

بررسی اینوفونوتایپینگ لنفوسيتهای T ارتشاح یافته به تومور(TIL) در بیماران مبتلا به سرطان پستان

دکتر داور امانی^۱، دکتر زهیر محمد حسن^۲، دکتر مجتبی کدیریم زاده^۳، صادق فیض الله زاده^۳،
دکتر محمد حسین دهقان^۴

^۱ نویسنده مسئول، استادیار گروه اینمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، E-mail: amanid@sums.ac.ir
^۲ استاد گروه اینمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد اینمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران^۴ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

چکیده

زمینه و هدف: لنفوسيتهای ارتشاح یافته به تومور (Tumor Infiltrating Lymphocytes) TILs) عامل شناسایی و دفاع بر علیه سلولهای توموری بدخیم توسط سیستم ایمنی میزان بوده و سلولهای T، بیشترین سلولهای ایمنی ارتشاح یافته به داخل تومور هستند. اطلاعات متناقضی درباره سلولهای T داخل تومور وجود دارد و مکانیسم های متعددی برای توضیح ناکارایی پیشنهاد شده است. هدف این مطالعه بررسی وضعیت این لنفوسيتهای T ارتشاح یافته به بافت تومور در سرطان پستان انسان میباشد.

روش کار: از ۱۶ زن مبتلا به سرطان پستان بیوپسی گرفته شد. بررسی های پاتولوژیک و بافت شناسی نشان دادند که در ۱۳ نمونه نوع تومور کارسینوم مجرایی مهاجم IDC (Invasive Ductal Carcinoma) است. نمونه های بافتی بیماران و گروه کنترل، برای آنالیز بوسیله فلوسیتومتری آماده شدند.

یافته ها: نتایج این بررسی نشان داد که سرطان پستان انسان دارای مقادیر متفاوت و متغیری TILs است. در مورد درصد سلول های داخل توموری با فنوتیپ CD3+, CD45+, CD45+ / CD3+ در گروه های موردمطالعه اختلاف معنی داری یافت نشد. همچنین تفاوت معنی داری در مورد ارتشاح و وضعیت فعالیت زیر جمعیت سلولهای T مابین بیماران سرطانی و گروه کنترل وجود نداشت. سلولهای IDC در بیماران CD4+ و سلولهای CD8+ در بیماران با تومورهای نوع دیگر Invasive ILC (Atypical Medullary Carcinoma AMC و Lobular Carcinoma) بودند. سلولهای TCD8+ HLA-DR مارکر CD25 بعنوان مارکر فعالیت، بیان می کنند.

نتیجه گیری: در این مطالعه ارتباطی بین میزان TILs و اندازه و همچنین مراحل بالینی تومور یافت نشد. سلول های ایمنی در بیشتر سرطان های پستان به داخل یافته تومور ارتشاح می یابند. همچنین با درنظر گرفتن بیان مارکرهای فعالیت، این سلولها تاحدوی فعال شده هستند. درک مکانیسم های سرکوب سیستم ایمنی توسط سلول های سرطانی ممکن است اطلاعات مهمی درمورد راههای فرار تومور و همچنین پیشرفت استراتژی های ضد سرطان بدست دهد.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، لنفوسيتهای ارتشاح یافته به تومور، سلولهای T

دریافت: ۸۵/۶/۱۱ پذیرش: ۸۵/۱۰/۷

نقص پاسخ های ایمنی رخ می دهد. اما مکانیسم های ایجاد این اختلالات ایمنی بطور کامل درک نشده است.
[۱]

مقدمه

کارسینومای مجرایی مهاجم (IDC)^۱ شایع ترین نوع سرطان پستان در ایران است. در بیشتر بیماران سرطانی

^۱ Invasive Ductal Carcinoma

ایمنولوژیک را می‌توان تاحدودی به ورود سلولهای T تنظیم کننده به محل تومور نسبت داد [۱۷]. IL-2 را که نقش مرکزی در فعال شدن سلول T را دارد، می‌توان به فعالیت آنزیماتیک متالوپروتئینازهای ماتریکس مشتق از سرطان نسبت داد. سرانجام القا بیان ژن IDO (آنژیم مهم در سرکوب پاسخ اینمنی در حاملگی) توسط سلولهای سرطانی ممکن است نقش مهمی در سرکوب اینمنی بازی کند [۱۸]. آشکار شدن مکانیسمهای نقش عملکردی TILs در تومورها نه تنها به پیشرفت درمان موفق تومور کمک می‌کند، بلکه می‌تواند به درک مکانیزم‌های ناشناخته سیستم اینمنی در مواجهه با بدخیمی بینجامد.

هدف این تحقیق، تعیین درصد لنفوسيت‌های TCD4+ و TCD8+ ارتضاح یافته به بافت سرطان پستان (در مراحل مختلف بالینی) بوسیله فلوسیتومتری بود. تعیین میزان فعالیت این سلولها در مراحل بالینی تومور و مقایسه میزان ارتضاح TILs در کارسینوم مجرایی مهاجم (شایعترین نوع سرطان پستان در ایران) با انواع دیگر سرطان پستان اهداف دیگر این مطالعه بودند.

روش کار

۱۶ بیمار مبتلا به سرطان پستان که در انسیتو سرطان بیمارستان امام خمینی تهران تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند وارد این مطالعه شده و از آنها بیوپسی تومور گرفته شد. بیمارانی که سابقه شیمی درمانی و یا پرتو درمانی داشتند از مطالعه حذف شدند. سن بیماران بین ۳۷ تا ۹۰ سال متغیر بود. در ۱۳ بیمار (۲۵/۸۱٪) از بیماران مبتلا، نوع تومور کارسینوم مجرایی مهاجم (IDC)، و در سه بیمار مبتلا، نوع تومور کارسینومای مدولاری آتیپیک (ILC)^۲ (دو بیمار ۱۲٪) و کارسینومای مدولاری آتیپیک (AMC)^۳ (یک بیمار ۶٪) تشخیص داده شد. همچنین در سه بیمار نوع

لنفوسيت‌های ارتضاح یافته به داخل تومور که عمدتاً شامل سلولهای T هستند به سادگی در نئوپلاسم‌های مختلف قابل تشخیص هستند [۲]. اینمنی سلولی نقش مهمی در اینمنی بر علیه سلولهای سرطانی بازی می‌کند و ارزیابی کمی آن بوسیله اندازه گیری نسبت لنفوسيت‌های TCD4+ و TCD8+ صورت می‌گیرد. با پیشرفت تومور نسبت لنفوسيت‌های CD4+ در خون محیطی بیماران سرطانی کاهش می‌باید و این تغییر با پیش آگهی بد بیماری مرتبط است [۳-۵]. اختلال در اینمنی سلولی می‌تواند مرتبط با تغییر در نسبت این سلولها باشد.

در مطالعات بدخیم پلورال تعداد سلول‌های TCD8+ بطور معنی داری کمتر از تعداد سلول‌های TCD4+ است [۶-۹]. بر عکس نسبت سلولهای CD4+ در حفره پلورال بیماران سرطان ریه بدون بدخیمی، بطور معنی داری کمتر از سلولهای CD8+ است [۱۰، ۱۱].

مکانیسم‌های مختلفی برای ناکارآمدی TILs بر علیه سلول‌های سرطان پیشنهاد شده است. در اینمنوتراپی برخی از سرطان‌ها نظیر ملانوما با فعال کردن TILs نتایج سودمندی حاصل شده است [۱۲]. اختلالات عملکردی TILs به غیرطبیعی بودن مولکولهای سیگنال دهنده نسبت داده شده است، هرچند اطلاعات ضد و نقیضی در این رابطه وجود دارد [۱۳، ۱۴].

مرگ TILs در تومورهای مختلف به مکانیسم RCAS1، PD-1، FasL و مرگ سلولی در اثر فعالیت^۱ (AICD) نسبت داده می‌شود که تمامی این مکانیسم‌ها توسط سلول‌های سرطانی القا می‌شود [۱۶، ۱۷]. استفاده از مدل‌های حیوانی برای مطالعه TILs نشان داده است که اختلال پاسخ‌های اینمنی در اثر تومور نه تنها در نتیجه مکانیسم‌های آنژری کلونی، بلکه در نتیجه تحلیل و یا حذف سلول‌های اینمنی می‌باشد. علاوه بر این، بی‌پاسخی

² Invasive Lobular Carcinoma

³ Atypical Medullary Carcinoma

^۱ Activity Induced Cell Death

پارافورمالدئید فیکس شده و در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد و در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد [۲۰، ۱۹].

آنالیز فلوسیتومتری

پس از انجام مراحل فوق نمونه ها جهت آنالیز به آزمایشگاه اینمنوژنتیک دانشکده پزشکی تهران منتقل شدند. نمونه های سلولی با فلوسیتومتر کولتیر با ترکیب فیلترهای متواالی اندازه گیری شد. بررسی برروی نواحی لنفویید با پراکنش قدامی (Forward Scatter) و جانبی (Side Scatter) انجام شد. سلولهای با رنگ آمیزی دوگانه با استفاده از نرم افزار کولتیر بررسی شدند.

جهت بررسی آماری نتایج بدست آمده از آزمونهای آنالیزواریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون غیرپارامتریک کروسکال- والیس با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. با سطح اطمینان ۹۵٪ سطح احتمال قابل قبول برای تمامی آزمونهای آماری ۵٪ ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته ها

درصد لنفوسیتیهای T و لکوسیتیهای ارتشاچ یافته به تومور در بیماران سرطان پستان به منظور تخمین درصد لکوسیت ها و لنفوسیت ها در بیماران مبتلا به بدخیمی و تومور و گروه تومور خوش خیم، شانزده بیمار به سه گروه تقسیم شدند و پرتوکل جدول شماره ۱ استفاده شد.

تمامی داده ها در ناحیه Gate (لنفوسیت و لکوسیت محاسبه شدند. در بیماران IDC متوسط درصد سلول های ارتشاچ یافته، دارای فوتیپ CD45+، CD3+، CD45+ و CD3+CD45+ به ترتیب ۵۹/۷، ۲۰/۹، ۳۲/۵ و ۱۰/۱ بودند. آنالیز آماری تفاوت معنی داری در درصد سلول های CD45+ (لکوسیت ها) و سلول های CD3+CD45+ (لنفوسیت های T) بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل نشان نداد (جدول ۱ و شکل ۱).

تومور خوش خیم گزارش گردید که بعنوان کنترل در نظر گرفته شدند. از کلیه بیماران رضایت نامه جهت شرکت در مطالعه اخذ گردید.

تهیه سوسپانسیون سلولهای T

نمونه های بیوبسی تومور، داخل لوله های استریل حاوی محیط کشت و روی يخ جهت کارهای بعدی به آزمایشگاه اینمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافتند. بیوبسی تومورهای سفت انسان توسط فورسپس و اسکالپل به تکه های کوچک بریده شدند. قطعات بافتی دوباربا با فرسغات شسته شده، سپس ۵ میلی لیتر از آنزیم mg/ml (Cocktail Collagenase ۰/۰۰۲ mg/ml و DANase ۰/۰۰۲ mg/ml) به مجموعه اضافه شد و مخلوط آن به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سوسپانسیون حاصله از توری استیلی ۱۵۰ میکرونی عبورداده شد. سوسپانسیون سلول های منفرد بدست آمده دو بار شسته شده و با آنتی بادی منوکلونال نشاندار شدند [۲۰، ۱۹].

ایمونوفوتایپینگ

آنتی بادی های منوکلونال فلورسنت DAKO، Denmark برای تشخیص لکوسیتیها و anti-CD45 برای تعیین لکوسیتیها، anti-CD3/CD45 برای تعیین لنفوسیت های T و anti-CD45/CD4 برای تعیین لنفوسیت های CD45/CD8 به ترتیب برای تعیین لنفوسیت های T مکن و لنفوسیت های T سیتوتوکسیک استفاده گردیدند. همچنین دو آنتی بادی منوکلونال دیگر؛ آنتی CD25 و آنتی HLA-DR برای تعیین TILs Fعال شده استفاده شدند. در این مطالعه $1\text{ }\mu\text{m}$ از هر نمونه با $1\text{ }\mu\text{m}$ از هر آنتی بادی منوکلونال که بطور مستقیم بافلوئورسین ایزو تیو سیانات^۱ یا آر-فیکوواریترین^۲ کونژوگه بودند، رنگ آمیزی شدند. سپس هر نمونه با

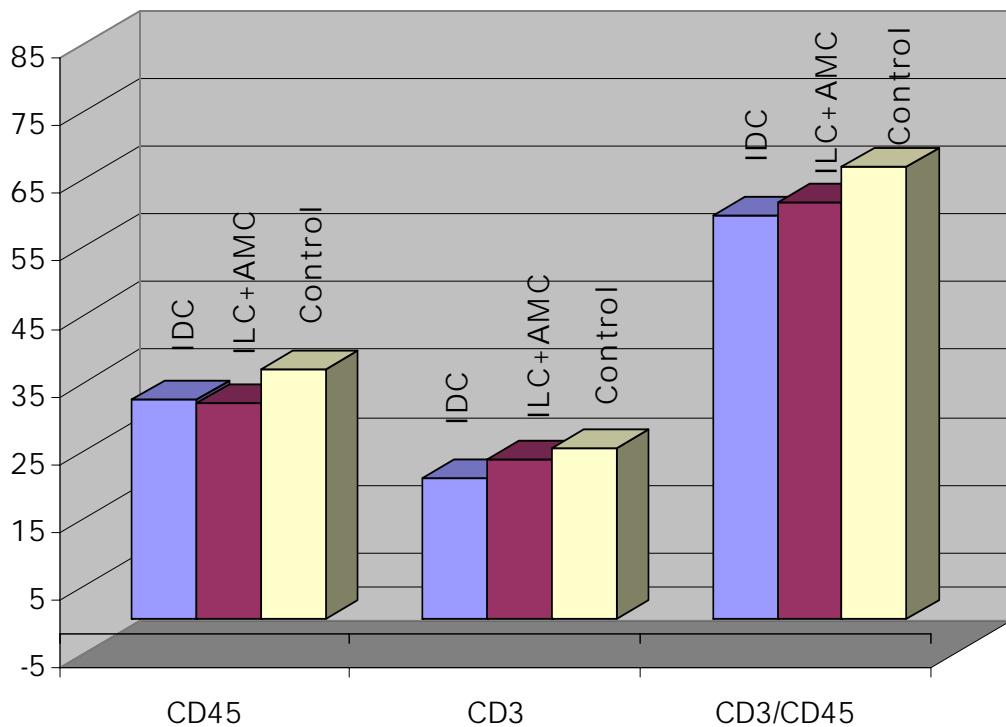
^۱ FITC

^۲ RPE

جدول ۱. مقایسه درصد لکوسيت ها و لنفوسيت های T داخل تومور در بیماران سرطان پستان و گروه کنترل

P Value	Group 3 Benign/control N=3	Group 2 ILC+AMC patients N=3	Group 1 IDC patients N=13	Marker
.۹۵	۳۷	۳۲	۳۲/۵	CD45 ⁺
.۹۶	۲۵/۳	۳۲/۷	۲۰/۹	CD3 ⁺
.۸۵	۶۶/۸	۶۱/۷	۵۹/۷	CD3 ⁺ /CD45 ⁺

IDC: Invasive Ductal Carcinoma ILC: Invasive Lobular Carcinoma AMC: Atypic Medullary Carcinoma



شکل ۱. مقایسه درصد لکوسيت ها و لنفوسيت های T داخل تومور در بیماران سرطان پستان و گروه کنترل

Group 1: IDC patients Group 2: ILC+AMC patients Group 3: Control

IDC: Invasive Ductal Carcinoma ILC: Invasive Lobular Carcinoma AMC: Atypic Medullary Carcinoma

(گروه ۱ و ۲) و گروه کنترل در مورد ارتباخ و وضعیت فعالیت زیر جمعیت های لنفوسيتیهای T (کمکی و سیتوکسیک) وجود ندارد. سلولهای T کمکی (٪ ۷/۷) در بیماران IDC و سلولهای T سیتوکسیک (٪ ۱۰/۳) در بیماران مبتلا به سایر تومورها (AMC+ ILC) به ترتیب بیشترین سلول های ارتباخ یافته بودند.

بررسی زیر جمعیت های لنفوسيتیهای T داخل تومور در بیماران با سرطان پستان به منظور ارزیابی درصد و وضعیت فعالیت این سلولهای با استفاده از پروتکل جدول شماره ۲ انجام شد.

تمامی نتایج در ناحیه (Gate) لکوسيتیها ارزیابی شدند. همانطوریکه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است، اختلاف معنی داری بین بیماران سرطانی

سلول های B ارتashag يافته به تومور نادر هستند [۲۴,۲۳,۲۱].

دربخی از تومورهای ایمونوژنیک، TILs نسبت بیشتری از سلول های عملکردی^۱ را شامل می شود که به طور اختصاصی سلولهای توموری را شناسایی می کنند [۲۶,۲۵].

اختصاصی بودن TILs نسبت به توموری که به آن ارتashag می یابند بیانگر آنست که سلولهای توموری، آنتی ژنیای بیان می کنند که ایمونوژنیک هستند. T-جانکر^۲ و همکارانش معتقدند که حضور سلولهای افکتور فعال شده در رافت توموری همیشه به این مفهوم نیست که پاسخ ایمنی اختصاصی رخداده است [۲۷].

در این مطالعه لکوسیتهای ارتashag يافته به تومور بیشتر سلولهای CD3+ بودند (۳۰/۳٪ سوسپانسیون سلول توموری). با اینکه روشهای مختلفی در آزمایشگاههای مختلف جهت بررسی TILs بکاربرده شده است ولی نتایج ما، يافته های دیگران را تایید می کند [۲۹,۲۸].

در مرور زیر جمعیتهای لنفوسيت T، نتایج این مطالعه نشان داد که سلولهای CD4+ (کمکی) و CD8+ (سیتو توکسیک) تقریباً بطور مساوی در داخل توده توموری بیماران کارسینوم مجرایی مهاجم (IDC) یافت می شوند (جدول شماره ۳).

در حالیکه در بیماران مبتلا به انواع دیگر سرطان پستان (AMC و ILC)، لنفوسيتهای CD8+ سلولهای غالب هستند. نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر در این مورد متفاوت می باشد. در بیشتر این گزارشات نشان داده شده است که در سرطان پستان انسان، سلولهای غالب ارتashag يافته به بافت تومور، سلولهای T کمکی هستند [۳۱,۳۰,۲۴].

در حالیکه دیگر محققین معتقدند که زیر جمعیت غالب TILs سلولهای T سیتو توکسیک هستند [۳۲,۳۹,۲۸].

سلول های TCD8+ ارتashag يافته به تومور، مارکر فعالیت دیررس (HLA-DR) را بیشتر از مارکر فعالیت زودرس (CD25) بیان می کردد.

ارتباط بین TILs و اندازه های مختلف کارسینوم مجرایی مهاجم (IDC) به منظور ارزیابی ارتباط بین درصد TILs و اندازه تومور، سیزده بیمار IDC ارزیابی شدند. همانطوریکه در جدول شماره ۳ آمده است، درصد و وضعیت فعالیت زیر جمعیتهای مختلف TILs در اندازه های مختلف تومور اختلاف معنی داری نداشتند.

اما در بیشتر سلولهای بررسی شده، کاهش درصد TILs با افزایش اندازه تومور مشاهده شد (جدول ۳). سلول های CD4+/CD8+ و CD8+CD25+/CD8+ ابتدا در اندازه ۳ cm افزایش یافته بودند. ارتباط بین TILs و مرحله بالینی کارسینومی مجرایی مهاجم همانطوریکه در جدول ۴ خلاصه شده، اختلاف معنی داری بین درصد و وضعیت فعالیت TILs در مرحله مختلف بالینی کارسینومی مهاجم مجرایی وجود ندارد. همچنین تعداد لنفوسيتهای T سیتو توکسیک که مارکر فعالیت دیررس (HLA-DR) را بیان می کنند بطور قابل ملاحظه ای با پیشرفت تومور افزایش می یابد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۴).

بحث

در تومورهای انسانی تعداد متغیری از لکوسیتها، خاصه ماکروفازها و لنفوسيتها، ارتashag می یابند. اکثر لنفوسيتهای ارتashag يافته به تومور (TILs) سلولهای T CD3+ هستند. سلولهای NK و لنفوسيت B در بافت های نئوپلاستیک اغلب خیلی کم هستند و یا اصلاً حضور ندارند [۲۲,۲۱].

میزان ارتashag و وضعیت ایمنولوژیک ماکروفازها و سلولهای NK همراه تومور در سرطان پستان انسان در مطالعاتی توسط نویسنده مورد بررسی قرار گرفته اند [۲۰,۱۹]. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده و منتشر نشده توسط محققین و گزارش سایر محققین،

¹ Effector

² Jonker

جدول ۲. مقایسه وضعیت اینتونوفوتایپینگ زیر جمعیت های مختلف لنفوسیتهای T داخل تومور در بیماران سرطان پستان و گروه کنترل

P Value	Group 3 Benign/control N=3	Group 2 ILC+AMC patients N=3	Group 1 IDC patients N=13	Marker
T Cytotoxic				
.۰/۳	۴/۵	۱۰/۳	۶/۵۲	CD8 ⁺
.۰/۶	۳۳/۲	۳۶/۹	۴۴/۵	CD8 ⁺ /CD3 ⁺
.۰/۹	۴۷	۶۷	۵۲/۳	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ CD8 ⁺
.۰/۶	۹/۳	۱۱/۴	۱۰/۴	CD8 ⁺ CD25 ⁺ / CD8 ⁺ *
.۰/۹	۲۹/۲	۳۴/۷	۳۳	CD8 ⁺ HLA-DR / CD8 ⁺ *
T Helper**				
.۰/۴	۳	۲/۷	۷/۷	CD4 ⁺
.۰/۹	۴۵/۶	۲۵/۷	۴۵	CD4 ⁺ /CD3 ⁺
.۰/۹	۵۵	۴۲/۵	۵۷/۲	CD4 ⁺ /CD4 ⁺ CD8 ⁺

* the expression of activation markers (CD25 and HLA-DR) on intratumor TCD8⁺ cells were significantly different ($p=0.001$) by T test.

** in the case of helper T lymphocytes the activation status were not studied because of technical problems

IDC: Invasive Ductal Carcinoma ILC: Invasive Lobular Carcinoma AMC: Atypic Medullary Carcinoma

جدول ۳. مقایسه وضعیت اینتونی TILs در بیماران کارسینوم مجرایی مهاجم در اندازه های مختلف تومور

P Value	<2 cm	2-3cm	> 3 cm	Marker
T Cytotoxic				
.۰/۳	۲/۷	۶/۵	۱۰/۵	CD8 ⁺
.۰/۶	۳۹	۳۷/۵	۵۹/۵	CD8 ⁺ /CD3 ⁺
.۰/۹	۴۸/۳	۵۰	۵۹/۲	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ CD8 ⁺
.۰/۶	۹/۲	۱۴/۹	۵/۴	CD8 ⁺ CD25 ⁺ / CD8 ⁺ *
.۰/۹	۳۰/۲	۳۱/۴	۳۸	CD8 ⁺ HLA-DR / CD8 ⁺ *
T Helper**				
.۰/۴	۲/۷	۳/۷	۴/۴	CD4 ⁺
.۰/۹	۴۲/۳	۴۷/۹	۴۴/۹	CD4 ⁺ /CD3 ⁺
.۰/۹	۵۱/۷	۶۴/۸	۵۵/۶	CD4 ⁺ /CD4 ⁺ CD8 ⁺

* the minimum number of cases in each group was three

جدول ۴. مقایسه وضعیت اینتونی TILs در بیماران کارسینوم مجرایی مهاجم در مراحل مختلف بالینی تومور

P Value	III	II	I	Marker
T Cytotoxic				
.۰/۵	۵/۷	۱۱/۴	۶/۵	CD8 ⁺
.۰/۹	۳۷/۷	۳۷/۸	۴۶/۷	CD8 ⁺ /CD3 ⁺
.۰/۷	۴۳/۶	۶۳	۵۵/۱	CD8 ⁺ /CD4 ⁺ CD8 ⁺
.۰/۴	۹/۸	۵/۸	۵/۷	CD8 ⁺ CD25 ⁺ / CD8 ⁺ *
.۰/۳	۴۱/۴	۲۹/۸	۲۷	CD8 ⁺ HLA-DR / CD8 ⁺ *
T Helper**				
.۰/۹	۳/۱	۳	۴	CD4 ⁺
.۰/۹	۴۲/۱	۴۲/۱	۴۸/۲	CD4 ⁺ /CD3 ⁺
.۰/۹	۵۶/۴	۵۵/۴	۵۴/۸	CD4 ⁺ /CD4 ⁺ CD8 ⁺

* the minimum number of cases in each clinical stage was three

نتایج این تحقیق نشان داد بین ارتashاج TILs و اندازه های مختلف تومور و همچنین مراحل بالینی تومور در بیماران کارسینوم مجرایی مهاجم اختلاف معنی داری وجود ندارد. همانطوریکه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

ارتashاج سلول های CD8+/CD8+HLADR+ با پیشرفت تومورافزایش می یابد (در مرحله یک ۲۷٪ و در مرحله سه ۴۱٪). این یافته ها برای مونوژنیتی تومورونقش ضدسرطانی لنفوسيتهای T سیتوتوکسیک تاکید دارد اما پیشرفت مراحل بالینی تومور نشان میدهد که این سلولها از نظر ایمونولوژیکی سرکوب شده اند. همچنین در این مطالعه ما نتوانستیم ارتباطی بین میزان ارتashاج زیر جمعیتهای مختلف TILs با سن و تعداد گره لنفي در گیر بیماران پیدا کنیم (داده های منتشر نشده محققین)، در صورتیکه قبلا در یک مطالعه ارتباط معنی داری بین میزان ارتashاج TILs و تعداد گره های لنفي در گیر بدست آمد [۳۳]. در دو گزارش اخیر ما ارتباط معنی داری در مورد ماکروفازهای همراه تومور (TAM) [۲۱] و سلولهای NK [۲۲] ارتashاج یافته به تومورین بیماران سرطان پستان و گروه کنترل پیدا نکردیم.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعداد متفاوتی از سلول های T فعال شده مخصوصاً سلول های T سیتوتوکسیک به سرطان پستان انسان ارتashاج می یابند. چون درصد TILs فعال شده با پیشرفت بالینی تومورافزایش می یابد، به نظر می رسد که این سلولها سرکوب شده باشند. درک مکانیسم های مقاومت و یا مهارکنندگی سلول های توموری در برابر پاسخ ایمنی ممکن است کمک شایانی به شناسائی مکانیسم های فرار تومور و همچنین پیشرفت استراتژیهای درمان سرطان نماید.

³ Tumor Assonated Macrophage

جورجیانوس^۱ و همکارانش در یک مطالعه با روش ایمنوهیستو کمیکال نشان دادند که بین میزان ارتashاج TILs و زیر جمعیت غالب لنفوسيت های T در داخل تومور ارتباط وجود دارد. به طوریکه در تومورهای با ارتashاج متوسط TIL، احتمال غالب بودن سلولهای T کمکی وجود دارد، در حالیکه با افزایش تعداد TILs کاهش در نسبت سلول های T کمکی به همراه افزایش نسبت سلولهای T سیتوتوکسیک مشاهده می شود [۳۳]. لذا پیشنهاد شده است که لنفوسيتهای TCD4+ ارتashاج یافته به تومور نقش مهمی در استقرار و بقای لنفوسيتهای TCD8+ اختصاصی در محل تومور دارد [۳۴].

بخشی از این نتایج متضاد را می توان به اندازه نمونه تومور و همچنین روش های متفاوتی که در آزمایشگاه های مختلف برای بررسی این سلولها استفاده شده است، نسبت داد.

نتایج این تحقیق نشان داد که لنفوسيتهای T سیتوتوکسیک ارتashاج یافته به بافت تومور هر دو مارکر فعالیت سلولهای T یعنی CD25 (مارکر فعالیت دیررس) (مارکر فعالیت اخیر) و HLA-DR (P=0,001) را بیان می کنند، اما میزان بیان HLA-DR نسبت به CD25 بطور معنی داری بیشتر است (جدول ۲). این یافته ها مطابق با نتایج وايت فورد^۲ و همکارانش است [۲۸].

همچنین این گروه نشان دادند که میزان بیان HLA-DR در سلول های CD8+ نسبت به CD4+ بیشتر است. در تحقیق حاضر، ما به دلیل مشکلات تکنیکی نتوانستیم وضعیت فعالیت سلول های T کمکی داخل تومور را بررسی کنیم. بررسی های قبلی TILs را از نظر فنوتیپی بعنوان سلولی که مارکرهای فعالیت مزمن (D69+ HLA-DR+) را در سطح خود دارند، معرفی می کنند [۳۶,۳۵].

در یک بررسی دانشمندان نشان دادند که سلولهای کارسینوم مدولاری در مقایسه با سلولهای کارسینومی مجرایی میزان بیشتری HLA-DR بیان می کنند [۳۶].

¹ Georgiannos

² Whitford

بخاطر تبیه نمونه های سرطان پستان و همچنین
از آقای دکتر پاکزاد کمال تشكر را دارند.

تقدیر و تشکر

این کار از نظر مالی بوسیله دانشگاه تربیت مدرس
تهران حمایت شد. نویسندهان از آقای دکتر عطری

References

- 1-Remedi MM, Hliba E, Demarchi M, Depiante-Depaoli M. Relationship between immune state and tumor growth rate in rats bearing progressive and non-progressive mammary tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 1998; 46:350-4.
- 2- Van Ravenswaay Claasen HH, Kluin PM, Fleuren GJ. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Lab Invest.* 1992;67:166-74.
- 3- Gemignani M, Maiman M, Fruchter RG, Arrastia CD, Gibbon D, Ellison T. CD4 lymphocytes in women with invasive and pre-invasive cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 1995;59:364-9.
- 4- Greenstein A, Pecht M, Kaver I, Trainin N, Braf Z. Characterization of peripheral blood T-cell subpopulation of bladder cancer patients. *Urol Res.* 1991;19:219-22.
- 5- Kaver I, Pecht M, Trainin N, Greenstein A, Braf Z. T lymphocyte subsets and function in the peripheral blood of patients with urological cancer. *Oncology.* 1992;49:108-13.
- 6- Lucivero G, Pierucci G, Bonomo L. Lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. *Eur Respir J.* 1988; 1: 337-40.
- 7- Inoue Y, Shijubo N, Uede T. Induction of killer cells from lymphocytes in pleural effusion of advanced lung cancer patients. *Jpn J Cancer Res.* 1990; 81: 1012-20
- 8- Albera C, Mabritto I, Ghio P, Scagliotti GV, Pozzi E. Lymphocyte subpopulations analysis in pleural fluid and peripheral blood in patients with lymphocytic pleural effusions. *Respiration.* 1991;58:65-71.
- 9- Yanagawa H, Sone S, Nii A, Fukuta K, Nakanishi M, Maeda K, et al. Ogura T. Lymphokine-activated killer induction and its regulation by macrophages in malignant pleural effusions. *Jpn J Cancer Res.* 1989;80:1220-7.
- 10- Takahashi K, Sone S, Kimura S, Ogura T, Monden Y. Phenotypes and lymphokine-activated killer activity of pleural cavity lymphocytes of lung cancer patients without malignant effusion. *Chest.* 1993 ;103:1732-8.
- 11- Takahashi K, Sone S, Saito S, Kamamura Y, Uyama T, Ogura T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments lymphokine-activated killer activity from pleural cavity mononuclear cells of lung cancer patients without malignant effusion. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86: 861-6.
- 12- Chiou SH, Sheu BC, Chang WC, Huang SC, Hong-Nerng H. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol.* 2005; 67: 35-50.
- 13- Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin, C, Matsuda, M, Mellstedt, H, et al. Decreased expression of the signal-transducing chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 5610-12.
- 14- Matsuda, M., Petersson, M., Lenke, R., Taupin, J.-L., Magnusson, I., Mellstedt, H., et al. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer.* 1995; 61: 765-72.
- 15- Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3137-45.
- 16- Joachim HL, Decuseara R, Giancotti F, Dorsett BH. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol Res Pract.* 2005;200:743-51.
- 17- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004 ;5:266-71.

- 18- Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer.* 2002;101:151-5.
- 19- Amani D, Hassan ZM, Ravangard F, Farazmand S, Karim-Zadeh M. Flowcytometric Analysis of Tumor Associated Macrophages in Invasive Ductal Carcinoma of Breast. *Iranian J Immunology.* 2005; 2:117-22.
- 20- Farazmand S, Amani D, Hassan ZM. Investigation of NK cell population in Peripheral Blood and Tumor Lesions of Patients with Breast Cancer. *Iranian J Immunology.* 2005; 2:152-57.
- 21- Wong PY, Staren ED, Tereshkova N, Braun DP. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J Surg Res.* 1998;76:95-103.
- 22- Zhang XD, Schiller GD, Gill PG, Coventry BJ. Lymphoid cell infiltration during breast cancer growth: a syngeneic rat model. *Immunol Cell Biol.* 1998;76:550-5.
- 23- von Kleist S, Berling J, Bohle W, Wittekind C. Immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations infiltrating breast carcinomas and benign lesions. *Int J Cancer.* 1987;40:18-23.
- 24- Underwood JC, Giri DD, Rooney N, Lonsdale R. Immunophenotype of the lymphoid cell infiltrates in breast carcinomas of low estrogen receptor content. *Br J Cancer.* 1987;56:744-6.
- 25- Whiteside TL, Jost LM, Herberman RB. Tumor-infiltrating lymphocytes. Potential and limitations to their use for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1992;12:25-47.
- 26- Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res.* 1992;58:143-75.
- 27- Joncker NT, Marloie MA, Chernysheva A, Lonchay C, Cuff S, Klijanienko J, et al. Antigen-independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors. *Int J Cancer.* 2006;118:1205-14.
- 28- Whitford P, Mallon EA, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer.* 1990;62:971-5.
- 29- Bilik R, Mor C, Hazaz B, Moroz C. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1989;28:143-7.
- 30- Gottlinger HG, Rieber P, Gokel JM, Lohe KJ, Riethmuller G. Infiltrating mononuclear cells in human breast carcinoma: predominance of T4+ monocytic cells in the tumor stroma. *Int J Cancer.* 1985;35:199-205.
- 31- Ben-Ezra J, Sheibani K. Antigenic phenotype of the lymphocytic component of medullary carcinoma of the breast. *Cancer.* 1987;59:2037-41.
- 32- Hurlimann J, Saraga P. Mononuclear cells infiltrating human mammary carcinomas: immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies. *Int J Cancer.* 1985;35:753-62.
- 33- Eorgiannos SN, Renaut A, Goode AW, Sheaff M. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery.* 2003;134:827-34.
- 34- Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, et al. Tumor specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol.* 2000;165:6047-55.
- 35- Agrawal S, Marquet J, Delfau-Larue MH, Copie-Bergman C, Jouault H, Reyes F, et al. CD3 hyporesponsiveness and in vitro apoptosis are features of T cells from both malignant and nonmalignant secondary lymphoid organs. *J Clin Invest.* 1998;102:1715-23.
- 36- Lazzaro B, Anderson AE, Kajdacsy-Balla A, Hessner MJ. Antigenic characterization of medullary carcinoma of the breast: HLA-DR expression in lymph node positive cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2001;9:234-41