Archive of SID

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره پنجم، شماره ۱/ ۲۹-۲۳/ بهار ۱۳۸۲

تقویت سیتوتوکسیسیته طبیعی توسط لوامیزول در موش

دکتر هدایت اله شیرزاده*، دکتر محمود رفیعیان**

چکیده:

سیتوتوکسیسیته طبیعی (Natural cytotoxicity=NC) به واسطه رسپتورهای NC-1.1 و NC-2، یکی از بازوهای ایمنی ذاتی بر علیه سرطان می باشد. حذف رسپتورهای فوق توسط آنتی بادی ضد NC-2 و NC-1.1 در موش منجر به رشد سریع تر برخی از سرطان ها می گردد. لذا از مواد تقویت کننده سیتوتوکسیسیته طبیعی می توان به عنوان داروهای ضد سرطان استفاده کرد. این پژوهش تاثیر داروی لوامیزول را بر تقویت سیتوتوکسیسیته طبیعی سلول های $NC\text{-}2^+$ و کنترل فیبروسارکومای WEHI-164 موش های نژاد BALB/c مورد بررسی قرار داده است. تزریق لوامیزول به موش، سیتوتوکسیسیته طبیعی سلول های طحال را در کشتن سلول های توموری رادیواکتیو شده با کرومیوم ۵۱ در محیط آزمایشگاه افزایش داده، به طوری که تزریق ۱۰ میلی گرم لوامیزول بر هر کیلوگرم وزن بدن به موش های BALB/c پس از ۴۸ ساعت، رشد سلول های توموری WEHI-164 را به طور معنی داری کاهش داده است. تجویر آنتی بادی ضد NC-2 حذف اثر لوامیزول را در پی داشت. این مطالعه نشان می دهد که اثر ضد توموری لوامیزول (حداقل بخشی از آن) توسط سلول های $NC\text{-}2^+$ سازماندهی می گردد.

واژه های کلیدی: سیتوتوکسیسیته طبیعی، لوامیزول، سلول های $NC\text{-}2^+$.

مقدمه:

ایمنی ذاتی یکی از بازوهای مهم سیستم ایمنی بوده که بر عکس ایمنی اکتسابی یا آداپتیو در برخورد با عوامل بیگانه به خاطره ایمونولوژیک نیاز ندارد. از نظر تکاملی نیز قدیمی ترین فرم ایمنی است که ابتدائاً در بی مهرگان ظاهر شده در صورتی که ایمنی اکتسابی خاص مهره داران است (۱۹،۱۲). سیتوتوکسیسیته ذاتی و اکتسابی با واسطه سلولی دو مکانیسم ایمنی هستند که دفاع بدن را در مقابل عوامل عفونی و بدخیمی های فراهم می نمایند. در ایمنی ذاتی، سیتوتوکسیسیته به واسطه سلولی مشتمل بر کشندگی طبیعی (Natural killing) (۷) و سیتوتوکسیسیته طبیعی (Natural cytotoxicity) (۱۶) می باشد. سیتوتوکسیسیته طبیعی هم در موش (۷) و هم در انسان (۵) گزارش گردیده است. این پدیده عمدتاً توسط لکوسیت هایی که رسپتورهای سطحی NC-1.1 (۱۶،۶) و NC-2 (۱۴) را دارا می باشند بروز می نمایند. رسپتور NC-2 پروتئینی است به وزن ۵۰ کیلو دالتون که بر سطح سلول هایی که عمدتاً درشت و گرانولار هستند وجود دارند (۱۴) و همانند NC-1.1 در موش موجب مصونیت آن در مقابل رشد برخی تومورهای پیوند شده و تومورهای حاصله از مواد شیمیایی سرطان زا می شود (۱۷،۱). لذا مواد و عواملی که عمل سیتوتوکسیسیته طبیعی را از طریق رسپتورهای فوق تقویت نمایند، می توانند به عنوان داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار گیرند.

با توجه به اهمیت سرطان در جهان امروز و اولویت

* استادیار گروه ایمونولوژی – دانشگاه علوم پزشکی: شهرکرد – رحمتیه – *دانشکده پزشکی – گروه ایمنی – تلفن: ۳۳۳۵۶۵۴-۰۳۸۱ داخلی ۲۴۳۶* **(مؤلف مسئول).**

**دانشیار گروه فارماکولوژی – دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

Archive

www.SID.ir

Archive of SID

شناخت نقش سیستم ایمنی در دفاع علیه سلول های تومورال و نقشی که داروی لومیزول در تشدید دفاع ایمنی علیه سرطان دارا می باشد، این بررسی به منظور شناسایی نقش این دارو بر فعالیت سیتوتوکسیسیتی طبیعی در فیبروسارکومای موشی انجام گرفت.

لوامیزول که یک داروی ضد کرم می باشد، خواص تقویت کنندگی سیستم ایمنی را نیز دارا بوده و همراه با ۵-فلئوروراسیل (5-fluorouracil) در بهبود بقاء بیمارانی که در اثر سرطان، کولون آنها برداشته شده مؤثر می باشد (۱۰). مطالعات انجام شده در محیط آزمایشگاه حاکی است که اثر تقویت کنندگی لوامیزول بر سیستم ایمنی از طریق منوسیت ها، سلول های کشنده طبیعی و سلول های کشنده فعال شده با لنفوکاین (Lymphokine activated killers) انجام نمی شود (۱۳). در حالی که از طریق سلول های سیتوتوکسیسیته طبیعی گزارش گردیده است (۴).

ما در این مطالعه پس از تعیین دوز مؤثر لوامیزول در کنترل تومور، نقش آن را در تقویت سیتوتوکسیسیته طبیعی سلول های $NC\text{-}2^+$ موش مورد بررسی قرار داده ایم.

مواد و روشها:

موش از نژاد BALB/c از هر دو جنس و کمتر از ۱۵ هفته در حیوان خانه بیمارستان سلطنتی نیوکاسل تحت مراقبت بوده و از نظر سن و جنس در گروه های مختلف به طور یکنواخت مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت سلول (Tissue culture medium=TCM) از نوع (Dulbecco's modification eagle's medium=DMEM) از شرکت CSL سیدنی استرالیا خریداری و ۲ میلی مول ال-گلوتامین، ۲۰ میلی مول HEPES، ۵۰ میکرومول ۲-مرکاپتواتانول، ۰/۲ درصد سدیم بیکربنات، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله غیر فعال شده با حرارت و ۵۰ میکروگرم در لیتر جنتامایسین اضافه و مورد استفاده قرار گرفت.

لوامیزول هیدروکلراید توسط Pitman-Moor سیدنی استرالیا فراهم گردید. آنتی بادی ضد رسپتور NC-2 همانگونه که قبلاً شرح داده شده است (۱۴)، تولید گردید و مطابق پروتوکل طراحی شده (اطلاعات چاپ نشده) مورد استفاده قرار گرفت. سلول های WEHI-164 که یک نوع فیبروسارکومای موش نژاد BALB/c می باشد (۱۱)، در محیط کشت تکثیر و مورد استفاده قرار گرفت.

تست آزاد سازی کرومیوم ۵۱:
(Chormiumm (51)-release cytotoxicity assay)

سیتوتوکسیسیته طبیعی سلول های موش در محیط آزمایشگاه *(in vitro)* را از طریق لیز سلول های توموری متصل شده باکرومیوم رادیواکتیو (کرومیوم ۵۱) همانگونه که قبلاً شرح داده شده است (۱۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور اختصار، سلول های توموری در طول شب (over night) با کرومیوم ۵۱ (۵ میلی کوری در هر میلی لیتر) مجاور شده و سپس سلول های طحال موش به عنوان سلول های عملگر (effector) با 10^4 سلول توموری مذکور در پلیت های ۹۶ چاهکی در مدت ۱۸ ساعت مجاور گردیدند. نتایج ابتداً به صورت درصد لیز اختصاصی (Percent specific lysis) از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\% \text{ لیز اختصاصی} = \frac{\text{میانگین زمینه - میانگین رادیو اکتیوته تست}}{\text{میانگین زمینه - میانگین رادیواکتیوته کل}} \times 100$$

سپس درصد لیز اختصاصی به لیتیک یونیت ۲۰ (Lytic $Unit_{20}$) برگردانده شد. یک لیتیک یونیت ۲۰ (LU_{20}) عبارت است از تعداد سلول عملگری است که سبب لیز اختصاصی ۲۰ درصد از سلول های توموری بشود.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه بین گروه های شاهد و مورد آزمایش توسط student's t-test انجام گرفت.

چگونگی تعیین دوز مناسب لوامیزول:

گروه های ۱۶ تایی از موش را به منظور تعیین دوز بهینه لوامیزول بر سیتوتوکسیسیته طبیعی آنها تحت تزریق ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی TCM (گروه شاهد) و یا لوامیزول با دوزهای ۱۰،۳ و ۳۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت (TCM) (گروه تحت مطالعه) مورد بررسی قرار گرفتند. در روزهای ۳،۲،۱ و ۷ بعد از تزریق، چهار موش از هر گروه را کشته و طحال های آنها استخراج و سوسپانسیون سلولی حاصل به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی طبیعی آنها بر علیه سلول های توموری WEHI-164 مورد آزمایش قرار گرفتند.

چگونگی مطالعه اثر لوامیزول و آنتی بادی ضد NC-2 بر رشد تومور WEHI-164:

ابتدا سلول های توموری را با دوزهای مختلف به موش های BALB/c تزریق تا تیتر یا حداقل دوزی که منجر به رشد صد در صد تومور می شود (MTD100) به دست آید. سپس چهار گروه ده تایی موش Balb/c را که از نظر سن و جنس یکسان بودند انتخاب و به گروه اول لوامیزول به صورت زیر جلدی (۱۰ میلی گرم) لوامیزول بر هر کیلوگرم وزن بدن در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی یا (TCM) و به گروه دوم آنتی بادی ضد NC-2 (۱:۱۰ مایع آسیت در ۲۰۰ میکرولیتر TCM) به صورت داخل صفاقی و به گروه سوم آنتی بادی ضد NC-2 همراه با لوامیزول به صورت داخل صفاقی، به گروه چهارم TCM به صورت داخل صفاقی، تزریق گردید. لوامیزول وTCM در روزهای ۲– و ۲+ و آنتی بادی ضد NC-2 به ترتیب در روزهای ۲–، ۰،۲،۴،۹ تزریق گردید. سلول های توموری WEHI-164 (10^6 سلول در ۲۰۰ میکرولیتر TCM) به صورت یک دوز واحد در روز صفر در ناحیه سینه حیوان به صورت زیر جلدی تزریق گردیدند. هر دو روز یک بار موش ها را به منظور تعیین اندازه تومور مورد بررسی قرار داده و قطر تومورها در دو جهت اندازه گیری و میانگین مساحت آنها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید

$$\text{میانگین مساحت تومور} = \pi \frac{(\text{قطر ۲} + \text{قطر ۱})^2}{۴}$$

مقایسه بین گروه های شاهد و تست از طریق تست های آماری Mann-Whitney U-test و student's t- test بر حسب نوع آزمایش انجام گردید.

نتایج:

نتایج حاصله از تعیین دوز بهینه لوامیزول بر تقویت سیتوتوکسیسیته طبیعی نشان دادند که موش هایی که ۳ و ۱۰ میلی گرم لوامیزول بر هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرده بودند، سلول های طحالشان سیتوتوکسیسیته طبیعی قابل ملاحظه ای ($P<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل دارا بودند. این اثر ۲۴ ساعت پس از دریافت لوامیزول ظاهر گردید و پس از گذشت ۴۸ ساعت با دوز ۱۰ میلی گرم لوامیزول بسیار مشخص بود (جدول شماره ۱).

تقویت سیتوتوکسیسیته طبیعی سلولی $NC\text{-}2^+$ توسط لوامیزول:

برای اثبات اینکه سیتوتوکسیسیته طبیعی تقویت شده با لوامیزول با مداخله سلول های $NC\text{-}2^+$ انجام می شود چهار گروه موش (۱۰ موش در هر گروه) به ترتیب تحت تزریق لوامیزول، آنتی بادی ضد NC-2، آنتی بادی ضد NC-2 همراه با لوامیزول و یا TCM قرار گرفتند. بیست و چهار ساعت پس از تزریق موش ها را کشته و طحال هر گروه از موش ها را یک جا استخراج و پس از ایجاد سوسپانسیون سلولی، بر علیه سلول های توموری WEHI-16 مجاور شده با کرومیوم رادیو اکتیو به کار

Archive of SID

www.SID.ir

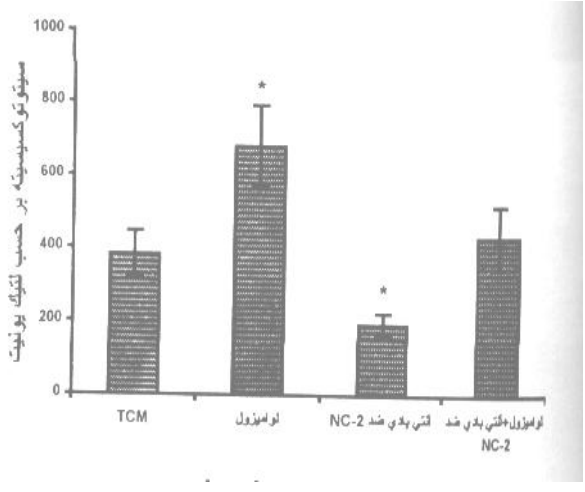
Archive of SID

جدول شماره ۱: دوز و زمان اثر لوامیزول *in vivo* بر سیتو توکسیسیته طبیعی سلول های طحال موش بر حسب لیتیک یونیت (**LU**)

دوز لوامیزول / روز بعد از تیمار	لیتیک یونیت -20 (LU_{20}) بر حسب دوز لوامیزول			
	TCM	3mg/kg	10mg/kg	30mg/kg
روز اول	۲۰۵ ±۱	۷۵۲ ±۱۸۰	۵۸۰±۲۳۲	۸۳۲ ±٤
روز دوم	٤۱۰ ±۸۸	*۱٤۱۲ ±۸۵	۲۱۸۰ ±۳۲۵*	۸۱۵ ±٤۸۵
روز سوم	۳۲۰ ±۱۰	٦۵۰ ±۲۱۲	۵٦۳ ±۲٤۲	۳۵۲ ±۱۳
روز هفتم	۲۷۲ ±۱۲	٤٦۹ ±۸۵	۲۳۸ ±٤۸	۵۷۲ ±۲۱۱

مقایسه میانگین (X±SE) گروههای مورد آزمایش با گروه شاهد به کمک Student t-test انجام گرفت. (P<۰/۰۵) *.

گرفته شد. نتایج نشان داد که موش هـای دریـافت کننـده لوامـیزول سیتوتوکسیسیته طبیعـی بـالایی (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه شاهد (گروه دریـافت کننـده TCM تنـها) دارا بودند (نمودار شـماره ۱). مـوش هـایی کـه تنـها آنتـی بـادی ضـدNC-2 دریـافت کـرده بودندکـاهش قـابل



نمودار شـماره ۱: *اثـرات تجویـز آنتـی بـادی ضـد NC-2 (in vivo) بـر تقویـت سیتوتوکسیسـیته طبیعـی ناشـی از لوامیزول. مقایسه میانگین گروههای مورد آزمایش بـا گـروه شاهد توسط Student t-test انجام گرفت (P<۰/۰۵)* *.

ملاحظـه ای (P<۰/۰۵) در سیتوتوکسیسـیته طبیعـی سلول های آنها در مقایسه با گروه شـاهد مشـاهده گردیـد (نمودار شماره ۱). گروهی از موش ها که آنتی بادی ضـد NC-2 و لوامیزول را به طور همزمان دریافت کرده بودند سیتوتوکسیسیته طبیعی مشابه گـروه شـاهد داشـتند، کـه حکـایت از حـذف اثـر تقویـت دهنـدگی لوامـیزول بـر سیتوتوکسیسیته طبیعی توسط آنتی بادی ضـد NC-2 در نزد حیوان (*in vivo*) دارد.

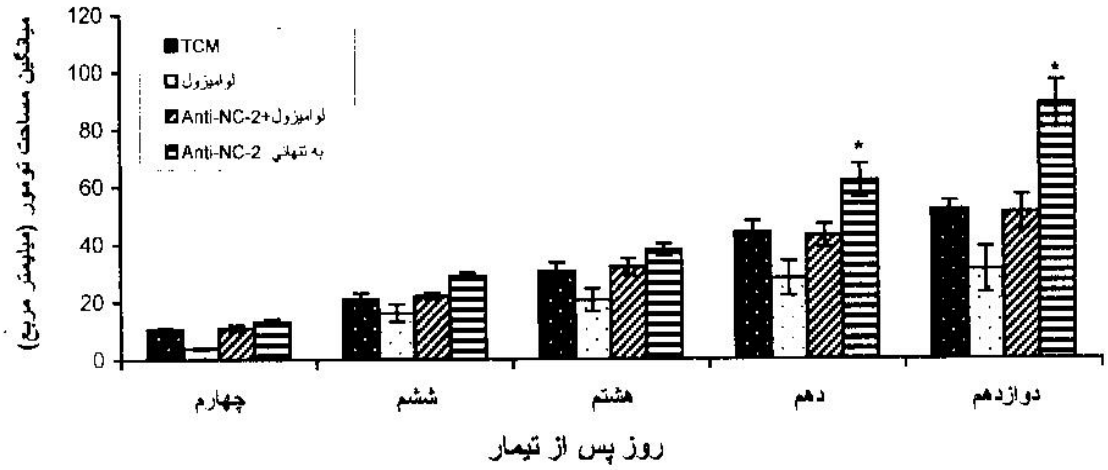
تقویت سیتوتوکسیسـیته طبیعـی و مراقبـت در مقـابل تومور (tumor surveillance) توسط لوامیزول:

در ایـن پژوهـش سـپس توانـایی لوامـیزول در میانجی گـری حفـاظت در مقـابل تومـور WEHI-164 در نزد حیوان (*in vivo*) نیز مورد ارزیابی قرار گرفـت. چـهار گروه از موش BALB/c مثل آنچه قبلاً متذکر شدیم، بـه ترتیـب تحـت تزریـق لوامـیزول، آنتـی بـادی ضـد NC-2، لوامیزول به علاوه آنتی بادی ضد NC-2 و یـا TCM تنـها قرار گرفتند و سپس به طریـق زیـر جلـدی دوز MTD100 (Diamiter-100 Mean Tumour) از سلول های توموری

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماه ۲: *تاثیر تجویز آنتی بادی ضد NC-2، لوامیزول و لوامیزول همراه با آنتی بادی ضد NC-2 بر رشد فیبرو در موش. نتایج به صورت میانگین مساحت تومور $X\pm SE$ (mm^2) برای هر گروه محاسبه و با استفاده از Mann-Whitney U-test با گروه شاهد (گروه تزریق شده TCM) مقایسه گردید.*

WEHI-164 به آنها تزریق گردید. در تمام موش ها تومور رشد نمود و موش هایی که لوامیزول تنها دریافت کرده بودند، ۱۰ تا ۱۲ روز بعد از تزریق تومور به طور معنی داری ($P<۰/۰۵$) تومورهای کوچک تر در مقایسه با گروه شاهد داشتند (نمودار شماره ۲). در مقابل موش هایی که آنتی بادی ضد NC-2 دریافت کرده بودند در روزهای ۱۰ تا ۱۲ تومورهای کاملاً بزرگتری ($P<۰/۰۵$) در مقایسه با آنهایی که TCM تنها دریافت کرده بودند داشتند (نمودار شماره ۲). موش هایی که لوامیزول و آنتی بادی ضد NC-2 به طور همزمان دریافت کرده بودند تومورهایی رشد نمود که در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری نداشتند (نمودار شماره ۲). این نتایج نشانگر این واقعیت است که آنتی بادی تزریق شده به حیوان (*in vivo*) مقاومت ایجاد شده در اثر لوامیزول را از بین می برد.

بحث:

یکی از واسطه های سیتوتوکسیسیته طبیعی رسپتور NC-2 است . این رسپتور پروتئینی است به وزن ۵۰ کیلو دالتون که بر سطح سلول هایی که عمدتاً درشت و گرانولار هستند وجود دارد (۱۴). مجاور کردن سلول های طحال با آنتی بادی ضد NC-2 عمل سیتوتوکسیسیته طبیعی این سلول ها را بر علیه WEHI-164 متوقف نموده و نیز مانع الحاق (Conjugation) این سلول ها با سلول های توموری WEHI-164 در محیط آزمایشگاه (*in vivo*) می شود (۱۴).

تجویز آنتی بادی ضد NC-2 به موش به دلیل کاهش سیتوتوکسیسیته طبیعی آنها رشد برخی از تومورهای پیوند شده نظیر WEHI-164 در آنها شدت می یابد، که حکایت از مداخله سلول های +NC-2 در مراقبت ایمنی حیوان بر علیه تومور می نماید (۱۴). لذا

www.SID.ir

Archive of SID

تقویت سیتوتوکسیسیته طبیعی بدن از طریق سلول های $NC\text{-}2^+$ ممکن است دفاع میزبان را در برابر تومور افزایش دهد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که لوامیزول سیتوتوکسیسیته طبیعی را بر علیه فیبروسارکومای WEHI-164 در آزمایشگاه افزایش می دهد. تاثیر لوامیزول بر سلول های $NC\text{-}1.1^+$ که بخشی از سیتوتوکسیسیته طبیعی را عهده دار می باشند گزارش شده است (۴). از طرفی لوامیزول (یک میکروگرم/میلی لیتر) منجر به ظهور و واکنش مولکول هایی بر سطح برخی از سلول های توموری می شود که به شناخت آنها توسط سلول های سیستم ایمنی منجر می گردد (۸)، که تائیدی است بر این فرضیه که لوامیزول از طریق تاثیر بر سلول های $NC\text{-}1.1^+$ و $NC\text{-}2^+$ عمل ضد توموری خود را بروز می دهد.

پدیده سیتوتوکسیسیته طبیعی به واسطه سلول های پلی مرف (۲) و سلول های طحال دارای مولکول های CD8, CD4, CD90 و یا Ig سطحی (۳) و رسپتورهای NC-1.1 (۱۵) و NC-2 (۱۴) صورت می گیرد. با این همه منشاء سلول های $NC\text{-}2^+$ که به لوامیزول پاسخ می دهند تاکنون مشخص نشده است و از طرفی چون رشد تومور در موش های فاقد تیموس (nude) و موش های هتروزیگوت طبیعی یکسان می باشد، لذا به نظر نمی رسد سلول های T در این رابطه نقشی داشته باشند (۲۰).

ما نشان داده ایم که در موش لوامیزول باعث تقویت سیتوتوکسیسیته سلولی ذاتی لکوسیت های NC-2 طحال می شود و به علاوه لوامیزول رشد فیبروسارکوما را در حیوان از طریق اثر بر سلول های $NC\text{-}2^+$ کاهش می دهد. از آنجایی که سیتوتوکسیسیته طبیعی در انسان نیز وجود دارد (۵)، احتمالاً اثر درمانی لوامیزول بر سرطان کولون انسان نیز توسط مکانیسم ایمنی ذاتی مشابهی انجام می گیرد. مطالعات اخیر در مورد درمان سرطان انسانی اغلب شامل استفاده از سیتو کاین ها و یا سلول های فعال شده توسط آنها بوده است که جزیی از سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند (۹). پاسخ های کامل و ناقص ضد توموری گزارش شده در انسان تا به امروز بیشتر ناشی از تقویت مکانیسم های ایمنی ذاتی است تا ایمنی آداپتیو یا اکتسابی. این امر غیر منتظره نیست زیرا بدخیمی ها و ایمنی ذاتی با یکدیگر ارتباط دارند (۱۲). ظاهراً سیستم ایمنی آداپتیو ابتدائاً با بدخیمی مرتبط نمی باشد (۱۸). از این رو پیشنهاد می شود که توجه بیشتر به پاسخ های ایمنی ذاتی بر علیه نئوپلازیا معطوف گردد، زیرا ایمنی ذاتی قابلیت بیشتری نسبت به ایمنی آداپتیو در بهبود و کنترل بیولوژیکی سرطان (به استثناء سرطان های ایجاد شده توسط ویروس ها) دارا می باشد.

تشکر و قدردانی:

نویسنده از همکاریهای بی دریغ دکتر گرگوری کلارک از دپارتمان جراحی دانشگاه نیوکاسل استرالیا و پرسنل دفتر مجله دانشکده پزشکی شهرکرد به خصوص سرکار خانم ها هوشمند و ریاحی قدردانی می نماید.

References:

1. Burton RC.; Smart YC. Natural cytotoxic cells mediate immunesurveillance against 3-methylcholanthren and mineral oil carcinogenesis in mice. Nat Immun, 13: 227, 1994.

2. Burton RC.; Grail D.; Warner NL. Natural cytotoxicity of haemopoietic cell populations against murine lymphoid tumors. Br J Cancer, 37: 806-17, 1978.

3. Bykowsky MJ.; Stutman O. The cells responsible for murine natural cytotoxic (NC) activity: a multi-lineage system. J Immunol, 137: 1120-6, 1996.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

4. Clarke GR.; Burton RC.; Smart YC. The anti tumor effects of levamisole in mice are mediated by NC-1.1^{+} cells. Cancer Immunol Immunother, 45: 115-8, 1997.

5. Collins JL.; Kao MS.; Patek PQ. Humans express natural (NC) activity that is similar to murine NC cell activity. J Immunol, 138: 4180, 1989.

6. Holmgreen SP.; Wang X.; Clarke GR.; Noltorp RS.; et al. Phosphorylation of the NC-1.1 receptor and regulation of natural cytotoxicity by protein kinase C and cyclic GMP-dependent protein kinase. J Immunol, 158: 2035-41, 1997.

7. Kiessling R.; Klein E.; Wigzell H. Natural killer cells in the mouse. I.Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol, 5: 112-4, 1975.

8. Kimball ES.; Fisher MC. Levamisole effects on major histocompatibility complex and adhesion molecule expression on myeloid cell adhesion to human colon tumor cell lines. J Natl Cancer Inst, 88(2): 109-16, 1996.

9. Krakoff IH. Systemic treatment of cancer. CA Cancer J Clin, 46(3): 134-41, 1996.

10. Moertel CG.; Fleming TR.; Macdonald JS.; Haller DG.; et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. N Engl J Med, 322(6): 352-58, 1990.

11. Rollinghoff M.; Warner NL. Specificity of *in vivo* tumor rejection assessed by mixing immune spleen cells with target and unrelated tumor cells. Proc Soc Exp Biol Mad, 144: 813-18, 1973.

12. Savary CA.; Lotzova E. Phylogeny of NK cells. In: Lotzovea E.; Herberman RB (eds.). Immunology of natural killer cells: From CRC Boca Raton. Florida: USA, 45, 1986.

13. Schiller JH.; Lindstrom M.; Witt PL.; Hank GA.; et al. Immunological effects of levamisole *in vitro*. J Immunother, 10(5): 297-306, 1991.

14. Shirzadeh H.; Burton RC.; Brien JH.; Smart YC. Monoclonal antibody anti-NC-2 identifies a second receptor on cells mediating natural cytotoxicity in mice. Immunol, 93: 122-8, 1998.

15. Shirzadeh H.; Clarke GR.; McNeil H.; Wang H.; et al. An IL-3-induced splenic NC-1.1+ mast cell line mediates natural cytotoxicity independent of TNF-a. Cellular Immunology, 174: 147-154, 1996.

16. Smart YC.; Farrelly ML.; Burton RC. Correlation of growth of tumor in NC-cell-dependent mice with NC- and NK-cell-mediated lysis *in vitro*. Int J Cancer, 50: 817-21, 1992.

17. Smart YC.; Stevenson KL.; Farrelly ML.; Brein GH.; et al. Production of a monoclonal all-antibody to murine natural cytotoxic cells. Immunol Cell Biol, 68: 277-84, 1990.

18. Stutman O. Cancer. In Nelson DS (ed.). Natural immunity. Academic Press Australia: Marrickville, 74, 1989.

19. Stutman O.; Paige CJ.; Figarella EF. Natural cytotoxic cells agaimst solid tumor in mice. I. Strain and age distribution and target cell susceptibility. J Immunol, 121: 1819-26, 1978.

20. Warner NL.; Woodruff MFA.; Burton RC. Inhibition of the growth of lymphoid tumor in syngenic athymic (nude) mice. Int J Cancer, 20(1): 146-55, 1977.

Archive of SID

www.SID.ir