8460
  19. Zhu B, Zou L, Cheng X, Lin Z, Duan Y, Wu Y, Zhou F, Chen Z. Administration of MIP-3alpha gene to the tumor following radiation therapy boosts anti-tumor immunity in a murine model of lung carcinoma. *Immunol Lett.* 2006; 103(2): 101-107
  20. Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, Cannistra S, Avigan D, Kufe D. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J. Immunol.* 2000; 165: 1705-1711
  21. Tanaka H, Shimizu K, Hayashi T, Shu S. Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells. *Cell Immunol* 2002; 220: 1-12
  22. Atkins H, Davies BR, Kirby JR, Kelly JD. Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer.* 2003; 89: 2312-2319
  23. Gould MP, Greene JA, Bhoj V, DeVecchio JL, Heinzel FP. Distinct Modulatory Effects of LPS and CpG on IL-18-Dependent IFN-Synthesis. *Journal of Immunology,* 2004; 172: 1754-1762
  24. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 29-53
  25. Re F, Strominger JL. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic cells *Journal of Biological chemistry* 2001; 37692-37699
  26. Viera PL, De Jong EC, Wierenga EA. Development of Th1- Inducing Capacity in Myeloid Dendritic cell Requires Environmental Instructio. *Journal of Immunology* 2000; 164: 4507-4512
  27. Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y. Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol.* 2001; 167: 6471-6479
  28. Friedman RS, Frankel FR, XU Z, Lieberman JU. Induction of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD8 T-Cell Responses by Listeria monocytogenes and a Hyper attenuated Listeria Strain Engineered To Express HIV Antigens. *Journal of Virology* 2000; 74(2): 9987-9993
  29. Peng X, Hussain SF, Paterson Y. The ability of two listeria monocytogenes vaccines targeting human papillomavirus-16 E7 to induce an antitumor response correlates with myeloid dendritic cell function. *J Immunol,* 2004, 15; 172(10): 6030-6038
  30. Verch T, Pan ZK, Paterson Y. Listeria monocytogenes-Based Antibiotic Resistance Gene-Free Antigen Delivery System Applicable to Other Bacterial Vectors and DNA Vaccines. *Infection and Immunity,* 2004; 72(11): 6418-6425
  31. Kim CH, Hong MJ, Park SD, Kim CK, ParkHyun-Jung Sohn MY. Enhancement of anti-tumor immunity specific to murine glioma by vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells engineered to produce interleukin-12. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(11): 1309-1319
  32. Bagley KC, Abdelwahad SF, Tuskan RG. Cholera Toxin and Heat-Labile Enter toxin Activated Human Monocyte -Derived Dendritic cells and Dominantly Inhibit Cytokine Production through a Cyclic AMP-Dependent Pathway. *Infection and Immunity.* 2002; 5533-5539
  33. Braun MC, He J, Wu CY, Kelsall BL. Cholera Toxin Suppresses Interleukin (IL)-12 Production and IL-12 Receptor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 Chain Express. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189(3): 541-552
  34. Yap G, Pesin M, Sher A. IL-12 Is Required for the Maintenance of IFN Production in T Cells Mediating Chronic Resistance to the Intracellular Pathogen. *Journal of Immunology.* 2000; 165: 628-631
  35. Shmizu T, Berhuanu A, Redlinger RE. Intrleukin-12 Transduced Dendritic cells Induce Regression of Established Murine Neuroblastoma. *Journal of Surgery* 2001; 36(8): 1282-1292