

تأثیر اجزای لیستریا مونوستیوژن بر سلول‌های دندربیتیک در القای پاسخ لنفوسيت‌های کمکی نوع ۱

معصومه معتمدی^{۱*}، سمانه عرب^۲، معصومه خمیس‌آبادی^۳، زهرا غلتی^۴، جمشید حاجتی^۵

- 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

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

چکیده

هدف: سلول‌های دندربیتیک 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 ایمنی درمانی سرطان جلب شده است. در مطالعه قبلی محققان حاضر نشان دادند که لیزات لیستریا مونوستیوژن قادر به بالغ کردن سلول‌های دندربیتیک، القای پاسخ لنفوسيتی نوع ۱ (TH1) و افزایش بقاء در یک مدل تجربی می‌شود. در تحقیق حاضر هدف بررسی تأثیر اجزای مختلف لیستریا مونوستیوژن در افزایش کارایی سلول‌های دندربیتیک برای ایجاد پاسخ TH1 است.

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

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

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داده که سلول‌های دندربیتیک بالغ شده با اجزای لیستریا به طور مؤثرتری موجب القای پاسخ لنفوسيتی نوع ۱ می‌شود و ممکن است در ایمنی درمانی سرطان مؤثر باشد.

کلیدواژگان: لیستریا مونوستیوژن، سلول دندربیتیک، لنفوسيت‌های کمکی نوع ۱

۱- مقدمه

ایجاد و هدایت انواع مختلفی از پاسخ‌های ایمنی را با توجه به عوامل و پیام‌های محیطی دارند. این سلول‌ها بر حسب شرایط

سلول‌های دندربیتیک (Dendritic Cells: DCs)، سلول‌های عرضه کننده حرله‌ای سیستم ایمنی هستند که قابلیت

* نشانی مکاتبه: لرستان، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

Email: masomeh_ims@yahoo.com

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، ۱۴]. با توجه به این که لیستریا موجب القای پاسخ به سمت TH1 می‌شود، در برخی مطالعات به عنوان ناقل واکسن برای آنتی‌ژن‌های مشتق از عوامل عفونی یا تومور به کار رفته است.

در مطالعه قبلی محققان حاضر نشان دادند که میکروب‌های داخل سلولی بهویژه لیستریا مونوستیوتوزن قادر به تحریک و ایجاد بالغ با توانایی القای پاسخ TH1 کارامد هستند [۱۵]. به منظور 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

۱-۱- حیوانات و رده سلولی

سلول‌های WEHI164 (فیبروسارکومای موش c/Balb) در محیط کشت (Fibrosarcoma) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر (Sigma) RPMI1640 پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتوماسین (Streptomycin)، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرمه غیرفعال جنین گوساله کشت داده شد. حیوانات مورد آزمایش موش‌های Balb/c ماده ۶ تا ۸ هفته بودند و از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

۲-۱- آنتی‌ژن‌ها و اجزای لیستریا مونوستیوتوزن

۲-۱-۱- تهیه لیزات آنتی‌ژن توموری

۵×۱۰⁷ سلول WEHI164 در ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ناقص به صورت زیرجلدی به پهلوی راست ۵ موش Balb/c تزریق شد. ۲۱ روز پس از ایجاد تومور، تومورها خارج شده و به صورت مکانیکی خرد و له شدند. عصاره به دست آمده ۵ تا ۷ بار منجمد (در ازت مایع) و ذوب (در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد) شد و مایع رویی حاصل از

رشد و بلوغ می‌توانند پاسخ‌های ایمنی نوع ۱ (TH1) یا نوع ۲ (TH2) را جهت‌دهی کنند [۱-۶]. با توجه به قابلیت بالای DCs در ایجاد پاسخ ایمنی اختصاصی از این سلول‌ها به عنوان عوامل مؤثر در برآنگیختن پاسخ‌های ضد توموری با القای TH1 و سلول‌های T سیتوکینیک استفاده شده است [۲].

Nabagl با قدرت زیاد اندوستیتوز و بروز اندک مولکول‌های سطحی CD80 و CD86 (Major histocompatibility complex) MHC-II قادر به تحریک و شناسایی می‌شوند. این سلول‌ها بعد از برخورد با ترکیبات و مستقات 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 تشخیص دهنده الگوهای مولکولی مانند گیرنده‌های شبیه 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. ایترنلکین ۱۲ (Interleukin 12: IL-12) مهم‌ترین سیتوکین دخیل در جهت‌دهی پاسخ ایمنی به سمت TH1 است. به نظر می‌رسد میزان تولید این سیتوکین از DCs در جهت‌دهی پاسخ ایمنی دخیل است [۹]. علاوه بر IL-12، IL-18 موجب القای ترشح ایترفرون گاما (Interferon gamma: IFN-γ) از لنفوسیت‌های T می‌شوند. علاوه بر افزایش بروز مولکول‌های کمک محرک و MHC-II، MHC-I بر سطح سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن، موجب تسريع تمایز سلول‌های T بکر به زیررده TH1 و مهار تمایز سلول‌های TH2 می‌شود [۱۰].

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

لیستریا مونوستیوتوزن (*Listeria monocytogene*) باکتری

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

۴-۲-۲- اجزاء پروتئینی لیستریا مونوسیتوژن

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

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

۳-۲- تولید و بلوغ DCs

برای تولید DCs نابالغ از پیش سازهای مغز استخوان استفاده شد [۱۶]. به طور 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 گلبول های قرمز از آب مقطر و بافر فسفات ۱۰X استفاده شد. این سلول ها در پلیت ۲۴ خانه چاهکی با غلظت 10^7 در میلی لیتر در محیط (Sigma) RPMI-1640 حاوی 10^6 واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استریپوماسین، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله (Roche) و در حضور ۵ نانوگرم IL4 و ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر GM-CSF (Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor) (Bender Medsystems) کشت داده شد. در روز پنجم $100\text{--}96$ میکرو لیتر اتابل ۲۰۰ میکروگرم لیزات توموری و ۷۰ میکروگرم لیزات کامل آنتی ژن لیستریا مونوسیتوژن یا ۱۰ نانوگرم DNA لیستریا مونوسیتوژن یا ۷۰ میکروگرم اجزاء پروتئینی لیستریا مونوسیتوژن به مدت ۲ روز اضافه شد.

استفاده از آنتی بادی های تکتبار (Monoclonal) کونژوگه با فوتیپ DCs توسط فلوسیتومتری (Flow cytometry) با

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

۴-۲-۲- لیزات کامل آنتی ژن لیستریا مونوسیتوژن

سویه لیستریا مونوسیتوژن به صورت لیوفلیزه (Lyophilized) از مرکز پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شد. بعد از کشت در محیط Brain Heart Infusion medium (BHI) نوع باکتری با بررسی ریخت شناسی (Morphology) (کلونی، ریخت شناسی میکروب، آزمون حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد و آزمون کمپ test) با استافیلکوک آرئوس (Staphylococcus aureus) تأیید شد. برای تهیه لیزات از سونیکاتور (Sonicator) استفاده شد (۳ بار به مدت ۲ دقیقه با قدرت ۵ و چرخه ۵۰ درصد).

۴-۲-۳- جداسازی اسیدهای نوکلئیک لیستریا

مونوسیتوژن

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 5000g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و به پلیت باکتریایی 180 میکرولیتر محلول 20 میکروگرم در میلی لیتر لیزوژوم (Lysozome) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به سوسپانسیون حاصل 20 میکرو لیتر پروتئیناز K و 200 میکرولیتر بافر افزوده و مخلوط شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در 56 درجه سانتی گراد و 15 دقیقه در 95 درجه سانتی گراد قرار داده شد.

200 میکرو لیتر اتابل $100\text{--}96$ درجه سانتی گراد به نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط کردن به ستون منتقل و مواد فیلتر شده دور ریخته شد.

به ستون 500 میلی لیتر بافر شستشوی ۱ اضافه کرده سپس ستون به مدت ۱ دقیقه در 6000g سانتریفوژ شد. بعد از دور ریختن محلول به ستون 500 میلی لیتر بافر شستشوی ۲ اضافه کرده و به مدت ۳ دقیقه در 20000g سانتریفوژ شد.

معصومه معتمدی و همکاران

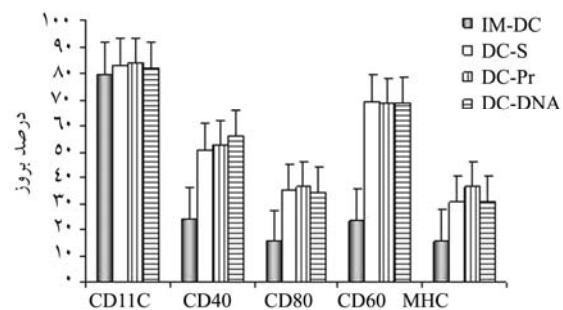
تک‌هسته‌ای با استفاده از فایکول (Ficoll) جدا شد. سپس DCs و سلول‌های طحالی در نسبت ۱/۲۰ در مجاورت هم قرار داده شدند. سوب رویی کشت همزمان سلول‌های طحالی و سلول‌های دندربینیک در روز دوم جمع آوری شده و میزان تولید IL-10 و IFN- γ به روش ELISA (R&D System) تعیین شد.

۶-۲- 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) (Markers) سطحی DCs 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)، بالغ شده با لیزات کامل لیستریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) و بالغ DCs (DC-DNA) در نشان می‌دهد. افزایش نشانگرها (به جزء CD11c) در تمام گروه‌های DCs بالغ شده نسبت به نابالغ مشاهده می‌شود.

IL-12 - ۱-۳

سوب رویی کشت DCs در روز هفتم جمع آوری و با

CD40 FITC، CD80، CD11c PE MHC-II ایزوتاپ کنترل (Bender Medsystem) در روز ۵ و ۷ تعیین شد. به طور خلاصه به هر لوله حاوی 10^5 سلول، ۱ میکرولیتر آنتی‌بادی کوئنزوگه اضافه و برای مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در تاریکی و سرما قرار داده شد. بعد از این مدت لوله‌ها با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و مایع رویی کاملاً خالی شد. سلول‌ها ۲ بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. در این مرحله به لوله 0.5 ml لیتر بافر فسفات اضافه و نتایج با دستگاه فلوسیتومتر و با استفاده از نرم‌افزار WINMDI بررسی شد.

۴-۲- ارزیابی میزان سیتوکین‌های تولید شده

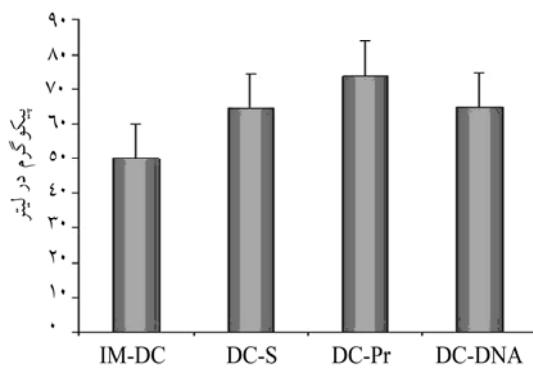
DCs توسط

سوب رویی DCs در روز پنجم و هفتم جمع آوری شد و میزان تولید ایتلولوکین IL-12، IL-10 و IL-18 با استفاده از کیت (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay: ELISA) تعیین و تمام نمونه‌ها به صورت سه‌تایی (R&D System) انجام شد.

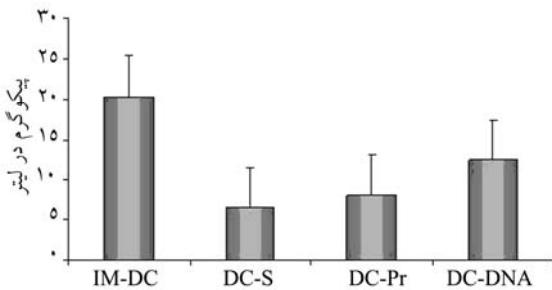
۴-۵- ارزیابی میزان سیتوکین‌های تولید شده توسط سلول‌های طحالی

برای این منظور DCs بالغ شده (روز هفتم) با انواع آنتی‌ژن‌های لیستریا، لیزات کامل آنتی‌ژن لیستریا (DC-S) یا DNA لیستریا مونوسیتوژن (DC-DNA) یا پروتئین لیستریا مونوسیتوژن (DC-Pr) در غلظت 5×10^5 در میکرولیتر محیط کشت تهیه و در بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی ۳۰ راد (Rad) به مدت ۳ دقیقه اشعه داده شدند. برای تهیه سلول‌های طحالی به یک سر موش ۲۰۰ Balb/c میکرولیتر لیزات توموری (حاوی 10^7 سلول توموری) به صورت 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

سیتوکین را ترشح می کند. با وجود این که DCs بالغ شده با DNA لیستریا در مقایسه با سایر گروه ها میزان بیشتری IL-10 ترشح می کند اما این اختلاف معنی داری نیست.
۰/۱۱۲<^p<۰/۴۹۶).



شکل ۳ میزان تر شح DCs نابالغ (IM-DC) از DCs، بالغ شده با لیزیتاریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) و DCs بالغ شده با DNA لیستریا (DC-DNA) بر حسب پیکوگرم در میلی لتر را نشان می دهد. تمام گروه های DCs بالغ نسبت به DCs نابالغ به طور معنی داری IL-18 را تر شح کردند.



شکل ۴ میزان ترشح IL-10 از DCs نابالغ (IM-DC) بالغ شده با DCs بالغ شده با DC-S (DC-PR) و DCs بالغ شده با DC-DNA (DC-LT) میزان ترشح IL-10 را نشان می‌دهد. DCs نابالغ به طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها میزان ترشح IL-10 کمتر است.

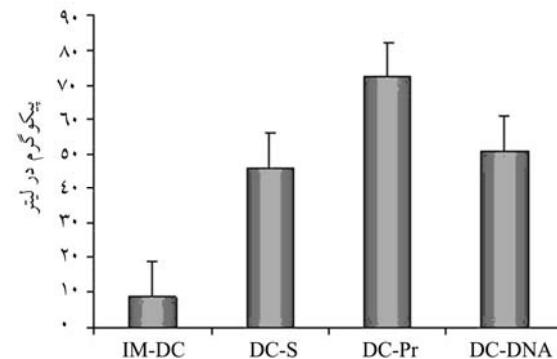
٣-٤- تأثير عوامل ميكروبي مختلف بر ترشح

سیستوکین‌ها از لنفو سیت‌ها

IFN- γ -1-3-4

برای ارزیابی سیتوکین‌های ترشح شده از لنفوسيت‌ها، سوپ رویی کشت همزمان لنفوسيت با DCs بالع شده با جزای مختلف لیستر با بعد از ۴۸ ساعت جمع‌آوری و یا کیست

استفاده از کیت ELISA میزان تولید IL-12 اندازه‌گیری شد. شکل ۲ غلظت IL-12 را در سوب رویی سلول‌های DCs بالغ شده با اجزای مختلف لیستریا و سوب رویی نابالغ (به عنوان کنترل) را بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد. DCs بالغ شده با پروتئینی لیستریا در مقایسه با سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری بالاترین حد نابالغ ($8/7\pm 2/6$)، و DCs نابالغ ($72/29\pm 0/58$) کمترین حد ترشح IL-12 را دارند.



شکل ۲ میزان ترشح IL-12 بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر از DCs نایابع بالغ DCs (IM-DC) باع شده با لیزات کامل لیستریا (DC-S)، DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) و DCs بالغ شده با DNA (DC-DNA) را نشان می دهد. DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا (DC-PR) بطور معنی داری میزان بیشتری از این بیست که، را در مقایسه با سانگ و هاه ترشح کرد است ($p < 0.05$).^{*}

IL-18 -۲-۳

در بین گروه‌ها بیشترین مقدار ترشح IL-18 مربوط به گروه DCs بالغ شده با پروتئین لیستریا ($73 \pm 1/56$) بود (شکار، ۳). $p < 0.02$.

گروههای لیزات کامل آنتیزن لیستریا مونوسیتوژنر و DNA در مقایسه با گروه DC نابالغ افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.001$).^{۴۰}

IL-10 -۲-۲

شکل ۴ میزان ترشح IL-10 از DCs روز پنجم و هفتم بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر را نشان می دهد. DCs نابالغ در مقایسه با سایر گروهها به طور معنی دار مقدار پیشتری از این

۴- بحث

نقش کلیدی DCs در ایجاد و جهت‌دهی پاسخ ایمنی ثابت شده است. مواجهه DCs با بیماری‌زاهای آنتی‌زن‌ها از طریق گیرنده‌های سطحی مانند TLR موجب بلوغ شده DCs به این امر برای مهاجرت DCs به بافت‌های لنفاوی، عرضه مناسب آنتی‌زن به لنفوسیت‌های T و القای پاسخ ایمنی الزامی است [۲۰-۲۱].

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

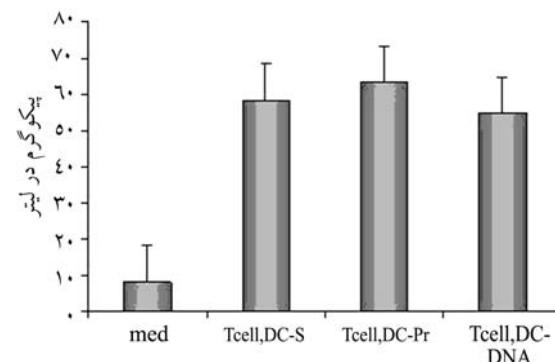
علاوه بر این مطالعات نقش IL-18 را به عنوان سیتوکین مؤثر بر القای پاسخ TH1 از طریق اثر هم‌افزایی آن با IL-12 در تمایز و تولید IFN-γ از سلول‌های T را نشان داده‌اند [۲۶، ۲۷].

مطالعات مختلف مطابق با مطالعه قبلی محققان حاضر نشان داده‌اند که لیستریا مونوستیتوژن 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، ۲۸-۳۰].

در تحقیق حاضر مشاهده شد که DCs بالغ شده با پروتئین

به روش ELISA بررسی شد (شکل ۵).

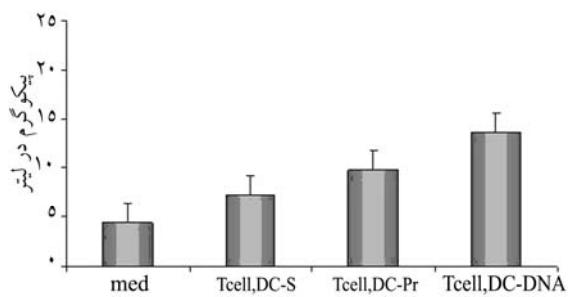
بیشترین میزان ترشح مربوط به لنفوسیت‌های مواجه شده با DCs بالغ شده با جزء پروتئینی $63/37 \pm 0/53$ بوده است.



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

۴-۲-۴-۳ IL-10

شکل ۶ میزان IL-10 ترشح شده در محیط روبی 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 به طور معنی‌داری پایین‌ترین سطح را نشان داده است ($p < 0/05$).



شکل ۶ 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) و DCs بالغ شده با لیستریا (Tcell, DC-DNA) بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر را نشان می‌دهد. DCs بالغ شده با DNA لیستریا به طور معنی‌داری میزان بیشتری از این سیتوکین را در مقایسه با دو گروه دیگر ترشح می‌کند ($p < 0/05$).

دارد. تازک (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 این‌زایی 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.

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

پروتئین‌های متنوعی در ساختمان باکتری لیستریا مونوستیوتیز نزدیک 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 مواجه شده با لیستریاهای جهش‌یافته (Mutant) DCs، TNF و IL-6 را در سطح پایین‌تری در مقایسه با باکتری‌های سالم تولید می‌کنند [۳۰، ۲۹].

ActA نیز یک پروتئین مریبوبه دیواره این باکتری است که در عبور بین سلولی و ویرولانس (Virulence) این باکتری نقش

۶- 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] Gatzka 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

- 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, Ikebara 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.
- [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 receptor 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

- 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.

