مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۵۹/هفته سوم آذر ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۷

بررسی سایتوکاین‌های IL-4، IFN-γ و IL-17 در بافت تومور، بافت سالم و سرم مبتلایان به تومور پستان

دکتر علیرضا عندلیب[۱]، کامران مقدس[۲]، دکتر فرخنده شریفی[۳]، نفیسه اسمعیل[۴]، سید جواد هاشمی‌نیا[۲]، دکتر محمد مؤذنی[۵]

خلاصه

مقدمه: محیط تومور واجد سایتوکاین‌های گوناگون است که توسط سلول‌های توموری و سلول‌های ایمنی موجود در محیط تومور تولید می‌شوند. رشد و تکامل تومور به سایتوکاین‌های ترشح شده در محیط نیز بستگی دارد. سایتوکاین‌های اینترلوکین ۴ (IL-4)، اینترفرون گاما (IFN-γ) و اینترلوکین ۱۷ (IL-17) اثرات بسیار متفاوتی بر رشد سلول‌های توموری و پاسخ ایمنی علیه تومور اعمال می‌کنند. بنابراین مقایسه‌ی مقدار این سایتوکاین‌ها در زنان مبتلا به تومور بدخیم و خوش‌خیم پستان در این مطالعه مد نظر قرار گرفت.

روش‌ها: نمونه‌های بافت تومور، بافت مجاور تومور و سرم خون ۲۹ بیمار مبتلا به تومور پستان مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۴ نفر دارای تومور بدخیم و ۱۵ نفر دارای تومور خوش‌خیم تشخیص داده شدند. نمونه‌ها از بیماران واجد بیوپسی برای تشخیص بدخیمی پستان تهیه گردید. با استفاده از دستگاه هموژنایزر، محلولی همگن از بافت‌ها تهیه و مقدار سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 و IL-17 در بافت توموری و بافت مجاور تومور و سرم خون بیماران به روش ELISA اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: مقادیر IL-4 برابر ۱۵/۲ ± ۱۱۲/۳، IL-17 برابر ۲/۳ ± ۱۶/۹ و IFN-γ برابر ۳/۸ ± ۱۴/۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر در بافت تومور بدخیم محاسبه گردید. مقادیر IL-4 و IL-17 در نمونه‌های حاصل از بافت توموری، بافت مجاور تومور و سرم افراد مبتلا به تومور بدخیم نسبت به نمونه‌های مشابه در بیماران مبتلا به تومور خوش‌خیم افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$). در این مطالعه بین غلظت IFN-γ در نمونه‌ی حاصل از بافت تومور بدخیم و بافت تومور خوش‌خیم اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که افزایش سایتوکاین‌های IL-4 و IL17 یا عدم تغییر مقادیر IFN-γ ممکن است درروند تومور بدخیم پستان نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: سایتوکاین، اینترفرون گاما، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۷، تومور پستان.

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است و به دلیل ایجاد متاستاز باعث مرگ می شود. سرطان پستان بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جمعیت زنان محسوب می شود (۱). واکنش بین سلول بدخیم و محیط اطراف آن به ویژه پاسخ های ایمنی نقشی حیاتی در ایجاد تومور، رشد، تکثیر و متاستاز سلول های بدخیم دارد (۲). محیط تومور پستان شامل سلول‌های مختلف و مواد محلول می‌باشد. سلول های موجود در این محیط شامل سلول های بدخیم، ماکروفاژها، لنفوسیت ها، نوتروفیل ها، سلول های کشنده‌ی طبیعی (Natural killer یا NK)، سلول‌های

[۱] دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] جراح عمومی، بیمارستان امام علی (ع) فرخشهر، شهرکرد، ایران.
[۴] کاندیدای دکتری ایمنی‌شناسی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۵] جراح عمومی، بیمارستان آیت ا... کاشانی، شهرکرد، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علیرضا عندلیب
Email: andalib@med.mui.ac.ir

www.mui.ac.ir

اندوتلیال و فیبروبلاست‌ها می‌باشد. سلول‌های موجود در محیط تومور توسط شبکه‌ای از پیام های خارج سلولی و گیرنده‌ی آن‌ها در ارتباط نزدیک و مداوم هستند (۳). سایتوکاین‌ها شامل گروهی از پروتئین‌ها و یا گلیکوپروتئین‌های محلول هستند که نقش انتقال پیام بین سلول‌های ایمنی و دیگر سلول‌ها را اعمال می‌کنند و می‌توانند اثرات متفاوتی بر رشد، تمایز و فعال نمودن سلول‌های طبیعی و توموری داشته باشند (۴). سایتوکاین‌ها همچنین دارای فعالیت پیش التهابی یا ضد التهابی و یا سرکوب سیستم ایمنی در محیط تومور هستند (۴).

محیط تومور غنی از سایتوکاین‌ها و دیگر واسطه‌های فعال التهابی و عوامل رشد سلولی و کموکاین‌ها است که می‌توانند بر رشد سلول‌های توموری و سرکوب سیستم ایمنی و ترمیم بافت و تولید رگ تأثیر بگذارند (۴). سایتوکاین‌ها و واسطه‌های التهابی موجود در محیط تومور به طور گسترده توسط سلول‌های توموری و سلول‌های ایمنی موجود در محیط تومور تولید می شوند و اثر خود را به صورت اتوکراین یا پاراکراین اعمال می‌کنند (۴-۳).

لنفوسیت های موجود در بافت تومور (TILs یا Tumour-infiltrating lymphocytes) جمعیت سلولی مهمی را در محیط تومور تشکیل می‌دهند (۵). سلول‌های TILs شامل جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها مانند لنفوسیت‌های B و Tو سلول‌های کشنده‌ی طبیعی می‌باشند (۶). از میان این سلول‌ها لنفوسیت‌های T و B در ایمنی اکتسابی و سلول های کشنده ی طبیعی در ایمنی ذاتی نقش دارند (۶). پاسخ ایمنی علیه تومور اغلب توسط سلول‌های TILS اجرا می‌شود.

همبستگی مثبتی بین افزایش سلول‌های TILS با پیش‌آگهی بهتر در سرطان پستان گزارش شده است (۷). این سلول ها جزء اولین اجزای سیستم ایمنی هستند که به بافت تومور نفوذ می‌کنند. این سلول‌ها را بر اساس مورفولوژی و عملکرد به فعال و غیر فعال و یا فقدان حضور سلول‌ها در موضع تقسیم‌بندی می کنند (۸). تعداد زیادی از سلول‌های TILS دارای فنوتیپ $CD3^+$ هستند که این سلول ها می توانند به صورت $TCD8^+$ یا $TCD4^+$ وجود داشته باشند (۸).

سلول های $TCD4^+$ بازوی مهمی از سیستم ایمنی هستند. این سلول ها می توانند علاوه بر عملکرد یاری‌گری از طریق لیگاند Fas و لیگاند عامل نکروز توموری (Tumor necrotizing factor یا TNF) و مسیر های وابسته به گرآنزیم و پرفورین باعث مرگ سلول شوند (۷). سلول‌های $TCD4^+$ بر اساس خصوصیات عملکردی و ترشح سایتوکاین‌های گوناگون به زیر رده های Th1، Th2 و Th17 تقسیم می‌شوند. سایتوکاین‌های گوناگون اثرات مختلفی را بر رشد سلول های توموری و فعالیت سیستم ایمنی اعمال می‌کنند (۶).

سلول‌های Th1 تولید و ترشح سایتوکاین‌های اینترلوکین ۱۵ (IL-15)، اینترلوکین ۲ (IL-2) و اینترفرون گاما (IFN-γ) و نیز لنفوتوکسین را بر عهده دارند. سلول های Th1 باعث فعال شدن ایمنی سلولی در محیط تومور می شوند. نشان داده شده است که سلول های Th1 برای مهار رشد تومور لازم و ضروری هستند (۸ ۶).

ایمنی ضد تومور اغلب به واسطه ی سلول های $TCD8^+$ CTL فعال، که به وسیله‌ی سایتوکاین‌های Th1 حمایت می‌شوند، صورت می‌گیرد. سایتوکاین های Th1 باعث تحریک و تقویت فعالیت سلول های CTL شده، می توانند مرگ برنامه‌ریزی شده

www.mui.ac.ir

را در سلول هدف القا کنند (۱۰).

IFN-γ سایتوکاین فعال کننده ی ماکروفاژها است و شرایطی را فراهم می‌کند که لنفوسیت‌های T و سلول‌های NK و ماکروفاژها فعال شوند (۱۱، ۹). گزارش شده است که این ماکروفاژها از نوع M_1 هستند که خاصیت ضد توموری مؤثری دارند (۷). اثرات مستقیم IFN-γ بر سلول های توموری باعث کاهش رشد سلول توموری می شود. به عنوان مثال در موش هایی که ژن تولید کننده ی IFN-γ آنان از کار انداخته شده است، میزان بروز و رشد تومورها بسیار بیشتر از موش‌هایی است که این سایتوکاین را تولید می کنند (۱۲). اثرات غیر مستقیم IFN-γ باعث افزایش شناسایی سلول های توموری توسط سایر مکانیسم های سیستم ایمنی می‌شود (۱۲). به علاوه کاربردهای بالینی درمان سرطان به وسیله‌ی IFN-γ گزارش شده است (۱۳).

سلول های Th2 سایتوکاین‌هایی شامل اینترلوکین ۱۳ (IL-13)، اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۵ (IL-5) و اینترلوکین ۴ (IL-4) را تولید می کنند. این سایتوکاین ها باعث پیشرفت پاسخ ایمنی به سمت واکنش های آلرژیک و یا تولید ایمنی هومورال می گردد (۶). بر خلاف سایتوکاین های Th1 افزایش سایتوکاین های Th2 باعث افزایش استعداد ابتلا به تومور از طریق سرکوب ایمنی سلولی در محل تومور می‌شوند. گزارش شده است کاهش نسبت سلول های Th1/Th2 در جمعیت سلول‌های TILs باعث نقص در فعالیت سایتوتوکسیسیتی علیه سلول‌های توموری می‌شود (۱۰)؛ اما Conticello و همکاران پیشنهاد دادند که سایتوکاین‌های Th2 علاوه بر نقص در فعالیت سایتوتوکسیسیتی از طریق کاهش آپوپتوز باعث بقای سلول های سرطانی می شوند (۱۴)؛ چرا که IL-4 باعث افزایش بروز مولکول های Bcl-xl و FLIP/FLAME و کاهش مولکول CD95 در سلول‌های توموری می‌شود که نتیجه ی آن کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد (۱۴).

مشخص شده است که کاهش سایتوکاین های Th1 و یا افزایش سایتوکاین های Th2 باعث افزایش رشد تومورهای آدنوکارسینوما در حیوانات آزمایشگاهی می شود (۶). در بدخیمی‌هایی مانند سرطان پستان، مجاری ادراری، مثانه، کلیه و پروستات کاهش نسبت سلول‌های Th1 و Th2 در محیط تومور گزارش شده است. بر همین اساس پیشنهاد شده است که شیفت از Th0 به سمت Th2 ممکن است در پیشرفت تومور نقش مهمی داشته باشد (۱۴).

محققانی چون Gooch و همکاران این دیدگاه را دارند که IL-4 می تواند مانع از رشد سلول های توموری شود. IL-4 این عمل را با القای آپوپتوز در سلول های توموری و همچنین تأثیر بر گیرنده های سطح سلول (Insulin receptor substrate2 یا IRS2) و فعال شدن STAT6 که باعث کاهش رشد سلول طبیعی و توموری می‌شود اعمال می‌نماید. این نظریه سبب شده است تا از IL-4 جهت درمان سرطان پستان استفاده کنند (۱۵).

تولید سایتوکاین IL-17 توسط سلول‌ها Th17 انجام می‌شود. این سایتوکاین نقش اساسی در بیماری‌های اتوایمیون، التهابی، مولتیپل اسکروزیس، آرتریت روماتوئید و دیابت نوع ۱ دارد (۱۶). تحقیقات Nam و همکاران نشان داد که IL-17 می تواند باعث سرکوب آپوپتوز در چندین رده ی سلول توموری شود. این پژوهشگران پیشنهاد دادند که این سایتوکاین می تواند به صورت مستقیم باعث مهار آپوپتوز در سلول‌های توموری گردد (۱۷).

www.mui.ac.ir

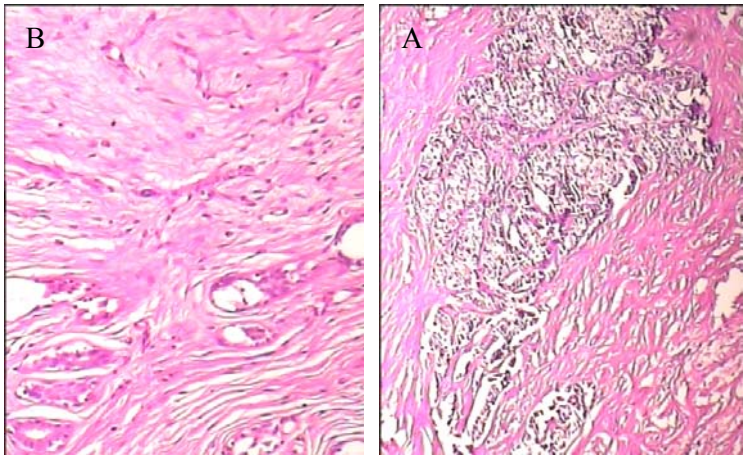
بر حسب گزارش ها اثرات غیر مستقیم IL-17 باعث تولید سایتوکاین‌هایی چون اینترلوکین ۱۰ (IL-10)، اینترلوکین ۸ (IL-8)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و اینترلوکین ۴ (IL-4) می‌شود (۱۷-۱۶). این سایتوکاین‌ها باعث سرکوب سیستم ایمنی و هم چنین افزایش رشد سلول‌های توموری می‌شوند (۱۸). بیان شده است که اثرات مستقیم IL-17 بر تومورها شدیدتر از اثرات غیر مستقیم این سایتوکاین است (۱۷)؛ ولی هنوز نکات بسیاری در مکانیسم اثر IL-17 بر تومورها ناشناخته باقی مانده است که نیاز به بررسی بیشتر دارد. در مطالعه‌ی حاضر به مقایسه‌ی مقدار این سایتوکاین‌ها در زنان مبتلا به تومور بدخیم و خوش‌خیم پستان پرداختیم.

روش‌ها

از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام علی (ع) فرخشهر و آیت‌ا... کاشانی شهرکرد، که جهت تشخیص نوع تومور پستان در سال ۹۰-۱۳۸۹ تحت عمل بیوپسی قرار گرفتند، سه نمونه‌ی بافت تومور، بافت سالم مجاور تومور و خون لخته گرفته شد.

نمونه‌ی خون لخته در همان روز جراحی از بیماران گرفته شد و در حداقل زمان ممکن سرم آن جدا و در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. نمونه‌های بافتی تهیه شده در ظرف درب‌دار حاوی سرم فیزیولوژی نگهداری و در حداقل زمان ۲-۱ ساعت بعد از تهیه چندین مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد تا کلیه ی مواد اضافی از جمله پروتئین‌ها و گلبول‌های قرمز همراه بافت از آن جدا و خارج شوند و تداخلی با آزمایش‌ها ایجاد نکنند.

۴ برابر وزن بافت، سرم فیزیولوژی به آن ها اضافه شد و تا زمان انجام آزمایش در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. بر اساس نوع تومور خوش‌خیم از ۵۰ بیماری، که نمونه‌های آنان تهیه شده بود، ۲۹ بیمار وارد مطالعه شدند و از ۲۹ نمونه ۱۵ مورد دارای تومور خوش‌خیم با تشخیص پاتولوژی فیبروآدنوما و ۱۴ مورد با تشخیص تومور بدخیم Compatible with invasive ductal carcinoma با Grade ۳ یا ۲ بودند. تشخیص تومورها بر اساس رنگ‌آمیزی بافت بیوپسی با هماتوکسیلین و ائوزین و تشخیص حداقل دو نفر پاتولوژیست صورت گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. A. نمونه‌ی بافتی تهیه شده‌ی بیمار مبتلا به تومور با تشخیص کارسینوم مجرایی مهاجم با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین
B. نمونه‌ی بافتی تهیه شده‌ی بیمار مبتلا به تومور با تشخیص فیبروآدنوما با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

www.mui.ac.ir

بافت‌های جمع‌آوری شده از حالت ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خارج گردید و با استفاده از دستگاه هموژنایزر بافت ها به صورت سوسپانسیون درآمد. هر بافت حدود ۱۵ دقیقه در دستگاه هموژنایزر قرار گرفت. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد و سپس محلول رویی (Supernatant) جدا و به لوله ی دیگر منتقل گردید. مقدار سایتوکاین IFN-γ، IL-4 و IL-17 در مایع حاصل از بافت توموری و بافت مجاور تومور و سرم خون بیماران به روش ELISA اندازه‌گیری گردید. کیت اندازه‌گیری مقادیر سایتوکاین‌ها از Bender Med system تهیه گردید. کلیه ی دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده در این مطالعه دارای گواهی کالیبراسیون معتبر بودند.

پس از انجام آزمایش ELISA، با مقایسه ی OD نمونه های تست با منحنی استاندارد مقادیر کمی غلظت سایتوکاین‌ها طبق پروتکل شرکت سازنده محاسبه شد.

آنالیز آماری نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار برای هر گروه از نمونه ها بیان گردید. جهت مقایسه ی گروه بیماران با تومور بدخیم و بیماران با تومور خوش‌خیم از آزمون Student-t در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL) استفاده گردید. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان شاخص معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد و از ضریب همبستگی Pearson جهت سنجش همبستگی داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۲۹ بیمار که دامنه ی سنی آنان از ۱۸ تا ۷۳ سال و میانگین سنی آن ها ۱۵/۶ ± ۳۹/۲ سال بود، انجام شد. ۱۵ نفر از این افراد دارای تومور خوش‌خیم با تشخیص فیبروآدنوما (یک توده‌ی خوش خیم بافت پستان است که از بافت فیبروز و سلول های طبیعی، که سرعت تکثیر زیادی دارند، تشکیل شده است) و میانگین سنی ۱۱/۸ ± ۳۰/۳ سال و ۱۴ نفر هم تومور بدخیم با تشخیص کارسینومای مجرایی مهاجم (به صورت یک توده ی مشخص است که حدود آن به شکل ستاره در بافت اطراف نفوذ می‌کند. این توده در مجاری پستان تشکیل می‌شود و به بافت های مجاور نفوذ می نماید) با مرحله‌ی ۲ یا ۳ و میانگین سنی ۱۳/۶ ± ۴۸/۸ سال بودند.

در این مطالعه سه نفر از ۱۴ نفر دارای سرطان پستان (۲۱/۴ درصد) با سن کمتر از ۳۵ سال وجود داشت. میانگین سنی افراد دو گروه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$).

مقایسه‌ی میانگین غلظت سایتوکاین‌های مورد مطالعه در بافت‌های توموری و بافت مجاور تومور و سرم در افراد گروه در جدول ۱ نشان داده شده است. مشاهده می شود که مقادیر هر سه سایتوکاین مورد مطالعه در بافت مجاور تومور و سرم مبتلایان به تومور بدخیم به طور معنی داری بیشتر از افراد مبتلا به تومور خوش خیم بود. مقدار IL-4 و IL-17 نیز در بافت تومور بدخیم به طور معنی‌داری بیشتر از بافت تومور خوش خیم بود اما در مورد IFN-γ تفاوت بین دو بافت تومور معنی‌دار نبود.

آنالیز همبستگی Pearson نشان داد که بین مقادیر IL-4 و IL-17 در بافت مجاور تومور خوش‌خیم دارای همبستگی مثبت ($P < ۰/۰۰۱$، $r = ۰/۹۸۲$) است. همبستگی آماری مثبتی بین مقادیر IL-17 و IL-4 در بافت مجاور تومور بدخیم نیز ($P < ۰/۰۰۱$، $r = ۰/۹۸۷$) مشاهده شد.

www.mui.ac.ir

جدول ۱. مقایسه‌ی مقادیر سایتوکاین‌های اندازه‌گیری شده در بیماران مبتلا به تومور خوش‌خیم و بدخیم پستان

صفت	شاخص	IL-4 پیکوگرم در میلی‌لیتر	مقدار P	IL-17 پیکوگرم در میلی‌لیتر	مقدار P	IFN-γ پیکوگرم در میلی‌لیتر	مقدار P
بافت تومور خوش‌خیم		۶۵/۶ ± ۱۴/۰۵	< ۰/۰۰۱	۹/۲ ± ۲/۴	< ۰/۰۰۱	۱۳/۸ ± ۲/۳	۰/۴۹۴
بافت تومور بدخیم		۱۱۲/۳ ± ۱۵/۳		۱۶/۹ ± ۲/۳		۱۴/۶ ± ۳/۸	
بافت مجاور تومور خوش‌خیم		۶۵/۸ ± ۱۴/۸	< ۰/۰۳۷	۹/۹ ± ۲/۴	< ۰/۰۲۳	۱۱/۹ ± ۲/۳	< ۰/۰۰۴
بافت مجاور تومور بدخیم		۸۵/۰۱ ± ۲۸/۸		۱۳/۰۶ ± ۴/۴		۱۵/۳ ± ۳/۴	
سرم بیماران با تومور خوش‌خیم		۲۱/۰۲ ± ۲/۷	< ۰/۰۲	۳/۱ ± /۴	< ۰/۰۱۷	۳/۷ ± /۵	< ۰/۰۴۵
سرم بیماران با تومور بدخیم		۲۴/۲ ± ۳/۹		۳/۶ ± /۵		۴/۳ ± /۸	

همبستگی آماری بین مقدار IL-4 در بافت مجاور تومور خوش‌خیم و غلظت IFN-γ در سرم افراد با تومور خوش‌خیم مشاهده شد (P < ۰/۰۱، r = ۰/۶۵۹) و همچنین بین مقادیر IFN-γ در بافت مجاور تومور بدخیم و IFN-γ در سرم بیماران با تومور بدخیم همبستگی آماری منفی (P < ۰/۰۱، r = −۰/۶۰۹) مشاهده گردید.

بحث

در این بررسی میزان سایتوکاین IL-4 در بافت تومور بدخیم پستان نسبت به بافت تومور خوش‌خیم پستان افزایش معنی داری داشت. یافته های ما با نتایج Camp و همکاران هم‌خوانی دارد؛ آن‌ها با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی به این نتیجه رسیدند که ۳۶ درصد سلول های TILs موجود در بافت تومور بدخیم پستان IL-4 تولید می کنند (۱۹). بر خلاف این نتایج، در بررسی Aspord و همکاران عنوان شد که میانگین غلظت IL-4 در مایع حاصل از بافت توموری پستان (این مایع از اثر PMA/ionomycin بر بافت تومور پستان به مدت ۱۶ ساعت به دست آمد) افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد و میزان آن برابر ۱۱ ± ۳۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (۲۰).

به نظر می رسد که جمعیت سلول های Th2 و یا فعالیت این سلول ها در بافت تومور بدخیم پستان افزایش می‌یابد. افزایش سطح سایتوکاین IL-4 در محیط تومور باعث می شود تا سلول های Th0، که به بافت تومور وارد می شوند، به سمت Th2 تمایز یابند. با بررسی این داده‌ها مشخص می‌شود که مقدار IL-4 در بافت مجاور تومور بدخیم نسبت به بافت مجاور تومور خوش خیم افزایش معنی داری داشته است. بر خلاف این نتیجه، Aspord و همکاران بیان نمودند که مقدار این سایتوکاین در مایع حاصل از بافت مجاور تومور بدخیم برابر ۵/۸۲ ± ۴/۳۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود (۲۰)؛ اما داده های حاصل از بررسی ما افزایش مقادیر قابل ملاحظه‌ای رانشان داد. به نظر می رسد که افزایش IL-4 در بافت مجاور تومور بدخیم به علت انتشار این سایتوکاین از بافت تومور بدخیم باشد.

در این بررسی مشخص شد که میزان IL-4 در سرم افراد مبتلا به سرطان پستان نسبت به مقدار این سایتوکاین در سرم افراد با تومور خوش خیم تفاوت معنی‌داری دارد. مطالعه‌ی ما هم جهت با مطالعه‌ی Shurin و همکاران بود که عنوان کردند، سایتوکاین های IL-4، IL-10 در سرطان پستان افزایش نشان می‌دهند (۱۰). اما در مطالعه‌ای که توسط Alimhojaeva انجام

www.mui.ac.ir

شد، مقدار سایتوکاین IL-4 در سرم افراد مبتلا به سرطان پستان برابر ۱/۶۸ ± ۶/۵۵ و در سرم افراد طبیعی برابر ۱/۱۵ ± ۳/۸۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر برآورد گردید که با مقادیر به دست آمده در بررسی ما تفاوت عددی نشان می دهد اما در افزایش این سایتوکاین در سرم افراد با تومور بدخیم تشابه دارد (۲۱).

در مطالعه‌ی Son و همکاران در بیماران مبتلا به سرطان پستان، که به وسیله ی جراحی و شیمی درمانی فرایند درمان را می گذراندند، میزان سایتوکاین IL-4 در سرم بیماران قبل از درمان برابر ۴/۴ ± ۱۱/۷۸ و بعد از درمان برابر ۵/۱۳ ± ۱۳/۸۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (۲۲) که با مطالعه ی ما از نظر عددی تفاوت قابل توجهی ندارد.

با توجه به مطالب فوق شاید بتوان بیان نمود که انتشار سایتوکاین IL-4 از بافت تومور به داخل جریان خون باعث افزایش مختصر اما معنی‌دار در سرم افراد مبتلا سرطان پستان می شود. از آن جایی که تفاوت میزان IL-4 در سرم افراد مبتلا به تومور بدخیم پستان و سرم افراد مبتلا به تومور خوش خیم پستان از نظر کمی قابل توجه نمی‌باشد، استفاده از آن در مسایل بالینی کاربردی به نظر نمی‌رسد.

در بررسی ما سایتوکاین IL-17 در بافت تومور بدخیم پستان نسبت به مقدار این سایتوکاین در بافت تومور خوش خیم پستان افزایش معنی داری داشت. این نتیجه همسو با مطالعه ی Maniati بود که گزارش نمود سلول‌های Th17 در محیط تومورهای مختلفی چون پانکراس و تخمدان دارای فعالیت عملکردی می باشند (۲۳). این گونه مشاهده می شود که سلول‌های Th17 در بافت تومور بدخیم پستان افزایش می‌یابند و یا فعالیت بیشتری نسبت به جمعیت این سلول ها در بافت تومور خوش‌خیم پستان از خود نشان می‌دهند.

در این مطالعه مقدار IL-17 در بافت مجاور تومور بدخیم افزایش معنی‌داری نسبت به مقدار این سایتوکاین در بافت مجاور تومور خوش خیم داشت که با مطالعه ی Zhu و همکاران همسو بود که مقدار این سایتوکاین با روش ایمنوهیستوشیمی نشان دهنده ی افزایش IL-17 در بافت اطراف تومور بدخیم پستان بوده است (۱۶). شاید افزایش IL-17 در بافت مجاور تومور بدخیم به دلیل افزایش آن در بافت تومور بدخیم پستان و انتشار آن به بافت مجاور باشد.

در این بررسی مقدار سایتوکاین IL-17 در سرم افراد با تومور بدخیم پستان افزایش معنی داری نسبت به مقدار این سایتوکاین در سرم افراد با تومور خوش‌خیم داشت که می توان نتیجه گرفت شاید انتشار IL-17 از بافت توموری به جریان خون باعث افزایش این سایتوکاین در سرم باشد. ولی تفاوت میزان IL-17 در سرم افراد مبتلا به تومور بدخیم پستان و سرم افراد مبتلا به تومور خوش خیم پستان از نظر کمیتی قابل توجه نبود.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می دهد که مقدار IFN-γ در بافت تومور بدخیم پستان و بافت تومور خوش خیم پستان تفاوت قابل ملاحظه ای ندارد. این نتایج با یافته های Rosen و همکاران مطابقت داشت (۲). آن‌ها با تأثیر کانکاوالین A و آنتی‌ژن P43 بر روی لنفوسیت‌های T به دست آمده از خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان بدخیم پستان و تومور خوش‌خیم پستان مشخص نمودند که سایتوکاین‌های Th1 از جمله IFN-γ در بین بیماران با تومور بدخیم و خوش‌خیم تغییر قابل ملاحظه‌ای نمی‌کند (۲).

همچنین Camp و همکاران در مطالعه‌ای که با

www.mui.ac.ir

روش ایمنوهیستوشیمی انجام شد، عنوان کردند که فقط ۳ درصد سلول های TILs موجود در بافت تومور بدخیم پستان IFN-γ تولید و ترشح می‌کنند (۱۹).

برخلاف یافته های ما در مطالعه‌ای که توسط Aspord و همکاران انجام شد، میانگین غلظت IFN-γ در مایع حاصل از بافت توموری پستان افزایش قابل ملاحظه‌ای (۱/۵ ± ۴/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر) نشان داده بود (۲۰). عدم افزایش IFN-γ در بافت بدخیم پستان را شاید بتوان این گونه تفسیر نمود که افزایش جمعیت سلول‌های Th2 و Th17 مانع از افزایش سلول‌های Th1 در این محیط می‌شود.

با انجام این بررسی مشخص شد که میزان IFN-γ در بافت مجاور تومور بدخیم نسبت به بافت مجاور تومور خوش‌خیم افزایش معنی‌داری داشت، اما در مطالعه‌ی Aspord و همکاران مقدار IFN-γ در مایع حاصل از بافت مجاور تومور برابر ۹۹۴ پیکوگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که تفاوت معنی داری را نشان داد (۲۰). به نظر می‌رسد افزایش IFN-γ در بافت مجاور تومور بدخیم به علت ایجاد التهاب بیشتر در مجاورت این بافت به دلیل رشد بیشتر سلول های بدخیم یا کاهش اثرات آن‌ها بوده که باعث مهار تولید این سایتوکاین در محیط تومور گشته است.

در مطالعه‌ی ما میزان IFN-γ در سرم افراد مبتلا به سرطان پستان افزایش معنی داری را نسبت به مقدار این سایتوکاین در سرم افراد مبتلا به تومور خوش خیم نشان داد، هر چند با توجه به $P < ۰/۰۴۵$ یک ارتباط محکم نمی‌باشد. این مطالعه هم‌جهت با بررسی Lyon و همکاران بود که مشخص نمودند بین مقدار IFN-γ در سرم افراد مبتلا به سرطان پستان و زنان مشکوک به سرطان پستان که جواب پاتولوژی منفی داشتند تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (۲۴).

Alimhojaeva میزان IFN-γ را در سرم افراد مبتلا به سرطان پستان ۰/۸۲ ± ۶/۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر و در سرم افراد طبیعی ۰/۸۴ ± ۴/۵۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر برآورد نمود (۲۱) که با نتایج به دست آمده در بررسی ما شباهت زیادی داشت.

گزارش Shurin و همکاران نشان داد که سلول های Th1 در سرطان پستان سرکوب می شوند که با نتایج به دست آمده از این بررسی مشابهت دارد (۱۰).

در مطالعه ی Son و همکاران در بیماران مبتلا به سرطان پستان که تحت درمان جراحی و شیمی‌درمانی بودند میزان IFN-γ در سرم بیماران قبل از درمان برابر ۱۷/۱۶ ± ۹۱/۷۵ و بعد از درمان برابر ۶۶/۶۱ ± ۱۶۷/۴۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود (۲۲).

از آن جایی که در این بررسی تفاوت میزان IFN-γ در سرم افراد مبتلا به تومور بدخیم پستان و سرم افراد مبتلا به تومور خوش خیم پستان از نظر کمیتی قابل توجه نبود، به نظر می رسد کاربرد بالینی محدودی داشته باشد. مگر این که به روش‌های سنجش مولکولی مثل RT-PCR اتکا گردد. این یافته‌ها در راستای تغییرات سیتوکاینی سلول‌های Th1، Th2 و Th17 در تومورهای بدخیم پستان بود که در بافت های توموری، بافت مجاور تومور و نیز در گردش خون تأیید کننده‌ی غلبه‌ی سلول‌های Th2 و Th17 در تومورهای پستان است (۱۷-۱۶، ۱۴). به علاوه تحقیقات متعددی، حتی با روش‌های ژنتیکی، نشان دهنده‌ی غالب بودن کلون‌های Th2 و Th17 در بدخیمی‌های پستان بوده است که از این جنبه نیز روش بررسی حاضر با توجه به سایتوکاین های سنجش شده در یک راستا و مؤید این مطالعات بود.

پیشنهاد شده است که شیفت از Th0 به سمت Th2

www.mui.ac.ir

و Th17 ممکن است در پیشرفت تومور نقش مهمی داشته باشد (۱۳، ۹). کاهش نسبت Th1/Th2 در بسیاری از بدخیمی‌های انسان مانند ریه، پستان، مثانه و مجاری ادراری نیز گزارش شده است (۱۰).

با توجه به مطالب بیان شده می توان نتیجه گرفت که با تمایز سلول‌های Th0 به سمت Th1 و مهار تمایز سلول‌های Th0به Th2 و Th17 شاید بتوان از رشد سلول‌های توموری ممانعت نمود. کنترل شیفت سلول‌های ایمنی ویا القای تمایز یا پرولیفرانسیون سلول های مطلوب Th1 و یا ممانعت از رشد جمعیت سلولی Th2 یا Th17 می‌تواند در جهت اهداف ایمنوتراپی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با شماره ی ثبت ۳۸۹۱۸۵ در سال ۸۹-۱۳۸۸انجام گردید. از خانم دکتر ماندانا مقیم (پاتولوژیست)، خانم دکتر شهلا طاهری (پاتولوژیست)، آقای دکتر شهرام شایق (پاتولوژیست)، آقای دکتر بهنام شاکریان (جراح)، آقای مسعود صادقی، آقای نگهدار ریاحی، مدیریت و پرسنل محترم بیمارستان امام علی (ع) فرخشهر و مدیریت و پرسنل محترم بیمارستان آیت‌ا... کاشانی شهرکرد که ما را در انجام این طرح یاری دادند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References

1. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins' Basic Pathology . 7th ed. London: WB. Saunders; 2003.
2. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. Carcinogenesis 2004; 25(8): 1543-9.
3. Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. J Leukoc Biol 1995; 57(5): 747-51.
4. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. Nat Rev Cancer 2008; 8(11): 887-99.
5. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol 2009; 86(5): 1065-73.
6. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC, Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. Cancer Immun 2009; 9: 3.
7. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol 2009; 86(5): 1065-73.
8. Disis ML, Park KH. Immunomodulation of breast cancer via tumor antigen specific Th1. Cancer Res Treat 2009; 41(3): 117-21.
9. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. Cancer Lett 2007; 256(2): 137-65.
10. Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. Springer Semin Immunopathol 1999; 21(3): 339-59.
11. Alvarez DV. Interferon-gamma Receptor Deficiency (IFNgR deficiency). Charlotte, NC: Davidson College [Online] 2011. Available from: URL: http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/V_Alvarez/IFNgRdeficiency.html.
12. Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, et al. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. Cancer Res 2008; 68(10): 3915-23.
13. Zhou Y, Weyman CM, Liu H, Almasan A, Zhou A. IFN-gamma induces apoptosis in HL-60 cells through decreased Bcl-2 and increased Bak expression. J Interferon Cytokine Res 2008; 28(2): 65-72.
14. Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, Stassi G, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. J Immunol 2004; 172(9): 5467-77.
15. Gooch JL, Christy B, Yee D. STAT6 mediates interleukin-4 growth inhibition in human breast cancer cells. Neoplasia 2002; 4(4): 324-31.
16. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines.

www.mui.ac.ir

Breast Cancer Res 2008; 10(6): R95.
17. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. J Leukoc Biol 2002; 71(1): 1-8.
18. Kozlowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. Rocz Akad Med Bialymst 2003; 48: 82-4.
19. Camp BJ, Dyhrman ST, Memoli VA, Mott LA, Barth RJ, Jr. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. Ann Surg Oncol 1996; 3(2): 176-84.
20. Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. J Exp Med 2007; 204(5): 1037-47.
21. Alimhojaeva LT. Pro and anti inflammatory cytokines level in patients suffering breast cancer [Online] 2010. [cited 2010 Apr 9]. Available from:URL: http://d.wanfangdata.com.cn/periodical_hwyy-z20100409.aspx
22. Son GS, Ryu WS, Kim HY, Woo SU, Park KH, Bae JW. Immunologic Response to Mistletoe Extract (Viscum album L.) after Conventional Treatment in Patients with Operable Breast Cancer. J Breast Cancer 2010; 13(1): 14-8.
23. Maniati E, Soper R, Hagemann T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour micro-environment. Oncogene 2010; 29(42): 5653-62.
24. Lyon DE, McCain NL, Walter J, Schubert C. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. Nurs Res 2008; 57(1): 51-8.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 159, 3rd week, December 2011 Received: 12.8.2011 Accepted: 8.11.2011

IFN-γ, IL-4 and IL-17 Concentration in Tumor Tissue, Adjacent Tumor Tissue and the Serums of Patients with Breast Cancer

Alireza Andalib PhD[1], Kamran Moghaddas MSc[2], Farkhondeh Sharifi MD[3], Nafiseh Esmaeil MSc[2], Seyed Javad Hasheminia MSc[2], Mohammad Moazeni MD[4]

Abstract

Background: Tumor environment consists of various cells and cytokines. The cytokines are widely produced in the environment by tumor and immune cells. Tumor growth and development depends on the cytokines secreted in this environment. Cytokines have either pro-or anti-inflammatory activity as well as immunesurvilance stability which influence tumor progression in microenvironment.

Methods: From 29 patients with breast cancer, 14 patients with malignant and 15 with benign tumors were considered. Specimens were collected from patients who were operated for breast cancer. Obtained tissues were kept at -80°C and then were prepared by homogenizer device. IFN-γ, IL-4 and IL-17 were measured in tumor tissue, adjacent tumor tissue, and patients' serum using ELISA technique.

Findings: The concentration of IL-4, IL-17, and IFN-γ were 112.3 ± 15.2, 16.9 ± 2.3, and 14.6 ± 3.8 pg/ml in malignant tissues, respectively. The concentration of IL-4 and IL-17 in tumor tissue, adjacent tumor tissue, and serum of patients with malignant tumors were higher than those with benign tumors.

Conclusion: Our data indicates that elevated IL-4 and IL-17, but not IFN-γ, in tumor microenvironment may affect the malignancy progression.

Keywords: Cytokines, IFN-γ, IL-4, IL-17, Tumor, Breast tumors.

[1] Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan Univrsity of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] General Surgeon, Farokhshar Imam Ali Hospital, Shahrekord, Iran.
[4] General Surgeon, Ayatolahe Kashani Hospital, Shahrekord, Iran.
Corresponding Author: Alireza Andalib PhD, Email: andalib@med.mui.ac.ir