Archive of SID
IJOGI, Vol. 19, No. 20, pp. 8-18, Aug 2016

مجله زنان مامائی و نازائی ایران

دوره نوزدهم، شماره ۲۰، صفحه: ۱۸-۸، هفته چهارم مرداد ۱۳۹۵

بررسی بیان مارکر CD8 و تکثیر لمفوسیت‌های خون محیطی زنان چندزا در مجاورت و هم‌کشتی سلول‌های توموری پستان، لاین MDA-231 و MCF-7 و مقایسه آن با زنان بدون فرزند

نازنین قاسمی[۱]، مهری حاجی آقایی[۱]، فاطمه رضایت[۱]، دکتر مهرناز مصداقی[۲]، دکتر نریمان مصفا[۳*]، دکتر فهیمه رمضانی تهرانی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولید مثل، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲. استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳. استاد گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولید مثل، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴. استاد، پژوهشکده علوم غدد درون ریزو متابولیسم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۵/۲۶

خلاصه

مقدمه: شیوع کمتر وقوع و متاستاز سرطان پستان در مادران چندزا، این نظریه را همراه نمود که وقوع میکروکایمریسم می‌تواند دلیل این پدیده باشد. لذا در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی پاسخ‌های سلولی تک هسته‌ای های خون محیطی در مجاورت لاین‌های توموری سرطان پستان، اقدام به اجرای یک مدل هم کشتی در شرایط آزمایشگاهی گردید.

روش‌کار: به کمک گرادیان فایکول (۱۰۷۷)، تک هسته‌ای‌های خون محیطی ۴۸ نفر از زنان چندزا و بدون فرزند جداسازی و تخلیص گردید. به کمک سیستم ترانس ول، کشت لاین‌های توموری پستان MDA-231 و MCF-7 در مجاورت تک هسته‌ای‌ها صورت پذیرفت. تکثیر لمفوسیتی و نیز ایمونوفنوتایپینگ آن‌ها به لحاظ تعیین درصد لمفوسیت‌های +CD3 و +CD8 به ترتیب به کمک روش‌های BrdU و فلوسایتومتری در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم کشتی انجام گرفت.

یافته‌ها: میانگین میزان تکثیر لمفوسیتی در گروه چندزا نسبت به گروه بدون فرزند، بالاتر و از نظر آماری در ۴۸ ساعت و در ۷۲ ساعت معنادار بود ($p<۰/۰۰۱$). همچنین مقایسه تکثیر لمفوسیت‌های مادران مولتی‌پار در مقابل لاین‌های MCF-7 ($p=۰/۰۲۶$) و MDA-231 ($p<۰/۰۰۱$) در مقایسه با زنان بدون فرزند نتایج معناداری را نشان داد. تعیین درصد جمعیت لمفوسیت‌های سایتوتوکسیک (CD8+ CD3+) تفاوت معناداری را بین دو گروه تحت بررسی نشان نداد ($p=۰/۶۰۳$).

نتیجه‌گیری: پاسخ‌های ایمنی سلولی مادران چندزا در مقابل هم کشتی با لاین‌های توموری، در مقایسه با زنان بدون فرزند، تفاوت آشکاری دارد که می‌تواند منجر به مقاومت آن‌ها در برابر تومورهای پستان باشد. این پدیده می‌تواند به دلیل میکروکایمریسم‌های در طول بارداری باشد. نتیجه‌گیری درباره ارتباط سرطان پستان و بارداری، نیازمند بررسی پاسخ‌های ضد توموری تکمیلی با حجم نمونه بیشتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: زنان چندزا، زنان بدون فرزند، سرطان پستان، لمفوسیت خون محیطی

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر نریمان مصفا؛ پژوهشکده علوم غدد درون ریزو متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۹۷۰ ؛ **پست الکترونیک:** yasamaryan@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تومورهای پستان در ایران، شایع‌ترین نوع سرطان تشخیص داده شده در بین زنان است (۱)؛ به طوری که در سال ۲۰۰۳ شیوع آن در ایران در هر ۱۰۰۰ نفر، ۶/۷ نفر بوده است (۲) و سالیانه میزان مرگ‌آوری آن نیز رو به افزایش است (۳). عوامل متعددی در ایجاد بدخیمی‌های پستان دخیل می‌باشند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تغییر الگوی باروری اشاره کرد (۴). نفوذ وگسترش لمفوسیتی خصوصاً سلول‌های $T\ CD_8^+$ در اطراف توده تومور با تشخیص بهتر سرطان در ارتباط است (۵). آنالیز موقعیت، حجم و نوع سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته که تحت عنوان "ترکیب ایمنی"[1] گفته می‌شود، می‌تواند امیدهایی برای تشخیص سریع‌تر بیماری و پاسخ بهتر به درمان باشد (۶). در این میان می‌توان به مهم‌ترین سلول و سایتوکاین ضدتوموری یعنی لنفوسیت های T و سیتوکاین TNF-α اشاره کرد:

$T\ CD_8^+$: در طول چند سال اخیر این سلول‌ها به عنوان مهم‌ترین سلول‌های ارتشاحی در روند سرطان‌های اپی تلیالی شناخته شده‌اند (۷). در سرطان پستان سلول‌ها با استفاده از برش هماتوکسیلین/ ائوزین و تکنیک ایمونوهیستوشیمی در تشخیص‌های اولیه یا مراحل اولیه سرطان با ارتشاح لمفوسیتی و نتایج بالینی بهتر در ارتباطند (۸، ۹). خصوصاً شناسایی این سلول‌ها در اطراف بافت سرطان پستان که فاقد هر سه مارکر بدخیمی می باشند (توموری که در آن بیان ER، PR و $HER2^2$ یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی منفی باشد)، در پیش آگهی تومور مؤثر است (۱۰). بنابراین ارتشاح این لمفوسیت‌ها با افزایش فعالیت ضد توموری در ارتباط است.

TNF-α۳: این سایتوکاین یک واسطه التهابی است که در بروز سرطان نقش دارد (۱۱) و به عنوان یک شمشیر دو لبه، غلظت بالای آن می‌تواند پاسخ ضد توموری (۱۲) و غلظت پایین آن پاسخ توموری ایجاد کند (۱۳). مکانیسم آن در تحریک رشد تومور، با القای تولید ROS^4 و RNS^5 است که می‌تواند منجر به آسیب DNA و کمک به روند ایجاد تومور شود (۱۴، ۱۵). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که بارداری می‌تواند اثرات متفاوت و دوگانه ای بر روی وقوع تومور و افزایش خطر سرطان پستان داشته باشد. مشخص شده است که هم پس از زایمان و در کوتاه مدت به دلیل تحریک رشد سلول‌هایی که در مراحل اولیه ترانسفورماسیون و بدخیمی می‌باشند، احتمال ابتلاء به بدخیمی افزایش می‌یابد، درحالی‌که در اثر بلند مدت بارداری که می‌تواند تا سال‌های بعد از تولد فرزندان به طول انجامد، شیوع سرطان پستان در مادران کاهش می‌یابد، زیرا تمایز سلول‌های بنیادی مستعد ایجاد تومور در پستان به دنبال تغییرات هورمونی شدت یافته و در نتیجه امکان بروز بدخیمی کاهش می‌یابد (۱۶، ۱۷).

با توجه به تغییرات پاسخ‌های دفاع ضد توموری در جریان بارداری‌های متعدد که در اثر تماس سیستم ایمنی مادر با آنتی ژن‌های مشترک توموری و سلول‌های جنینی رخ می‌دهد، می‌توان به پدیده میکروکایمریسم اشاره کرد. بنابر فرضیه وقوع میکروکایمریسم جنینی (FM)[6] طول بارداری و تقویت رو به گسترش آن در مادران چندزا و رابطه بین شیوع کمتر سرطان پستان در این مادران، این روزها بحث برانگیز و مورد تحقیق بسیار قرار گرفته است. آمار و اطلاعات موجود در منابع نشان می‌دهد که در صورت وقوع میکروکایمریسم، سرطان پستان در زنان با سابقه بارداری متعدد مهار می‌شود و عکس آن نیز صادق است؛ بدین معنا که در انسان مبتلا به سرطان پستان اثر کمتری از وقوع میکروکایمریسم جنینی ملاحظه نمی‌شود. از آنجایی که یکی از وظایف مهم سیستم ایمنی مقابله با تومورها می‌باشد، این امکان وجود دارد که سیستم ایمنی مادران چندزا به دلیل کایمریسم‌های متعدد، قدرت مقابله با تومور پستان را در طی سال‌های متمادی کسب نموده و مقاومت این مادران به دلیل فعالیت ضدتوموری سیستم ایمنی باشد (۱۸-۲۰). بر اساس نتایج بسیاری از گزارشات و مقالات، وقوع

[1] Immune Contexture
[2] Human Epidermal growth factor Receptor
[3] Tumor Necrosis Factor
[4] Reactive Oxygen Species
[5] Reactive Nitrogen Species
[6] Fetal Microchimerism

www.SID.ir

Archive of SID

بارداری‌های متعدد، نقش محافظتی چشمگیری در بروز تومورهای پستان و نیز تأخیر و مهار متاستاز آن‌ها دارد (۲۰)، لذا با توجه به این پدیده، مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط تعدد بارداری با وقوع پاسخ‌های ضد توموری در شرایط آزمایشگاهی انجام شد که لازمه آن ارزیابی توان تکثیری لمفوسیت‌های خون محیطی و تعیین درصد جمعیت سایتوتوکسیک CD8 در جمعیت مادران چندزا در مقایسه با بانوان بدون فرزند می‌باشد. بدین منظور به ایجاد مدل هم کشتی بین تک هسته‌ای های خون محیطی و لاین‌های توموری پستان شامل لاین‌های MDA-231 و MCF-7 در شرایط آزمایشگاهی اقدام شد.

روش کار

رده‌های سلول‌های توموری:

سلول‌های لاین MDA-231 از انستیتو پاستور و MCF-7 از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران به صورت گسترده شده در فلاسک خریداری شد. رده سلولی MDA-231 در محیط (Gibco-USA) DMEM، % 5 FBS و رده سلولی MCF-7 در محیط (Gibco-USA) RPMI، 10% FBS و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین ۱٪ کشت داده شدند. انکوباسیون سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه و اتمسفر دارای ۵٪ CO2 و رطوبت ۸۰٪ انجام گرفت و ذخیره‌سازی در انجماد ۷۰- درجه انجام گرفت.

نمونه‌گیری:

۱۰ سی سی خون وریدی هپارینه از افراد مورد مطالعه گرفته شد. واحدهای پژوهش شامل ۲۴ نفر از زنان بدون فرزند و ۲۴ نفر از زنان چندزا بودند که در دو گروه قرار گرفتند. از افراد جهت شرکت در مطالعه رضایت شخصی اخذ گردید.

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به روش گرادیان غلظتی به کمک فایکول هیپاک ۱۰۷۷ (Gibco-USA) تخلیص گردید. پس از شمارش با لام نئوبار با کمک رنگ‌آمیزی با تریپان بلو، درصد حیات سلول‌ها در بالای محدوده ۹۵٪ تعیین شد. شرکت‌کنندگان در این مطالعه با اعلام رضایت برای اخذ نمونه، فرم مخصوص را تأیید و امضا کردند. افراد مورد مطالعه داوطلبینی بودند که بر اساس اطلاعیه مربوط به پذیرش نمونه مراجعه کردند. معیارهای ورود و خروج در پرسشنامه مخصوص جمع‌آوری اطلاعات مشخص گردید معیار های ورودشامل: تعداددفعات بارداری و تولد بالاتر از ۳ فرزند زنده و سالم برای مادران چندزا و نداشتن فرزند برای بانوان بدون فرزند، محدوده سنی برای انتخاب نمونه ها ۲۵ تا ۴۰ سال بود.

معیارهای خروج شامل وجود سابقه سقط جنین،هرگونه بیماری سیستمیک، دیابت، فشارخون و وقوع تومور در افراد درجه یک خانواده در نظر گرفته شد.

سیستم هم کشتی:

۱۲ ساعت قبل از هر مرحله هم کشتی، ابتدا در بستر چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای مخصوص سیستم هم کشتی (SPL- Korea) تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول لاین توموری کشت داده شد. پس از تفرق کامل سلولی در روز بعد، تعداد ۲×۱۰^{۶} از سلول‌های تک هسته‌ای در هر یک از چنبرهای ترانس ول قرار داده شدند. به منظور کنترل شرایط آزمون سیستم هم کشتی یا تست-کنترل برای هر نمونه، کنترل بدون رده سلول توموری نیز در نظر گرفته شد.

آزمون تکثیر لمفوسیتی BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine):

میزان تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در فواصل ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم کشتی توسط کیت BrdU بر اساس روش سنجش کالریمتریک که محصول کمپانی (REF:11647229001 -Roche Germany) می‌باشد، با تعیین دانسیته اپتیک (در طول موج ۴۵۰ و ۶۹۰ نانومتر به عنوان طول موج رفرانس) بررسی و OD آن اندازه‌گیری شد. همچنین جهت کنترل زمینه و بلانک در دو چاهک مجزا مطابق جدول ۱ عمل گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- محتویات کنترل‌های کیت تکثیر سلولی BrdU

محتویات چاهک	بلانک	کنترل زمینه
محیط کشت سلولی	µl ۱۰۰	-
سلول ها	-	µl ۱۰۰
BrdU	µl ۱۰	-
Anti-BrdU-POD	µl ۱۰۰	µl ۱۰۰

ایمونو فنوتایپینگ و بررسی بیان مارکر CD3 و CD8 توسط فلوسایتومتری:

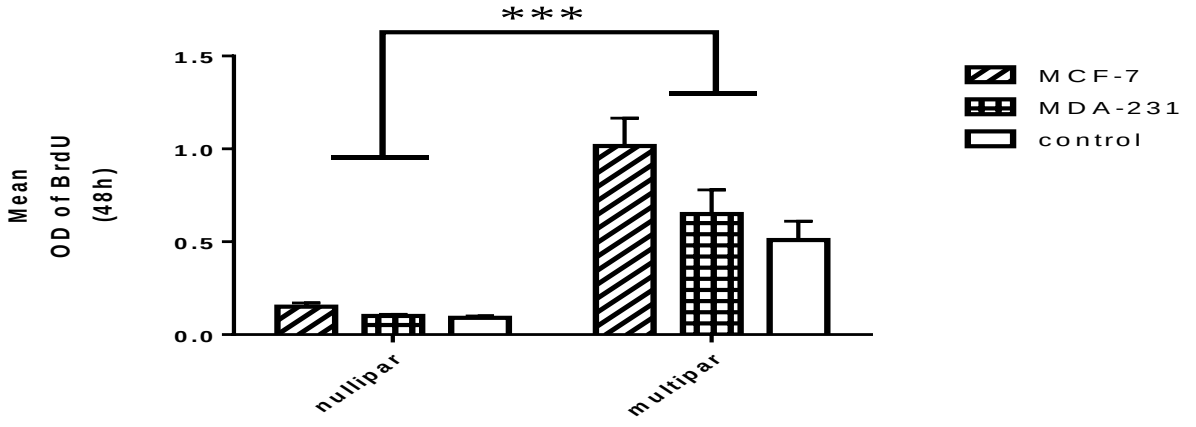
برای بررسی درصد لمفوسیت‌های T سایتوتوکسیک CD3 و CD8 در نمونه‌های سلولی برداشتی از چاهک‌ها در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم کشتی، از آنتی بادی مونوکلونال کوکتل حاوی آنتی بادی ضد شاخص CD3 انسانی متصل به PE و آنتی بادی ضد شاخص CD8 انسانی متصل به FITC متعلق به شرکت BD Biosciences, Cat) (Simultest CD3/CD8, (No:340044 استفاده شد. بر اساس پروتکل رنگ‌آمیزی موجود در کیت و نیز استفاده از ایزوتایپ کنترل به منظور پرهیز از واکنش‌های غیر اختصاصی، سلول‌ها برای انجام ایمونوفنوتایپینگ آماده شدند.

تحلیل نتایج و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام گرفت. به‌منظور تعیین حجم نمونه از فرمول تعیین اختلاف معنی دار بین دو گروه ومقایسه بین میانگین‌ها استفاده گردید در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال بود، از آزمون آنالیز واریانس و تی مستقل و در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود، از آزمون کروسکال والیس و من ویتنی استفاده شد. در تمام آزمایشات حدود اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقایسه تکثیر لمفوسیتی طی هم کشتی، بین دو گروه چندزا و بدون فرزند:

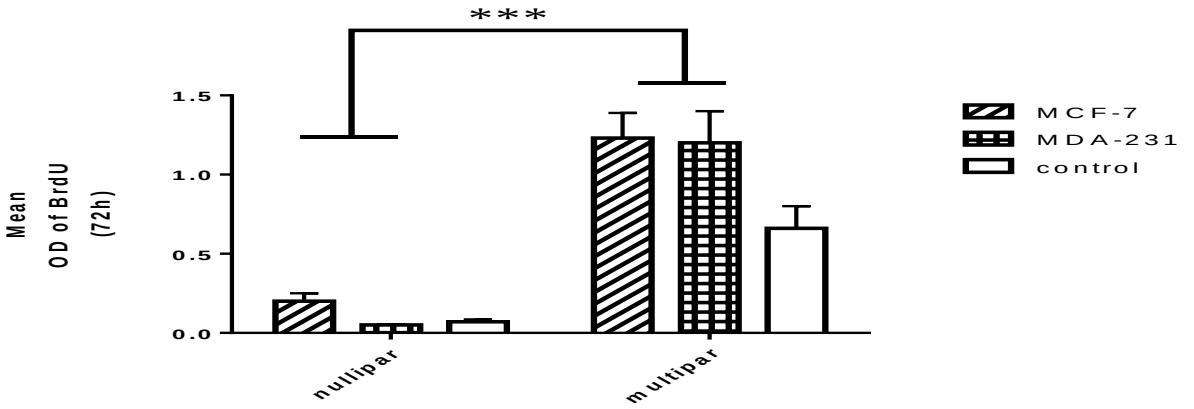
نتایج کامل میزان تکثیر لمفوسیتی طی هم کشتی با هر دو نوع سل لاین توموری و کنترل در دو گروه بدون فرزند و چندزا در هر دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود، میانگین میزان تکثیر لمفوسیتی در گروه چندزا نسبت به گروه بدون فرزند بالاتر بود و این مقدار از نظر آماری در ۴۸ ساعت ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۱) و ۷۲ ساعت از نظر آماری معنادار بود ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲).



نمودار ۱- مقایسه میانگین تکثیر لمفوسیتی در دو گروه چندزا و بدون فرزند پس از هم کشتی در ۴۸ ساعت با هر دو نوع سل لاین و کنترل

www.SID.ir

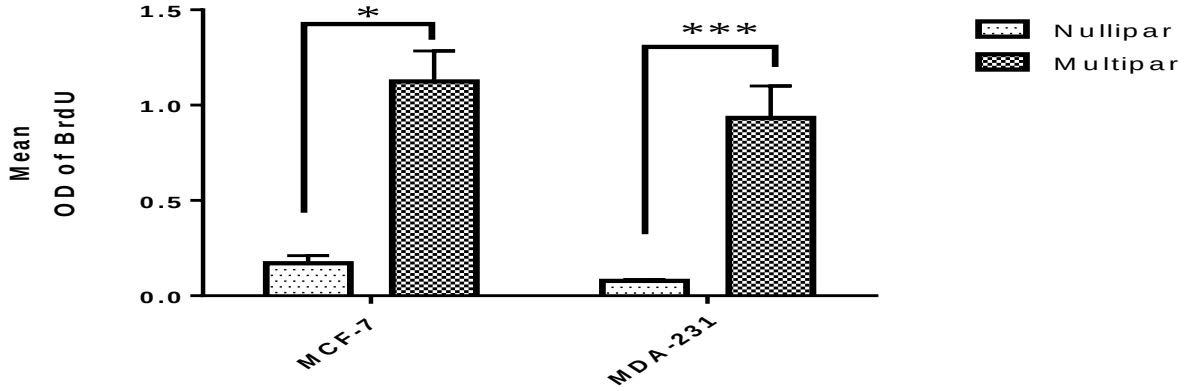
Archive of SID



نمودار ۲- مقایسه میانگین تکثیر لمفوسیتی در دو گروه چندزا و بدون فرزند پس از هم کشتی در ۷۲ ساعت با هر دو نوع سل لاین و کنترل

مقایسه تکثیر لمفوسیتی بین رده‌های سلولی توموری MCF-7،MDA-231 و کنترل بدون سل لاین:

بر اساس نتایج مربوط به بررسی اثر مربوط به نوع سل لاین توموری که هم کشتی با لمفوسیت‌های هر دو گروه چندزا و بدون فرزند صورت گرفت، میانگین تکثیر لمفوسیتی در هر دو گروه، برای سل لاین MCF-7 بیشتر از MDA-231 بود. هم‌چنین این مقدار از نظر آماری برای سل لاین MCF-7 معنادار بود (p=۰/۰۲۶) و میانگین تکثیر لمفوسیتی برای سل لاین MDA-231 نیز معنادار شد؛ به طوری که در این لاین‌ها، میزان تکثیر گروه چندزا بیشتر از بدون فرزند بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۳).



نمودار ۳- مقایسه میانگین تکثیر لمفوسیتی دو گروه طی هم کشتی با هر دو رده سل لاین توموری MCF-7 و MDA-231
(مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ با علامت یک ستاره (*) نشان داده شده اند)

بررسی درصد جمعیت سلول‌های CD_3 و CD_8 در بین گروه‌های مورد مطالعه و شرایط مختلف

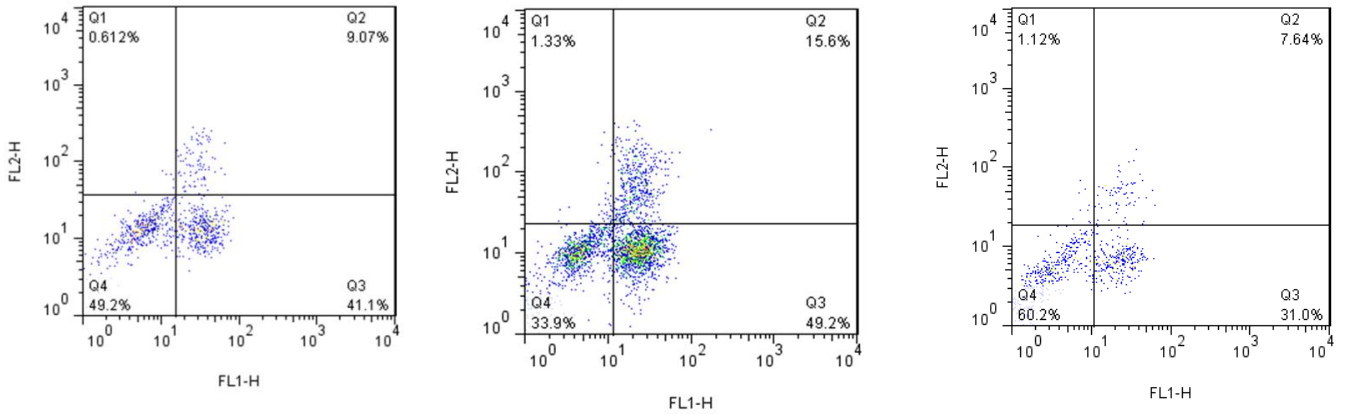
در مطالعه حاضر با استفاده از روش فلوسایتومتری، درصد جمعیت سلول‌های CD3 و CD8 در بین دو گروه مورد مطالعه و در بین زمان انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعته تفاوت معناداری نداشت (p=۰/۶۰۳). بر اساس دیاگرام های فلوسایتومتری در تصویر شماره ۱، درصد جمعیت سلول‌های CD3 و CD8 در گروه A (بدون فرزند) نسبت به گروه B (چندزا) بیشتر بود که این می‌تواند به دلیل جوان‌تر بودن میانگین سنی زنان بدون فرزند نسبت به زنان چندزا باشد. همچنین تصویر ۱، چگونگی مقایسه بین درصد لمفوسیت‌های سایتوتوکسیک در گروه‌های مورد مطالعه در شرایط هم کشتی با دو مدل سل لاین توموری MCF-7 و MDA-231 را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

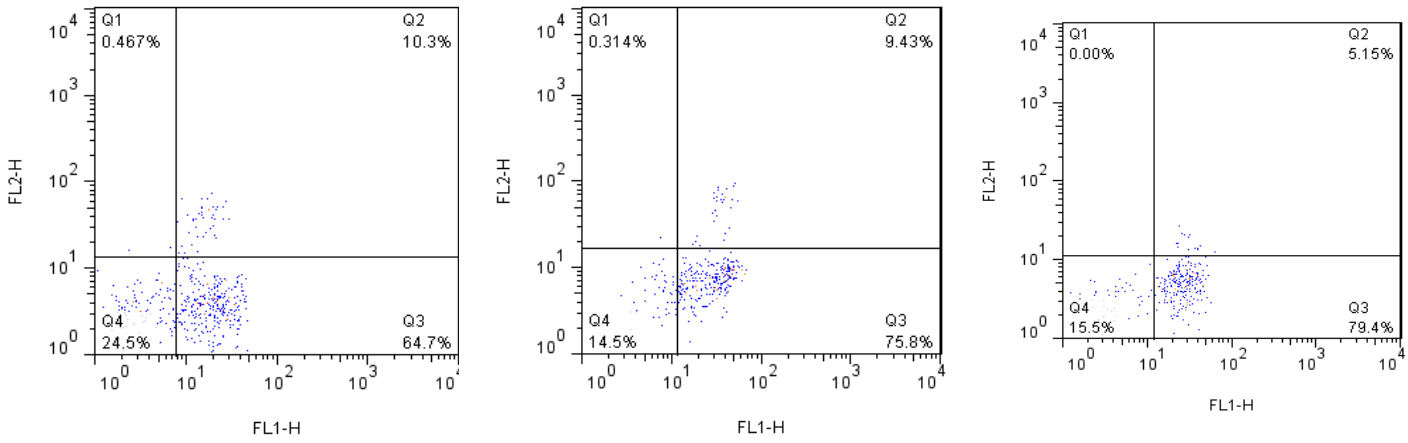
Archive of SID

A :

MDA-231:لاین کشت توام با **MCF-7: لاین کشت توام با کنترل بدون کشت توام:**



B :



تصویر ۱- دیاگرام‌های فلوسایتومتری مربوط به بررسی درصد لمفوسیت‌های +T CD3 و +CD8 در کشت ۴۸ ساعته در دو گروه چندزا (B) و بدون فرزند (A)

بحث

پدیده انتقال و بقای سلول‌های پروژنیتور جنینی به داخل جریان خون مادری در طول بارداری، مورد توجه و تحقیق بسیاری از دانشمندان و پژوهشگران و حتی محققان بالینی قرار گرفته است. با توجه به ماهیت بنیادی بودن اکثریت این سلول‌های مستقر در بافت‌های مادری که منجر به رخدادهای مفید و سودمند در مادر می‌شود و به نوعی در ترمیم، اصلاح و بازپروری بافت‌های مادری نقش مهم دارد، می‌تواند منجر به وقوع پاسخ‌های دفاعی آلوژنیک شود. بر این اساس میتوان اذعان داشت که پدیده میکروکایمریسم می‌تواند واجد اثرات مفید و خوب باشد و در عین حال به دلیل برانگیختن پاسخ‌های ایمنی بر علیه پیوند نیمه بیگانه جنین، برای مادر مضر و خطرناک باشد که بدان میکرو کایمریسم بد اطلاق می‌نمایند. ولی به لحاظ ماهیت بسیار مشابه برخی سلول‌های توموری به خصوص تومورهای پستان با سلول‌های مزانشیمی جنینی، این امکان برای مادر باردار در طی بارداری‌های متعدد فراهم می‌شود که سیستم ایمنی فرصت شناسایی این ساختار مشترک را داشته باشند. از آنجایی‌که هر دو گروه سلولی بین سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مزانشیم بنیادی و سلول‌های توموری اپی‌تلیالی برخی بدخیمی‌های پستان واجد ریز محیط بسیار مشابه می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که وقوع بارداری‌های مکرر باعث ثبات و پایداری یک دفاع سلولی و مولکولی چشمگیر می‌شود که نشانه این پدیده، مقاومت به وقوع بدخیمی در اثر تولد نوزادان زنده می‌باشد.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که به دلیل بقاء طولانی مدت سلول‌های جنینی در بافت‌های مادری، این روند می‌تواند به مدت طولانی، مادر را در مقابل وقوع تومورهای پستان مصون نگه دارد، هرچند وقوع اولین بارداری در سنین جوانی بر بقاء و پایداری این دفاع ضد توموری می‌افزاید (۲۱).

در مطالعه بابیتا و همکاران (۱۹۹۹) بر اساس یک پژوهش تجربی با وجود اطلاع از این واقعیت که تغییرات تکثیری لنفوسیت‌های T در گذر سن و در مراحل میانسالی و سپس کهنسالی باعث کاهش پاسخ‌های سلولی می‌شود و با توجه به تفاوت چشمگیر بین میانگین سن مادران چندزا و گروه زنان بدون فرزند، باز هم میزان پاسخ لمفوسیتی در مادران چندزا متفاوت و بالاتر از زنان جوان بدون فرزند بود (۲۲). علاوه بر این در مطالعه فوق به مقایسه پاسخ لمفوسیتی بین دو گروه مادر چندزا و زنان بدون فرزند در یک محدوده سنی پرداخته شد که نتایج با ارزش آن نشان داد که سابقه بارداری آن هم به دفعات، در این دو گروه هماهنگ شده به لحاظ سنی، باز هم باعث افزایش توان تکثیری لمفوسیت‌های T در مقابل میتوژن می‌شود. نتیجه نهایی این مطالعه نشان داد که چندزایی باعث جلوگیری از مهار و تغییر شیفت در پاسخ‌دهی و عملکرد لمفوسیت‌های T در گذر سن می‌شود (۲۲).

پژوهشی وسیع با استناد بسیار متعدد به آن در سال ۱۹۹۵ انجام پذیرفت. پاسخ‌های لمفوسیت‌های T بر علیه یکی از شناخته شده‌ترین تومور مارکرهای سرطان پستان یعنی MUC-1 به لحاظ پاسخ‌های تکثیری مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا نویسندگان این گزارش معتقد بودند که چندزایی با محافظت بر علیه تومور پستان به شدت همراهی می‌نماید. آن‌ها آنتی‌ژن نوترکیب مناسبی به نام MUC-1 را با پالس به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به عنوان محرک سلول‌های تک هسته‌ای افراد مورد مطالعه (مادران با سابقه ۲ و یا بیشتر از ۲ بار بارداری و آقایان داوطلب) مورد آزمایش قرار دادند (۲۳). اثربخشی و اعتبار این واکسن سنتتیک از آنجایی مورد توجه قرار گرفت که T سل‌های پاسخ دهنده به آنتی‌ژن MUC-1 در مادران فوق، آن هم در سه ماهه اول بارداری مورد تعیین و ارزیابی قرار گرفته و ظهور آن‌ها در گردش خون زنان تحت تزریق به اثبات رسید. حضور فعال این T سل‌های پرایم شده را زنان بدون فرزند که تحت تزریق واکسن فوق قرار گرفتند نیز نشان دادند. بنابراین اهمیت MUC-1 در دوران بارداری به عنوان بخش مهمی از ایمونیزاسیون مادران بر علیه بافت‌های توموری به اثبات رسید.

نتایج برجسته دیگری نیز در این مطالعه وسیع نشان داده شد که:

۱- بیش از نیمی از مادران با ۲ بار حاملگی واجد لمفوسیت‌های T واکنش‌پذیر به MUC-1 هستند، در حالی‌که هیچ یک از زنان بدون فرزند سلول‌های +TCD4 مختص به MHC-1 را نداشتند.

۲- T سل‌های استخراج شده از مادران چندزا قادر بود تا لاین‌های حامل MUC-1 را شناسایی و لیز نماید.

۳- شرایط فوق را با الگویی مشابه در زنان بدون فرزند فراهم نمودند و به نتایج خوبی در مورد اثربخشی واکسن ضد تومور پستان دست یافتند.

۴- MUC-1 را به عنوان ایده‌آل ترین واکسن یا آنتی ژن همراه تومور (Tumor Associated Ag) معرفی نمودند که به صورت طبیعی در جمعیت لمفوسیت‌های T مادران چندزا حضور دارد.

مطالعه فوق نیاز fallow-up را برای مادران با سابقه بارداری متعدد و بانوان فاقد سابقهٔ بارداری اجتناب ناپذیر نمود که بعدها مطالعات اپیدمیولوژیک، پژوهش فوق را تأیید کردند (۲۳).

نقش اندوزوم‌های توموری یا همان به اصطلاح تگزوزوم‌ها به عنوان فرآورده‌های مستخرجه از سلول های توموری که در شرایط سلامت و بدخیمی به عنوان عوامل مؤثر در تحریک دفاع ذاتی و اختصاصی نقش

www.SID.ir

Archive of SID

مهمی دارند، در ریز محیط رشد و تکثیر سل لاین‌های توموری می‌توانند پاسخ‌های از پیش راه اندازی شده متعاقب بارداری را در سلول‌های تحت همجواری با لاین توموری نمایان کنند. در واقع ریز محیط توموری، پاسخ‌های از پیش تحریک شده مادران را که در طول بارداری حضور داشته، در شرایط کشت پدیدار ساخته و وادار به فعالیت می‌نماید.

با وجود تفاوت روش بررسی پاسخ‌های دفاعی مادران چندزا در این مطالعه با سایر منابع و مراجع مرتبط، می‌توان نتایج این کوشش مبتنی بر سیستم همکشتی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با سل لاین‌های متفاوت توموری پستان را با این گزارشات منطبق نمود و آن را همگام با فرضیات و نظریات مندرج در این منابع تلقی کرد. گزارشات انتشار یافته همگی در تغییرات عمده در مکانیسم‌های دفاع سلولی و هومورال اتفاق نظر دارند و تأکید بسیار و مستند بر اهمیت بارداری بر وقوع مکانیسم‌های محافظتی بر علیه سلول‌های توموری پستان می‌نمایند. مهم‌ترین دستاورد این پژوهش‌ها، افزایش پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی است که در این بررسی به اثبات رسید، هرچند تحقیق وسیع‌تر و روش‌های بررسی دقیق‌تری را طلب می‌نماید.

در جمع‌بندی نهایی نتایج این تحقیق می‌توان ابعاد مختلفی را که در ارزیابی وضعیت پاسخ‌های فعالیتی تک هسته‌ای های خون محیطی در شرایط باروری و عدم باروری در نظر گرفت را به شرح زیر مورد طبقه‌بندی قرار داد:

۱) با توجه به تفاوت آشکار بین دو لاین سلولی MCF-1 و MAD-123 به لحاظ ساختار سلولی و مولکولی و به‌خصوص شباهت بسیار زیادی بین سلول‌های سرطانی شبیه به MSC در لاین MCF-7 می‌توان اذعان داشت که مادران چندزا قطعاً به‌دلیل همان میکروکایمریسم جنینی، در طول بارداری‌های متعدد پاسخ‌های سلولی پایداری را از خود منعکس می‌کنند که می‌تواند در سال‌های آینده آنان را در مقابل وقوع این نوع از تومورهای پستان، مصون نگه دارد. البته تأکید و استناد به این نظریه نیازمند انجام پژوهش‌های تکمیلی و به خصوص در تعداد بیشتری از زنان است. نکتهٔ حائز اهمیت این بود که در گردآوری نمونه‌ها، نهایت سعی در انتخاب موارد مناسب انجام گرفت. به عنوان مثال روش زندگی داوطلبین تحت نمونه‌گیری و سوابق فامیلی به لحاظ عدم ابتلاء به سرطان در وابستگان و خویشاوندان نزدیک (شامل پدر- مادر- خواهر- بردار و بعضاً افراد درجه دوم فامیل) بر اعتبار نتایج حاصله می‌افزاید که شاید در یک پژوهش دیگر توجه به این نکته ضروری باشد که در مطالعه حاضر به‌دلیل مشکلات و محدودیت‌های اخذ نمونه از زنان تحت بررسی به دلیل نداشتن هماهنگی سن بین دو گروه که ناشی از میانگین سنی بالاتر مادران چندزا در برابر زنان بدون فرزند بود، نتایج مربوط به فعالیت لمفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (CD8+ / CD3+) تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان نداد. دلیل این امر همان جوان‌تر بودن زنان بدون فرزند در مقایسه با مادران چندزا بود که متأسفانه به‌دلیل شرایط فعلی اجتماعی، امکان اخذ نمونه از مادری جوان ولی چندزا فراهم نشد، به‌خصوص که کرایتریای دارو به مطالعه مانند شرایط زندگی و سابقه فامیلی بدخیمی نیز کاملاً در نظر گرفته شد. شاید با در دست داشتن نمونه‌های بیشتر بتوان نقش ژنتیک و عوامل محیطی دیگر را بر حساسیت یا مقاومت زنان چندزا بر پاسخ‌های فعالیتی تک هسته‌ای های خون محیطی مورد مطالعه و بررسی دقیق‌تر قرار دارد. لازم به ذکر است که زنان بدون فرزند داوطلب در این مطالعه نیز به لحاظ سوابق خانوادگی و روش زندگی، هماهنگی بسیار مثبتی را با گروه آزمایش یعنی زنان چندزا داشتند.

۲) با توجه به بررسی وضعیت لمفوسیت‌های T سایتوتوکسیک در مجموعه تک هسته‌ای های تکثیر یافته در زنان چندزا و بدون فرزند، مشخص گردید که مجاورت لمفوسیت‌های CD8+ T با ریز محیط رشد تومور سل لاین، امکان تحریک مجدد و یا فعالیت اختصاصی این سلول‌ها را فراهم نمی‌آورد. چنانچه در یک بررسی دیگر به تکمیل این روند یعنی تحریک سلول‌های لمفوسیتی با Ag های شناخته شده تومور مارکرها پرداخته شود، شاید بتوان نتایج متفاوتی را در زمینه

www.SID.ir

Archive of SID

تحریک و تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای زنان چندزا در مقایسه با زنان بدون فرزند و تولید سایتوکاین بیشتر توسط آن‌ها بدست آورد. از طرفی امکان بروز پاسخ‌های ایمنی توسط سلول‌های دفاع ذاتی نمونه های تحت بررسی در مواجهه با ریز محیط سلول‌های توموری بوده است. نقش سلول‌های لنفوسیتی دفاع اختصاصی بخصوص لنفوسیت‌های کمکی یا Th نیز که برعلیه آنتی‌ژن‌های مشترک سلول‌های توموری و سلول‌های بنیادی جنینی موجب تکثیر آن‌ها در شرایط درون لوله ایست نیز اهمیت دارد چرا که این پاسخ‌ها در طول بارداری شکل یافته اند. بنابراین لازم است در یک مطالعه بسیار جامع، با استفاده از سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و نیز بکارگیری از چند آنتی ژن توموری منجمله MUC-1, 16 به ارزیابی دفاع اختصاصی مادران چندزا بر علیه Ag های توموری پرداختند که انجام این پروژه نیاز به طراحی و ابداع یک متدولوژی پیشرفته می‌باشد که جداسازی و تخلیص سلول‌های دفاع ایمنی داوطلبین به صورت کاملاً دقیق صورت پذیرد. تفاوت بین فعالیت گروه‌های تحت بررسی در شرایط کشت با کنترل آزمون‌ها نشان دهنده تحت تأثیر قرار گرفتن جمعیت سلولی در مجاورت ریز محیط تومور سل لاین‌ها می‌باشد. ۳) با استناد به یافته‌های این پژوهش، لمفوسیت‌های مادران مولتی پار، پاسخ تکثیری قابل توجهی در مجاورت با لاین توموری MCF-7 نشان دادند که در مقایسه با زنان بدون فرزند به لحاظ تفاوت‌آماری معنی‌داری داشت (p=۰/۰۲۶). این یافته می‌تواند دلیل توانایی تکثیری لمفوسیت‌های مادران چندزا را با پدیده وقوع میکروکایمریسم بیان کند، زیرا لاین MCF-7 واجد تمام خصوصیات مولکولی و فنوتیپیک با سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. این مادران بارها تجربه برخورد و همجواری با سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی را در بافت‌های خود دارا می‌باشند و دلیل این توان تکثیری، وجود سابقه دفاع ایمنی در برخورد با سلول‌های فوق می‌باشد که به طور حفاظتی موجب مقاومت و تکثیر در مقابل سل لاین توموری فوق شده است. بدین ترتیب فرضیه میکروکایمریسم و مقاومت به تومور را تقویت می‌نماید (۲۴).

در ارتباط با مسائلی که زنان جامعه ایرانی با آن دست به گریبانند، با توجه به نتایج مثبت و مفید حاصل از تعدد بارداری که در مطالعه حاضر نیز با آن مواجه شد، توصیه برای درک علمی از مفاهیم نوین رابطه بارداری با مقاومت به بروز تومور پستان را می‌توان به زنان جامعه ایرانی تعمیم داد. خوشبختانه با توجه به آموزه‌های دینی و نیز تأکید رهبریت و مسئولین کشور، توجه به ایجاد فرهنگ فرزندآوری می‌تواند یکی از راه‌های جلوگیری از گسترش اخیر سرطان پستان در بین زنان ایرانی باشد.

در انتها توجه به این نکته نیز ضروری است که به دلیل مشکلات و محدودیت‌های انتخاب نمونه مناسب که واجد تمام کرایتریاهای ورود به مطالعه و پرهیز از معیارهای خروج از مطالعه باشند، امکان دستیابی به برخی یافته‌های دیگر مانند فعالیت لمفوسیت‌های سایتوتوکسیک (CD8+/CD3+) فراهم نشد. البته نمی‌توان این نتیجه را تماماً به اختلاف معنی‌دار سن بین دو گروه که دلیل این امر، جوان‌تر بودن زنان بدون فرزند در مقابل مادران چندزا است، نسبت داد که ناشی از شرایط خاص جامعه شهری تهران می‌باشد، زیرا در سال‌های اخیر شاهد بالارفتن سن ازدواج و فرزندآوری بانوان می‌باشیم. از طرفی با وجود دسترسی به تعداد زیادی نمونه، در نظر گرفتن شرایط زندگی و نیز عدم سابقه تومور در افراد خانواده، بر سنگینی بار نمونه‌گیری افزود. این نکته را نیز باید در نظر گرفت که دلیل این عدم تفاوت بین گروه‌ها به لحاظ پاسخ‌های دفاع اختصاصی سایتوتوکسیک، این است که آنتی‌ژن‌های توموری در این سیستم هم کشتی مورد نظر نبودند و تنها فضای ریز محیطی سلول‌های توموری در حال کشت قادر به برانگیختن دفاع سلولی از پیش تشکیل یافته در مادران چندزا به صورت فعالیت سایتوتوکسیک نشده است. پس این احتمال وجود دارد که تنها بخشی از لمفوسیت‌های خاطره‌ای پاسخ دهنده به برخی از اجزای ریز محیط تومور به دلیل مجاورت مولکولی به تنهایی، تکثیر یافته اند.

دستیابی به موارد مستند در ارائه یک روش کارآمد به منظور بررسی ایمنی ضد تومور در مادران چندزا،

www.SID.ir

Archive of SID

نیازمند طراحی پژوهشی دیگر مبتنی بر تخلیص و تفکیک سلول‌های مختلف ایمنی و نیز ردیابی اجزای مولکولی سیستم دفاع ایمنی است.

نتیجه‌گیری

اپیدمیولوژی سرطان پستان در گروه مادران باسابقه تولد چند فرزند، در مقایسه با زنان بدون فرزند، موید این نظریه می‌باشد که تعدد باروری موجب مقاومت مادران به وقوع و متاستاز تومور پستان می‌گردد. امید است که با ارتقاء سطح آگاهی و وضعیت اقتصادی زنان در سنین ازدواج و بارداری، باروری در جامعه افزایش یافته و یکی از راه‌های پیشگیری از وقوع بدخیمی پستان، در جامعه زنان گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند و همچنین از همکاری مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی به خصوص سرکار خانم شباهنگ امیر شکاری و سرکار خانم فرهید عزیزپور، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. Asian Pac J Cancer Prev 2005; 6(3):359-63.
2. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol 2009; 20(3):556-63.
3. Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, Pourhoseingholi A, Barzegar F, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(1):367-70.
4. Gadi V, Nelson JL. Fetal microchimerism in women with breast cancer. Cancer Res 2007; 67(19):9035-8.
5. Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. Immunol Rev 2007; 220:82–101.
6. Mlecnik B, Bindea G, Pages F, Galon J. Tumor immunosurveillance in human cancers. Cancer Metastasis Rev 2011; 30(1):5–12.
7. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer 2012; 12(4):298–306.
8. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol 2010; 28(1):105–13.
9. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. J Clin Oncol 2011; 29(15):1949–55.
10. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. Nat Med 2008; 14(5):518–27.
11. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 2002; 296(5573):1634–5.
12. Havell EA, Fiers W, North RJ. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. J Exp Med 1988; 167(3):1067–85.
13. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. Cancer Metastasis Rev 2006; 25(3):409–16.
14. Woo CH, Eom YW, Yoo MH, You HJ, Han HJ, Song WK, et al. Tumor necrosis factor-α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. J Biol Chem 2000; 275(41):32357–62.
15. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. Nature Rev Cancer 2003; 3(4):276–85.
16. Fatima N, Zaman M, Fatima T. Increased risk of breast cancer in multiparous and lactating women attending a breast care clinic in Pakistan: a paradigm shift? Asian Pac J Cancer Prev 2010; 11(5):1219-23.
17. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. Endocr Relat Cancer 2007; 14(4):907–33.
18. Bhadoria AS, Kapil U, Sareen N, Singh P. Reproductive factors and breast cancer: a case–control study in tertiary care hospital of North India. Indian J Cancer 2013; 50(4):316-21.
19. Fasching PA, Ekici AB, Wachter DL, Hein A, Bayer CM, Häberle L, et al. Breast cancer risk – from genetics to molecular understanding of pathogenesis. Geburtshilfe Frauenheilkd 2011; 71(12):1228-35.
20. Hsieh C, Pavia M, Lambe M, Lan SJ, Colditz GA, Ekbom A, et al. Dual Effect of parity on breast cancer risk. Eur J Cancer 1994; 30(7):969-73.
21. Seppanen E, Fisk NM, Khosrotehrani K. Pregnancy-acquired fetal progenitor cells. J Reprod Immunol 2013; 97(1):27-35.

www.SID.ir

Archive of SID

22. Skowron-Cendrzak A, Rudek Z, Sajak A, Kubera M, Basta-Kaim A, Shani J. Effect of multiparity on T-cell proliferation response to mitogen stimulation in elderly women. Int J Immunopharmacol 1999; 21(3):177-83.
23. Agrawal B, Reddish MA, Krantz MJ, Longenecker BM. Does pregnancy immunize against breast cancer? Cancer Res 1995; 55(11):2257-61.
24. Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G, et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. Biomaterial 2012; 33(5):1437-44.

www.SID.ir