تأثیر توأم سیتوتوکسیک وروتوکسین تیپ ۱ و منوفسفوریل لیپیدA بر روی رده سلولی MCF-7 در شرایط آزمایشگاهی

دکتر حسن حسین زادگان[۱]، مرتضی سالاری[۲]، عبدالامیر علامه[۳]، زهیر محمد حسن[۴]، سیمین اصغری[۵]

یافته / سال پنجم / شماره ۱۹

چکیده

مقدمه: وروتوکسین ها سمومی با ساختمان دو بخشی هستند که در پاتوژنز سویه های اشرشیا کولی انتروهموراژیک دخالت دارند. مطالعات اولیه درمان برخی تومورهای سرطانی و نیز بررسی اثر سیتوتوکسیسیته این سموم روی رده های توموری در شرایط محیط کشت(In Vitro) وحیوانات آزمایشگاهی نشان دهنده اثر بخشی آنهاست.این سموم به دلیل دارا بودن گیرنده های اختصاصی بر روی رده های توموری مطالعه شده به صورت انتخابی عمل می نمایند.

هدف از این تحقیق بررسی سیتوتوکسیسیته وروتوکسین۱ تخلیص شده از سویه مولد وروتوکسین اشریشیا کولی توأم با منوفسفوریل لیپیدA (MPL) بر روی رده سلولی تومور پستانی انسان به نام MCF-7 بود.

مواد و روشها: در این تحقیق ابتدا وروتوکسین۱ تولید شده از ۵ سویه مولد وروتوکسین به دست آمده از انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه مرجع بو علی با استفاده از کیت آگلوتیناسیون معکوس(VTEC-RPLA)1 تأیید و با استفاده از کروماتوگرافی جذبی تخلیص شد. در مرحله بعد رقت های مختلف وروتوکسین۱ و MPL به صورت توأم و یا جداگانه بر روی رده سلولی MCF-7 اضافه شد و قابلیت زنده ماندن سلول ها (Viability) با استفاده از تریپان بلو و شکستگی ژنوم آنها با الکتروفورز آگارز بررسی گردید.

یافته ها: مطالعات ما نشان داد که سلول های MCF-7 مطابق با تحقیقات قبلی حساسیت فوق العاده ای به وروتوکسین۱ دارند و مقدار ۳۳ نانوگرم در هر میلی لیتر اثری معادل دوز سیتوتوکسیک ۵۰ درصد CD50% ایجاد می کند. بررسی های شکستگی ژنوم سلولی الگوی مشخصی از بروز پدیده آپوپتوزیز را نشان می دهد. در حالی که MPL به تنهایی ماده ای غیر سمی است؛ ولی استفاده توام آن با وروتوکسین۱ اثرات سمی آن را تشدید می کند.

نتیجه گیری: اگرچه اثرات ضد توموری وروتوکسین۱ از سال ها قبل روشن شده است؛ ولی کشف و شناسایی عوامل مختلف تشدید کننده اثر سیتوتوکسیک مواد ضد تومورها نیز مورد توجه محافل علمی است. MPL یکی از متابولیت های میکروبی است که اثر سینرژیستی آن با وروتوکسین۱ در مرگ سلول های توموری پستان برای اولین بار در این تحقیق مورد بررسی شده است.

واژه های کلیدی: وروتوکسین۱، MPL، MCF-7، سرطان پستان، اثر سیتوتوکسیک

۱- عضو هیئت علمی ـ گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
۲- استادیار ـ گروه میکروب شناسی دانشگاه تربیت مدرس
۳- استاد ـ گروه بیوشیمی دانشکده تربیت مدرس (دانشکده پزشکی)
٤- استادیار ـ گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس (دانشکده پزشکی)
۵- لیسانس زیست شناسی

مقدمه

وروتوکسین ها یا سموم شبه شیگا، سمومی با ساختمان زیر واحدی هستند که از برخی سویه های اشرشیا کولی و شیگلا دیسانتریه تیپ۱ تولید می شوند. این سموم به دلیل ساختمان زیر واحدی پروتئینی جزء قوی ترین سموم شناخته شده هستند. باکتری های مولد وروتوکسین علاوه بر اسهال آبکی یا خونی در بروز سندرم اورمی همولیتیک (HUS)[1] و کولیت هموراژیک(HC) [2] نیز نقش دارند(۱).

در سال ۱۹۷۷ کونووالکوک[3] و همکاران وی اولین بار گزارش کردند که برخی سویه های اشرشیا کولی اثرات سیتوتوکسیک بر سلول های ورو[4] دارند. بدین سبب آن را وروتوکسین[5] نام گذاری کردند. وروتوکسین ها به دو نوع اصلی ۱ و۲ شناخته شده اند، نوع۱ از نظر ساختمانی و ایمنی شناسی مشابه سم شیگا[6] است که از شیگلا دیسانتریه نوع ۱ تولید می شود. این سموم متشکل از دو زیر واحد A و B هستند و به ترتیب حدود ۳۲ و۷/۵ کیلو دالتون وزن دارند. زیر واحدA بخش سمی است که دارای فعالیت N –گلیکوزیدازی است و با حذف باز آدنین از موقعیت ۴۳۲۴ در28srRNA مانع سنتز پروتئین و مرگ سلول های حساس می شود. بخش ملکولی گیرنده اصلی این سم بر روی سلول های حساس Gb3 یا گلوبوتریا اوسیل سرامید است که به نامهای CD-77 در سطح سلول های لنفوسیتB مراکز زاینده ویا آنتی ژن pK در سطح سلول های خونی P نامیده می شود (۲). این گیرنده علاوه بر بخش کورتیکال کلیه ها و سلول های اندوتلیال عروق در سطح بسیاری از سلول های توموری نیز شناسایی شده است. بنابر این وروتوکسین ها به عنوان یکی از مواد سیتوتوکسیک انتخابی برای درمان انواع تومورها کانون توجه قرار گرفته اند (۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹). در سال های اخیر دو مورد از درمان تومورهای بدخیم مننژیوما و آستروسیتوما ی مقاوم به درمان در کانادا گزارش شده است(۴،۵).

سرطان پستان با وجود پیشرفت های مهم در تشخیص و درمان هنوز از معضلات شایع زنان است. اگرچه وجود داروهای مؤثری مانند تاموکسیفن و رالوکسیفن (مدولاتورهای گیرنده استروژنی یا آنتی استروژن ها) و یا داروهای داخل توموری آناسترازول (Armidex) و لتروزول (ممانعت کننده های آروماتازی) که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانت درمانی در طی سی سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است (۱۰)؛ ولی معایب مختلفی از جمله عود موارد بیماری ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئید ها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان سینه (۱۱،۱۲) سبب محدودیت استفاده از این شیوه های درمانی شده است. لذاهدف اصلی این تحقیق با توجه به سابقه مطالعات انجام شده، ابتدا بررسی اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین۱ بر روی رده توموری MCF-7 و بعد اثر توأم آن با MPL است ، که یکی از متابولیت های میکروبی مشتق شده از لیپوپلی ساکارید باکتری هاست.

با توجه به سابقه مطالعات سیتوتوکسیسیته وروتوکسین۱ بر روی سلول های توموری مختلف و اثبات وجود گیرنده مربوط روی آنها، رده توموری MCF-7 به عنوان مدل و نمونه شاخصی از رده های توموری کارسینومای پستانی در این تحقیق استفاده شده است.

مواد و روشها

این مطالعه، تحقیقی بنیادی و کاربردی است که به روش زیر انجام گردید. سویه های مولد وروتوکسین از انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه مرجع بوعلی تهیه گردید. از محیط کشت TSB با ۲٪ آگار و سولفات پلی میکسین ب (سیگما) سلیت ۵۴۵ خشک و Gb3 (سیگما) برای تولید، تخلیص و استخراج سم استفاده شد. کیت سرولوژیک آگلو تیناسیون معکوس VTEC-RPLA (اکسوئید) برای بررسی وجود و تعیین نوع و

1. Hemolytic Uremic Syndrome
2. Hemorrhagic Colitis
3. Konovalkok
4. Vero
5. Verotoxin
6. Shign

تیتر سموم وروتوکسین۱ و۲ استفاده شد. رده سلولی MCF-7 نیز از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

تولید و تخلیص وروتوکسین۱:

هر یک از پنج سویه در محیط TSB و دمای ۳۷ درجه با ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس در سوسپانسیون باکتری ها با فیلتر ۴۵/. میکرون استریل و با استفاده از کیت VTEC-RPLA طبق دستور العمل کارخانه سازنده، تولید و یا عدم تولید دو سم وروتوکسین۱ و۲ بررسی شد. یکی از سویه ها که تنها تولید کننده وروتوکسین ۱ بود، در محیط TSB کشت و در شرایط ۲۰- درجه و ۱۰ درصد گلیسرول به عنوان استوک نگهداری و به نام PA101 نام گذاری شد.

سویه PA101 در ۳۷ درجه و محیط کشت TSB با ۲ درصد آگار کشت شد. کلنی باکتری ها بعد از ۲۴ ساعت جمع آوری و با بافر فسفات استریل شستشو داده شد؛ سپس با ۳/. میلی گرم در هر میلی لیتر از پلی میکسین ب سولفات به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه مجاورت داده شدند تا وروتوکسین۱ استخراج شود.محلول حاوی سم با استفاده از آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید(PMSF) با غلظت ۳۰ میلی مولار در هر میلی لیتر استریل، دیالیز و پس از لیوفیلیزه کردن با استفاده از کروماتوگرافی جذبی تخلیص و مجددا لیوفیلیزه شد و به عنوان سم خالص برای بررسی های سیتوتوکسیسیته استفاده گردید (۱۳).

تعیین قابلیت زنده بودن سلول های MCF-7:

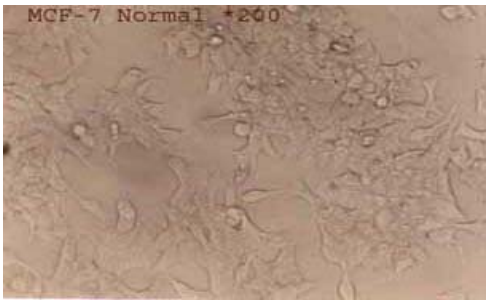
از هر یک از رده های سلولی، ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای در محیط کشت RPMI-1640 ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در شرایط ۵ درصد Co2 و ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس با تعویض محیط کشت با غلظت های مختلف وروتوکسین۱ (۰، ۰/۱، ۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی لیتر وروتوکسین۱) و MPL (۰، ۵، ۱۰، ۵۰ ، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم) و غلظت های متقاطع آنها تیمار شدند. هر غلظت به صورت سه تایی شکل گرفت. تعداد سلول های زنده و مرده با استفاده از جذب رنگ تریپان بلو در روزهای ۱، ۲ و ۳ بعد از تیمار در مقایسه با گروه شاهد (بدون تیمار) و مقدار سیتوتوکسیک ۵۰ درصد سم برای هر رده سلولی با استفاده از رابطه Reed & Munch محاسبه گردید (۳).

بررسی قطعه قطعه شدن ژنوم سلول ها:

میزان قطعه قطعه شدن DNA سلولی پس از مجاورت با سم بر اساس روش زیر انجام شد: تعدادیک میلیون سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه ای به مدت ۱ روز با وروتوکسین۱ (۲۰ نانوگرم) تیمار شد. سلول ها با بافر فسفات شستشوو در بافر لیز سرد (10mM تریس-HCL با pH برابر ۷/۴ و 1mM از EDTA , و ۲/. درصد از تریتون X-100)به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه لیز شدند. سپس با سانتریفوژ در14000g به مدت ۱۵ دقیقه لیزات سلول ها حذف و به سوپرناتانت حاوی ملکول های با وزن ملکولی پایین مقدار ۲/. میلی گرم در میلی لیتر از پروتئیناز K در ۳۷ درجه به مدت ۴ ساعت افزوده شد؛ سپسDNA سلولی دو بار با فنل /کلروفرم استخراج و با اتانول سرد ۲۰°- به مدت یک شب رسوب داده و با سانتریفوژ در 14000g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه جمع آوری و پلت DNA در ۱۵ میکرولیتر از بافر TE حل شد. بعد از یک ساعت تیمار با RNAse در ۳۷ درجه با استفاده از بافر loading در ژل اگارز ۱ درصد دارای اتیدیوم بروماید وجود شکستگی بین نوکلئوزوم ها زیر نور ماورای بنفش بررسی شد (۱۴).

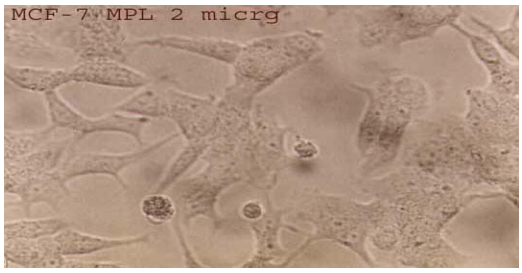
یافته ها

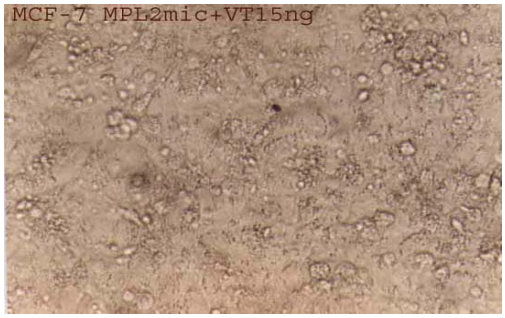
در شکل ۱ نمونه ای از سلولMCF-7 تیمار شده با وروتوکسین۱ نشان داده شده است. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد، تیمار هم زمان وروتوکسین۱ با سلول ها مانع اتصال آنها در سطح فلاسک های کشت و یا چاهک های میکروپلیت می شود و حد اکثر سیتوتوکسیسیته را بر روی آنها ایجاد می کند. لذا تمامی آزمایشات بر روی کشتهایی انجام گرفت، که یک روز پس از پاساژ به صورت تک لایه در آمده بودند.





شکل ۱- سلو ل های MCF-7 کنتر ل (بالا) و سلول های تیمار شده با ۲۰ نانوگرم از وروتوکسین۱ (پایین) نشان داده شده اند. گرد شدن سلول ها و اثر سیتوپاتیک ناشی از وروتوکسین۱ به وضوح مشاهده می شود.





شکل ۲- در این شکل سلول های تیمار شده با MPL (بالا) و سلول های تیمار شده توأم با MPL و وروتوکسین۱(پائین) نشان داده شده اند. در سلول های تیمار شده MPL در مقایسه با سلول های کنترل تغییرات ظاهری و سیتوپاتیک مشاهده نمی شود. در حالی که در سلول های تیمار شده با وروتوکسین۱ و یا توأم آنها اثرات شدید آسیب های سلولی مشاهده می شود.

در شکل ۳ نمونه ای از الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول های تیمار شده در کنار سلول های تیمار نشده با وروتوکسین ۱ نشان داده شده است، وجود باندهای مختلف که نشان دهنده شکستگی ژنوم از نواحی بین نوکلئو زو مها است. از معیار های آپوپتوزیز تحریک شده در سلول هاست که در بررسی های مربوط به سیتوتوکسیسیته از آن استفاده می شود.در سلول های تیمار شده با وروتوکسین۱ (ستون۱) در مقایسه با سلول های کنترل (ستون۲) وجود شکستگی در ژنوم استخراج شده از سلول ها مشخص است.



شکل ۳ـ نمونه ای از الکتروفوز DNA استخراج شده از سلولهای تیمار شده در کنار سلولهای تیمار نشده با وروتوکسین ۱

بحث

وروتوکسین ۱ یا شبه سم شیگا۱ (SLT1) از پروتئن های غیر فعال کننده ریبوزوم های یوکاریوتی است و عمدتا توسط سویه های پاتوژنیک اشریشیا کولی سروتیپ O157:H7 و یا سویه های انتروهموراژیک اشریشیا کولی (EHEC) تولید و سبب مرگ سلول هایی می شودکه در سطح خود دارای ملکول های Gb3 و یا CD77 هستند. در این تحقیق نشان داده شد که وروتوکسین ۱مانع رشد رده تومور پستانی انسان بنام MCF-7 می شود. حساسیت این سلول ها به اندازه رده های سلولی ورو که به طور استاندارد برای شناسایی وروتوکسین ها استفاده می شود، نیست؛ ولی مقادیر بسیار کمی از این سم اثرات

سیتوتوکسیک شدیدی بر آنها ایجاد می کند که نشانه حساسیت زیاد آنها به وروتوکسین۱ است.

اخیرا وجود گیرنده گلیکو لیپیدی این سم در سطح سلول های سرطانی پستان به همراه لنفوما و میلوما بررسی شده است؛ ولی علیرغم وجود گیرنده زیاد در سطح برخی از رده ها حساسیت متفاوتی در برابر وروتوکسین۱ گزارش شده است که نشان دهنده دخالت سایر عوامل در سیتوتوکسیسیته ناشی از وروتوکسین۱ بر روی این سلول ها است (۸).

وروتوکسین۱ عامل فعال آنتی نئوپلاستیک موجود در باکتریوسین نیمه خالص است که چندین سال قبل اثر ضد توموری آن بر فیبروسارکومای موشی نشان داده شده است (۱،۵). درمان موش های تومور دار دارای Gb3 در سطح سلول های توموری مانع متاستاز تومورها شده است(۱۶) و برای رده های توموری مختلف از جمله آستروسیتوما (۳،۴)، مننژیوما (۵)، لنفوم بورکیت(۱۶)، بیماری لنفو پرولیفراتیو بعد از پیوند ناشی از ویروس اپشتین بار (۶)، میلوم مولتیپل و رده های سرطانی پستان (۸) اثرات ضد توموری و سیتوتوکسیسیته وروتوکسین۱ نتایج بسیار درخشان و امیدوار کننده ای داشته است. به طوریکه رده های مقاوم چند دارویی در برابر این سم حساسیت بیشتری نسبت به سلول های نرمال دارند.

در بسیاری از سرطان ها سطح Gb3 در سلول های توموری نسبت به سلول های طبیعی افزایش می یابد وحتی در سرطان های رده سلولی زاینده از جمله کوریو کارسینوما و بیضه ها نیز Gb3 از مارکرهای سرطانی شدن آنها است (۹). زیرواحد B سم بدون فعالیت زیر واحدA قادر به تحریک آپوپتوزیز است. بنابر این وروتوکسین۱ علاوه بر توقف ساخت پروتئین، با استفاده از تحریک کاسپازهای غشای میتوکندری های سلول های حساس و مستقل از زیر واحد A می تواند سبب تحریک آپوپتوزیز در سلول های حساس دارای Gb3 شود (۱۷). این پدیده از مهم ترین فرایند های سلولی است که در تمایز و حفظ هوموستاز موجودات پر سلولی مورد استفاده می شود (۴) و اساس طراحی داروهای ضد نئو پلاستی است.

همان طور که می دانیم در سالهای اخیر به دلیل محدودیت درمان های رایج سرطان از جمله شیمی درمانی و پرتودرمانی به استفاده از متابولیت های میکروبی توجه خاصی صورت گرفته است (۱۸). MPL یکی از متابولیت های مهم باکتریایی است که علاوه بر استفاده از آن به عنوان ادجوانت در واکسیناسیون اثرات کاهش حجم تومور آن به دلیل تحریک تولید واسطه های ایمنی از جمله فاکتور نکروز تومور آلفا ثابت شده است (۱۹،۲۰،۲۱). لذا بررسی اثرات متقابل آن با سایر متابولیت های میکروبی مانند وروتوکسین ها از زمینه های مهم تحقیقی در این زمینه است.

در این تحقیق ابتدا اثرات سیتوتوکسیک ناشی از وروتوکسین۱ بر سلول های MCF-7 بررسی و پس از آن کنش های متقابل آن با MPL مطالعه گردید. درسلول های MCF-7 بررسی شده، ۳ ساعت پس از شروع تیمار با وروتوکسین۱ شکستگی ژنوم با الکتروفورز مشاهده شده و در صورتی که هم زمان با پاساژ، سلول ها در معرض سم قرار می گرفتند. به طور کلی در مقایسه با سلول های شاهد مانع اتصال سلول ها به ته فلاسک های کشت می شود. با وجود گزارشات مختلف در مورد فقدان شکستگی در ژنوم سلول های MCF-7، بررسی های الکتروفورز آگارز ما نشان داد که وروتوکسین۱ در سلول های MCF-7 تیمار شده اثرات شدید شکستگی ژنوم را ایجاد می کند که یکی از معیارهای آپوپتوزیز محسوب می شود (۲۲).

نتایج این تحقیق با بررسی های قبلی در مورد سیتوتوکسیسیته وروتوکسین۱ برای بسیاری از سلول های سرطانی انسانی از جمله رده های توموری پستان همخوانی دارد (۳،۴،۵،۶،۸).

استفاده هم زمان از MPL نیز سبب تشدید اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین۱ می شود. با توجه به نتایج حاصل

سینرژی بین MPL و وروتوکسین۱ از دو جهت اهمیت دارد: اول این که در عفونت های ناشی از سویه های مولد وروتوکسین تولید و وجود هم زمان این دو ماده میکروبی در جایگاه عفونت ها صورت می گیرد و احتمالا در پاتوژنز آنها نقش مهمی ایفا می کند که می توان از نظر استفاده از آنتی بادی های ضد لیپیدA و یا MPL در کاهش شدت آسیب های حاصله مطالعه بیشتری نمود. دوم این که در رابطه با درمان و حذف سریع تر سلول های توموری مختلف به عنوان یک ادجوانت قوی می توان از MPL استفاده نمود که نیازمند مطالعات بیشتری در شرایط آزمایشگاهی و الگوهای In Vivo انجام داد.

References

1. Chart H. Clinical significance of verotoxin-producing Echerichia coli O157:H7.World J of Microbiol,Biotech, 2000; 16:719-724
2. Ramotar K, Boyds B, Tyrrel G, Gariepy J, Lingwood C, and Branton J. Characterization of Shiga-like toxin1 B subunit purified from overproducing clones of the SLT-1 B cistron. Biochem J, 1999; 272: 805-811
3. Sara A, Murakami M, Boyd B, Hubbard S, Lingwood C,and Rutka J.Verotoxin inhibits the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. J Neurol Oncol, 1998; 40: 137-150
4. Sara A, James R, and Lingwood C.Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice.Oncol Res, 1999; 11: 33-39
5. Salhia B, James R, Lingwood C, et al.The treatment of malignant meningioma with verotoxin. Neoplasia, 2002; 4: 304-311
6. Arbus GS, Grisara S, Segal O, et al. Verotoxin targets lymphoma infiltrates of patients with post- transplant lymphoproliferative disease. Leuk. Res, 2000; 24: 857-864
7. Wenk J, Peter WA, Jochen C, et al. Glycolipids of germ cell tumors, extended globo- series glycolipids are a hallmark of human embryonal carcinoma cells. Int. J. Cancer, 1994; 58: 108-115
8. Lacasse EC, Bary MR, Patterson B, et al.SLT-1 receptor on human breast cancer, lymphoma , and myeloma and absence from CD34+ hematopoietic stem cells: Implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. Blood, 1999; 94: 2901-2910
9. Chikara O,Yasuo F, Makoto S, et al. Changes in glycolipid expression in human testicular tumors. Int. J. Cancer, 1990; 45:1040-1044
10. Baum M. The changing face of breast cancer post – present and future perspectives. Breast Cancer Res and Tratment, 2002; 75: S1-S5
11. Lowrence W. Tamoxifen- An update on current data and where it can now be used. Breast Cancer Research and Treatment, 2002; 75: S7-S12.
12. Carole R, Florent DV, Ibrahima D, et al. Radiation dose, chemotherapy and risk of lung cancer after breast cancer treatment. Breast Cancer Research and Treatment, 2002; 75: 15-24
13. Jean B, Sara A, and Clifford A L. Universal method for the facile production glycolipid/lipid matrices for the affinity purification of binding ligands. Analy. Biochem, 1994; 217: 1-6

14. Beatriz M, Sira N, Maria P, et al. Prodiogiogin from the supernatant of Serratia marcesense induces apoptpsis in haematopoietic cancer cell lines. British J.Of harmacology, 2000; 131: 585 -593
15. Hill RP, Frakas H. Further studies of the action of a partially purified bacteriocin against a murine fibrosarcoma. Cancer Res. 1991; 51: 1359-1365
16. Frakas H, Hill P, Rosen B, et al. The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin1. Pro Natl Acad Sci, USA, 1995; 92: 6996-7000
17. Taga S, Carlier D, Tetaud C, et al. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkits lymphoma cells. Blood, 1997; 90: 2757-2767
18. Dang L. et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. Pro. Natl. Acad. Sci USA, 2001; 98: 15155 –15160
19. Madona GS, Peterson J, Ribi E, and Vogel S.N. Early- phase endotoxin tolerance induction by a detoxified lipidA derivative monophosphoryl lipid A. Infection and Immunity, 1986; 52: 6-11
20. Beth EH, William RB, and Vogel N.S. Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipidA that result in equivalent early endotoxin tolerance. Infection and Immunity, 1990; 58[8]: 2429-2437
21. Michael M, Suzanne MM, and Jannet K. Role of innate factors in the adjuant activity of monophosphoryl lipidA. Infection and Immunity, 2003; 71[5]: 2498-2508
22. Villar E, Redendo M, Rodrigo I, et al. Bcl-2 expression and apoptosis in priming and metastatic breast carcinomas. Tumor Biology, 2001; 22: 137-145