Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۹۲
اردیبهشت ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۹
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۸۹/۱۲/۲۵
پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۲۷

افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک توسط اجزای پروتئینی در مقایسه با عصاره تام لیستریامونوسایتوژنز در ایمونوتراپی مدل تجربی تومور

نویسندگان: سمانه عرب[۱]، معصومه معتمدی[۲]، معصومه خمیس‌آبادی[۱]، زهرا غفلتی[۳]، طاهره ابوفاضلی[۳]، رضا میرزائی[٤]، دکتر جمشید حاجتی[۵*]

۱-کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ایران
۳-کارشناس، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
٤-دانشجوی دکترای تخصصی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۵-استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
* نویسنده مسئول: دکتر جمشید حاجتی **E-mail: hajatij@sina.tums.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: استفاده از سلول‌های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن‌های توموری در جایگاه یک اقدام درمانی برای مقابله با تومورها پیشنهادشده‌است. به‌منظور افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک از عواملی گوناگون، نظیر لیگاند مولکول‌های TLR و فراورده‌های باکتریایی استفاده‌می‌شود. در این مطالعه از عصاره تام و اجزای پروتئینی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز برای القای بلوغ سلول‌های دندریتیک استفاده‌شده‌است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های مغز استخوان موش Balb/c به مدت ۵ روز در حضور IL-4 وGM-CSF کشت‌داده‌شدند. در روز پنجم به سلول‌های دندریتیک نابالغ، لیزات توموری و سپس اجزای پروتئینی یا عصاره تام باکتری لیستریا مونوسیایتوژنز اضافه شد. به‌منظور بررسی میزان بلوغ، بیان مولکول‌های CD80، CD86 و MHC-II ، روی سلول‌ها در روز هفتم بررسی‌شد؛ پس از القای تومور در موش ها با استفاده از رده سلولی WEHI-164، 10^6 سلول دندریتیک بالغ به صورت زیر جلدی به آنها تزریق‌شد. رشد تومور، میزان بقاء و قدرت کشندگی سلول‌های طحالی در گروه‌های مورد مطالعه بررسی گردید.

نتایج: در موش‌های واکسینه‌شده با سلول‌های دندریتیکی که با اجزای پروتئینی بالغ شده-بودند، تأخیر در رشد تومور و بقای بیشتر مشاهده‌شد؛ همچنین در این موش‌ها فعالیت کشندگی سلول‌های طحالی در مقایسه با مابقی گروه ها بالاتر بود. در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام و اجزای پروتئینی نسبت‌به گروه کنترل، افزایش فعالیت سیتوتوکسیسیتی و تأخیر در رشد تومور مشاهده‌شد.

نتیجه‌گیری: اجزای پروتئینی باکتری لیستریا در مقایسه با عصاره تام، توانایی بالاتری برای افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در ایمونو تراپی مدل موشی تومور دارند.

واژگان کلیدی: ایمونوتراپی، سلول دندریتیک، تومور، لیستریا مونوسیتوژنز

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

مقدمه

سلول‌های دندریتیک (DC۱)، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC۲) هستند که فعال‌شدن سلول‌های T را برای آغاز پاسخ ایمنی تنظیم‌می‌کنند (۱). این سلول‌ها مولکول‌های MHC، کمک‌تحریکی و مولکول‌های چسبان را بیان‌می‌کنند (۱). سلول‌های دندریتیک به عنوان آغازگر و تنظیم‌کنندهٔ قوی پاسخ ایمنی اختصاصی و خاطره‌ای ضدآنتی‌ژن‌های توموری فعالیت‌می‌کنند (۲). با توجه به نقش مهم سلول‌های دندریتیک در راه‌اندازی پاسخ ضدتوموری، از طریق برداشت، پردازش و عرضه آنتی‌ژن‌های توموری به لنفوسیت‌های T، ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک بسیار مورد توجه قرارگرفته‌است (۲). سلول‌های دندریتیک قادرند پاسخ لنفوسیت‌های T را به سمت سلول‌های Th1 یا Th2 هدایت‌کنند (۱, ۳). سلول‌های Th1 با تولید IFN-γ در بروز پاسخ ضدتوموری نقشی مهم دارند؛ درحالی‌که سلول‌های Th2 با تولید IL-10 و IL-4 در مهار فعالیت سیتولیتیک (که در دفاع ضد-توموری بسیار حائز اهمیت است) مؤثرند. در مطالعات گوناگون نشان‌داده‌شده‌است که موفقیت در ایمونوتراپی سرطان به ایجاد پاسخ Th1 نیازمند است (٤).

با افزودن ترکیب‌های مختلف به محیط کشت DC از جمله TNF-α، IL-1، IL-6 و لیگاندهای TLR[3] مانند LPS، CPG و Poly(I:C) می‌توان نوعی مناسب از سلول‌های دندریتیک را برای ایجاد پاسخ Th1 و درنتیجه، نوع مناسب پاسخ ایمنی به‌منظور ازبین‌بردن تومور در میزبان ایجادکرد (۵, ٦). به‌احتمال فراورده‌های میکروبی از طریق اتصال به رسپتورهای شناساگر الگو (PRR[4]) همچون TLR افزایش بیان سطحی مولکول‌های MHC و کمک‌محرک بر سلول‌های دندریتیک باعث می‌شوند (۷, ۸). لیستریا مونوسایتوژنز باکتری گرم مثبت داخل‌سلولی اختیاری است و مانند سایر باکتری‌های داخل‌سلولی توانایی‌دارد که باقی‌مانده، تکثیر شود (۹). سلول‌های دندریتیک از طریق مولکول‌های PRR اجزای مختلف این میکروب را شناسایی‌کرده، پس‌از دریافت پیام‌های تحریکی بالغ می‌شوند؛ این سلول‌ها سایتوکاین‌هایی مانند IL-1 و IL-12 را تولیدمی‌کنند (۱۰)؛ همچنین سلول‌های دندریتیک آنتی‌ژن‌های لیستریا را به هر دو مسیر پردازش آنتی‌ژنی واردمی‌کنند و درنتیجه موجب القای هم‌زمان سلول‌های TCD4+ و TCD8+ را موجب می‌شوند (۱۱).

لیستریا مونوسایتوژنز باکتری گرم مثبت داخل سلولی اختیاری است و مانند سایر باکتری‌های داخل سلولی توانایی بقا و تکثیر در داخل سلول‌ها را دارد [۹]. سلول‌های دندریتیک از طریق مولکول‌های PRR اجزاء مختلف این میکروب را شناسایی کرده و پس از دریافت پیام‌های تحریکی بالغ می‌شوند. این سلول‌ها سایتوکاین‌هایی مانند IL-1 و IL-12 را تولید می‌کنند [۱۰]. همچنین سلول‌های دندریتیک آنتی ژن‌های لیستریا را وارد هر دو مسیر پردازش آنتی ژنی می‌کنند و در نتیجه موجب القاء همزمان سلول‌های TCD4+ و TCD8+ می‌شوند [۱۱]. (تکراری)

ازآنجاکه در مطالعهٔ پیشینی که همین گروه انجام‌دادند (۱۲)، مشخص‌شد که عصاره تام باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از توانایی بالایی در القای پاسخ ضد-توموری سلول‌های دندریتیک در مدل موشی فیبروسارکوما بهره‌مند است؛ لذا هدف از انجام این مطالعه، مقایسهٔ اجزای پروتئینی موجود در قسمت‌های گوناگون جسم باکتری و عصاره تام باکتری لیستریا در افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در مقابله با تومور است.

مواد و روش کار

حیوانات و رده سلولی

موش‌های Balb/c ماده ٦–۸ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط مناسب نگهداری شدند. سلول‌های WEHI-164 (فیبروسارکومای موش Balb/c) و

1- Dendritic cell
2- Antigen Processing Cell
3- Toll-like receptor
4- pattern recognition receptor

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

CT-26 (کارسینومای کولون موش Balb/c) در محیط کشت RPMI1640 (Sigma,Steinhem,Germany) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی-مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال شده جنین گوساله (Gibco,Grand Island, USA) کشت داده شد.

تهیه لیزات توموری

۲۱ روز پس از تزریق زیرجلدی سلول‌های توموری به موش‌های Balb/c، تومورهای ایجادشده خارج و به صورت مکانیکی خرد و له شدند؛ سپس سوسپانسیون توموری پنج تا هفت بار منجمد (در ازت مایع) و ذوب (در انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد) شدند. سوپ رویی حاصل از سانتریفوژ (10 min, 900g) جدا و از فیلتر ۰,۲ میکرومتری گذرانده‌شد (۸). غلظت پروتئین در محلول به‌دست‌آمده با روش برادفورد تعیین و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد.

تهیه عصاره تام لیستریا مونوسیتوژنز

باکتری لیستریا مونوسایتوژنز (ATCC 1060) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه‌شد. بعد از کشت در محیط BHI[1] نوع باکتری با بررسی مورفولوژی کلونی، موفولوژی میکروب، انجام آزمایش حرکت در ۲۵ و ۳۷ درجه و آزمایش کمپ با استافیلوکوک اورئوس تأییدشد. برای تهیه لیزات از سونیکاتور استفاده‌گردید (پنج بار به مدت ۲ دقیقه با قدرت ۵)؛ پس‌از عبور محلول حاصل از فیلتر ۰,۲ میکرومتری، غلظت پروتئین محلول با روش برادفورد محاسبه‌شد. محلول به‌دست‌آمده تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد (۱۲).

جداسازی اجزای پروتئینی لیستریا مونوسایتوژنز

جداسازی اجزای پروتئینی محلول لیزشدهٔ باکتری با استفاده از کیت استخراج پروتئین (Qproteome Bacterial Protein Prep Kit, QIAGEN) و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام‌شد. غلظت پروتئین در محلول حاصل با روش برادفورد محاسبه و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد. برای اثبات عدم آلودگی این محلول با DNA از روش الکتروفورز DNA، روی ژل گاروز یک درصد حاوی اتدیوم بروماید استفاده‌شد.

تولید سلول‌های دندریتیک

برای تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای مغز استخوان موش استفاده‌شد (۱۳). به‌طورخلاصه، پس‌از کشتن موش Balb/c استخوان ساق و ران جدا و با استفاده از محیط ناقص (RPMI1640 بدون سرم) محتویات داخل استخوان‌ها خارج‌شد و برای ازبین‌بردن گلبول‌های قرمز از آب مقطر و بافر فسفات x ۱۰ استفاده‌شد؛ این سلول‌ها در پلیت ۲٤ خانه با غلظت $۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI1640 حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال جنین گوساله (Gibco, USA) و در حضور ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر IL-4 و ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر GM-CSF (Bender Medsystem) کشت‌داده-شدند. روز سوم، سلول‌های غیرچسبان جداشده، پس‌از افزودن محیط کشت تازه، در پلیت‌های شش خانه‌ای کشت داده شدند. در روز پنجم، 100 میکروگرم لیزات تومور به‌ازای هر $۱۰^{٦}$ سلول اضافه شد؛ پس‌از ٦ تا۷ ساعت برای بالغ‌کردن سلول‌های دندریتیک، ۷۰ میکروگرم عصاره تام لیستریا یا ۷۰ میکروگرم اجزای پروتئینی لیستریا به‌ازای $۱۰^{٦}$ سلول اضافه و درنهایت، سلول‌های دندریتیک غیرچسبان جدا و برای ایمونوتراپی استفاده‌شدند.

ارزیابی وضعیت بلوغ سلولهای دندریتیک

فنوتایپ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم و هفتم توسط فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی‌بادی‌های

1- Brain Heart Infusion

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

مونوکلونال کنژوگه با FITC ضد مولکول‌های MHCII، CD80، CD86 وCD40 (BD PharMingen, San Diego, CA) و آنتی‌بادی مونوکلونال کنژوگه با PE ضد CD11c (BD PharMingen, San Diego, CA) تعیین‌شد. در همه آزمایش‌ها از یک آنتی‌بادی مونوکلونال با ایزوتیپ یکسان در جایگاه ایزوتیپ کنترل استفاده‌شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار WINMDI مورد بررسی قرارگرفت.

ایجاد تومور و ایمونوتراپی

$1,5\times10^{6}$ سلول WEHI-164 در حجم ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت ناقص به صورت زیرجلدی به پهلوی راست ۱۵ موش Balb/c تزریق‌شد. در روز هفتم پس‌از تزریق سلول‌های توموری، تعداد 10^{6} سلول دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا مونوسایتوژنز در اطراف تومور تزریق‌شد؛ به گروه کنترل نیز ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات تزریق شد. سرعت رشد تومور از طریق اندازه‌گیری قطر تومور و میزان بقاء بر اساس درصد حیوانات در هر گروه درمانی که در زمان معین به نقطه پایان آزمایش نرسیده‌باشند، مشخص شد. نقطه پایان آزمایش هنگامی‌که قطر تومور به ٤٠٠ میلی‌متر مربع می‌رسید درنظرگرفته‌شد. قطر تومور برحسب میلی‌متر مربع (طول×عرض) یک‌روزدرمیان با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری‌شد.

بررسی قدرت کشندگی سلولهای طحالی

در روز بیست‌ویکم، پس‌از ایجاد تومور، سلول‌های طحالی موش‌های درمان‌شده (از هر گروه ۳ موش) و موش‌های کنترل به عنوان سلول‌های عملکردی (effector) جدا شدند؛ سلول‌های توموری (WEHI-164و CT-26) نیز در جایگاه سلول‌های هدف (Target) مورد استفاده قرارگرفتند. درصد لیز سلول‌های توموری با استفاده از کیت بررسی تولید آنزیم لاکتات دهیدروژناز (Roche Applied Science) (LDH) و طبق پروتکل شرکت سازنده اندازه‌گیری‌شد (۸).

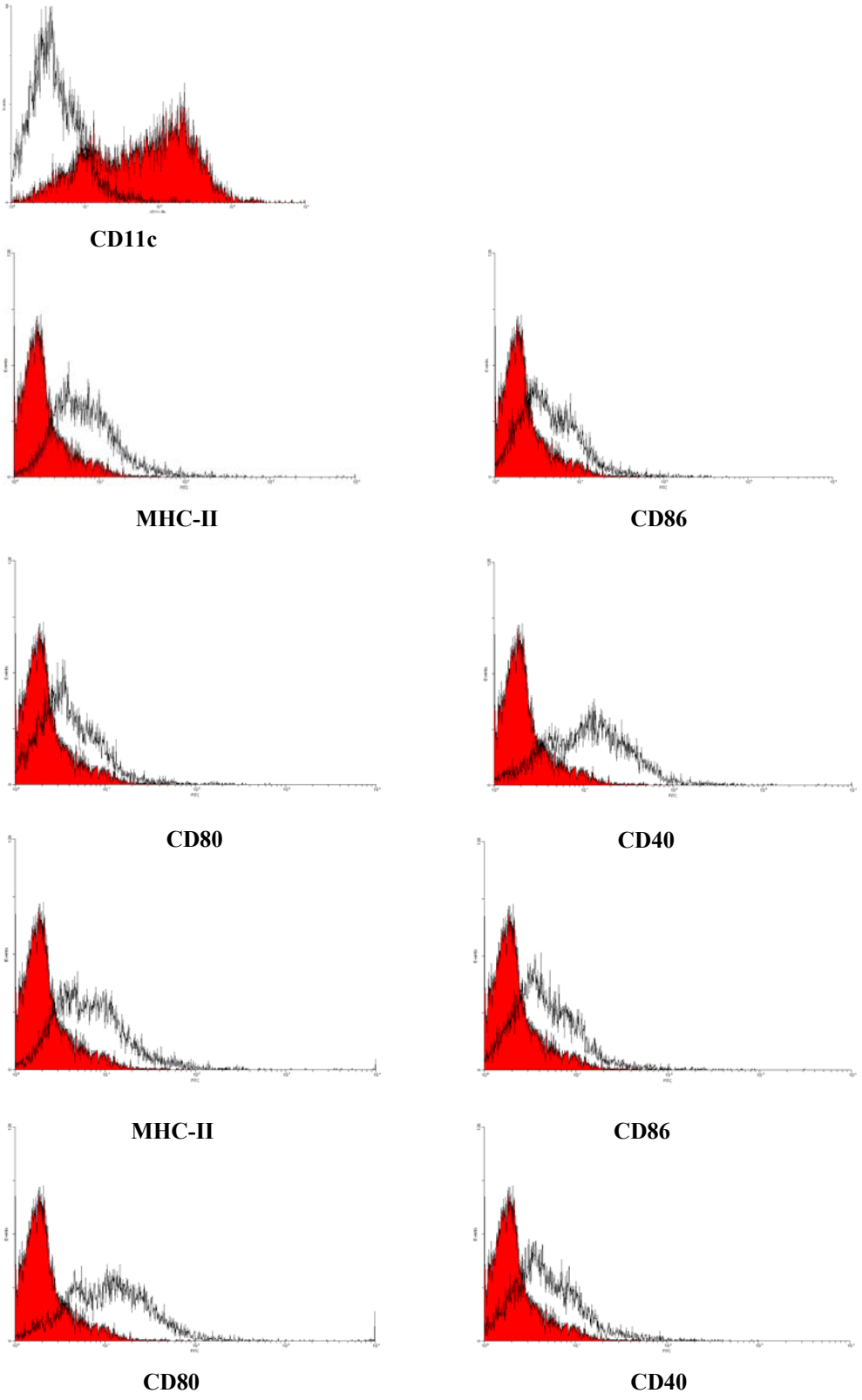
روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

برای بررسی تفاوت میانگین مقادیر به‌دست‌آمده میان گروه‌ها از آزمون‌های آماری Student's t test و One-Way ANOVA استفاده‌شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 11.5 انجام و $p<0.05$ معنی‌دار درنظرگرفته‌شد.

نتایج

تأثیر اجزای پروتئینی لیستریا بر بلوغ سلول‌های دندریتیک

فنوتایپ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم و هفتم با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه ضد مولکول‌های CD11c، CD40، CD80، CD86 و MHCII تعیین‌شد. شکل شماره ۱ فنوتایپ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم را در مقایسه با ایزوتایپ کنترل نشان‌می‌دهد؛ همان‌طورکه در شکل مشخص است، حدود ۷۰ درصد سلول‌ها مارکر CD11c را بیان‌می‌کنند. در روز هفتم پس‌از برخورد سلول‌های دندریتیک با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا، مطابق شکل۱، بروز این مولکول‌ها در سطح سلول‌های دندریتیک در هر دو گروه افزایش‌می‌یابد. جدول شماره ۱، میزان بروز مارکرهای سطحی را در سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ نشان‌می‌دهد. اگرچه از نظر آماری میان گروه عصاره تام و اجزای پروتئینی تفاوتی قابل‌ملاحظه دیده‌نمی‌شود، ولی گروه اجزای پروتئینی، مارکرهای بلوغ را در سطح بالاتری عرضه کرده اند.



شکل ۱. الف. بروز مارکر CD11c در سطح سلولهای دندریتیک نابالغ (توخالی) در مقایسه با ایزوتایپ کنترل (توپر). ب. بروز مارکر های بلوغ در سطح سلول های دندریتیک بالغ شده با عصاره تام لیستریا (توخالی) در مقایسه با سلولهای دندریتیک نابالغ (توپر). ج بروز مارکر های بلوغ در سطح سلول های دندریتیک بالغ شده با اجزاء پروتئینی لیستریا (توخالی) در مقایسه با سلولهای دندریتیک نابالغ (توپر).

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

جدول ۱. درصد سلول‌های دندریتیک بروزدهندهٔ مارکرهای بلوغ در پی مواجه‌شدن با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا در مقایسه با سلول‌های دندریتیک نابالغ

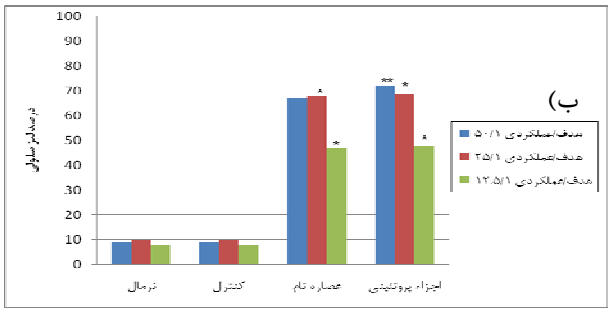
سلول دندریتیک	CD40		CD80		CD86		II MHC	
	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%
نابالغ	۲,۴	۱۵,۴	۶,۴	۲۳,۵	۳,۱	۱۵,۴	۴,۴	۲۴
بالغ شده با عصاره تام لیستریا	۳,۷	۳۰,۷	۵	۶۹,۴	۲,۹	۳۵	۳,۸	۵۰,۹
بالغ شده با اجزاء پروتئینی لیستریا	۳,۴	۳۶	۱۳,۳	۶۸,۷	۳	۳۶,۶	۴	۵۲,۵

القای پاسخ سیتوتوکسیک توسط سلول‌های دندریتیک بالغ-شده با اجزای پروتئینی

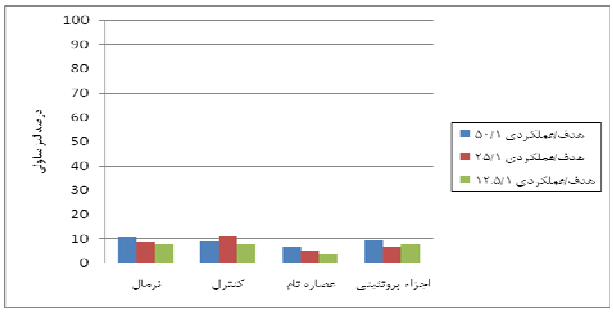
به‌منظور ارزیابی القای ایمنی اختصاصی ضدتومور، فعالیت کشنده سلول‌های طحالی موش‌های درمان‌شده بررسی‌شد. سلول‌های طحالی با سلول‌های توموری WEHI-164 در نسبت‌های ۱:۱۲/۵، ۱:۲۵و۱:۵۰ به مدت ٦ ساعت کشت‌داده‌شدند و قدرت کشندگی سلول‌ها با استفاده از کیت LDH بررسی‌شد؛ همان‌طورکه در شکل شماره ۲ نشان‌داده‌شده، درصد لیز سلولی در دو نسبت ۱:۱۲/۵ و ۱:۲۵ در گروه‌های عصاره تام و اجزای پروتئینی لیستریا از بقیه گروه‌ها بالاتر است و این تفاوت از بعد آماری، معنی‌دار است ($P<0.05$). در نسبت ۱/۵۰ اختلافی معنی‌دار در درصد لیز سلولی میان گروه اجزای پروتئینی با مابقی گروه‌ها مشاهده‌شد؛ همچنین در همه گروه‌ها، درصد لیز سلولی برای سلول‌های توموری نا مرتبط CT-26 کمتر از ۱۵ درصد به‌دست‌آمد.

شکل شماره ۲، دو هفته پس‌از تزریق سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا به موش‌های توموری‌شده با سلول‌های WEHI-164، سلول‌های طحالی جدا با سلول‌های توموری WEHI-164 یا CT-26 در سه نسبت سلول‌های هدف به عملکردی کشت‌داده‌شدند. درصد لیز سلول‌های توموری با کیت LDH سنجیده شد. گروه کنترل، PBS دریافت-کردند: الف) درصد لیز سلولی ضد رده سلولی WEHI-164. ب) درصد لیز سلولی ضد رده سلولی CT-26. هر گروه شامل ۳ رأس موش بوده، *Pv کمتر از ۰,۰۵ در مقایسه با گروه‌های کنترل و نرمال. ** Pv کمتر از ۰,۰۵ در مقایسه با گروه‌های عصاره تام، کنترل و نرمال بوده-است.

الف)



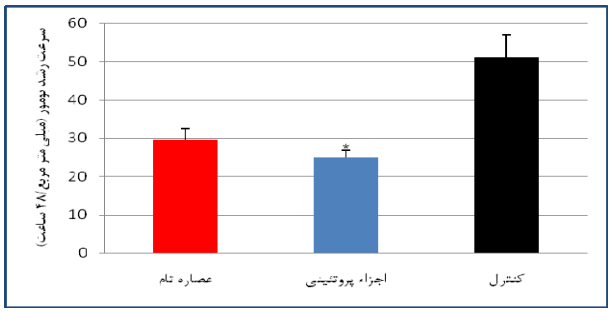
ب)



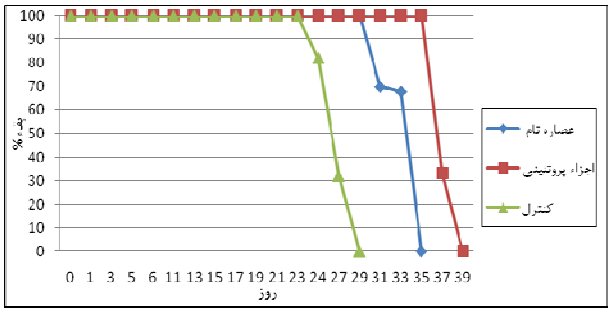
شکل شماره ۲، بیانگر این تفاوت در سرعت رشد است. پس‌از محاسبه درصد بقای موش‌های درمان‌شده، مشخص شد که بقای موش‌ها در گروه اجزای پروتئینی نسبت‌به گروه‌های دیگر بالاتر است. میزان بقاء در روز ۳۶ در گروه اجزای پروتئینی ۱۰۰ درصد و در سایر گروه‌ها ۰ درصد محاسبه‌شد. شکل شماره ۲ نتایج حاصل را نشان‌می‌دهد.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

الف)



ب)



شکل۳. سرعت رشد تومور و میزان بقاء در گروه های مختلف. سلول های دندریتیک بالغ شده با عصاره تام و یا اجزاء پروتئینی لیستریا به موش های توموری تزریق گردید. الف. قطر تومور یک روز در میان توسط کولیس اندازه گیری و سرعت رشد بر حسب میلی متر مربع محاسبه گردید. ب. زمانی که قطر تومور به بیش از ٤٠٠ میلی متر مربع رسید، به عنوان نقطه پایان (End point) در نظر گرفته شد. میزان بقاء به صورت درصد حیواناتی که به نقطه پایان نرسیده بودند در مقاطع زمانی مختلف محاسبه شد. گروه کنترل، PBS دریافت کردند. هر گروه شامل ۳ راس موش می باشد. Pv* کمتر از ۰٫۰۵ در مقایسه با سایر گروه ها.

کاهش سرعت رشد تومور در پی تزریق سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با اجزای پروتئینی لیستریا

سرعت رشد تومور با اندازه‌گیری قطر تومور در هر ٤٨ ساعت محاسبه‌شد؛ نتایج به‌دست‌آمده نشان‌داد که تفاوتی معنی‌دار میان رشد تومور در گروه اجزای پروتئینی با سایر گروه‌ها وجوددارد. ($P<0.05$).

شکل شماره ۳، سرعت رشد تومور و میزان بقاء در گروه‌های مختلف نشان‌می‌دهد: سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام یا اجزای پروتئینی لیستریا را که به موش‌های توموری تزریق شده، الف) قطر تومور یک-روزدرمیان، با کولیس اندازه‌گیری و سرعت رشد بر-حسب میلی‌متر مربع محاسبه‌شد؛ ب) زمانی‌که قطر تومور به بیش از ٤٠٠ میلی‌متر مربع رسید، نقطه پایان (End point) درنظرگرفته‌شد. میزان بقاء به صورت درصد حیواناتی که به نقطه پایان نرسیده‌بودند در مقاطع زمانی مختلف محاسبه‌شد. گروه کنترل، PBS دریافت-کردند. هر گروه شامل ۳ رأس موش بوده، Pv* کمتر از ۰٫۰۵ در مقایسه با سایر گروه‌ها بوده‌است.

بحث

نقش سلول‌های دندریتیک در ایجاد و جهت‌دهی پاسخ ایمنی در مقام مهم‌ترین سلول عرضه‌کننده آنتی‌ژن اثبات‌شده‌است (١٤). کشف مکانیسم‌های مؤثر در کارآمدترکردن این سلول‌ها تحولات فراوانی در زمینه ایمونوتراپی سرطان موجب شده‌است (١٥)؛ از جمله روش‌هایی که برای افزایش کارایی این سلول‌ها استفاده-شده‌است استفاده از ترکیب‌های گوناگون برای تحریک بلوغ، عرضه موثرتر آنتی‌ژن‌های توموری و تحریک مناسب‌تر سلول‌های سیتوتوکسیک ذکرکردنی است (١٦, ١٧). در مطالعه حاضر از عصاره تام و اجزای پروتئینی لیستریا مونوسایتوژنز برای افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در ایمونوتراپی مدل موشی تومور استفاده‌شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که اجزای پروتئینی لیستریا در مقایسه با عصاره تام توانایی بالاتری در القای پاسخ سیتوتوکسیک و کاهش سرعت رشد تومور دارند.

با توجه به اینکه لیستریا القای پاسخ به سمت Th1 را موجب می‌شود در برخی مطالعات به‌تنهایی به عنوان حامل آنتی‌ژن‌های توموری و عامل تقویت‌کننده آثار واکسن به‌کاررفته‌است (١٨, ١٩). در مطالعه *فردمن* نشان‌داده‌شد که لیستریا مونوسایتوژنز که آنتی ژن gag از ویروس ایدز را بارزمی‌کند، به ایجاد پاسخ CTL قوی

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

ضد ویروس منجرمی‌شود (۲۰)؛ همچنین در مورد تومورهایی مانند پاپیلوما و ملانوما نیز، لیستریا از طریق افزایش تولید IFNγ و افزایش قدرت سیتولیتک CTL ها سبب افزایش طول عمر و کاهش متاستازها در موش‌های مبتلا به تومور را سبب‌شده‌است (۲۱, ۲۲)؛ لذا در مطالعات گوناگون از لیستریا به عنوان عامل تحریک سیستم ایمنی برای درمان تومور استفاده‌شده‌است.

یکی از شرایط اولیه برای تحریک مناسب سیستم ایمنی برای درمان تومور، بروز مناسب و کافی انواع مولکول‌های دخیل در روند عرضه آنتی‌ژن و تحریک سلول‌های T، بر سطح سلول‌های عرضه‌کنندهٔ آنتی‌ژن در طی روند بلوغ آنهاست (٦). در مطالعه قبلی (۱۲) مشخص شد که سلول‌های دندریتیک مواجه‌شده با عصاره تام لیستریا میزان بالاتری مولکول‌های کمک-تحریکی را در مقایسه با گروه کنترل بیان‌می‌کنند؛ در همین زمینه برزوزا (۲۳) نشان‌داده‌اند که لیستریا موجب می‌شود بروز مولکول‌های کمک‌تحریکی در سطح سلول‌های دندریتیک، در مقایسه با گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ افزایش‌یابد؛ در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با لیستریا میزان بالاتری مولکول کمک‌تحریکی بیان‌می‌کنند؛ درضمن در مطالعه پیشین مشخص شد که عصاره تام لیستریا به‌طور معنی‌داری افزایش تولید IL-12 را توسط سلول‌های دندریتیک در مقایسه با گروه کنترل باعث می‌شود؛ لذا این نتایج، تأییدکننده این موضوع است که لیستریا قادر به القای بلوغ سول‌های دندریتیک است. در مطالعات گذشته (۷, ۱۲) با بررسی اثر لیستریا روی ایمونوتراپی تومور با سلول‌های دندریتیک، کاهش سرعت رشد تومور و افزایش بقای در پی تزریق سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام لیستریا مشاهده‌شد. کاهش در سرعت رشد تومور در گروه سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده با عصاره تام و اجزای پروتئینی لیستریا نیز در این مطالعه مشاهده‌شد؛ این کاهش در سرعت رشد تومور را می‌توان به افزایش بیان مولکول‌های کمک‌تحریکی و افزایش تولید IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک بالغ‌شده نسبت‌داد.

در مطالعه حاضر با مقایسه اجزای پروتئینی با عصاره تام لیستریا مشخص شد که اجزای پروتئینی توانایی بالاتری در القاء بروز مولکول‌های کمک‌تحریکی بر روی سلول‌های دندریتیک و درنتیجه کاهش سرعت رشد تومور و افزایش بقاء دارا هستند؛ ازآنجاکه عصاره تام مخلوطی از اجزای پروتئینی و غیرپروتئینی مانند اسیدهای نوکلئیک است لذا به‌احتمال، اجزای غیرپروتئینی نظیر اسیدهای نوکلئیک با القای پاسخ‌های تنظیمی و سرکوب‌کننده پاسخ Th1، کاهش کارایی ایمنی تراپی تومور را سبب‌می‌شوند. در چندین مطالعه، نتایج مرتبط با القای پاسخ‌های تنظیمی توسط اسیدهای نوکلئیک مانند CpG گزارش‌شده‌است (۲٤, ۲۵). اجزای پروتئینی احتمالا به علت فقدان اسیدهای نوکلئیک و در-نتیجه فقدان عوامل تحریک‌کننده پاسخ‌های تنظیمی، کاهش سرعت رشد تومور و افزایش بقاء در موش‌های مبتلا به تومور فیبروسارکوما را موجب شده‌است. در مطالعه‌های متعددی، دخالت اجزای پروتئینی باکتری لیستریا در تحریک سلول‌های دندریتیک تأییدشده‌است. در مطالعه‌ای، باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جهش‌یافته فاقد سم پروتئینی لیستریولیزین O، قادر به تحریک سلول‌های دندریتیک برای بروز مولکول‌های MHC و کمک‌تحریکی نبودند (۲٦). در مطالعه دیگری مشخص شد که جزء پروتئینی لیستریولیزین O قادر به انحراف پاسخ‌های Th2 به Th1 در مدل موشی آلرژی است (۲۷). در مطالعات انجام‌شده فقط به لیستریولیزین O به عنوان مسئول تحریک سلول‌های دندریتیک اشاره‌شده‌است

سلول‌های T سایتوتوکسیک بازوی عملکردی مهمی در پاسخ ضدتوموری هستند (۲۸). سایتوتوکسیسیتی به

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

واسطه این سلول‌ها القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده را در سلول‌های هدف موجب می‌شود؛ این کار از طریق ترشح پرفورین، گرانزیم، اتصال Fas و Fas ligand به یکدیگر انجام‌می‌گیرد (۲۸)؛ فعال‌شدن این سلول‌ها با پاسخ بالینی مناسب به واکسن و ازبین‌رفتن تومور ارتباط‌دارد (۲۹)؛ به همین دلیل در این مطالعه، سلول‌های طحالی موش-های درمان‌شده از نظر قدرت کشندگی مورد بررسی قرارگرفتند. گروه اجزای پروتئینی پاسخ بهتری را نشان-دادند؛ درضمن، این پاسخ اختصاصی سلول‌های توموری بود که موش‌ها بدان مبتلا شده‌بودند و ضد سلول‌های توموری نامرتبط پاسخی حاصل نشد. این نتیجه ثابت-کرد که پاسخ قوی سلول‌های Tسایتوتوکسیک با پاسخ in vivo در این مطالعه هم‌خوانی‌دارد.

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری داخل‌سلولی است که اجزای مختلف آن با سلول‌های دندریتیک و از طریق رسپتورهای سطح سلولی مثل TLR2 و TLR9 شناسایی-می‌شود (۳۰-۳۲). TLR2 به ترکیب‌های دیواره سلولی مانند اسید لیپوتیکوئیک و پپتیدوگلیکان باکتری متصل می‌شود (۳۳)؛ همچنین TLR9، CpG غیرمتیله را شناسایی‌می‌کند (۳٤)؛ اتصال این رسپتورها به لیگاند خود بلوغ سلول‌های دندریتیک را موجب می‌شود. با توجه به توانایی بالاتر اجزای پروتئینی در القای بلوغ سلول‌های دندریتیک و افزایش کارایی ایمنی تراپی، به-احتمال، لیگاندهایی در این مجموعه پروتئینی وجوددارد که از طریق اتصال به رسپتورهای شناساگر الگو (PRR) بر سطح یا داخل سلول‌های دندریتیک، القای بلوغ این سلول‌ها را سبب‌می‌شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان‌داد که اجزای پروتئینی لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با عصاره تام قادر به ایجاد پاسخ ضدتوموری بهتری است؛ بنابراین اگر بتوان به‌طور دقیق‌تر و خالص‌تری اجزای پروتئینی را تفکیک‌کرد و جزء مؤثر این مجموعه پروتئینی را شناخت، درنهایت می‌توان از آن در مقام یک لیگاند مؤثر برای القای بلوغ سلول‌های دندریتیک و ایمونوتراپی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله، نتیجهٔ طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۳۳۱۳ است.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

منابع

1- Bousso, P., T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. Nat Rev Immunol, 2008. 8(9): p. 675-84.

2- Figdor, C.G., et al., Dendritic cell immunotherapy: mapping the way, 2004, Nature Publishing Group. p. 475-480.

3- Guermonprez, P., et al., Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 621-67.

4- Ikeda, H., et al., The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. Cancer Sci, 2004. 95(9): p. 697-703.

5- McIlroy, D. and M. Gregoire, Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. Cancer Immunol Immunother, 2003. 52(10): p. 583-91.

6- Morse, M.A., et al., Dendritic cell maturation in active immunotherapy strategies. Expert Opin Biol Ther, 2002. 2(1): p. 35-43.

7- Khamisabadi, M., et al., Listeria monocytogenes activated dendritic cell based vaccine for prevention of experimental tumor in mice. Iran J Immunol, 2008. 5(1): p. 36-44.

8- Motamedi, M., et al., Improvement of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with components of Toxoplasma gondii. Clin Vaccine Immunol, 2009. 16(10): p. 1393-8.

9- Zenewicz, L.A. and H. Shen, Innate and adaptive immune responses to Listeria monocytogenes: a short overview. Microbes Infect, 2007. 9(10): p. 1208-15.

10- Pamer, E.G., Immune responses to Listeria monocytogenes. Nat Rev Immunol, 2004. 4(10): p. 812-23.

11- Reinicke, A.T., et al., Dendritic cell cross-priming is essential for immune responses to Listeria monocytogenes. PLoS One, 2009. 4(10): p. e7210.

12- M. Motamedi, S.A., N. Khansari, SM. Moazeni, M. Vodjgani, AH. Keyhani, Z. Gheflati, T. Aboofazeli, J. Hadjati, Effect of Listeria Monocytogenes on Tumor Immunotherapy with Dendritic Cells. yakhteh, 2007(32.(

13- Inaba, K., et al., 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): p. 1693-702.

14- van de Ven, R., et al., The ABC of dendritic cell development and function. Trends Immunol, 2009. 30(9): p. 421-9.

15- Kadowaki, N. and T. Kitawaki, Dendritic cell-based tumor immunotherapy. Rinsho Ketsueki, 2009. 50(5): p. 358-63.

16- Strome, S.E., et al., Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. Cancer Res, 2002. 62(6): p. 1884-9.

17- Moschella, F., et al., Combination strategies for enhancing the efficacy of immunotherapy in cancer patients. Ann N Y Acad Sci. 1194: p. 169-78.

18- Paterson, Y., P.D. Guirnalda, and L.M. Wood, Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. Semin Immunol. 22(3): p. 183-9.

19- Singh, R. and Y. Paterson, Listeria monocytogenes as a vector for tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. Expert Rev Vaccines, 2006. 5(4): p. 541-52.

20- Friedman, R.S., et al., Induction of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8 T-cell responses by Listeria monocytogenes and a hyperattenuated Listeria strain engineered to express HIV antigens. J Virol, 2000. 74(21): p. 9987-93.

21- Gunn, G.R., et al., 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(11): p. 6471-9.

22- Bruhn, K.W., et al., Characterization of anti-self CD8 T-cell responses stimulated by recombinant Listeria monocytogenes expressing the melanoma antigen TRP-2. Vaccine, 2005. 23(33): p. 4263-72.

23- Brzoza, K.L., A.B. Rockel, and E.M. Hiltbold, Cytoplasmic entry of Listeria monocytogenes enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. J Immunol, 2004. 173(4): p. 2641-51.

24- Mellor, A.L., et al., Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. J Immunol, 2005. 175(9): p. 5601-5.

25- Moseman, E.A., et al., Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol, 2004. 173(7): p. 4433-42.

26- Yamamoto, K., et al., 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): p. 268-74.

27- Yamamoto, K., et al., Listeriolysin O derived from Listeria monocytogenes inhibits the effector phase of an experimental allergic rhinitis induced by ovalbumin in mice. Clin Exp Immunol, 2006. 144(3): p. 475-84.

28- Andersen, M.H., et al., Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol, 2006. 126(1): p. 32-41.

29- Karanikas, V. and A. Germenis, Tumor specific CD8+ T cells in patients with lung cancer and healthy individuals. J Buon, 2009. 14 Suppl 1: p. S153-7.

30- Shen, Y., et al., Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of Listeria monocytogenes by murine macrophages. Infect Immun. 78(6): p. 2857-67.

31- Janot, L., et al., CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of Listeria monocytogenes infection. J Infect Dis, 2008. 198(1): p. 115-24.

32- Huang, B., et al., Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. Cancer Res, 2007. 67(9): 4346-52.

33- Wetzler, L.M., The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. Vaccine, 2003. 21 Suppl 2: S55-60.

34- Miyake, K., Nucleic acid-sensing Toll-like receptors: beyond ligand search. Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(7): p. 782-5.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 2:57 IRST on Saturday December 16th 2017

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.92 April, May 2011

Received: 8/2/2011
Last revised: 15/3/2011
Accepted: 17/3/2011

Increased efficacy of dendritic cells by protein components compared to total extract of *Listeria monocytogenes* in experimental tumor immunotherapy

Samaneh Arab[1], Masoumeh Motamedi[2], Masoumeh Khamisabadi[1], Zahra Gheflati[1], Tahereh Aboofazeli[1], Reza Mirzaei[1], Jamshid Hajati[1*]

1. Immunology Department, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Immunology Department, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Iran.

E-mail: hajatij@sina.tums.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Using dendritic cells (DCs) loaded with tumor antigens as a therapeutic strategy against tumors has been proposed. In order to increase the efficacy of DCs, a variety of factors such as TLR ligand molecules and bacterial products are used. In this study, the protein components of the bacteria *Listeria monocytogeneses* (LM) for induction of dendritic cell maturation were used.

Materials and Methods: Bone marrow cells of Balb/c mice in the presence of IL-4 and GM-CSF were cultured for 5 days. On day 5, tumor lysate and then protein components or total extract of LM was added to immature DCs. In order to survey the maturation status of DCs, on day 7, the expression of CD80, CD86 AND MHC-II on the cell surface was evaluated. After induction of tumors in mice using WEHI-164 cell line, 10^6 mature dendritic cells subcutaneously injected. Tumor growth rate, survival rate and cytotoxic activity of spleen cells were evaluated in the studied groups.

Results: In mice vaccinated with protein components matured-DCs, delayed tumor growth rate and increased survival were seen. In addition, in these mice, the cytotoxic activity of spleen cells was higher compared to other groups. In all groups receiving protein components or total extract mature-DCs, increased cytotoxic activity and decreased tumor growth rate were seen compared to controls.

Conclusion: *Listeria monocytogenes* protein components compared to total extract have higher ability to increase the efficacy of DCs for tumor immunotherapy in mouse model.

Key words: Immunotherapy, Dendritic cell, Tumor, Listeria monocytogenes

Daneshvar(medicine) shahed University/ 18th year/2011/NO.92