

بررسی بروز گیرنده‌های CCR3، CCR4، CCR5، CXCR3 در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به بدخیمی معده

دکتر علیرضا عندلیب^۱، حسن دولابی^۲، دکتر محمدرضا مرآئی^۳، دکتر عباس رضایی^۲، سید جواد هاشمی‌نیا^۲

چکیده

مقدمه: مقادیر بروز رسپتورهای کموکاین‌ها بر روی سلول‌های ایمنی دارای تنوع است و از آن جایی که بر حسب این تنوع سلول‌های CD4 را به گروه‌های Th1 و Th2 (T helper) تقسیم‌بندی می‌کنند، بنابراین سنجش گروه‌های لنفوسیتی Th1 و Th2 بر حسب بروز مولکول‌های فوق در روند پیشرفت سرطان معده مورد نظر واقع گردید.

روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (peripheral blood mononuclear cell یا PBMC) از نمونه‌ی خون بیست و هفت بیمار مبتلا قبل از عمل جراحی و ۲-۳ ماه پس از عمل و نیز از بیست و هفت نفر فرد سالم گرفته شد. نمونه‌ها برای رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های ضد-CD4، ضد-CCR5 (CC chemokine receptor)، ضد-CXCR3 (CXC chemokine receptor)، ضد-CCR3 و ضد-CCR4 برای سنجش در روش فلوسیتومتری طبق پروتکل‌های استاندارد آماده‌سازی شد.

یافته‌ها: میانگین بروز سلول‌های CD4CCR5 در لنفوسیت‌های T در گروه شاهد $0/9 \pm 1/23$ درصد و در گروه بیماران قبل از عمل $0/34 \pm 0/83$ درصد و پس از عمل $0/74 \pm 1/34$ درصد بود. تفاوت در بروز سلول‌های واجد CCR5 در بیماران قبل و پس از عمل تفاوت معنی‌دار آماری داشت ($P < 0/001$). میانگین بروز سلول‌های CD4CXCR3 در گروه شاهد برابر $8/4 \pm 19/09$ درصد و در گروه بیماران قبل از عمل برابر $5/71 \pm 16/95$ درصد و پس از عمل $9/31 \pm 25/08$ درصد بود. افزایش بروز سلول‌های CXCR3 پس از عمل در لنفوسیت‌های CD4+ نسبت به گروه شاهد و قبل از عمل از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). آنالیز ضریب همبستگی Pearson یک رابطه‌ی مستقل برابر بروز CCR5CXCR3 قبل و بعد از عمل نشان داد (بعد از عمل $r = 0/267$ با $P = 0/177$ و قبل از عمل $r = 0/091$ با $P = 0/513$). میانگین بروز سلول‌های CD4+CCR3+ در افراد شاهد برابر $0/93 \pm 0/75$ درصد و در گروه قبل از عمل برابر $0/46 \pm 0/57$ و بعد از عمل برابر $0/42 \pm 0/62$ بود. تفاوت آماری بین گروه‌ها مشاهده نشد ($P = 0/707$). میانگین بروز سلول‌های CD4 و CCR4 در گروه شاهد برابر $10/36 \pm 26/8$ درصد و در گروه بیماران قبل از عمل برابر $9 \pm 32/29$ درصد و در گروه بعد از عمل برابر $8/76 \pm 31/69$ بود. تفاوت آماری بین گروه بیماران قبل از عمل و گروه شاهد با $P = 0/42$ معنی‌دار بود و در گروه شاهد و گروه بیماران پس از عمل با $P = 0/067$ و بین میانگین بروز در قبل و بعد از عمل با $P = 0/513$ معنی‌دار نبود. ضریب همبستگی Pearson رابطه‌ای بین بروز CCR3 و CCR4 نشان نداد ($r = 0/211$ با $P = 0/126$). تنها دو نوع گیرنده‌ی CCR3 و CCR5 از لحاظ آماری دارای همبستگی معنی‌دار با ضریب $r = 0/321$ و $P = 0/018$ حاصل گردید.

نتیجه‌گیری: بررسی سلول‌های واجد گیرنده‌ها به صورت مجموعه‌ای برای گروه (CD4⁺ CXCR3⁺ CCR5) و Th1 و گروه Th2 بر روی سلول‌ها تابع مقدار حداقلی بروز آنتی‌ژن‌ها است و از لحاظ کمی برای مصارف بالینی قابل توجه نمی‌باشد. به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری CCR4 و CXCR3 در لنفوسیت‌های خون محیطی به دلیل کمیت قابل توجه بروز آن‌ها در جمعیت سلولی جهت بررسی‌های تغییرات Th1 و Th2 در سرطان معده ارزش بالینی بیشتری داشته باشد.

واژگان کلیدی: کانسر معده، کموکاین رسپتور، CCR3، CCR4، CCR5، CXCR3، CD4، Th1، Th2.

مقدمه

خود در بدن ایجاد تعادل هموستاز و اعمال پاسخ‌های مناسب در برخورد با آنتی‌ژن‌های با منشأ خارجی یا داخلی اعمال می‌کند (۱). لنفوسیت‌های TCD4 که

سیستم ایمنی اکتسابی با محوریت لنفوسیت‌های اجرایی و کمکی و ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های

^۱ دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

^۳ دانشیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

غلبه‌ی پاسخ‌های گروه Th1 و ایجاد سایتوکاین‌های مربوطه توسط Luo و همکاران گزارش شده است (۶). ایمونوترابی بیماران مبتلا به بدخیمی پیشرفته‌ی پروستات در جهت کاهش تولید IL-4 توسط PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) و افزایش تولید IL-2 بود که نتایج مطلوبی در جهت کاهش شاخص آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) یا Prostate-specific antigen (Prostate-specific antigen) در بیماران گزارش شده است (۷). گزارش‌های متعدد دیگری در جهت ارزیابی نسبت $Th1/Th2$ در بدن انسان برای ارزیابی وضعیت بدخیمی‌ها انجام می‌شود و تلاش در جهت اعمال تغییر نسبت آن‌ها در جهت غلبه‌ی سلول‌های Th1 در مسیر غلبه بر بدخیمی‌ها بوده است (۸).

ارزیابی Th1 و Th2 در خون با بررسی لنفوسیت‌های PBMC خون پس از استخراج و جداسازی لنفوسیت‌ها و متعاقب آن سنجش سایتوکاین‌ها در سطح پروتئین‌های خارج سلولی و یا داخل سلولی و یا بررسی mRNA در داخل سلول‌ها به صورت مقادیر کمی بیان می‌گردد. این گونه روش‌ها نیاز به زمان به نسبت طولانی به ازای هر سایتوکاین، هزینه‌های قابل توجهی دارد (۹-۱۰).

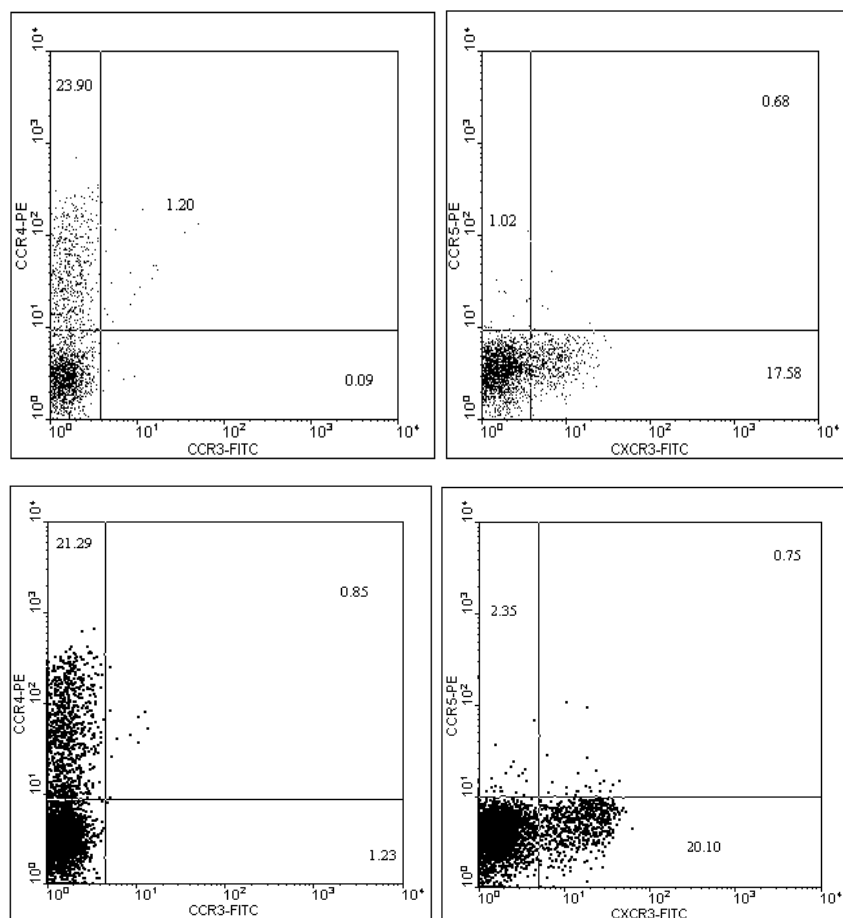
سلول‌های Th1 و Th2 از لنفوسیت‌های Th0 حاصل می‌شوند. سلول‌های Th0 پس از تحریک با سلول‌های دندریتیک (DC) ایمنی و القای سایتوکاین‌های اولیه‌ی محیطی مانند IL-4، IL-10، PGE2 (Prostaglandin E2)، IL-12 به سمت لنفوسیت‌های گروه یک و یا دو یا سایر زیرمجموعه‌های سلولی شیفت می‌کنند (۹). لنفوسیت‌های T پس از تحریک و تولید سایتوکاین‌های متعدد به مراحل نهایی تمایزی در

ترشح سایتوکاینی غالب آن‌ها IL-2 (Interleukin 2) و IFN γ (Interferon γ) است به نام Th1 (T helper) و آن‌هایی که سایتوکاین‌های غالب‌شان IL-10، IL-5 و IL-4 باشد، به نام لنفوسیت‌های گروه دو یا Th2 نامیده می‌شوند. سایتوکاین‌های حاصل از لنفوسیت‌های Th1 ایجاد لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک را تسهیل می‌کند و سایتوکاین‌های سلول‌های Th2 به لنفوسیت‌های B کمک می‌کند تا آنتی‌بادی بسازد (ایمنی همورال) و در این موقعیت فعالیت لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک را سرکوب کند (۳-۲). وجود تعادل در تعداد لنفوسیت‌ها و مقادیر سایتوکاین‌های تولید شده توسط سلول‌های Th1 و Th2 در حالت سلامتی و نیز در برخورد با بعضی از آنتی‌ژن‌ها، شاخص‌هایی را جهت ارزیابی و پیگیری فعالیت سیستم ایمنی در سلامت و بیماری ایجاد می‌نماید. به عنوان مثال نسبت $Th1/Th2$ طبق بررسی Tabata و همکاران در بررسی بدخیمی سیستم گوارشی، به صورت قابل ملاحظه‌ایی در جهت افزایش سلول‌های TCD4+ واجد سایتوکاین‌های IL-4، IL-6 و IL-10 نسبت به گروه افراد سالم مشاهده شده است. در همین گزارش نشان داده شده است که یک ماه پس از برداشتن تومورها این نسبت در جهت کاهش گروه Th2 سیر نموده است (۴).

مشابه همین روند در بدخیمی تخمدان توسط Reinartz و همکاران گزارش شده است که البته پس از انجام درمان واکسیناسیون آنتی‌ایدیوتایپ، با افزایش سایتوکاین‌های IFN γ و IL-2 پاسخ ایمنی در جهت افزایش نسبت گروه Th1 مشاهده شده است (۵). انجام ایمونوترابی بدخیم مثانه با ترکیبی از BCG (Bacillus calmette-guerin) و IFN α جهت ایجاد

سایتوکاینی محیطی به صورت تجربی هم امکان‌پذیر می‌باشد (۸). مارکرهای سطحی سلولی مشخصی که نمایانگر سلول‌های لنفوسیتی در گروه‌های Th1 و Th2 باشد هنوز شناخته نشده است،

زیرمجموعه‌ی سلولی قرار می‌گیرند و نام‌گذاری آن‌ها در گروه‌های ۱ و ۲ پس از تمایز و تولید سیتوکاین‌های گروه‌های مربوط می‌باشد (۱۱). بنابراین سوگیری Th0 در اثر تحریک اولیه و فضای



شکل ۱. نمایانگر پلات نقطه‌ای حاصل از آنالیز نرم‌افزاری فلوسیتومتری از نمونه‌ی **PBMC** بیماران مبتلا به بدخیمی معده است. به طور عموم در این گونه نمودارها هر نقطه حاصل نمایش یک سلول مورد خوانش می‌باشد (گاهی شباهت پارامترهای سلول‌های مشابه باعث برهم قرار گرفتن داده‌ها در صفحه می‌گردد) هر صفحه‌ی دات پلات با دو خط عمود بر هم به چهار خانه تقسیم می‌گردد. نقاط موجود در خانه‌ی چپ پایین نمایانگر کنترل سلولی بدون رنگ‌آمیزی به عنوان استاندارد جمعیت سلولی مورد مطالعه و یا در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به عنوان جمعیت سلولی فاقد پارامترهای به کار برده شده می‌باشد. خانه‌ی چپ بالایی در کنار محور **Y** نمایانگر درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با مارکر متصل به **PE** و از لحاظ **FITC** منفی می‌باشد. خانه‌ی راست پایین نمایانگر درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با مارکر متصل به **FITC** و از لحاظ **PE** منفی می‌باشد. خانه‌ی سمت راست بالا شامل درصد سلول‌هایی است که واجد هر دو مارکر متصل به **PE** و **FITC** یا مثبت دوگانه (**Double Positive**) می‌باشد. پلات‌های ارائه شده به عنوان نماینده‌ی بررسی کموکاین رسپتورهای مطالعه شده بر روی سلول‌های **CD4** نشان داده شده است که درصد سلول‌های حاصل از رنگ‌آمیزی در محاسبات آماری لحاظ و در جداول منعکس شده است.

همین ویژگی در جهت تقویت پاسخ‌هایی که منجر به کاهش حجم یا رشد سلول‌های توموری گردد در ایمونوترابی استفاده می‌گردد (۱۵، ۸، ۱). توزیع و تنوع بروز گیرنده‌های کموکاین بر روی سلول‌های متفاوت نیز متفاوت است. برای مثال سلول‌های دندریتیک ایمنی در مرحله‌ی بلوغ خود گیرنده‌های کموکاینی CCR7 (CC chemokine receptor) و CXCR4 (CXC chemokine receptor) را بیان می‌کند که در حالت غیر بالغ خود فاقد آن‌ها هستند و نیز سلول‌های T بکر واجد بروز CCR7 و CXCR4 هستند ولی در حالت فعال شدن واجد CXCR3 و CXCR5 می‌گردند. به همین روال بیان شده است که سلول‌های Th2 دارای بروز CCR8 و CCR4 می‌باشند (۱۶، ۱۳-۱۲، ۸). بررسی‌های بیشتر نشان داد که بروز گیرنده‌های کموکاین بر روی سلول‌های گروه Th1 با گروه Th2 متفاوت است به عنوان مثال بروز گیرنده‌های کموکاین در لنفوسیت‌های Th1 شامل CCR5، CCR1 و CXCR3 و Th2 شامل CCR4، CCR3، CXCR4 و CCR8 بیان شده است (۱۶).

جنبه‌ی دیگری که از لحاظ محیط ریزمغذی سلول‌های توموری و بافتی که سلول‌های توموری در آن در حال رشد است لازم است مورد نظر واقع شود، آن است که بروز کموکاین و گیرنده‌ی کموکاینی در بافت‌های متفاوت بدن متفاوت است. به عنوان مثال CCL20 و CCL27 در کراتینوسیت‌های اپیدرمال پوستی بروز دارد ولی CX3CL1، CCL25 و CCL20 در بافت روده، CXCL12 در مغز استخوان و CXCL12، CCL21 و CXCL8 در گره‌های لنفی و CXCL12 و CXCL8 در ریه‌ها بیان می‌شود (۱۴-۱۲). بروز این گیرنده‌ها در جایگزینی

بنابراین بررسی سایتوکاین‌های حاصل از فعالیت لنفوسیت‌ها به عنوان شاخص عملکردی و فعالیت سلولی در نظر گرفته می‌شود که سنجش آن پس از مراحل آزمایشگاهی شامل آزمایش‌های ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) یا سنجش mRNA سلولی به روش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) و یا وسترن بلات و یا کشت لنفوسیت‌ها و سنجش مدیاتورهای آن‌ها و مستلزم هزینه و وقت زیادی می‌باشد (۱۰).

کموکاین‌ها مولکول‌های پروتئینی محلولی با وزن مولکولی ۱۴-۸ کیلو دالتون است که مشابه سیتوکاین‌ها توسط سلول‌های مختلف بدن به ویژه سلول‌های ایمنی در پاسخ به محرک‌ها تولید می‌شوند. برای حدود ۵۰ نوع کموکاین شناخته شده تعداد ۲۰ گیرنده شناخته شده است. که ارتباط لیگاند و گیرنده بر روی سلول‌های در تمایز، تکامل، هموستاز سلول‌ها و التهاب نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۲). به طور کلی بیان می‌شود که سلول‌های ایمنی، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتلیال، آندوتلیال و سلول‌های توموری با ترشح کموکاین‌ها و سیتوکاین‌ها و همچنین بروز رگیرنده‌های آن‌ها در تعامل هستند (۱۳-۱۲). در بافت توموری علاوه بر حضور سلول‌های توموری، سلول‌های غیر توموری بافتی مثل فیبروبلاست، اندوتلیال و یا اپیتلیال وجود سلول‌های متنوع ایمنی مثل سلول‌های DC و ماکروفاژ و انواع لنفوسیت‌ها قابل ارزیابی است (۱۴، ۱۲). بیان شده است که مقادیر سایتوکاین و کموکاین حاصل فعالیت انواع سلول‌های موجود در محیط بافتی توموری می‌تواند در سرنوشت بافت توموری مؤثر باشد از

جنسی مشابه بیماران داشتند نیز نمونه‌ی خون گرفته شد و به روش مشابه آماده‌سازی گردید. انجام شمارش سلولی به روش استاندارد از خون گرفته شده در لوله‌ی حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) با دستگاه آنالیزور هماتولوژی اتوماتیک انجام شد. آماده‌سازی نمونه برای خوانش با فلوسیتومتری - خون گرفته شده از بیمار در لوله حاوی EDTA بعنوان آنتی کوآگلانت استفاده می‌گردید. نمونه‌ی خون با همان حجم (PBS یا Phosphate-buffered saline) فسفات بافر ایزوتونیک سرد مخلوط شد و سپس روی شیب چگالی Lympho-prob 1.077 در لوله‌ی فالكون ۵۰ سی‌سی قرار گرفت. پس از انجام سانتریفوژ نمونه در سانتریفوژ یخچال‌دار بدون استفاده از ترمز و مشاهده‌ی سلول‌ها در حد فاصل دو لایه‌ای فایکول، لایه‌ی سلولی جدا شده توسط پیت پاستور جدا شد و در لوله‌ی استریل با بافر Hank's دو بار شستشو داده شد. پس از جداسازی PBMC به تعداد آنتی‌بادی‌های مورد استفاده، شاهد منفی (بدون آنتی‌بادی) و ایزوتایپ موشی نیز جهت شاهد منفی، سلول‌ها در لوله‌های فالكون در ۵۰ میکرولیتر فسفات بافر تقسیم گردید. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مورد اشاره در هر لوله به طور مجزا استفاده شد (۱۸-۱۹).

Anti-human CCR4- phycoerythrin-conjugate mouse
 Monoclonal (isotype, IgG2B clone#205410, from R&D system, USA),
 Anti-human-CCR3-carboxyfluorescein-conjugated monoclonal (isotype, rat IgG2a, colne#61828.111, from R&D system, USA),
 Anti-human CXCR3- carboxyfluorescein-conjugated monoclonal (isotype, mouse IgG1, colne#49801, from R&D system, USA),

لنفوسیت‌ها در بافت‌ها و ایجاد تعامل و پاسخ ایمنی حاصل می‌تواند مؤثر باشد. تأثیرپذیری و تغییر در ترکیب سلول‌های TCD4+ و سایر زیرمجموعه‌های لنفوسیتی در ایمنی اکتسابی علیه تومورها می‌تواند حاصل نوع بافت مبتلا به تومور، نوع و مقادیر سیتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و لنفوسیت‌های موجود در بافت و بالتبع انعکاسی از آن‌ها در خون محیطی باشد (۱۷). بنابراین بررسی ایجاد تغییرات فنوتیپی بر حسب بروز گیرنده‌های سایتوکاینی لنفوسیت‌های گردش خون با توجه به حضور یا عدم حضور توده‌ی بدخیمی دستگاه گوارش و مقایسه‌ی این شاخص‌ها با افراد غیر مبتلا به عنوان یک بررسی تحقیقاتی مورد نظر قرار گرفت (۱۸). با توجه به بررسی فنوتیپی لنفوسیت‌های خون محیطی با دستگاه فلوسیتومتری سرعت بسیار بیشتری نسبت به بررسی سیتوکاین‌های لنفوسیت‌ها با روش‌های دیگر و ایجاد قضاوت در غلبه‌ی گروه‌های Th1 یا Th2 در یک روند ایمنوپاتولوژیک، طرح پژوهشی حاضر را به وجود آورد.

روش‌ها

در این بررسی از ۲۷ نفر از بیماران مبتلا به سرطان معده و دارای پرونده‌ی پزشکی در بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و بیمارستان شریعتی تهران قبل از عمل جراحی و دو تا سه ماه پس از عمل جراحی، ۳ میلی‌لیتر خون گرفته شد و برای انجام آزمایشات مربوطه، رنگ‌آمیزی و آماده‌سازی برای فلوسیتومتری استفاده گردید. در این بررسی نمونه‌های آدنوکارسینومای معده وارد مطالعه شدند و داده‌های سایر تشخیص‌ها وارد مطالعه نگردید. به علاوه از ۲۷ فرد سالم که شرایط سنی و

فلوسیتومتری دتکتورهای نوری FL1 برای شناسایی نورهای بازتابی ۵۳۰ نانومتر طراحی شده است و FL2 برای جذب و شناسایی و تمایز نورهای بازتابی ۵۷۵ نانومتر می‌باشد. دتکتور SSC برای جذب و شناسایی و جمع‌آوری نورهای بازتابی با طول موج ۴۸۸ نانومتر طراحی شده است که مقادیر هر کدام از نورهای جذب شده توسط سیستم رایانه‌ای به صورت گراف‌های نرم‌افزاری و اعداد محاسبه شده منعکس می‌شود که در بررسی‌ها از آنها به صورت داده‌های آماری استفاده می‌شود. (شکل ۱). لوله‌های حاوی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال توسط دستگاه فلوسیتومتری Becton Dickinson-USA و با تعداد $10^4 \times 1$ PBMC خوانش شد. پس از انجام Gating برای سلول‌های CD4 و تعیین مقادیر حاصل، مقادیر محاسبه شده‌ی کموکاین گیرنده‌های نشان‌دار شده ضبط گردید و نتایج به صورت هیستوگرام یا دات بلات جهت مطالعات تکمیلی در فایل‌های مجزا جمع‌آوری گردید (۲۰). اطلاعات حاصل از فلوسیتومتری با استفاده از نرم‌افزار Cellquest تحلیل آماری گردید. داده‌های هر نمونه حاصل از خوانش $10^4 \times 1$ سلول نیز به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز گردید.

نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار برای هر گروه از نمونه‌ها بیان گردید. جهت مقایسه‌ی گروه شاهد با بیماران از آزمون Student-t در نرم‌افزار SPSS استفاده گردید و برای مقایسه‌ی میانگین قبل و بعد از عمل از آزمون Paired-t استفاده شد و برای تعیین ارتباط بین گیرنده‌ها از ضریب همبستگی Pearson استفاده گردیده استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان شاخص معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

Anti-human CCR5-phycoerythrin-conjugated monoclonal (mouse IgG2b, clone#45531, from R&D system, USA)

و یا از Anti-human CCR3-fluorescein به میزان ۱۰ میکرولیتر و یا ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال استفاده شد.

به علاوه از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال PE/Cy5 anti-human-CD4 (isotype mouse IgG2b, clone#okT4) Biologend تهیه شده از شرکت با مشخصات mouse IgG2b برای سنجش CD4 استفاده گردید. از آنتی‌بادی مونوکلونال Carboxyfluorescein (CFS) conjugated mouse IgG1 antibody isotype control (clone 11711) برای سنجش گیرنده‌ها در نمونه‌ی شاهد منفی جهت مقایسه‌ی استاندارد با نمونه‌های رنگ‌آمیزی مثبت و برای اجتناب از تداخلات رنگی (ساخت شرکت R & D) استفاده گردید. تمامی لوله‌های نمونه‌های سلولی پس از اضافه نمودن آنتی‌بادی به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در فویل آلومینیمی (برای اجتناب از نور) در یخچال ۲-۸ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس آنتی‌بادی‌های اضافی و واکنش نداده دوباره با بافر PBS شستشو شدند و نمونه‌ها در ۲۰۰-۴۰۰ میکرولیتر از بافر PBS برای آنالیز فلوسیتومتری استفاده گردید.

برای انجام فلوسیتومتری از فلوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) متصل به مارکرهای ویژه‌ی خوانش با دستگاه فلوسیتومتری استفاده گردید که به دلیل فلورسنت بودن توانایی جذب طیف نوری ۴۸۸ نانومتر و انعکاس طول موج بالاتر از آن را (۵۳۰ نانومتر) دارد. به علاوه از فلوروکروم فیکواریترین (PE) که طیف جذبی متفاوت (۵۷۰ نانومتر) در انعکاس طول موج دارد، برای تمایز مارکرهای رنگ‌آمیزی شده استفاده گردید. در سیستم

یافته‌ها

میانگین گلبول‌های سفید در نمونه‌ی خون بیماران مبتلا به کانسر معده در این بررسی برابر 1916 ± 7406 در میلی‌لیتر و در افراد شاهد برابر 1783 ± 6401 شمارش گردید ($P = 0/051$). شمارش لنفوسیتی در دو گروه نشان داد که نسبت مقادیر لنفوسیت‌ها در گروه بیماران $5/61 \pm 35/03$ درصد یا 734 ± 2588 تعداد در میلی‌لیتر و در گروه شاهد $5/43 \pm 36/77$ درصد یا 840 ± 2343 تعداد در میلی‌لیتر بود ($P = 0/261$). بررسی نسبت جمعیت لنفوسیت‌های TCD4 در گروه بیماران برابر $7/03 \pm 45/40$ درصد و گروه شاهد $6/87 \pm 45/86$ درصد بود که با $P = 0/810$ تفاوت آماری معنی‌داری بین نسبت دو گروه مشاهده نگردید (جدول ۱). مقایسه‌ی مقادیر فوق نشان‌دهنده‌ی افزایش سلول‌های پلی‌مورفونوکلوثر ولی نه در جمعیت لنفوسیتی در گروه بیماران و تأثیر در افزایش جمعیت گلوبول‌های سفید بود.

میانگین سلول‌های واجد بروز CCR5 در جمعیت سلول‌های TCD4 در گروه شاهد برابر $0/9 \pm 1/23$ درصد و در گروه بیماران قبل از عمل برابر $0/34 \pm 0/83$ درصد و در گروه بیماران پس از عمل برابر $0/74 \pm 1/34$ درصد محاسبه گردید. مقایسه‌ی میانگین بین گروه شاهد و بیماران قبل از عمل با $P = 0/034$ و با گروه بیماران پس از عمل با $P = 0/651$ نشان‌دهنده‌ی کاهش معنی‌دار CCR5 در

گروه بیماران قبل از عمل بود. مقایسه‌ی میانگین بروز CCR5 در بیماران قبل و بعد از عمل نشان‌گر اختلاف معنی‌دار در افزایش بروز CCR5 پس از عمل بود ($P \leq 0/001$). بروز CCR5 سلول‌های TCD4 از لحاظ کمیتی قابل توجه نبود (جدول ۲).

میانگین سلول‌های واجد بروز CXCR3 در جمعیت سلول‌های TCD4 در گروه شاهد برابر $8/4 \pm 19/09$ درصد و در گروه بیماران قبل از عمل $5/71 \pm 16/95$ و در گروه بیماران پس از عمل برابر $9/31 \pm 25/08$ سنجش گردید. آنالیز آماری بین میانگین بروز CXCR3 در بیماران قبل از عمل و گروه شاهد با $P = 0/278$ بدون اختلاف آماری و در گروه شاهد و پس از عمل با $P = 0/016$ با تفاوت آماری معنی‌دار نشان‌گر تغییرات بروز پس از عمل بود. به علاوه؛ مقایسه‌ی میانگین بروز در گروه بیماران قبل و پس از عمل با $P < 0/001$ نمایان‌گر اختلاف در بروز CXCR3 در قبل و پس از عمل بود. بنابراین می‌توان بیان نمود که ابتلا به بدخیمی معده در کاهش کلون‌های بروزدهنده‌ی CXCR3 در خون محیطی مؤثر بود. به علاوه ضریب همبستگی Pearson جهت بروز CXCR3 و CCR5 بر روی سلول‌های TCD4 پس از عمل $r = 0/267$ و $P = 0/0177$ و قبل از عمل $r = 0/091$ و $P = 0/513$ بود که نشان‌گر استقلال در بروز این دو گیرنده بر روی سلول‌های TCD4 بود.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار شمارش لنفوسیت‌های و درصد بیان آن‌ها در خون در گروه بیمار و گروه شاهد

درصد لنفوسیت‌های خون TCD4		شمارش لنفوسیت‌های خون TCD4		انحراف معیار \pm میانگین
گروه بیمار	گروه شاهد	گروه بیمار	گروه شاهد	
$45/40 \pm 7/03$	$45/86 \pm 6/87$	1183 ± 418	1009 ± 382	
	0/810		0/115	P مقدار

جدول ۲. مقادیر رسپتورهای کموکاینی در لنفوسیت‌های گروه Th1 در گروه سالم و گروه بیماران قبل و بعد از درمان

Th1						رسپتورهای کموکاینی
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺			CD4 ⁺ CCR5 ⁺			
گروه بیماران بعد از عمل	گروه بیماران قبل از عمل	گروه شاهد	گروه بیماران بعد از عمل	گروه بیماران قبل از عمل	گروه شاهد	گروه‌ها
۲۵/۰۸ ± ۹/۳۱	۱۶/۹۵ ± ۵/۷۱	۱۹/۰۹ ± ۸/۴۰	۱/۳۴ ± ۰/۷۴	۰/۸۳ ± ۰/۳۴	۱/۲۳ ± ۰/۰۹	انحراف معیار ± میانگین
	< ۰/۰۰۱	P1 = ۰/۲۷۸		< ۰/۰۰۱	P1 = ۰/۰۳۴	P مقدار
		P2 = ۰/۰۱۶			P2 = ۰/۰۶۵	

P1 و P2 برای مقایسه‌ی بین مقادیر در موقعیت بین گروه‌ها قبل و بعد از درمان و شاهد می‌باشد

CCR: CC chemokine receptor CXCR: CXC chemokine receptor Th: T helper

جدول ۳. بیان مقادیر گیرنده‌های کموکاینی در لنفوسیت‌های گروه Th2 در گروه سالم و گروه بیماران قبل و بعد از درمان

Th2						رسپتورهای کموکاینی
CD4 ⁺ CCR4			CD4 ⁺ CXCR3 ⁺			
گروه بیماران بعد از عمل	گروه بیماران قبل از عمل	گروه شاهد	گروه بیماران بعد از عمل	گروه بیماران قبل از عمل	گروه شاهد	گروه‌ها
۳۱/۶۹ ± ۸/۷۶	۳۲/۲۹ ± ۹	۲۶/۸ ± ۱۰/۳۶	۰/۶۲ ± ۰/۴۲	۰/۵۷ ± ۰/۴۶	۰/۷۵ ± ۰/۹۳	انحراف معیار ± میانگین
	۰/۵۱۳	P1 = ۰/۰۴۲		۰/۷۰۷	P1 = ۰/۳۷۷	P مقدار
		P2 = ۰/۰۶۷			P2 = ۰/۵۰۷	

P1 و P2 برای مقایسه‌ی بین مقادیر در موقعیت بین گروه‌ها قبل و بعد از درمان و کنترل می‌باشد

Th: T helper CCR: CC chemokine receptor CXCR: CXC chemokine receptor

بالینی می‌تواند کاربردی باشد.

از اهداف اولیه‌ی طرح بررسی توأم بروز CD4+CXCR3+CCR5 (Th1) و CD4+CCR3+CCR4 (Th2) بود. ولی به علت بروز ناچیز CCR5 و CCR3 در هر کدام از گروه‌ها، رنگ‌آمیزی توأم گیرنده‌های کموکاین‌ها با آنتی‌بادی‌های مربوط و خوانش توأم آن‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری، نمایش بیان گیرنده به صورت توأم متناسب با حداقل بروز گیرنده‌ی کموکاین‌ها بروز نمود. همان گونه که در جدول ۴ نشان داده شد، کلیه‌ی مارکرهای اندازه‌گیری شده به صورت توأم هر چند که از لحاظ آماری اعداد قابل محاسبه ایجاد نموده است ولی به دلیل نمایش درصد مارکر تابع حداقل بروز گیرنده‌ی مشترک، این نوع سنجش را فاقد کاربرد بالینی نموده است. آنالیز ضریب همبستگی

مقایسه‌ی بیان گیرنده‌های کموکاینی Th2 در

جدول ۳ نشان داده شده است.

آنالیز آماری نشان‌دهنده‌ی افزایش میزان بروز CCR4 در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد با $P = ۰/۰۴۲$ برای قبل از عمل و با $P = ۰/۰۶۷$ برای پس از عمل محاسبه شد. اختلافی بین بروز این مولکول قبل و بعد از عمل در بیماران مشاهده نگردید ($P = ۰/۵۱۳$). ضریب همبستگی پیرسون بین مقادیر بروز CCR4 و CCR3 در جمعیت سلول‌های TCD⁺4 نشان‌دهنده‌ی مستقل بودن بیان این دو گیرنده در سلول‌ها بود ($r = ۰/۲۱۱$ با $P = ۰/۱۲۶$) و ($r = ۰/۲۵۵$) با $P = ۰/۲۵۹$ بود. نتایج این بررسی نشان داد که به دلیل بروز ناچیز CCR3 در جمعیت سلول‌ها در اهداف بالینی از آن‌ها نمی‌توان استفاده نمود ولی بروز CCR4 قابل توجه است و جهت ارزیابی‌های بیشتر

بحث

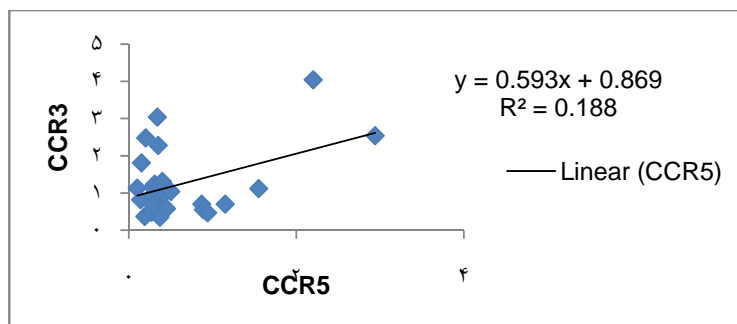
لنفوسیت‌های T بخشی از سیستم ایمنی اکتسابی هستند که کلون‌هایی از آن‌ها پس از شناسایی آنتی‌ژن‌های توموری می‌تواند علیه تومور فعال شود و هم در گردش خون و هم در بافت‌های لنفاوی ثانویه به صورت تنوعی از زیرمجموعه‌های لنفوسیتی قابل

بین گروه‌های گیرنده‌ی کموکاین‌های سنجش شده فقط برای CCR3 و CCR5 نقش مثبت همبستگی را نشان داد ($r = 0/321$ با $P = 0/018$) (شکل ۲). همچنین آنالیز همبستگی Pearson در گروه پس از درمان رابطه‌ی آماری معنی‌داری (معکوس) بین بروز CCR4 و CCR5 را نشان داد ($r = 0/401$ با $P = 0/038$) (شکل ۳).

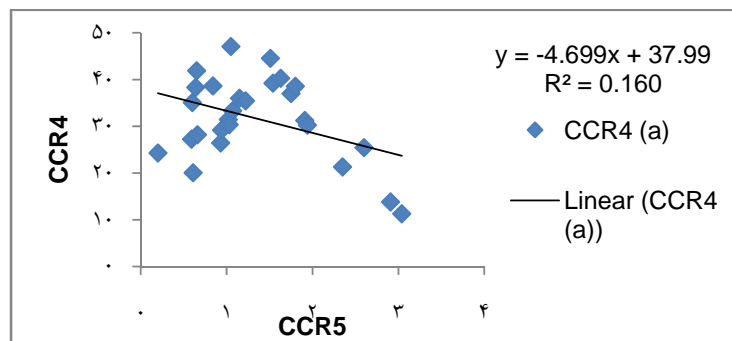
جدول ۴. نشاندهنده بیان مقادیر رسپتورهای کموکاینی در لنفوسیت‌های گروه Th1 و Th2 بطور توأم در گروه‌ها میباشد.

Th2 CD4 ⁺ CCR3 ⁺ CCR4 ⁺		Th1 CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR5 ⁺		رسپتورهای کموکاینی گروه‌ها
گروه بیماران قبل از عمل	گروه بیماران بعد از عمل	گروه بیماران قبل از عمل	گروه بیماران بعد از عمل	
1/27 ± 0/66	1/57 ± 0/83	1/60 ± 1/05	1/57 ± 0/67	انحراف معیار ± میانگین
	< 0/001	P1 = 0/336	< 0/001	مقدار P
		P2 = 0/080	P2 = 0/014	

P1 و P2 برای مقایسه بین مقادیر در موقعیت بین گروه‌ها قبل و بعد از درمان و کنترل می‌باشد



شکل ۲. همبستگی کموکاین رسپتورهای CCR5 و CCR3



شکل ۳. همبستگی کموکاین رسپتورهای CCR5 و CCR4

سلولی مطلق در بدن است. چنان چه در بررسی Asano و همکاران بررسی الگوی کموکاینی CXCR3 و CXCR4 در طبقه‌بندی Th1 و Th2 به عنوان مدلی برای شاخص‌های بررسی بدخیمی بیان شده است (۲۵).

در بررسی حاضر Th1 و Th2 بر حسب گیرنده‌های کموکاینی (CD4CCR3, CCR4) در Th2 و CD4+، CXCR3+ و CCR5 در Th1 تفاوت آماری قابل ملاحظه‌ای بین میانگین بروز آن‌ها در گروه بیماران قبل و بعد از عمل گاستروکتومی با $P < 0/001$ برای Th1 و $P < 0/001$ نیز برای Th2 حاصل گردید (جدول ۴) که نشان‌گر تغییرات فنوتیپی کلون‌هایی از سلول‌های TCD4 در گردش خون است که تغییرات جمعیتی آن‌ها نتوانسته بود در جمعیت مطلق سلولی تأثیر آماری قابل سنجشی را نشان دهد، ولی روش ارزیابی فنوتیپی توانست نشان‌دهنده‌ی تغییرات سلولی گردش خون (از لحاظ کلون‌ها) در افراد مبتلا به بدخیمی معده باشد.

بررسی مقادیر بروز گیرنده‌های کموکاینی Th1 در مرحله‌ی ابتلا به کانسر معده در گردش خون نشان دهنده‌ی کاهش کلون‌های واجد Th1 در خون در مقایسه با گروه شاهد بود. داده‌های حاصل پس از عمل گاستروکتومی نشان‌دهنده‌ی افزایش فنوتیپی کلون‌های لنفوسیتی Th1 در خون محیطی در مقایسه با گروه شاهد و نیز قبل از عمل بود که با تفاوت آماری $P = 0/014$ در جدول ۴ به خوبی مشخص است. افزایش پتانسیل Th1 با گزینش فنوتیپ CCR3 در ارتقای ضد توموری در تحقیق Yoon و همکاران نیز منعکس است (۲۶).

این یافته‌ها در راستای تغییرات فنوتیپی و یا سیتوکاینی سلول‌های Th1 در سایر تومورها بوده است

شناسایی هستند. آنتی‌ژن‌های توموری در بافت‌ها و غدد لنفاوی توسط سلول‌های DC پردازش می‌شوند و سلول‌های DC لنفوسیت‌های بکر را به صورت سلول‌های اجرایی و حافظه‌ای بسیج می‌نمایند. جمعیت سلولی، تنوع و ترکیب سیتوکاینی و کموکاینی و گیرنده‌ی آن‌ها در فعالیت و تعامل با سلول‌های توموری که خود با بروز کموکاین، سیتوکاین و گیرنده‌هایشان محیط ریزمغذی برای تومور فراهم می‌کنند و در سرنوشت تومور مؤثر هستند (۲۳-۲۱).

در بررسی حاضر جمعیت لنفوسیتی خون در گروه مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد تفاوت آماری نشان نداد و با این که شمارش جمعیت WBC (White blood cell) خون دو گروه متفاوت و به حد تفاوت آماری رسیده بود ($P = 0/051$) نشان‌دهنده‌ی افزایش جمعیت لکوسیت‌های خون به غیر از جمعیت لنفوسیت‌ها در خون محیطی بود. جمعیت لنفوسیت‌های TCD4 نیز در خون افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم نیز با این که از لحاظ عددی بالاتر بود ولی تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. این یافته‌ها به خوبی نشان می‌دهد که سیستم هموستاز بدن نسبت به تغییرات شدید جمعیت لنفوسیتی به سوی تعادل حرکت می‌کند و از آن جایی که فقط درصد کمی (۲ درصد) از جمعیت لنفوسیتی بدن در گردش خون است و ۴۰ درصد در غدد لنفاوی و بقیه در سایر بافت‌ها توزیع دارد (۲۴)، بنابراین بررسی فنوتیپی جمعیت لنفوسیتی برای پی بردن به نحوه‌ی عملکرد آن‌ها و حضور کلون‌های فعال شده و در نظر گرفتن گردش بین خون و بافت‌های آن‌ها راهی در مسیر برون‌رفت از قضاوت‌های عادی در مورد جمعیت

این نیز با Stage تومور و سطوح سرمی IL-6, IL-10 و IL-4 همبستگی مثبت و با مقادیر IL-2 و IFN γ همبستگی منفی داشته است و به خوبی نشان‌دهنده‌ی تقویت بازوی ایمنی Th2 در این گونه تومورها است (۳۰). کارهای مشابه دیگران نیز شیفت Th1 به سوی Th2 را در محیط رشد تومورها نشان داده است (۱۹).

در بررسی حاضر مقایسه‌ی تغییرات گیرنده‌های کموکاین CXCR و CCR5 در گروه Th1 در بیماران قبل و بعد از عمل به طور اختصاصی نشان می‌دهد که کمیت بروز CXCR3 در جمعیت لنفوسیت‌ها واجد مقادیر قابل توجهی نسبت به بروز CCR5 در روی سلول‌های TCD⁺4 می‌باشد. بنابراین جهت مصارف بالینی استفاده از CXCR3 قابل قبول‌تر از CCR5 می‌باشد. چنان چه داده‌ها نشان می‌دهد تغییرات فنوتیپی CCR5 پس از عمل در جهت گروه شاهد افزایش داشت و تفاوت آماری در میانگین بروز CCR5 در قبل و بعد از عمل وجود داشت. افزایش بروز CXCR3 در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران پس از عمل جراحی در مقایسه با قبل از عمل با اختلاف آماری معنی‌دار و گروه شاهد نیز با تفاوت آماری معنی‌دار نشانه‌ی افزایش نسبت کلون‌های Th1 در جمعیت سلولی WBC خون بود.

تغییرات فنوتیپی CCR3 در گروه Th2 هر چند که از لحاظ کمیت قابل توجه نبود و با این که تغییرات بروز آن در سلول‌های TCD4 مشاهده شد ولی احتمال دارد که کاهش جمعیت سلولی واجد CCR3 در بررسی‌های بالینی کاربرد نداشته باشد، ولی همچنان در روش‌های تحقیقاتی ممکن است قابل توجه باشد. هر چند که تفاوت‌های بروز آن در قبل و بعد از عمل تفاوت آماری نداشت. بروز CCR4 در گروه Th2 از

که هم در سنجش Th1 در بافت‌های توموری و هم در گردش خون و هم در روند بهبودی پس از ایمونوتراپی‌ها مشاهده شده است. تحقیقات متعددی حتی با روش‌های ژنتیکی سایتوکاین‌های شاخص Th1 و Th2 و استفاده از روش وسترن بلات نشان‌دهنده‌ی غالب بودن کلون‌های Th2 در بدخیمی‌های معده بوده است (۱۰) که از این جنبه روش بررسی حاضر با توجه به فنوتیپ گیرنده‌های کموکاین‌های سنجش شده در یک راستا قرار دارد.

روند بررسی فنوتیپ گیرنده‌های کموکاینی در لنفوسیت‌های (CD4+CCR3+CCR4) Th2 در گردش خون بیماران نشان‌دهنده‌ی کاهش درصد میانگین فنوتیپ‌های Th2 پس از عمل جراحی بدخیمی معده بود. مشابه همین نتیجه در تحقیق Ishikawa و همکاران منعکس شده است (۲۷).

فنوتیپ Th2 در گردش خون نتوانست تفاوت آماری قابل ملاحظه‌ای در گروه بیماران قبل و بعد از عمل جراحی با گروه شاهد نشان دهد که شاید اگر هم تفاوتی در سایر گزارش‌ها وجود دارد مربوط به وجود و حضور سلول‌های Th2 در موقعیت بافتی تومور (Microenvironment) است و انعکاس آن در جمعیت فراوان سلول‌های گردش خون دور از انتظار نیست. چنین تغییر در تعادل Th2 در محیط بافت‌های توموری و نیز پس از عمل در کارهای Tabate punoen و Pellegrini دیده شده است (۲۹-۲۸، ۴).

بررسی کلون‌هایی از لنفوسیت‌های T تحت تأثیر بدخیمی دستگاه گوارش توسط Berghella و همکاران نشان داد که سطح sIL-2R در سرم بیماران مبتلا به کانسر کولون بیشتر از گروه شاهد سالم بوده است که

سلول‌های TCD4 به صورت مستقل از همدیگر است و بنابراین تغییرات فنوتیپی آن‌ها در لنفوسیت‌های گروه Th1 و Th2 به صورت مستقل انجام می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با شماره‌ی ثبت ۱۸۶۰۹۸ در سال ۱۳۸۷-۱۳۸۸ انجام گردید. از خانم دکتر مژگان مختاری (پاتولوژیست) و خانم دکتر شادی بابازاده (اونکولوژیست) جهت مشاوره‌ی سرطان‌شناسی بالینی قدردانی می‌گردد.

لحاظ کمیت بیان بر روی سلول‌های TCD4⁺ نیز قابل توجه بود. هر چند که تفاوتی در گروه بیماران قبل و بعد از عمل نداشت ولی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار داشت. استقلال در بروز هر کدام از گیرنده‌های کموکاین در سلول‌های TCD4 جنبه‌ی دیگری از بررسی ما را تشکیل داد. بررسی ضریب همبستگی Pearson نشان داد که فقط کموکاین رسپتورهای CCR3 با CCR5 دارای همبستگی مثبت و CCR4 با CCR5 دارای همبستگی منفی در گروه پس از عمل بود. بروز سایر کموکاین گیرنده‌ها بر روی

References

- Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, Chatta G, et al. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(3): 333-56.
- Viola A, Contento RL, Molon B. T cells and their partners: The chemokine dating agency. *Trends Immunol* 2006; 27(9): 421-7.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19(12): 568-74.
- Tabata T, Hazama S, Yoshino S, Oka M. Th2 subset dominance among peripheral blood T lymphocytes in patients with digestive cancers. *Am J Surg* 1999; 177(3): 203-8.
- Reinartz S, Boerner H, Koehler S, Von RA, Schlebusch H, Wagner U. Evaluation of immunological responses in patients with ovarian cancer treated with the anti-idiotype vaccine ACA125 by determination of intracellular cytokines--a preliminary report. *Hybridoma* 1999; 18(1): 41-5.
- Luo Y, Chen X, Downs TM, DeWolf WC, O'Donnell MA. IFN-alpha 2B enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer patients receiving Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Immunol* 1999; 162(4): 2399-405.
- Hrouda D, Baban B, Dunsmuir WD, Kirby RS, Dalglish AG. Immunotherapy of advanced prostate cancer: a phase I/II trial using Mycobacterium vaccae (SRL172). *Br J Urol* 1998; 82(4): 568-73.
- 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.
- De ST, Van MM, De BG, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27(5): 1229-35.
- Yang P, Qiu G, Wang S, Su Z, Chen J, Wang S, et al. The mutations of Th1 cell-specific T-box transcription factor may be associated with a predominant Th2 phenotype in gastric cancers. *Int J Immunogenet* 2010; 37(2): 111-5.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3): 138-46.
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 2007; 256(2): 137-65.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820.
- Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer* 2007; 109(12): 2392-404.
- Sugasawa H, Ichikura T, Kinoshita M, Ono S, Majima T, Tsujimoto H, et al. Gastric cancer cells exploit CD4⁺ cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8⁺ cell-involved tumor elimination. *Int J Cancer* 2008; 122(11): 2535-41.
- Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. United States:

- Garland Science; 2011.
17. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 1999; 190(5): 617-27.
 18. Fujii K, Sonoda K, Izumi K, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. T lymphocyte subsets and Th1/Th2 balance after laparoscopy-assisted distal gastrectomy. *Surg Endosc* 2003; 17(9): 1440-4.
 19. Liu XL, Gao J, Han CZ, Qiao LJ. Pre- and post-chemotherapy expressions of Th1 and Th2 type cytokines and their clinical significance in gastric cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2008; 30(11): 844-7. [In Chinese]
 20. Macey GM. *Flow Cytometry: Principles and Applications*. New York, NY: Humana Press; 2007.
 21. Cavallo F, Curcio C, Forni G. Immunotherapy and immunoprevention of cancer: where do we stand? *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(5): 717-26.
 22. Negus RP, Stamp GW, Hadley J, Balkwill FR. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am J Pathol* 1997; 150(5): 1723-34.
 23. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112(5): 1557-69.
 24. Paul EW. *Fundamental Immunology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2008.
 25. Asano N, Suzuki R, Ohshima K, Kagami Y, Ishida F, Yoshino T, et al. Linkage of expression of chemokine receptors (CXCR3 and CCR4) and cytotoxic molecules in peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified and ALK-negative anaplastic large cell lymphoma. *Int J Hematol* 2010; 91(3): 426-35.
 26. Yoon SH, Yun SO, Park JY, Won HY, Kim EK, Sohn HJ, et al. Selective addition of CXCR3(+) CCR4(-) CD4(+) Th1 cells enhances generation of cytotoxic T cells by dendritic cells in vitro. *Exp Mol Med* 2009; 41(3): 161-70.
 27. Ishikawa M, Nishioka M, Hanaki N, Miyauchi T, Kashiwagi Y, Ioki H, et al. Perioperative immune responses in cancer patients undergoing digestive surgeries. *World J Surg Oncol* 2009; 7: 7.
 28. Pellegrini P, Berghella AM, Del BT, Cicia S, Adorno D, Casciani CU. Disregulation in Th1 and Th2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 42(1): 1-8.
 29. Pellegrini P, Contasta I, Berghella AM, Del BT, Casciani CU, Adorno D. The Th1 and Th2 cytokine network in healthy subjects: suggestions for experimental studies to create prognostic and diagnostic indices for biotherapeutic treatments. *Cancer Biother Radiopharm* 2000; 15(3): 267-78.
 30. Berghella AM, Pellegrini P, Del BT, Marini M, Tomei E, Adorno D, et al. The significance of an increase in soluble interleukin-2 receptor level in colorectal cancer and its biological regulating role in the physiological switching of the immune response cytokine network from Th1 to Th2 and back. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 45(5): 241-9.

A Study of CD4, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR3 Expression in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Gastric Cancer

Alireza Andalib PhD¹, Hassan Dolabi², Abbas Rezaei PhD², Mohamad Reza Maracy PhD³,
Seyed Javad Hasheminia MSc²

Abstract

Background: Based on the different expression of chemokine receptors in immune cells, we hypothesized that there would be an alteration in the relative expression of these receptors by T helper cells (Th1 and Th2) during the progression of a malignancy.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 27 patients and 27 controls were studied. The percentage of CD4⁺ T cells expressing chemokine receptors (before and after gastrectomy) was determined by flow cytometry using anti-CD4 and one of the following chemokine receptor antibodies: anti-CC chemokine receptor (CCR) type 5 (CCR5), anti-CXC chemokine receptor 3 (CXCR3), anti-CCR3 and anti-CCR4.

Findings: The mean percentage of CD4/CCR5 expressing cells was $1.23 \pm 0.90\%$, $0.83 \pm 0.34\%$, and $1.34 \pm 0.74\%$ in control, and pre- and post-operation groups, respectively. The expressing cells were different between pre- and post-gastrectomy groups ($P = 0.001$). The expression of CD4/CXCR3 cells in control, and pre- and post-operation groups were $19.09 \pm 8.40\%$, $16.95 \pm 5.71\%$, and $25.08 \pm 9.31\%$, respectively. The expression of CXCR3 cells increased significantly in patients after operation ($P = 0.001$). Pearson's correlation analysis showed an independent correlation between CCR5 and CXCR3 expression before and after the operation ($r = -0.091$; $P = 0.513$ before operation and $r = 0.0267$; $P = 0.0177$ after operation). The expression of CD4/CCR3 cells in control, and pre- and post-operation groups were $0.75 \pm 0.93\%$, $0.57 \pm 0.46\%$, and $0.62 \pm 0.42\%$, respectively with no difference between pre- and post-operation groups ($P = 0.707$). The corresponding values for CD4/CCR4 cells were $26.80 \pm 10.36\%$, $32.29 \pm 9.00\%$, and $31.69 \pm 8.76\%$. While a significant difference was observed between control and pre-treatment groups ($P = 0.042$), differences between post-operation and control groups ($P = 0.067$) and pre- and post-operation groups ($P = 0.513$) were not significant. Pearson's correlation analysis showed no relationship between CCR3 and CCR4 expression ($r = 0.211$; $P = 0.126$). The only significant correlation was detected between CCR3 and CCR5 ($r = 0.321$; $P = 0.018$).

Conclusion: Due to low expression of CCR5 in Th1 cells and CCR3 in Th2 cells, these receptors are not appropriate for clinical evaluation. On the other hand, CXCR3 and CCR4 seem to be more valuable in clinical assessments of gastric cancer.

Keywords: Gastric cancer, Chemokine receptors, CC chemokine receptor, T helper cells, CXC chemokine receptor.

¹ Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Associate Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Alireza Andalib PhD, Email: andalib@med.mui.ac.ir