

# بررسی مقادیر سرمی اینترفرون گاما، اینترلوکین ۱۲ و درصد سلولهای ایمنی CD8، CD4 و NK در زنان مبتلا به سرطان پستان متاستاتیک، غیرمتاستاتیک و افراد سالم

## چکیده

**زمینه و هدف:** سیستم ایمنی، توانایی پاسخ به بسیاری از تومورها را داراست. علاوه بر این، سایتوکین‌هایی نظیر اینترلوکین ۱۲ (Interleukin IL-12) و اینترفرون گاما (Interferon-IFN- $\gamma$ ) در ایمنی تومورها شرکت دارند و دارای اثرات ضدتوموری موثری می‌باشند. IL-12 سبب تمایز سلولهای T<sub>H</sub>1 و تولید IFN- $\gamma$  می‌گردد. IFN- $\gamma$  نیز بر تولید IL-12 از سلولهای فاگوسیتی می‌افزاید، علاوه بر ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی نقش مهمی دارد. در این مطالعه مقادیر سرمی IL-12 و IFN- $\gamma$  و درصد سلولهای تولید کننده IFN- $\gamma$  [لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup> و CD8<sup>+</sup> و سلولهای NK (Natural Killer cells)] در مبتلایان به سرطان پستان غیرمتاستاتیک و متاستاتیک و افراد بظاهر سالم، به منظور یافتن ارتباط مقادیر آنها با بروز بیماری و گسترش آن، بررسی و مقایسه شده است. علاوه بر این، با شمارش سلولهای تولید کننده این سایتوکین‌ها مشخص شد که تغییر احتمالی در مقادیر سایتوکین، مربوط به تغییر در تعداد این سلولها است یا عملکرد آنها تحت تاثیر بوده است.

**روش بررسی:** از ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان قبل از درمان که به بیمارستان‌های دکتر شریعتی و دی مراجعه کرده بودند، بعد از تکمیل فرمهای اطلاعاتی، نمونه‌گیری شد و نمونه‌های خون تام و سرم برای انجام آزمایشات به گروه ایمونولوژی منتقل گردید. بیماران براساس Stage بیماری به دو گروه غیرمتاستاتیک (Stage I, II) شامل ۳۰ بیمار و متاستاتیک (Stage III, IV) شامل ۲۰ بیمار تقسیم شدند، همچنین ۲۶ فرد بظاهر سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. مقادیر سرمی سایتوکین‌ها، به روش الایزا و درصد سلولها، به روش فلوسایتومتری و به کمک آنتی‌بادی‌های دو رنگی بر ضد شاخص‌های CD4/CD8 و CD3/CD16+CD56 تعیین شد. نوع مطالعه، توصیفی از نوع مقطعی مقایسه‌ای است. نتایج یافته‌های پارامتریک، با آزمون One way Anova و یافته‌های غیرپارامتریک، با آزمون Mann whitney و kruskal wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** مقادیر سرمی اینترلوکین ۱۲ در گروه متاستاتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۱۷) و مقادیر اینترفرون گاما در بیماران، در همان محدوده گروه کنترل بود. درصد لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup> خون محیطی در بیماران گروه غیرمتاستاتیک و متاستاتیک در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (به ترتیب P برابر ۰/۰۲۲ و ۰/۰۲۷) ولی درصد لنفوسیت‌های CD8<sup>+</sup> و سلولهای NK تفاوت معنی‌داری نداشت.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهد که با وجود کاهش درصد لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup> در بیماران، به علت فعال شدن سیستم هومئوستاز جبرانی و افزایش مقادیر IL-12، در مقادیر IFN- $\gamma$  تغییری ایجاد نشده بود، لذا به نظر می‌رسد که افزایش مقادیر سرمی IL-12 با پیشرفت بیماری مرتبط باشد ولی مقادیر سرمی IFN- $\gamma$  در پیشرفت بیماری تاثیر قابل توجهی نداشته باشد. پاسخ ایمنی سلولی در این بیماران در مقایسه با افراد بظاهر سالم، اختلال و نقص مهمی را نشان نداد.

**کلیدواژه‌ها:** ۱- سایتوکین ۲- سلولهای T<sub>H</sub>1 ۳- سرطان پستان متاستاتیک ۴- سرطان پستان غیرمتاستاتیک  
۵- اینترلوکین ۱۲ ۶- اینترفرون گاما

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۲۶، تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۲۷

- (I) دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (\*مؤلف مسؤول).
- (II) استادیار و فوق تخصص هماتولوژی - انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، تهران، ایران.
- (III) دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.
- (IV) استاد گروه جراحی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران و متخصص جراحی عمومی و جراحی سرطان، بیمارستان دی، تهران، خیابان ولی‌عصر، نبش خیابان توانیر، تهران، ایران.
- (V) کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.
- (VI) کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز آموزش تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.
- (VII) لیسانس بیولوژی، کارشناس آزمایشگاه، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

## مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در زنان بوده و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه می‌باشد. تشخیص زودهنگام و به دنبال آن، روشهای درمانی مناسب، در کنترل پیشرفت بیماری و کاهش مرگ و میر ناشی از آن تاثیر بسزایی دارد.<sup>(۱،۲)</sup> بعلاوه شناخت مکانیسم‌های محافظتی ایمنی و بررسی وضعیت آنها در مراحل مختلف بیماری، مدتهاست توجه محققین را به خود جلب کرده است، بطوری که براساس نظریه ویرایش ایمنی (Immunoediting) که شامل سه مرحله حذف، تعادل و گریز است، سلولها و سایتوکین‌های ایمنی ذاتی و آدپتیو نقش مهمی در حذف و از بین بردن سلولهای سرطانی دارند که در واقع مؤید همان نظریه پیشین مراقبت ایمنی است. براساس این تئوری، در مرحله تعادل، سلولهای توموری با تغییرات و موتاسیون‌های بیش‌تر به انواع جدیدی تبدیل شده که مقاوم‌تر هستند و در نهایت در مرحله گریز، از مکانیسم‌های دفاعی سیستم ایمنی فرار می‌کنند.<sup>(۳)</sup>

از جمله سایتوکین‌های مؤثر در مرحله حذف، IL-12 و IFN- $\gamma$  می‌باشد. IFN- $\gamma$ ، پروتئین همودایمری است که توسط سلولهای ایمنی ذاتی از قبیل سلولهای NK و سلولهای ایمنی آدپتیو مثل لنفوسیت‌های  $T_H1$  ( $CD4^+$ ) و  $CD8^+$  تولید می‌شود. سلولهای NK، منبع اصلی تولید IFN- $\gamma$  طی مراحل اولیه پاسخ ایمنی می‌باشند که سبب تحریک تولید IL-12 از ماکروفاژها می‌گردد که این سایتوکین هم، بر تولید IFN- $\gamma$  از سلولهای NK می‌افزاید؛ بنابراین مقادیر فراوانی از IFN- $\gamma$  حتی قبل از شروع ایمنی آدپتیو تولید می‌شود. تولید IFN- $\gamma$  از سلولهای T نیز توسط سایتوکین IL-12 القاء می‌گردد. نقش محافظتی IFN- $\gamma$  در بسیاری از تومورها تأیید شده، بطوری که IFN- $\gamma$  بر تعداد زیادی از سلولهای توموری که دارای گیرنده هستند، اثر ضدتکثیری و القاء آپوپتوز دارد که این عمل وابسته به فعال نمودن مسیر انتقال سیگنال STAT1 (Signal transducers and activators of transcription) می‌باشد؛ بعلاوه IFN- $\gamma$  با مهار رگ‌سازی می‌تواند مانع گسترش تومورها شود، بطوری که سبب القاء تولید

کموکاین‌های IP10 (Interferon inducible protein) و Mig (Monokine induced by interferon  $\gamma$ ) که در مهار رگ‌سازی نقش مهمی دارند، می‌شود. همچنین با فعال نمودن ماکروفاژها سبب افزایش فعالیت فاگوسیتوز و تولید IL-12 می‌گردد. IFN- $\gamma$  با افزایش بیان TAP1 (Transporter associated with antigen processing) در تومورهای دارای گیرنده IFN- $\gamma$  سبب افزایش بیان MHC کلاس I شده و بدین ترتیب سبب افزایش عملکرد سلولهای  $CD8^+$  T که نقش مهمی در از بین بردن تومور دارند، می‌شود و بدین ترتیب سبب تقویت ایمنی آدپتیو می‌گردد.<sup>(۴)</sup>

IL-12 به صورت هتروداایمری متشکل از زیر واحدهای ۳۵ و ۴۰ کیلودالتون است که با پیوند دی‌سولفیدی به همدیگر متصل شده‌اند. منابع اصلی IL-12، فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای فعال شده و سلولهای دندریتی هستند. IL-12 در ابتدای روند پاسخ‌هایی که ماکروفاژها، سلولهای NK و لنفوسیت‌های T را درگیر می‌کنند، نقش مهمی در مراقبت ایمنی دارد، بطوری که تولید IFN- $\gamma$  از سلولهای NK و لنفوسیت‌های T را تحریک می‌کند؛ بعلاوه اعمال سایتولیتیک سلولهای NK تقویت شده و لنفوسیت‌های T سایتولیتیک  $CD8^+$  را افزایش می‌دهد که این اثر IL-12، نقش مهمی در ایمنی تومورها دارد، همچنین تمایز لنفوسیت‌های T یاریگر  $CD4^+$  به سلولهای  $T_H1$  تولید کننده IFN- $\gamma$  را تحریک می‌کند. در واقع IL-12 در توسعه پاسخ  $T_H1$  و تعادل  $T_H1/T_H2$  به نفع سلولهای  $T_H1$ ، نقش مهمی ایفا می‌کند.

با توجه به نقش ضدتوموری سایتوکین‌های IL-12 و IFN- $\gamma$  و از طرفی با توجه به امکان فرار تومورها از دسترس سیستم ایمنی، در این مطالعه به منظور بررسی تأثیر تغییر در مقادیر این سایتوکین‌ها در ایجاد یا پیشرفت بیماری، مقادیر سرمی این دو سایتوکین در زنان مبتلا به سرطان پستان متاستاتیک، غیرمتاستاتیک (قبل از شروع شیمی درمانی یا پرتودرمانی) و افراد بظاهر سالم مقایسه شد. همچنین با شمارش لنفوسیت‌های  $CD4^+$  و  $CD8^+$  و سلولهای NK ( $CD16^+CD56^+$ ) در خون محیطی، به تعداد این سلولها در گروه‌های مذکور پی برده شد. از آنجایی که هر سه این

صورت گرفت. آنتی‌بادی ضد CD4 متصل به FITC (Fluorescein isothiocyanate)، جهت تعیین درصد لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup> و آنتی‌بادی ضد CD8<sup>+</sup> متصل به PE (Phycoerythrin)، جهت تعیین درصد لنفوسیت‌های CD8<sup>+</sup>، همچنین آنتی‌بادی ضد CD3 متصل به FITC و آنتی‌بادی ضد CD16 و ضد CD56 متصل به PE، جهت تعیین درصد سلولهای NK بکار رفت، در ضمن از آنتی‌بادی IgG مونوکلونال دورنگی به عنوان کنترل منفی جهت رنگ‌آمیزی غیراختصاصی استفاده گردید. مقادیر سرمی سایتوکین‌های IL-12(P70+P40) و IFN $\gamma$ ، به روش الیزا و با استفاده از کیت کمپانی BIOSOURCE انجام گردید و مقادیر سرمی شاخص‌های توموری CEA و CA15-3 نیز به روش الیزا و با استفاده از کیت کمپانی Can Ag، جهت تایید بر ابتلا و گسترش بیماری و افزودن اطلاعاتی در رابطه با این شاخص‌های توموری صورت گرفت.

برای تحلیل نتایج، از آزمون‌های آماری پارامتریک One Way Anova و غیرپارامتریک Kruskal-Wallis و Mann-Whitney استفاده شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده گردید.

#### یافته‌ها

مقادیر سرمی IL-12 گروه متاستاتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۱۷) ولی در گروه‌های دیگر تفاوت معنی‌داری دیده نشد. مقادیر سرمی IFN $\gamma$  بیماران، در همان محدوده گروه کنترل بود و تفاوتی نداشت. جدول شماره ۱، میانگین و انحراف معیار مقادیر سرمی سایتوکین‌های IL-12 و IFN $\gamma$  را نشان می‌دهد.

**جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار مقادیر سایتوکین‌ها در**

گروه‌های مورد مطالعه			
مقادیر سایتوکین	IL-12 (pg/ml)		IFN $\gamma$ (pg/ml)
	میانگین	انحراف معیار	میانگین انحراف معیار
کنترل	۷۹/۸۷	۵۱/۲۰	۲/۹۸
غیرمتاستاتیک	۹۳/۹۳	۶۳/۱۸	۲/۷۵
متاستاتیک	۱۳۲/۵۲	۶۵/۹۰	۲/۶۸

سلولها منابع اصلی تولید IFN $\gamma$  می‌باشند، با شمارش این سلولها معلوم می‌شود که تغییر احتمالی در مقادیر سایتوکین، مربوط به تغییر در تعداد آنهاست یا عملکرد این سلولها تحت تاثیر بوده است. بعلاوه از آنجایی IFN $\gamma$ ، سایتوکین اصلی سلول T<sub>H</sub>1 است و نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد، با اندازه‌گیری آن تا حدودی وضعیت پاسخ ایمنی سلولی در بیماران مشخص می‌گردد.

#### روش بررسی

در مجموع ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان که قبل از شروع درمان (شیمی درمانی یا پرتودرمانی)، به بخش آنکولوژی و جراحی بیمارستان دکتر شریعتی یا بخش جراحی بیمارستان دی مراجعه نموده بودند، به عنوان گروه بیمار انتخاب شدند. هیچ کدام از افراد، مبتلا به بیماری عفونی یا دیگر بیماری‌های خاص نبوده و داروی سرکوبگر سیستم ایمنی نیز مصرف نکرده بودند.

بیماران براساس Stage به دو گروه تقسیم شدند، بطوری که ۳۰ بیمار در Stage I, II، به عنوان گروه غیرمتاستاتیک (با میانگین سنی ۴۴/۴±۹/۰ سال) و ۲۰ بیمار در Stage III, IV، تحت عنوان گروه متاستاتیک (با میانگین سنی ۴۶/۸±۸/۰ سال) جای گرفتند. ۲۶ نفر از افراد بظاهر سالم در همان محدوده سنی به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند (با میانگین سنی ۴۴/۹±۸/۵ سال). این مطالعه بصورت توصیفی از نوع مقطعی مقایسه‌ای طراحی گردیده است.

از افراد فوق‌الذکر حدود ۵ سی‌سی خون گرفته شد که ۲ سی‌سی آن جهت آزمایش فلوسایتومتری به لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و مابقی خون به لوله دیگری جهت جداسازی سرم منتقل گردید که سرم حاصل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت اندازه‌گیری مقادیر سایتوکین‌ها، نگهداری گردید.

تعیین درصد زیرگروه‌های لنفوسیتی به روش فلوسایتومتری و توسط دستگاه Partec با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی‌های دورنگی بر ضد شاخص‌های CD4/CD8 و CD3/CD16/CD56 محصول شرکت IQ<sup>®</sup>

درصد لنفوسیت‌های  $CD4^+$  بیماران گروه غیرمتاستاتیک ( $P=0/022$ ) و متاستاتیک ( $P=0/037$ ) در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت. درصد لنفوسیت‌های  $CD8^+$  و سلولهای NK در سه گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت. جدول شماره ۲، میانگین و انحراف معیار درصد زیرگروه‌های لنفوسیتی را نشان می‌دهد.

**جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار درصد زیرگروه‌های لنفوسیتی در گروه‌های مورد مطالعه**

سلولهای NK		لنفوسیت‌های $CD8^+$		لنفوسیت‌های $CD4^+$		درصد سلولهای ایمنی	گروه‌های مورد مطالعه
میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار		
۴/۴۹	۱۱/۶۲	۴/۸۳	۲۶/۹۱	۴/۶۹	۴۳/۵۳		کنترل
۵/۲۲	۱۳/۶۳	۶/۸۵	۲۶/۸۸	۶/۵۸	۳۹/۲۷		غیرمتاستاتیک
۷/۳۳	۱۴/۸۶	۱۰/۰۶	۳۱/۲۳	۵/۰۳	۳۹/۱۵		متاستاتیک

IL-12 (ماکروفازها) توسط تومورها باشد، بخصوص مواقعی که متاستاز صورت گرفته است.

در این مطالعه، تفاوتی در مقادیر سرمی  $IFN\gamma$  در گروه بیماران در مقایسه با افراد سالم دیده نشد ولی در تحقیقی که Kovacs E در سال ۲۰۰۰<sup>(۱)</sup> انجام داد و تولید  $IFN\gamma$  از سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به انواع مختلف سرطان را بررسی نمود، کاهش معنی‌داری در گروه بیمار در مقایسه با افراد سالم گزارش نمود. همچنین Goto S در سال ۱۹۹۹<sup>(۲)</sup> و Sato M<sup>(۳)</sup> در سال ۱۹۹۸، کاهش تولید  $IFN\gamma$  را در مبتلایان به انواع مختلف سرطان پیشرفته گزارش نمودند. علت تفاوت نتایج این مطالعه با تحقیق‌های ذکر شده را می‌توان به روش بررسی سایتوکین (مقادیر سرمی یا تولید سایتوکین از سلولهای تک هسته‌ای) نسبت داد؛ در برخی تحقیقات اشاره شده، بیماران انتخابی، به سایر سرطان‌ها غیر از سرطان پستان مبتلا بوده‌اند و یا تولید و ترشح سایتوکین‌ها، در بافت اندازه‌گیری شده در حالی که اندازه‌گیری سایتوکین‌ها در مطالعه اخیر در بیماران مبتلا به سرطان پستان و در خون انجام شده است.

در این مطالعه، درصد لنفوسیت‌های  $CD4^+$  در گروه بیمار

مقادیر شاخص توموری CEA ( $P=0/001$ ) و CA15-3 ( $P=0/003$ ) در گروه متاستاتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. میانگین و انحراف معیار مقادیر CEA در گروه‌های کنترل، غیرمتاستاتیک و متاستاتیک به ترتیب عبارت بودند از  $0/71 \pm 0/66$ ،  $0/76 \pm 25/38$  و  $9/61 \pm 26/12$  میکروگرم در میلی‌لیتر. میانگین و انحراف معیار مقادیر CA15-3 در گروه‌های مذکور به ترتیب عبارت بودند از  $13/24 \pm 5/46$ ،  $24/91 \pm 54/20$  و  $33/97 \pm 39/0$  واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر.

#### بحث

نتایج نشان داد که مقادیر سرمی IL-12 در مبتلایان به سرطان پستان نسبت به افراد سالم، هماهنگ با پیشرفت بیماری، افزایش یافته بود؛ بطوری که بین گروه کنترل و گروه متاستاتیک، این افزایش معنی‌دار بود ( $P=0/017$ ). افزایش IL-12 موافق با نتایج Kovacs E در بیماران مبتلا به انواع مختلف سرطان در سال ۲۰۰۰<sup>(۳)</sup> و ۲۰۰۱<sup>(۴)</sup> و نتایج Tsuboi K و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در مبتلایان به سرطان مری<sup>(۵)</sup> بود، با این تفاوت که این محققین افزایش

T CD8<sup>+</sup> در مبتلایان به سرطان معده تغییری نکرده است ولی بر عکس این نتایج، شمارش مطلق لنفوسیت‌های CD8<sup>+</sup> در تحقیق Kuss I در سال ۲۰۰۴<sup>(۹)</sup> و Hong WS در سال ۱۹۹۵<sup>(۱۱)</sup> کاهش داشته است. در تحقیق Alam SM و همکارانش<sup>(۲۰)</sup> در سال ۱۹۹۳ افزایش درصد لنفوسیت‌های CD8<sup>+</sup> در مبتلایان به سرطان پستان که درگیری غدد لنفاوی نیز داشته‌اند، گزارش گردیده است. توجه این اختلاف‌ها به مطالعات بیش‌تری نیاز دارد.

افزایش درصد سلولهای NK در این مطالعه با پیشرفت بیماری رابطه داشته، ولی اختلاف، معنی‌دار نبوده است. Kovacs E نیز در سال ۲۰۰۰<sup>(۲۱)</sup> تفاوت معنی‌داری بین سلولهای NK در بیماران، در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نکرده است. Murta EF و همکارانش در سال ۲۰۰۰<sup>(۲۱)</sup> و Farazmand S و همکارانش در سال ۲۰۰۵<sup>(۲۲)</sup> افزایش معنی‌داری در سلول NK در بیماران در مقایسه با گروه کنترل گزارش نمودند.

در این مطالعه به نظر می‌رسد با وجود کاهش درصد لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup> به علت فعال شدن مکانیسم‌های هومئوستاز جبرانی و افزایش قابل توجه مقادیر IL-12، تعداد کل سلولها تقریباً در حد ثابتی حفظ شده است و از آنجا که این سلولها، تولید کننده IFN- $\gamma$  هستند در نتیجه در مقادیر سرمی سایتوکین IFN- $\gamma$  در هر گروه از بیماران در مقایسه با گروه کنترل نیز تغییری صورت نگرفته است.

افزایش مقادیر سرمی IL-12 در بیماران بخصوص گروه متاستاتیک در این مطالعه می‌تواند نشانه عدم افزایش پاسخ‌های مهار کننده T<sub>H</sub>2 باشد بعلاوه عدم تغییر در مقادیر سایتوکینی IFN- $\gamma$  (با وجود کاهش تعداد لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup>) می‌تواند نشانه وجود و عملکرد مناسب سلولهای T<sub>H</sub>1 و در نتیجه پاسخ ایمنی سلولی باشد. بنابراین با این استدلال چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تغییری در تعادل سلولهای T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 در بیماران مبتلا ایجاد نشده و این تعادل همچنان برقرار است. جهت ارزیابی دقیق‌تر، مطالعه تولید سایتوکین‌های تیپ ۱ و ۲ از لنفوسیت‌های خون محیطی

نسبت به افراد سالم کاهش داشت، بطوری که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه غیرمتاستاتیک (P=۰/۰۲۲) همچنین بین گروه متاستاتیک و گروه کنترل (P=۰/۰۳۷) دیده شد. این نتایج موافق با تحقیقات Kuss I و همکارانش در سال ۲۰۰۴<sup>(۹)</sup> و ۲۰۰۵<sup>(۱۰)</sup> بر مبتلایان به سرطان سر و گردن، Hong WS و همکارانش در سال ۱۹۹۵<sup>(۱۱)</sup> بر مبتلایان به سرطان معده، Schroder W و همکارانش در سال ۱۹۹۷<sup>(۱۲)</sup> بر مبتلایان به سرطان پستان و Lee WJ و همکارانش در سال ۱۹۹۴<sup>(۱۳)</sup> بر مبتلایان به سرطان معده می‌باشد. البته Kovacs E<sup>(۲۱)</sup> تغییری در تعداد این سلولها در مبتلایان مشاهده نکرده است.

تومورها جهت مهار پاسخ عملکردی میزبان، از مکانیسم‌های گریز از سیستم ایمنی استفاده می‌کنند که یکی از این مکانیسم‌ها، بیان لیگاند Fas بر سطح سلولهای سرطانی می‌باشد. لیگاند Fas متصل به غشاء در اکثر موارد شکسته شده و به صورت واسطه‌های محلول (sFasL)، آزاد و منتشر می‌شود که سبب القاء آپوپتوز در لنفوسیت‌ها می‌شود. مقادیر بالای sFasL در مبتلایان به سرطان از جمله سرطان پستان گزارش شده است.<sup>(۱۴ و ۱۵)</sup> واکنش لیگاند Fas یا sFasL با Fas (CD95) بر سطح لنفوسیت‌های خونی در بیماران سرطانی، سبب القاء آپوپتوز در این سلولها می‌گردد.<sup>(۱۶-۱۹)</sup> گزارش گردیده است که بیان مولکول Fas بر سطح لنفوسیت‌های CD4<sup>+</sup> بیش‌تر بوده<sup>(۱۶ و ۱۹)</sup>، در نتیجه این سلولها بیش‌تر تحت آپوپتوز واقع می‌شوند و کاهش نسبی تعداد سلولهای CD4<sup>+</sup> را مطرح می‌کند که اثبات قطعی این موضوع نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد.

درصد لنفوسیت‌های CD8<sup>+</sup> در این تحقیق در مراحل غیرمتاستاتیک با گروه کنترل تفاوتی نداشته و در گروه غیرمتاستاتیک در مقایسه با گروه کنترل، کمی افزایش داشته که البته این افزایش معنی‌دار نبوده است. این نتیجه با نتایج Kovacs E در سال ۲۰۰۱ موافق است، این محقق نیز تفاوت معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌های CD8<sup>+</sup> مبتلایان به انواع مختلف سرطان مشاهده نکرده است. همچنین Lee WJ و همکارانش در سال ۱۹۹۴<sup>(۱۳)</sup> نشان دادند که درصد سلولهای

عمل بیمارستان دی و اساتید و پرسنل محترم بخش انکولوژی و جراحی بیمارستان دکتر شریعتی قدردانی می‌گردد.

#### فهرست منابع

1- Parkin DM. International variation, oncogene 2004; 23: 6329-40.

2- Stewart SL, King JB, Thompson TD, Friedman C, Wingo PA. Cancer mortality surveillance-united states, 1990-2000. MMWR Surveill Summ 2004; 53: 1-108.

3- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol 2004; 22: 329-60.

4- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13(2): 95-109.

5- Kovacs E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumor stage and previous therapy. Biomed Pharmacother 2001; 55(2): 111-16.

6- Kovacs E. Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells(PBMC) in cancer patients treated with Viscum album extract. Biomed Pharmacother 2000; 54(6): 305-10.

7- Goto S, Sato M, Kaneko R, Itoh M, Sato S, Takeuchi S. Analysis of Th1 and Th2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells as a parameter of immunological dysfunction in advanced cancer patients. Cancer Immunol Immunother 1999; 48(8): 435-42.

8- Sato M, Goto S, Kaneko R, Ito M, Sato S, Takeuchi S. Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. Anticancer Res 1998; 18(5D): 3951-5.

9- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer res 2004; 10(11): 3755-62.

10- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. Adv Otorhinolaryngol 2005; 62: 161-72.

همچنین از لئوسیت‌های احشایی توموری، می‌تواند مکمل مطالعه اخیر باشد. در رابطه با این موضوع، Schondorf T و همکارانش در سال ۱۹۹۷<sup>(۲۳)</sup> نشان دادند که اینترفرون گاما، سایتوکین غالب تولید شده توسط لئوسیت‌های خون محیطی در مبتلایان به سرطان پستان و تخمدان است. Wong PY و همکارانش در سال ۱۹۹۸<sup>(۲۴)</sup> مشاهده کردند که تولید سایتوکین‌های تیپ ۱ در مبتلایان به سرطان پستان بیش‌تر است و همچنین Santin AD و همکارانش در سال ۲۰۰۱<sup>(۲۵)</sup> با بررسی تولید سایتوکین‌های تیپ ۱ و ۲ از لئوسیت‌های خون محیطی و لئوسیت‌های احشایی بافت در مبتلایان به سرطان پیشرفته تخمدان نشان دادند که تولید سایتوکین‌های تیپ ۱ در هر دو جمعیت لئوسیتی غالب است. مطالعات Tsoboi و Muakaml نیز تغییرات زودهنگام IL-12 و IL-18 را در سرطان مری و معده به اثبات رسانده‌اند.<sup>(۲۶ و ۲۷)</sup>

با توجه به اینکه غالب بیماران که تشخیص سرطان IV و stage III برای آنها مطرح می‌شود، سریعاً تحت تاثیر داروهای وسیع ضد سرطان قرار می‌گیرند و بسیاری از این داروها تکثیر سلولی و تعادل سیستم ایمنی را مختل نموده و تنظیم سایتوکینی را بر هم می‌زنند؛ لذا مدت زمان طولانی لازم است تا بیماران با شرایط تعیین شده در پژوهش و بدون دستکاری داروئی انتخاب گردند.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه گمان می‌رود که مقادیر سرمی سایتوکین IL-12 با مرحله و پیشرفت بیماری ارتباط داشته باشد، بطوری که با گسترش بیماری، مقادیر آن افزایش می‌یابد. بعلاوه به نظر می‌رسد که مقدار سرمی سایتوکین IFN $\gamma$  با گسترش بیماری ارتباطی نداشته باشد و نهایتاً به نظر می‌رسد اختلال مهمی در سیستم ایمنی سلولی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مراحل مختلف بروز نمی‌کند.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات و همکاری صمیمانه کارکنان اتاق

- 11- Hong WS, Min YI, Son YS, Hong SI. Peripheral blood lymphocyte subsets in patients with stomach cancer. *J Korean Med Sci* 1995; 10(3): 164-8.
- 12- Schroder W, Vering A, Stegmuller M, Strohmeier R. Lymphocyte subsets in patients with ovarian and breast cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 1997; 18(6): 474-7.
- 13- Lee WJ, Chang KJ, Lee CS, Chen KM. Selective depression of T-lymphocyte subsets in gastric cancer patients: an implication of immunotherapy. *J Surg Oncol* 1994; 55(3): 165-9.
- 14- Sheen-Chen SM, Chen HS, Eng HL, Chen WJ. Circulating soluble Fas in patients with breast cancer. *World J Surg* 2003; 27(1): 10-13.
- 15- Ueno T, Toi M, Tominaga T. Circulating soluble Fas concentration in breast cancer patients. *Clin cancer Res* 1999; 5(11): 3529-33.
- 16- Cardi G, Heaney JA, Schned AR, Ernstoff MS. Expression of Fas (APO-1/CD95) in tumor-infiltrating and peripheral blood lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(10): 2078-80.
- 17- Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, et al. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 1999; 59(20): 5356-64.
- 18- Song E, Chen J, Ouyang N, Su F, Wang M, Heemann U. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer* 2001; 85(7): 1047-54.
- 19- Yuen MF, Hughes RD, Heneghan MA, Langley PG, Norris S. Expression of Fas antigen(CD95) in peripheral blood lymphocytes and in liver-infiltrating, cytotoxic lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 92(8): 2136-41.
- 20- Alam SM, Clark JS, George WD, Campbell AM. Altered lymphocyte populations in tumor invaded nodes of breast cancer patients. *Immunol Lett* 1993; 35(3): 229-34.
- 21- Murta EF, de Andrade JM, Falcao RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori* 2000; 86(5): 403-7.
- 22- Farazmand S, Amani D, Mohammad Hassan Z. Investigation of NK cell population in peripheral blood and tumor lesions of patients with breast cancer. *IJI* 2005; 2(3): 152-7.
- 23- Schondorf T, Engel H, Lindemann C, Kolhagen H, von Rucker AA, Mallmann P. Cellular characteristics of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gynecological tumors. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44(2): 88-96.
- 24- Wong PY, Staren ED, Tereshkova N, Braun DP. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J Surg Res* 1998; 76(1): 95-103.
- 25- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman JJ, Smith CV, et al. Phenotypic and functional analysis of tumor-infiltrating lymphocytes compared with tumor-associated lymphocytes from ascitic fluid and peripheral blood lymphocytes in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 51(4): 254-61.
- 26- Tsuboi K, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, et al. Serum interleukin-12 and interleukin-18 levels as a tumor marker in patients with esophageal carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 205(2): 207-14.
- 27- Murakami S, Okubo K, Tsuji Y, Sakata H, Hamada S, Hirayama R. Serum interleukin-12 levels in patients with gastric cancer. *Surg Today* 2004; 34(12): 1014-19.

## The Evaluation of Serum Levels of IFN- $\delta$ , IL-12 and Percentage of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NK Cells in Peripheral Blood of Metastatic, Nonmetastatic Breast Cancer Patients and Normal Individuals

<sup>I</sup> \*M. Shekar Abi, PhD    <sup>II</sup> B. Bahar, MD    <sup>III</sup> M. Behbin, BSc    <sup>IV</sup> M. Atri, MD  
<sup>V</sup> R. Falak, MSc    <sup>VI</sup> M. Imani, MSc    <sup>VII</sup> P. Danesh, BSc

### Abstract

**Background & Aim:** The immune system is quite capable to combat tumors and many immunological parameters including cytokines such as IL-12 & IFN- $\gamma$  play major roles in this regard. IL-12 is also the major cytokine responsible for the differentiation of T<sub>H</sub>1 cells, which are potent producers of IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  in turn has a powerful enhancing effect on the ability of phagocytes to produce IL-12 as well as having an important role in cellular immune response. In this study the serum concentration of IL-12 & IFN- $\gamma$  and percentage of IFN- $\gamma$  producing cells (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK cells) in metastatic & nonmetastatic breast cancer patients and healthy adults was evaluated, with the aim of finding out the possible correlation between cytokine levels with disease stage and progression. Since cytokines are produced by all of these cells, cell enumeration may help to find out whether changes in cytokine levels is due to change in the cell number or their function has been altered during disease progression.

**Patients and Methods:** Whole blood samples were taken from 50 breast cancer patients prior to therapeutic manipulation who were admitted to Dr. Shariaty & Day general hospitals. Also 26 healthy people were selected as control and blood was taken similarly. According to disease stage patients were classified into non-metastatic (stage I, II) and metastatic (stage III, IV) groups. 30 patients were non metastatic and 20 patients were in metastatic stages respectively. Serum cytokines level (IFN- $\gamma$ , IL-12) was measured by ELISA. Lymphocyte subpopulation percentage was measured by flow-cytometry using bichromatic specific antibodies (anti-CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, anti-CD3/CD16+CD56). The research protocol is designed as a descriptive, comparative cross sectional study. The parametric findings were analysed by one way Anova test and the nonparametric data were analysed using Mann whitney and Kruskal Wallis statistical tests.

**Results:** IL-12 level was increased significantly in metastatic group compared to controls (P=0.017), while IFN- $\gamma$  levels were in the same range as controls. CD4<sup>+</sup> lymphocyte percentage in nonmetastatic (P=0.022) and metastatic groups (P=0.037) was decreased significantly compared to control, but there was no significant difference in CD8<sup>+</sup> and NK cell numbers.

**Conclusion:** Despite the decrease in percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in patients (due to activation of compensative hemostatic system and increase in IL-12), there was no change in IFN- $\delta$  level. It seems that increase in serum IL-12 levels correlates with disease progression. However serum IFN- $\gamma$  level has no effect on disease progression and as a whole no prominent failure was recorded in the cellular immune response of breast cancer patients as compared to normal individuals.

**Key Words:** 1) Cytokine 2) T<sub>H</sub>1 Cells 3) Metastatic Breast Cancer

4) Nonmetastatic Breast Cancer 5) Interleukin-12 6)  $\gamma$ -Interferon

**I)** Associate Professor of Immunology, Crossing of Hemmat and Chamran expressways, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (\*Corresponding Author)

**II)** Assistant Professor of Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

**III)** MSc student in Immunology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

**IV)** Professor of Surgery, Tehran University of Medical Sciences and Health Services; General Surgeon, Day General Hospital, Valiasr St., Tehran, Iran.

**V)** MSc in Immunology, Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

**VI)** MSc in Immunology, Research and Training Center for Laboratory Science, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

**VII)** BSc in Biology, Lab. Technician, Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.