[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ٤: از ۸۷-۹۵
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

تأثیر اجزای لیستریا مونوسیتوژنز بر سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱

معصومه معتمدی[1*]، سمانه عرب[2]، معصومه خمیس‌آبادی[3]، زهرا غفلتی[4]، جمشید حاجتی[5]

۱- کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان، ایران
۲- کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- کاردان، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۹ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۴

چکیده

هدف: سلول‌های دندریتیک نقش کلیدی در آغاز و جهت‌دهی پاسخ‌های ایمنی دارند. با مشاهده نقص این سلول‌ها در افراد مبتلا به تومور، توجه زیادی به اصلاح این سلول‌ها و استفاده از آن‌ها در ایمنی‌درمانی سرطان جلب شده است. در مطالعه قبلی محققان حاضر نشان دادند که لیزات لیستریا مونوسیتوژنز قادر به بالغ کردن سلول‌های دندریتیک، القای پاسخ لنفوسیتی نوع ۱ (TH1) و افزایش بقاء در یک مدل تجربی می‌شود. در تحقیق حاضر هدف بررسی تأثیر اجزای مختلف لیستریا مونوسیتوژنز در افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک برای ایجاد پاسخ TH1 است.

مواد و روش‌ها: مراحل کار شامل تهیه اجزای مختلف لیستریا مونوسیتوژنز (لیزات لیستریا، اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیک (DNA)، بالغ کردن سلول‌های دندریتیک مشتق شده از مغز استخوان با انواع اجزای لیستریا مونوسیتوژنز، ارزیابی سیتوکین‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک و سلول‌های بود.

نتایج: نتایج به‌دست آمده بیانگر آن است که کلیه اجزای لیستریا (لیزات، پروتئین و اسید نوکلئیک) قادر به بالغ کردن سلول‌های دندریتیک مجاور شده با آنتی‌ژن فیبروسارکومای موش بوده و موجب جهت‌دهی پاسخ به سمت TH1 می‌شوند. با این وجود سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزای پروتئینی لیستریا مونوسیتوژنز به‌طور مؤثرتری قادر به جهت‌دهی پاسخ به سمت TH1 هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داده که سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزای لیستریا به‌طور مؤثرتری موجب القای پاسخ لنفوسیتی نوع ۱ می‌شود و ممکن است در ایمنی‌درمانی سرطان مؤثر باشد.

کلیدواژگان: لیستریا مونوسیتوژنز، سلول دندریتیک، لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱

۱- مقدمه

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells: DCs)، سلول‌های عرضه کننده حرفه‌ای سیستم ایمنی هستند که قابلیت ایجاد و هدایت انواع مختلفی از پاسخ‌های ایمنی را با توجه به عوامل و پیام‌های محیطی دارند. این سلول‌ها بر حسب شرایط

* **نشانی مکاتبه:** لرستان، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی
Email: masomeh_ims@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

رشد و بلوغ می‌توانند پاسخ‌های ایمنی نوع ۱ (TH1) یا نوع ۲ (TH2) را جهت‌دهی کنند [۱- ٦]. با توجه به قابلیت بالای DCs در ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی از این سلول‌ها به‌عنوان عوامل مؤثر در برانگیختن پاسخ‌های ضد توموری با القای TH1 و سلول‌های T سیتوتوکسیک استفاده شده است [۲].

DCs نابالغ با قدرت زیاد اندوسیتوز و بروز اندک مولکول‌های سطحی CD80، CD86 و MHC-II (Major histocopatibility complex) شناسایی می‌شوند. این سلول‌ها بعد از برخورد با ترکیبات و مشتقات میکروبی با افزایش مولکول‌های سطحی CD80، CD86 و MHC-II بالغ شده و برای تحریک سلول‌های لنفوسیت T به بافت‌های لنفاوی ثانویه مهاجرت می‌کنند [۱، ۷، ۸].

DCs از طریق گیرنده‌های تشخیص‌دهنده الگوهای مولکولی مانند گیرنده‌های شبه تول (Toll like receptors: TLR) قادر به شناسایی عوامل میکروبی هستند. در پی این شناسایی و بر حسب نوع عامل بلوغ با ترشح سیتوکین‌های (Cytokines) التهابی، کموکاین‌ها (Chemokines)، بروز مولکول‌های کمک محرک و MHC موجب القای پاسخ لنفوسیتی نوع ۱ یا ۲ می‌شوند. سیتوکین‌ها نقش مهمی در جهت‌دهی پاسخ ایمنی دارند. اینترلوکین ۱۲ (Interleukin 12: IL-12) مهم‌ترین سیتوکین دخیل در جهت‌دهی پاسخ ایمنی به سمت TH1 است. به‌نظر می‌رسد میزان تولید این سیتوکین از DCs در جهت‌دهی پاسخ ایمنی دخیل است [۹]. علاوه بر IL-12، IL-18 موجب القای ترشح اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN-γ) از لنفوسیت‌های T می‌شوند. IFN-γ علاوه بر افزایش بروز مولکول‌های کمک محرک و MHC-I، MHC-II بر سطح سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن، موجب تسریع تمایز سلول‌های CD^{4+} T بکر به زیرده TH1 و مهار تمایز سلول‌های TH2 می‌شود [۱۰].

در حالی که IL-10 از طریق مهار تولید IL-12 و TNF و کاهش بروز کمک محرک‌ها ومولکول‌های MHC-II موجب مهار فعال شدن سلول‌های T و خاتمه واکنش ایمنی سلولی می‌شود [۱۱، ۱۲].

لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogene*) باکتری گرم مثبت داخل سلولی اختیاری است. DCs از طریق TLR2 و TLR9 این میکروب را شناسایی کرده و سیتوکین‌هایی مانند IL-1 و IL-12 را تولید می‌کنند [۱۳، ۱٤]. با توجه به این‌که لیستریا موجب القای پاسخ به سمت TH1 می‌شود، در برخی مطالعات به‌عنوان ناقل واکسن برای آنتی‌ژن‌های مشتق از عوامل عفونی یا تومور به‌کار رفته است.

در مطالعه قبلی محققان حاضر نشان دادند که میکروب‌های داخل سلولی به‌ویژه لیستریا مونوسیتوژنز قادر به تحریک و ایجاد DCs بالغ با توانایی القای پاسخ TH1 کارامد هستند [۱۵]. به‌منظور یافتن جزء یا اجزای کارامدتر این میکروب برای القای پاسخ TH1 در این مطالعه تأثیر اجزای مختلف پروتئینی و اسید نوکلئیکی این باکتری بر پاسخ‌های لنفوسیت‌های T بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- حیوانات و رده سلولی

سلول‌های WEHI164 (فیبروسارکومای (Fibrosarcoma) موش Balb/c) در محیط کشت RPMI1640 (Sigma) حاوی ۱۰۰ واحد درمیلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماسین (Streptomycin)، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله کشت داده شد. حیوانات مورد آزمایش موش‌های Balb/c ماده ٦ تا ۸ هفته بودند و از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

۲-۲- آنتی‌ژن‌ها و اجزای لیستریا مونوسیتوژنز

۲-۲-۱- تهیه لیزات آنتی‌ژن توموری

۵×۱۰^{٦} سلول WEHI164 در ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ناقص به‌صورت زیرجلدی به پهلوی راست ۵ موش Balb/c تزریق شد. ۲۱ روز پس از ایجاد تومور، تومورها خارج شده و به‌صورت مکانیکی خرد و له شدند. عصاره به‌دست آمده ۵ تا ۷ بار منجمد (در ازت مایع) و ذوب (در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد) شد و مایع رویی حاصل از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

سانتریفوژ این عصاره پس از فیلتر نمودن و تعیین غلظت پروتئین به‌عنوان لیزات توموری استفاده شد.

۲-۲-۲- لیزات کامل آنتی‌ژن لیستریا مونوسیتوژنز

سویه لیستریا مونوسیتوژنز به‌صورت لیوفلیزه (Lyophilized) از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شد. بعد از کشت در محیط BHI (Brain Heart Infusion medium)، نوع باکتری با بررسی ریخت‌شناسی (Morphology) کلونی، ریخت‌شناسی میکروب، آزمون حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و آزمون کمپ (Camp test) با استافیلوکوک آرئوس (*Staphylococcus aureus*) تأیید شد. برای تهیه لیزات از سونیکاتور (Sonicator) استفاده شد (۳ بار به‌مدت ۲ دقیقه با قدرت ۵ و چرخه ۵۰ درصد).

۲-۲-۳- جداسازی اسیدهای نوکلئیک لیستریا مونوسیتوژنز

سوسپانسیون میکروبی در غلظتی معادل ۱ مک فارلند تهیه و از کیت شرکت کیاژن (QIAGEN) برای جداسازی و تخلیص DNA مطابق روش زیر استفاده شد:

سوسپانسیون باکتریایی با ۵۰۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و به پلیت باکتریایی ۱۸۰ میکرولیتر محلول۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزوم (Lysozome) افزوده و به‌مدت۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به سوسپانسیون حاصل ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز k و ۲۰۰ میکرولیتر بافر افزوده و مخلوط شد، سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۹۶-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط کردن به ستون منتقل و مواد فیلتر شده دور ریخته شد.

به ستون ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر شستشوی ۱ اضافه کرده سپس ستون به‌مدت ۱ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ شد. بعد از دور ریختن محلول به ستون ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر شستشوی ۲ اضافه کرده و به‌مدت ۳ دقیقه در ۲۰۰۰۰g سانتریفوژ شد.

بعد از دور ریختن محلول به ستون ۲۰۰ میکرولیتر بافر آنزیمی افزوده و به‌مدت ۱ دقیقه ستون در ۶۰۰۰g سانتریفوژ شد.

۲-۲-۴- اجزای پروتئینی لیستریا مونوسیتوژنز

برای جداسازی و تخلیص اجزای پروتئینی از کیت شرکت QIAGEN استفاده شد. به‌طور خلاصه روش کار جداسازی پروتئین به شرح زیر است:

۱۰ میلی‌لیتر از بافر لیزات به پلیت باکتریایی افزوده شد و سوسپانسیون را به‌مدت ۲- ۳ دقیقه روی یخ مخلوط کرده تا یکنواخت شود. سپس با دور ۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و محلول رویی برای ارزیابی پروتئین جمع‌آوری شد. بعد از فیلتر کردن، غلظت محلول‌های حاصل با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

۲-۳- تولید و بلوغ DCs

برای تولید DCs نابالغ از پیش‌سازهای مغز استخوان استفاده شد [۱۶]. به‌طور خلاصه بعد از کشتن موش Balb/c استخوان ساق و ران جدا و با استفاده از محیط ناقص محتویات داخل استخوان‌ها خارج شد و برای از بین بردن گلبول‌های قرمز از آب مقطر و بافر فسفات ۱۰x استفاده شد. این سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه چاهکی با غلظت 10^6 در میلی‌لیتر در محیط RPMI-164 (Sigma) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماسین، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله (Roche) و در حضور ۵ نانوگرم IL4 و ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر GM-CSF (Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor) (Bender Medsystems) کشت داده شد. در روز پنجم ۱۰۰ میکروگرم لیزات توموری و ۷۰ میکروگرم لیزات کامل آنتی‌ژن لیستریا مونوسیتوژنز یا ۱۰ نانوگرم DNA لیستریا مونوسیتوژنز یا ۷۰ میکروگرم اجزای پروتئینی لیستریا مونوسیتوژنز به‌مدت ۲ روز اضافه شد.

فنوتیپ DCs توسط فلوسیتومتری (Flocytometery) با استفاده از آنتی‌بادی‌های تک‌تبار (Monoclonal) کونژوگه با

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

MHC-II PE ،CD11c ،CD80 ،CD86 FITC ،CD40 و ایزوتایپ کنترل (Bender Medsystem) در روز ۵ و ۷ تعیین شد. به‌طور خلاصه به هر لوله حاوی 10^5 سلول، ۱ میکرولیتر آنتی‌بادی کونژوگه اضافه و برای مدت ۳۰- ٤٥ دقیقه در تاریکی و سرما قرار داده شد. بعد از این مدت لوله‌ها با دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۵- ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی کاملاً خالی شد. سلول‌ها ۲ بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. در این مرحله به لوله ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه و نتایج با دستگاه فلوسیتومتر و با استفاده از نرم‌افزار WINMDI بررسی شد.

۲-٤- ارزیابی میزان سیتوکین‌های تولید شده توسط DCs

سوپ رویی DCs در روز پنجم و هفتم جمع‌آوری شد و میزان تولید اینترلوکین IL-10، IL-12 و IL-18 با استفاده از کیت الایزا (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay: ELISA) (R&D System) تعیین و تمام نمونه‌ها به‌صورت سه‌تایی انجام شد.

۲-۵- ارزیابی میزان سیتوکین‌های تولید شده توسط سلول‌های طحالی

برای این منظور DCs بالغ شده (روز هفتم) با انواع آنتی‌ژن‌های لیستریا، لیزات کامل آنتی‌ژن لیستریا (DC-S) یا DNA لیستریا مونوسیتوژنز (DC-DNA) یا پروتئین لیستریا مونوسیتوژنز (DC-Pr) در غلظت 5×10^3 در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تهیه و در بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی ۳۰ راد (Rad) به‌مدت ۳ دقیقه اشعه داده شدند. برای تهیه سلول‌های طحالی به یک سر موش Balb/c ۲۰۰ میکرولیتر لیزات توموری (حاوی 10^6 سلول توموری) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. در روز چهاردهم موش کشته شد. در شرایط استریل طحال جدا و با ته سرنگ و به آرامی تا جایی که فقط کپسول طحال باقی بماند له شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از فایکول (Ficoll) جدا شد.

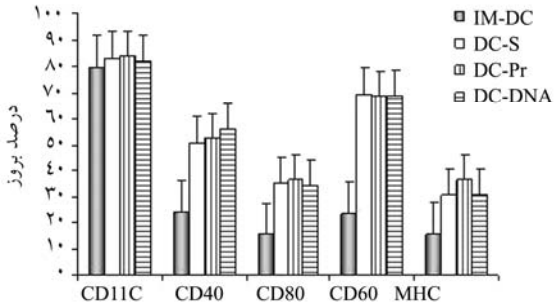
سپس DCs و سلول‌های طحالی در نسبت ۱/۲۰ در مجاورت هم قرار داه شدند. سوپ رویی کشت همزمان سلول‌های طحالی و سلول‌های دندریتیک در روز دوم جمع‌آوری شده و میزان تولید IL-10 و IFN-γ به روش ELISA (R&D System) تعیین شد.

۲-٦- روش‌های آماری

آزمون t (t-test) برای بررسی تفاوت گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۰ انجام شد و سطح معنی‌داری $p<0/05$ بود.

۳- نتایج

شکل ۱ درصد بروز نشانگرهای (Markers) سطحی DCs (CD11C، MHCII، CD80، CD86 و CD40) را نشان می‌دهد. در روز هفتم بعد از برخورد DCs با اجزای مختلف لیستریا بروز این مولکول‌ها در سطح DCs در تمام گروه‌ها افزایش می‌یابد.



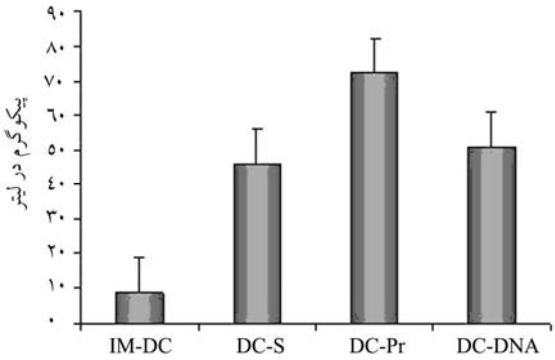
شکل ۱ بروز نشانگرهای سطحی را بر سطح DCs نابالغ (IM-DC)، DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) و DCs بالغ شده با DNA لیستریا (DC-DNA) را نشان می‌دهد. افزایش نشانگرها (به‌جز CD11c) در تمام گروه‌های DCs بالغ شده نسبت به نابالغ مشاهده می‌شود.

IL-12 -۱-۳

سوپ رویی کشت DCs در روز هفتم جمع‌آوری و با

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

استفاده از کیت ELISA میزان تولید IL-12 اندازه‌گیری شد. شکل ۲ غلظت IL-12 را در سوپ رویی سلول‌های بالغ شده با اجزای مختلف لیستریا و سوپ رویی DCs نابالغ (به‌عنوان کنترل) را برحسب پیکوگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد. DCs بالغ شده با پروتئینی لیستریا در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بالاترین حد (۷۲/۲۹±۰/۵۸)، و DCs نابالغ (۸/۷±۲/۶) کمترین حد ترشح IL-12 را دارند.



شکل ۲ میزان ترشح IL-12 بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر از DCs نابالغ (IM-DC)، DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) و DCs بالغ شده با DNA لیستریا (DC-DNA) را نشان می‌دهد DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) به‌طور معنی‌داری میزان بیشتری از این سیتوکین را در مقایسه با سایر گروه‌ها ترشح کرده است (۰<p<۰/۲۵).

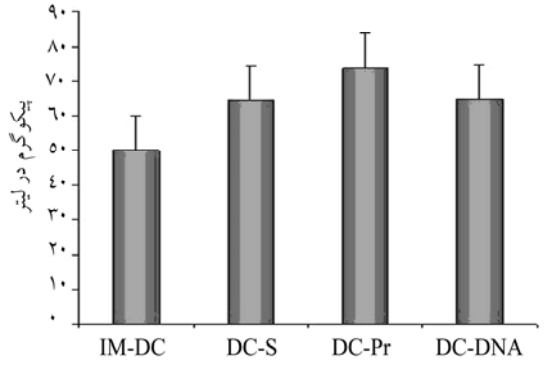
IL-18 -۲-۳

در بین گروه‌ها بیشترین مقدار ترشح IL-18 مربوط به گروه DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (۷۳±۱/۵۶) بود (۰<p<۰/۰۲) (شکل ۳).

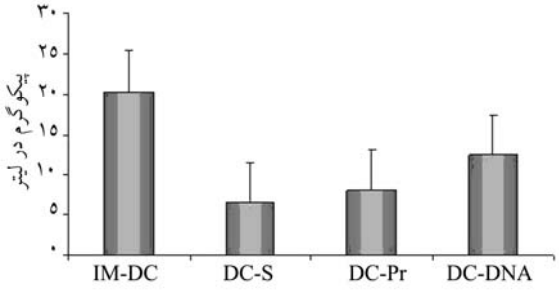
گروه‌های لیزات کامل آنتی‌ژن لیستریا مونوسیتوژنز و DNA در مقایسه با گروه DC نابالغ افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (۰/۰۰۱<p<۰/۰۴).

IL-10 -۳-۳

شکل ٤ میزان ترشح IL-10 از DCs روز پنجم و هفتم بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. DCs نابالغ در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌دار مقدار بیشتری از این سیتوکین را ترشح می‌کند. با وجود این‌که DCs بالغ شده با DNA لیستریا در مقایسه با سایر گروه‌ها میزان بیشتری IL-10 ترشح می‌کنند اما این اختلاف معنی‌داری نیست (۰/۱۱۲<p<۰/٤۹٦).



شکل ۳ میزان ترشح IL-18 از DCs نابالغ (IM-DC)، DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا DC-PR و DCs بالغ شده با DNA لیستریا (DC-DNA) بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. تمام گروه‌های DCs بالغ نسبت به DCs نابالغ به‌طور معنی‌داری IL-18 را ترشح کرده‌اند.



شکل ٤ میزان ترشح IL-10 از DCs نابالغ (IM-DC)، DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) و DCs بالغ شده با DNA لیستریا (DC-DNA) بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. DCs نابالغ به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها میزان بیشتری IL-10 ترشح کرده‌اند.

۳-٤- تأثیر عوامل میکروبی مختلف بر ترشح سیتوکین‌ها از لنفوسیت‌ها

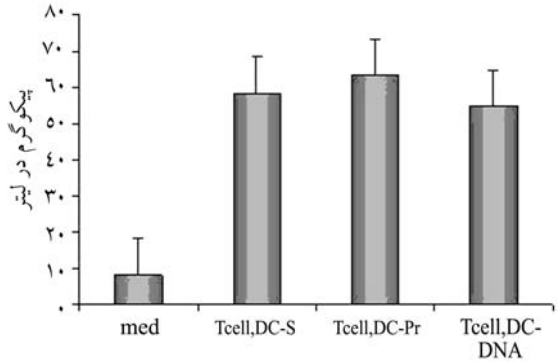
IFN-γ -۱-٤-۳

برای ارزیابی سیتوکین‌های ترشح شده از لنفوسیت‌ها، سوپ رویی کشت همزمان لنفوسیت با DCs بالغ شده با اجزای مختلف لیستریا بعد از ٤٨ ساعت جمع‌آوری و با کیت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

به روش ELISA بررسی شد (شکل۵).

بیشترین میزان ترشح مربوط به لنفوسیت‌های مواجه شده با DCs بالغ شده با جزء پروتئینی (۰/۵۳±۶۳/۳۷) بوده است.

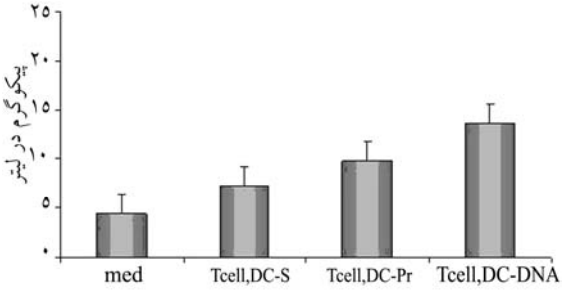


شکل ۵ میزان ترشح IFN-γ از سلول‌های لنفوسیت در کشت همزمان سلول‌های لنفوسیت با DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (T cell, DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (Tcell, DC-PR)، DCs بالغ شده با DNA لیستریا (T cell, DC-DNA) و محیط به تنهایی (med) بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. بیشترین میزان مربوط به DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا است.

IL-10 -۲-٤-۳

شکل ٦ میزان IL-10 ترشح شده در محیط رویی کشت همزمان انواع DCs با سلول‌های طحالی را در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد.

در بین گروه‌ها، گروه DNA نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین میزان ترشح و گروه لیزات کامل لیستریا به‌طور معنی‌داری پایین‌ترین سطح را نشان داده است (۰/۰۰۷>p>۰/۰۵).



شکل ٦ میزان ترشح IL-10 از سلول‌های لنفوسیت در کشت همزمان سلول‌های لنفوسیت با DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (Tcell, DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (Tcell, DC-PR)، DCs بالغ شده با DNA لیستریا (Tcell, DC-DNA) و محیط به تنهایی (med) بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. DCs بالغ شده باDNA لیستریا به‌طور معنی‌داری میزان بیشتری از این سیتوکین را در مقایسه با دو گروه دیگر ترشح می‌کند (۰/۰۰۷>p>۰/۰۵).

٤- بحث

نقش کلیدی DCs در ایجاد و جهت‌دهی پاسخ ایمنی اثبات شده است. مواجهه DCs با بیماری‌زاها یا آنتی‌ژن‌ها از طریق گیرنده‌های سطحی مانند TLR موجب بلوغ DCs شده که این امر برای مهاجرت DCs به بافت‌های لنفاوی، عرضه مناسب آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T و القای پاسخ ایمنی الزامی است [۱۷- ۲۰].

یکی از شرایط اولیه تحریک مناسب سلول‌های T بروز مناسب و کافی انواع مولکول‌های دخیل در روند عرضه آنتی‌ژن بر سطح DCs است. در مطالعه حاضر DCs بالغ شده با لیزات کامل لیستریا، پروتئین و DNA لیستریا مولکول‌های کمک محرک، CD40 و MHC-II را بیشتر از گروه کنترل بیان کرده‌اند. در مطالعه قبلی محققان حاضر نشان دادند که عصاره لیستریا موجب بلوغ DCs می‌شود [۱۵]. در همین زمینه برزوزا (Brzoza) و همکاران نشان داده‌اند که لیستریا مونوسیتوژنز موجب افزایش بروز مولکول‌های کمک محرک، CD40 و MHC-II در سطح DCs، در مقایسه با گروه DCs نابالغ می‌شود [۲۱].

سیتوکین‌های ترشح شده از DCs مهم‌ترین عامل تعیین کننده نوع پاسخ ایمنی اختصاصی هستند.

IL-12 سیتوکین شاخص در القای پاسخ TH1 و IL-10 در ایجاد پاسخ TH2 حائز اهمیت است. ثابت شده است که میزان IL-12 تولید شده از DCs در جهت‌دهی پاسخ ایمنی نقش اساسی دارد [۱۰، ۲۲- ۲۵].

علاوه بر این مطالعات نقش IL-18 را به‌عنوان سیتوکین مؤثر بر القای پاسخ TH1 از طریق اثر هم‌افزایی آن با IL-12 در تمایز وتولید IFN-γ از سلول‌های T را نشان داده‌اند [۲٦، ۲۷].

مطالعات مختلف مطابق با مطالعه قبلی محققان حاضر نشان داده‌اند که لیستریا مونوسیتوژنز موجب بلوغ DCs شده و با تولید مقادیر بالای IL-12، IL-18 و مقادیر کم IL-10 با افزایش تولید IFN-γ از لنفوسیت‌ها، موجب جهت‌دهی پاسخ ایمنی به سمت TH1 می‌شود [۱۵، ۲۱، ۲۸- ۳۰].

در تحقیق حاضر مشاهده شد که DCs بالغ شده با پروتئین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

لیستریا با تولید بیشتر IL-12، IL-18 موجب القای ترشح IFN-γ بیشتری در لنفوسیت‌ها می‌شود و در نهایت موجب القای بهتر پاسخ TH1 می‌شوند.

پروتئین‌های متنوعی در ساختمان باکتری لیستریا مونوسیتوژنز وجود دارند که شاید هر کدام از آن‌ها را بتوان عامل بروز این آثار قلمداد نمود. لیستریو لیزین O (Listeriolysin O: LLO) سم پروتئینی این باکتری است. این سم با انهدام غشای فاگوزوم موجب فرار باکتری از فاگوزوم به سیتوزول و بیماری‌زایی آن می‌شود [۳۱]. مطالعات نشان داده که DCs مواجه شده با لیستریاهای جهش‌یافته (Mutant) فاقد این آنزیم، مولکول‌های کمک محرک و سیتوکین‌هایی مثل TNF، IL-12 و IL-6 را در سطح پایین‌تری در مقایسه با باکتری‌های سالم تولید می‌کنند [۳۰،۲۹].

ActA نیز یک پروتئین مربوط به دیواره این باکتری است که در عبور بین سلولی و ویرولانس (Virulence) این باکتری نقش دارد. تاژک (Flagella) باکتری نیز که در حرکت و بیماریزایی آن تأثیر می‌گذارد، از طریق DCs TLR5 شناسایی می‌شود [۳۲].

احتمالاً به این دلیل که اجزای مختلف پروتئینی این باکتری از طریق TLRهای مختلف شناسایی می‌شوند و از طرف دیگر به دلیل ایمن‌زایی بالاتر پروتئین‌ها، توانایی بهتری نیز در افزایش کارایی DCs داشته‌اند.

با توجه به اهمیت سلول‌های TH1 و نقش آن در القای پاسخ سیتوتوکسیک ضد توموری در این مطالعه مشاهده شد که جزء پروتئینی لیستریا قادر به القای بهتر پاسخ TH1 می‌شود که احتمالاً می‌توان از این جزء در درمان مدل توموری استفاده نمود.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران در خصوص انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 2002; 20: 621–67.

[2] Hegmans JP, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrech BN. Immunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate–pulsed dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171(10): 1168-77.

[3] Xu JJ, Yao K, Yu CJ, Chen X, Lu MP, Sun H, Li BZ, Ding CN, Zhou F. Anti-tumor immunity against nasopharyngeal carcinoma by means of LMP2A-specific cytotoxic T lymphocytes induced by dendritic cells. Auris Nasus Larynx 2006; 33(4): 441-6.

[4] Gatza E, Okada CY. Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells are more effective than TCR Id protein vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. J Immunol 2002; 169(9): 5227–35.

[5] Khan JA, Yaqin S. Dendritic cell therapy with improved outcome in glioma multiforme -- a case report. J Zhejiang Univ Sci B 2006; 7(2): 114-7.

[6] Brody JD, Engleman EG. DC-based cancer vaccines: lessons from clinical trials. Cytotherapy 2004; 6(2): 122-7.

[7] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392(6673): 245-52.

[8] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell 2001; 106(3): 263–6.

[9] Hüttner KG, Breuer SK, Paul P, Majdic O, Heitger A, Felzmann T. Generation of potent

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

[17] 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(28): 25680–6.

[18] Re F, Strominger JL. Toll-like recptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. J Biol Chem 2001; 276(40): 37692-9.

[19] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett 2003; 85(2): 85-95.

[20] De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJ, Adema GJ, Punt CJ, Figdor CG. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. Cancer Res 2003; 63(1): 12-7.

[21] 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(4): 2641–51.

[22] Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol 2000; 1(4): 311-6.

[23] de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. Microbial anti-tumor immunity in mice by interleukin-12-secreting dendritic cells. Cancer Immunol Immunother 2005; 54(1); 67-77.

[10] Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol 2003; 21: 713–58.

[11] Yao Y, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. J Exp Med 2005; 201(12):1899-903.

[12] Abul K.Abbas, Andrew H.Lichtman. Cellular and Molecular Immunology. Section 5, 5th ed, 2003; p: 505-30.

[13] Geginat G, Schenk S, Skoberne M, Goebel W, Hof H. A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from Listeria monocytogenes. J Immunol 2001; 166(3): 1877-84.

[14] Skoberne M, Schenk S, Hof H, Geginat G. Cross-presentation of Listeria monocytogenes - derived CD4 T cell epitopes. J Immunol 2002; 169(3): 1410–8.

[15] Motamedi M, Arab S, Khansari S, Moazeni SM, Vodjgani M, Keyhani AH, Gheflati Z, Aboofazeli T, Hadjati J. Effect of Listeria monocytogenes on tumor immunotherapy with dendritic cells. Yakhteh J 2007; 8(32): 232-318.

[16] 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(6): 1693-702.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. J Immunol 2002; 168(4): 1704–9.

[24] Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. J Leukoc Biol 2005; 78(3): 656-64.

[25] Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. J Immunol 2000; 164(9): 4507-12.

[26] Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. J Immunol 2000; 164(1): 64–7.

[27] Gould MP, Greene JA, Bhoj V, DeVecchio JL, Heinzel FP. Distinct modulatory effects of LPS and CpG on IL-18-dependent IFN-gamma synthesis. J Immunol 2004; 172(3): 1754–62.

[28] Pamer EG. Immune responses to Listeria monocytogenes. Nat Rev Immunol 2004; 4(10): 812–23.

[29] Yamamoto K, Kawamura I, Tominaga T, Nomura T, Kohda C, Ito J, Mitsuyama M. Listeriolysin O, a cytolysin derived from Listeria monocytogenes, inhibits generation of ovalbumin-specific Th2 immune response by skewing maturation of antigen-specific T cells into Th1 cells. Clin Exp Immunol 2005; 142(2): 268–74.

[30] Xiong H, Kawamura I, Nishibori T, Mitsuyama M. Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of Listeria spp. differing in virulence. Infect Immun 1994; 62(9): 3649–54.

[31] Vazquez-Boland JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorn B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity islands and virulence evolution in Listeria. Microbes Infect 2001; 3(7): 571–84.

[32] Low JC, Donachie W. A review of Listeria monocytogenes and listeriosis. Vet J 1997; 153(1): 9–29.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]