سطح سرمی عوامل محرک کلونی گرانولوسیتی، ماکروفاژی و گرانولوسیتی- ماکروفاژی در خون محیطی بیماران مبتلا به تومور پستان

محبوبه رزمخواه[1]، پریسا کریم‌زاده[2]، فاطمه اقبالی[3]، سمیه رضایی فرد[4]، زهرا فقیه[5]*

۱. دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲. پزشک عمومی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳. پزشک عمومی، بیمارستان نمازی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۴. دانشجوی دکتری ایمونولوژی سرطان، مرکز تحقیقات سرطان، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۵. استادیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸

چکیده

زمینه و هدف عوامل محرک کلونیگلیکوپروتئین‌هایی هستند که تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونساز را در مغز استخوان تحریک می‌کنند. اما مطالعات متعدد نشان داده‌اند این فاکتورها می‌توانند سبب تحریک تکثیر سلول‌های غیر خونساز، ازجمله سلول‌های سرطانی نیز شوند. ازاین‌رو در این مطالعه عوامل محرک کلونی-ماکروفاژی (M-CSF)، ماکروفاژی-گرانولوسیتی (GM-CSF) و گرانولوسیتی (G-CSF) در سرم بیماران مبتلا به تومور پستان و ارتباط آن‌ها با پارامترهای پاتولوژیکی و پاراکلینیکال بیماری بررسی شد.

مواد و روش‌ها ۶۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان که هیچ درمانی دریافت نکرده بودند و ۵۴ زن سالم که از لحاظ سنی با گروه بیمار همخوانی داشتند به‌عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. از هر دو گروه پس از اخذ رضایت آگاهانه ۵ سی‌سی خون محیطی گرفته و سرم آن‌ها جدا شد. سطح سرمی سایتوکاین‌های مورد بررسی با روش cytokine-bead array اندازه‌گیری شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS18 و سطح معناداری ۰/۰۵ بررسی شد.

یافته‌ها میانگین سطح سرمی فاکتورهای رشد G-CSF، M-CSF و GM-CSF در بیماران مبتلا به سرطان پستان بیماران به ترتیب ۱۳/۱۶±۱۴/۱۸، ۵/۶۲±۶/۱۱ و ۸۳/۲۲±۶۳/۴۸ pg/ml محاسبه شد. هرچند که آنالیز آماری تفاوت معناداری بین سطح سرمی این فاکتورهای رشد در دو گروه بیمار و گروه کنترل نشان نداد ($p>0.05$)، اما بررسی‌های بیشتر نشان داد که با افزایش مرحلهٔ بیماری از I به III سطح سرمی GM-CSF به‌طور معناداری کاهش می‌یابد ($p=0.016$).

نتیجه‌گیری در مجموع نتایج این مطالعه حاکی از نقش آنتی‌تومورژنیک GM-CSF در سرطان پستان بود. هرچند که تأیید این نتایج نیازمند انجام مطالعات کامل‌تر با حجم نمونه بیشتر است.

کلیدواژه‌ها:
خون محیطی، سرطان پستان، G-CSF،M-CSF ، GM-CSF

مقدمه

سلول‌های توموری و همچنین سلول‌هایی که قسمتی از ریزمحیط تومور هستند از جمله سلول‌های عروقی، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های التهابی، به‌طور مداوم در معرض

* نویسندهٔ مسئول: زهرا فقیه
نشانی: شیراز، خیابان زند، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکدهٔ پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان

تلفن: ۰۷۱-۳۲۳۰۳۶۸۷ **دورنگار:** ۰۷۱-۳۲۳۰۴۹۵۲
رایانه: faghihz@sums.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-4563-3069
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-0875-2851

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۵، شمارهٔ ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۷، ص ۸۰۹-۸۱۷
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها هستند که رشد، تهاجم و متاستاز آن‌ها را تحت تأثیر خود قرار می‌دهند. از طرف دیگر، سلول‌های توموری نیز با بیان مارکرها و تولید فاکتورهای متعدد، بر سلول‌های اندوتلیوم، ماکروفاژها، سلول‌های T و فیبروبلاست‌ها اثر می‌گذارند تا از دفاع میزبان فرار کنند، آنژیوژنز انجام دهند و فاکتورهایی که باعث تحریک رشد، بقا و متاستاز تومور می‌شوند را تحریک کنند [۱].

عوامل محرک کلونی[1] گلیکوپروتئین‌هایی هستند که تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونساز را در مغز استخوان تحریک می‌کنند. این فاکتورها که با انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی و غیرایمنی تولید می‌شوند، شامل فاکتور محرک کلونی ماکروفاژی M-CSF یا CSF1، GM-CSF یا CSF2، G-CSF یا CSF3 هستند که عوامل مهم در بقا، تکثیر، تمایز، بلوغ و فعال‌سازی عملکرد سلول‌های خونساز از جمله مونوسیت‌ها و ماکروفاژها شناخته شده‌اند [۲، ۳]. همچنین در مطالعات نشان داده شده است که این فاکتورهای رشد می‌توانند باعث تحریک تکثیر سلول‌های غیرخونساز، از جمله سلول‌های سرطانی در محیط آزمایشگاهی نیز شوند [۴-۶]. گزارش‌ها متعددی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بسیاری از سلول‌های توموری از جمله پروستات [۷]، ریه [۸]، کولورکتال [۹-۱۱] و اندومتریوز [۱۲، ۱۳] نیز قادر به تولید این فاکتورها هستند. مجموعه مطالعات انجام شده حاکی از نقش مهم فاکتورهای محرک کلونی به‌ویژه M-CSF، GM-CSF و G-CSFدر بیولوژی تومور است [۲، ۱۴]. بخشی از این رفتار را می‌توان به تحریک مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک و اثر آن‌ها بر فرایند ارائهٔ آنتی‌ژن و پاسخگویی ایمنی نسبت داد [۱۵، ۱۶]. همچنین این فاکتورها با مکانیسم‌های مختلف از جمله تحریک آنژیوژنز، شرایط را برای رشد تومور فراهم می‌آورند یا سبب تهاجم و متاستاز در رده‌های مختلف سرطانی می‌شوند [۱۶-۱۸].

اما نکتهٔ قابل توجه آن است که در تمام مطالعات انجام شده میزان این فاکتورها به تنهایی و به روش‌های متفاوت و بعضاً با دقت‌های پایین مثل الیزا اندازه‌گیری شده است. ازاین‌رو در این مطالعه ما به این فاکتورها در کنار هم و با روش جدید و بسیار دقیق‌تر cytokine bead array نگاه کردیم که قابلیت اندازه‌گیری مقادیر بسیار پایین‌تر از روش‌های معمول مانند الیزا را دارد و ارتباط آن‌ها را با یکدیگر و فاکتورهای پاراکلینیکی و پاتولوژیکی بررسی کردیم.

1. Colony stimulating factors: CSFs

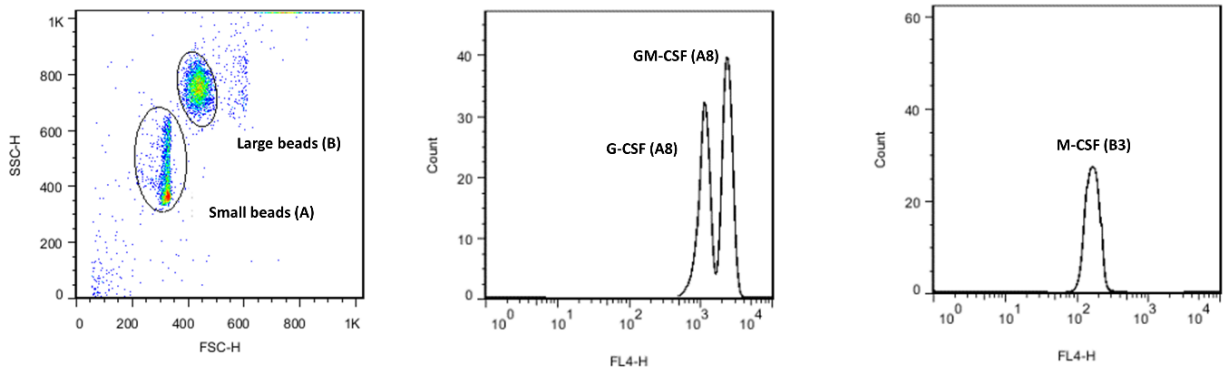
مواد و روش کار

نمونه‌ها

در مطالعهٔ مورد-شاهدی، ۶۲ زن مبتلا به سرطان پستان با میانگین سنی ۱۱/۷۸ ± ۴۸/۳۷ و از منطقهٔ جنوب کشور که سرطان آن‌ها توسط پزشک متخصص و بررسی‌های پاتولوژیک ثابت شده بود، وارد این مطالعه شدند. همچنین ۵۴ زن سالم که از لحاظ سنی با گروه بیمار همخوانی داشته (۸/۹۳ ± ۴۵/۰۷) و فاقد هر گونه سرطان و بیماری‌های خود ایمن در خود و خانوادهٔ درجه‌یک خود بودند نیز به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. این مطالعه با کد اخلاق مرد تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی شیراز قرار گرفت (IR.SUMS.REC.1395.S222). از هر دو گروه بیمار و کنترل پس از اخذ رضایت آگاهانه ۵ سی‌سی خون محیطی گرفته شد، پس از گذشت ۳۰ دقیقه از لخته شدن نمونهٔ خون، به مدت ۱۰ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰×g قرار داده شد. سپس سرم‌های به دست آمده تا زمان انجام تست در حجم‌های ۳۰ میکرولیتر در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شدند.

اندازه‌گیری سطح سرمی فاکتورهای رشد G-CSF، M-CSF و GM-CSF

سطح سرمی سایتوکین‌های G-CSF،M-CSF وGM-CSF با روش cytokine bead array و براساس پروتکول کیت شرکت Biolegend (Biolegend, USA) اندازه‌گیری شد که روش ایمونو اسی مبتنی بر بیدهای کوچک است. این روش با بهره‌گیری از همان اصول اساسی ساندویچ ایمنی (بید-سایتوکاین-آنتی‌بادی) عمل می‌کند و از این طریق یک آنالیت محلول بین دو آنتی‌بادی گیر می‌افتد. جمعیت مهره‌ها در اندازه‌های مختلفی است و میزان متفاوتی از نور فلورسانس را به خود اختصاص می‌دهند که به آن‌ها اجازه می‌دهد به‌وضوح از یکدیگر متمایز باشند. به‌علاوه هر مجموعه مهره‌ای درسطح خود با یک آنتی‌بادی اختصاصی کانژوگه شده است که باعث می‌شود به‌عنوان دریافت‌کننده یک آنالیت خاص عمل کند. درنهایت برای هر جمعیت از بیدها، شدت سیگنال فلورسنت با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری اندازه‌گیری می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار خوانش فلوسیتومتری عوامل محرک کلونی با روش سایتوکاین-بید-آری (CBA)

در این روش به‌طور خلاصه نخست سرم را با بافر واکنش به نسبت یک به دو رقیق و سپس در تیوب‌های مربوطه ریخته شد. سپس به هر تیوب ۲۵ میکرولیتر بافر واکنش و ۲۵ میکرولیتر میکروبید اضافه شد. پس از آن ۲۵ میکرولیتر آنتی‌بادی تعیین کننده (detection Ab) به تیوب‌های مربوطه اضافه شد. در تیوب‌های استاندارد به‌طور هم زمان با تیوب‌های تست، ابتدا ۲۵ میکرولیتر ماتریکس B و سپس استانداردهای ۱ تا ۷ به میزان ۲۵ میکرولیتر به هر تیوب اضافه شد. استانداردهای ۱ تا ۷ بر اساس دستورالعمل کیت از محلول استاندارد موجود در کیت تهیه شد. به تیوب‌های استاندارد ۲۵ میکرولیتر ماتریکس B اضافه شد و مراحل اضافه کردن بید و آنتی‌بادی تعیین کننده در تیوب‌های استاندارد نیز انجام شد. سپس تیوب‌های تست و استاندارد روی یک شیکر با دور ۵۰۰ rpm به مدت دو ساعت قرار داده شدند. پس از آن ۲۵ میکرولیتر محلول SAPE به هر تیوب اضافه شده و مجدداً تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه دیگر روی شیکر قرار داده شدند. پس از آن تیوب‌ها دو مرتبه با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شست‌وشو، شسته شده و درنهایت به هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر محلول شست‌وشو اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری چهار رنگ FACSCalibur (BD Biosciences, USA) مورد خوانش قرار گرفت.

آنالیز آماری

سطح سرمی سایتوکین‌ها بر اساس پروتکول کیت مربوط اندازه‌گیری و غلظت هر آنالیت بر اساس منحنی استاندارد شناخته‌شده‌ای با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی LEGENDplex (Biolegend, USA) تعیین شد. نوع آنالیز استفاده شده در این طرح (Log Scale) Five parameter curve fitting بود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری با نرم‌افزار SPSS 16 آنالیز شد. پس از بررسی توزیع داده‌ها، چون توزیع نمونه‌ها نرمال نبود از آزمون Mann-Whiney U test برای مقایسهٔ ارتباط دو گروه، از آزمون Kruskal-Wallis H برای بررسی ارتباط بیش از دو گروه و از آزمون Spearman Ranks' Correlation برای بررسی ارتباط بین سطح سرمی سایتوکاین‌ها با یکدیگر یا با سن بیماران استفاده شد. P value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

نمونه‌ها

در این مطالعه سطح سرمی فاکتورهای رشد M-،G-CSF GM-CSF،CSF در میان ۱۱۶ نمونه شامل ۶۲ فرد بیمار مبتلا به سرطان پستان در مراحل مختلف بیماری و ۵۴ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل اندازه‌گیری شده است. تمامی بیماران زن بودند. اطلاعات پایه بیماران در جدول ۱ آمده است. بیشترین بیماران در مرحلهٔ ۲ بیماری (۲۴/۶۴، ۳۸/۷۰ درصد) به سر می‌بردند و هیچ‌یک از بیماران در هنگام عمل در مرحلهٔ ۴ نبودند. در عمدهٔ بیماران درجهٔ تمایز بافت توموری متوسط (II) (۲۶درصد) و شایع‌ترین نوع تومور کارسینومای مهاجم داکتال (۸۷/۱ درصد) بود. درگیری غدهٔ لنفاوی نیز در ۵۷/۴درصد از بیماران مشاهده شد.

جدول ۱. ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی بیماران مبتلا به سرطان پستان

ویژگی‌های مورد بررسی	مقادیر
سن (سال)	۴۸/۳۷ ± ۱۱/۷۸
وضعیت غدد لنفاوی	
آزاد	۲۶ (۴۲/۶%)
درگیر	۳۵ (۵۷/۴%)
گزارش نشده	۱ (۱/۶%)
مرحله تومور	
I	۲۰ (۳۲/۳%)
II	۲۴ (۳۸/۷%)
III	۱۸ (۲۹/۰%)
نوع تومور	
IDC	۵۴ (۸۷/۱%)
MC	۱ (۱/۶%)
ILC	۴ (۶/۵%)
DCIS	۳ (۴/۸%)
سایز تومور	
T1 (≤2)	۳۰ (۴۸/۴%)
T2 (2-5)	۲۴ (۳۸/۷%)
T3 (>5)	۷ (۱۱/۳%)
گزارش نشده	۱ (۱/۶%)
درجهٔ بافت‌شناسی	
خوب تمایزیافته(I)	۱۶ (۲۵/۸%)
متوسط تمایزیافته	۲۶ (۴۱/۹%)
ضعیف تمایزیافته	۱۵ (۲۴/۲%)
گزارش نشده	۵ (۸/۱%)
گیرندهٔ استروژن(ER)	
منفی	۱۳ (۲۱/۰%)
مثبت	۴۴ (۷۱/۰%)
گزارش نشده	۵ (۸/۰%)
گیرندهٔ پروژسترون (PR)	
منفی	۱۶ (۲۵/۸%)
مثبت	۴۱ (۶۶/۱%)
گزارش نشده	۵ (۸/۱%)
بیان Her2	
منفی	۲۸ (۴۵/۲%)
مثبت	۱۱ (۱۷/۷%)
دوپهلو	۱۸ (۲۹/۰%)
گزارش نشده	۵ (۸/۱%)

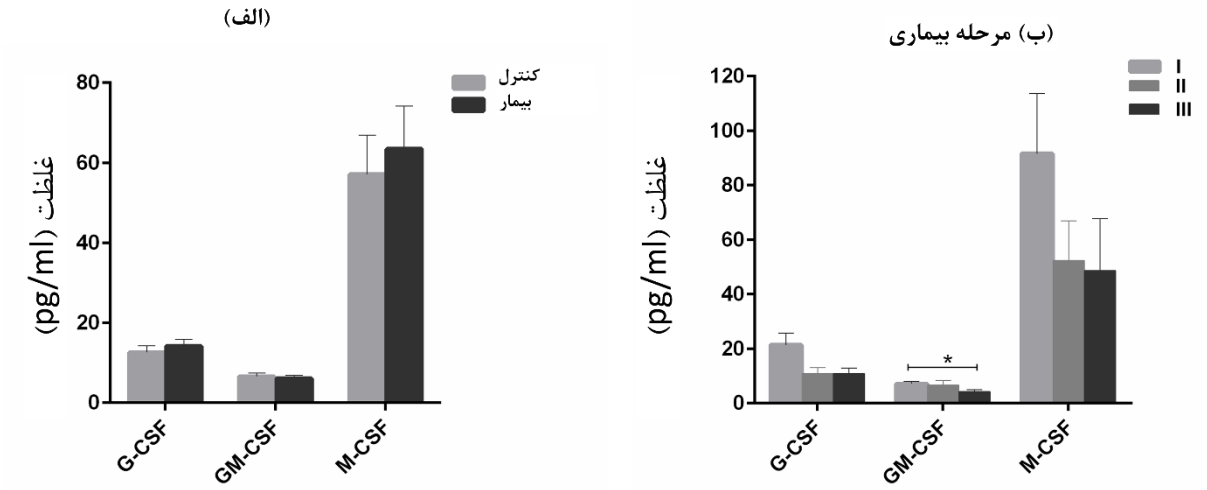
سطح سرمی فاکتورهای رشد G-CSF،M-CSF و GM-CSFدر بیماران و گروه کنترل

مقادیر حداقل و حداکثر، میانگین و میانهٔ اندازه‌گیری شده از سطح سرمی فاکتورهای رشد در بیماران مبتلا به سرطان پستان و همچنین گروه کنترل در جدول ۲، به‌طور خلاصه آمده است. با توجه به نرمال نبودن توزیع G-CSF، M-CSF، GM-CSFدر دو گروه بیمار و کنترل برای مقایسهٔ سطح سرمی فاکتورهای مورد بررسی از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney U test استفاده شد، هر چند که آنالیز آماری تفاوت معناداری بین سطح سرمی این فاکتورهای رشد در دو گروه بیمار و گروه کنترل نشان نداد (به ترتیب p=۰/۶۰، p=۰/۷۲ و p=۰/۶۷؛ شکل ۱-الف).

در مرحلهٔ بعد سطح سرمی فاکتورهای رشد G-CSF، M-CSF و GM-CSF در بیماران با ویژگی‌های مختلف کلینیکی و پاتولوژیکی بیماری از جمله مرحله بیماری، درجهٔ تومور و درگیری غدد لنفاوی بررسی و مقایسه شد. مقایسهٔ سطح سرمی فاکتورهای رشد مورد مطالعه بین بیماران با مراحل مختلف بیماری نشان داد که ارتباط نزدیک به معناداری میان فاکتور GM-CSF و مرحله بیماری دیده می‌شود (p=۰/۰۵۶). آنالیزهای بیشتر حاکی از آن بود که این تفاوت بین مرحلهٔ یک و سه بیماری است (p=۰/۰۱۶)، به‌طوری‌که با افزایش مرحلهٔ بیماری از I به III سطح سرمی GM-CSF به‌طور معناداری کاهش می‌یافت (شکل ۱-ب).

مقایسهٔ سطح سرمی فاکتورهای رشد مورد مطالعه بین بیمارانی که حداقل یک غدهٔ لنفی درگیر داشتند (بیماران LN+) و بیمارانی که فاقد درگیری در غدد لنفاوی خود بودند (LN-) نیز نشان داد که سطح سرمی G-CSF در بیمارانی که دارای حداقل یک غدهٔ لنفی مثبت هستند روند افزایشی دارد، هرچند که این افزایش به لحاظ آماری معنادار نبود (p=۰/۰۹). همچنین افزایش غیرمعناداری میان سطح سرمی G-CSF در بیماران دارای تهاجم لنفاوتیک دیده شد (p=۰/۰۹). ارتباطی بین هیچ کدام از فاکتورها و درگیری عروق یا درگیری عصبی دیده نشد.

سطح سرمی فاکتورهای رشد مورد مطالعه همچنین بین بیماران با بیان متفاوت گیرنده‌های هورمونی شامل گیرندهٔ استروژن (ER)، گیرندهٔ پروژسترون (PR) و فاکتور رشد اپیدرمال (HER2) نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که در بین فاکتورهای مورد بررسی سطح سرمی GM-CSF در بیماران با بافت توموری مثبت برای PR نسبت به بیماران دارای تومور PR منفی، افزایش نزدیک به معناداری نشان می‌دهد (p=۰/۰۵۶). اما بررسی سطح سرمی این فاکتور و دیگر فاکتورهای مورد بررسی در بیماران با وضعیت بیان متفاوت سایر گیرنده‌های هورمونی ارتباطی نشان نداد.



شکل ۲. مقایسهٔ سطح سرمی عوامل محرک کلونی در بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم (الف) و بیماران در مراحل مختلف بیماری (ب). نتایج به‌صورت میانگین ±SEM گزارش شده است. تک‌ستاره به معنای مقدار p کمتر از ۰/۰۵ است.

در ادامهٔ آزمون همبستگی دو طرفه بین سطح سرمی فاکتورهای رشد مورد مطالعه و سن در هر دو گروه بیمار و کنترل حاکی از آن بود که در هر دو گروه، ارتباط معناداری بین سطح سرمی GM-CSF و سن دیده می‌شود. به این معنی که با افزایش سن افراد چه بیمار ($p<۰/۰۰۰۱$) و چه کنترل ($p=۰/۰۲$) سطح سرمی GM-CSF هم افزایش می‌یابد. اما میان دو فاکتور دیگر و سن، نه در گروه بیماران و نه در گروه کنترل ارتباطی دیده نشد. همبستگی سطح سرمی فاکتورهای مورد مطالعه با یکدیگر نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که بین سطح سرمیGM-CSF با دو فاکتور دیگر یعنی G-CSF و M-CSF ارتباط قوی و مستقیم وجود دارد که به لحاظ آماری معنادار است (در تمامی موارد $p<۰/۰۰۱$). همچنین میان فاکتورهای G-CSF و M-CSF نیز ارتباط مثبت معنادار دیده شد ($p<۰/۰۰۱$). این ارتباط در هر دو گروه بیمار و کنترل به‌صورت افزایشی بود.

بحث

در این مطالعه سطح سرمی سه فاکتور رشد مهم در خون‌سازی شامل M-CSF،G-CSF و GM-CSF در بیماران مبتلا به سرطان پستان بررسی شد. هر چند که آنالیز آماری تفاوت معناداری بین سطح سرمی این فاکتورهای رشد در دو گروه بیمار و گروه کنترل نشان نداد اما مقایسهٔ سطح سرمی فاکتورهای رشد مورد مطالعه بین بیماران با مراحل مختلف بیماری نشان داد که ارتباط معناداری میان فاکتور GM-CSF و مرحلهٔ بیماری دیده می‌شود به‌طوری‌که با افزایش مرحلهٔ بیماری سطح سرمی GM-CSF به‌طور معناداری کاهش می‌یافت. سطح سرمی G-CSF نیز در بیمارانی که دارای حداقل یک غدهٔ لنفی مثبت بودند (بیماران +LN) و همچنین بیماران دارای تهاجم لنفاوتیک نیز یک روند افزایشی داشت، هرچند که این افزایش به لحاظ آماری معنادار نبود.

GM-CSF گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون است که با انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله لنفوسیت‌هایT و B، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیوم و فیبروبلاست‌ها تولید و یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رشد برای بقا و نگهداری رده سلول‌های خونساز است [۱۹، ۲۰]. در این مطالعه ما مشاهده کردیم که با افزایش مرحله بیماری، سطح سرمی GM-CSF به‌طور معناداری کاهش می‌یافت. کاهش مشاهده شده در این مطالعه می‌تواند حاکی از سرکوب بیان این سایتوکاین در نتیجهٔ رشد تومور یا نقش آنتی توموری این سایتوکاین در سرطان پستان باشد. در همین راستا دیده شده است که GM-CSF باعث تحریک مونوسیت‌ها و به دنبال آن رفتار ضد توموری می‌شود. گفته می‌شود که GM-CSF ارائه آنتی‌ژن به ماکروفاژها و پاسخگویی ایمنی را بهبود می‌بخشد [۱۶]. همچنین بر اساس تعدادی از مطالعات آزمایشگاهی پیشنهاد شده است که GM-CSF می‌تواند بر مونوسیت‌ها و ماکروفاژها تأثیر گذاشته و باعث تحریک بقا و آزادسازی عوامل التهابی برای از بین بردن ارگانیسم‌های پاتوژن و تومورها شود [۱۵، ۲۱]. GM-CSF همچنین با مهار تولید فاکتورهای رگ سازی می‌تواند مانع از رشد و متاستاز مدل‌های موشی تومور پستان شود [۲۲]. در یکی از مطالعه‌های اخیر نیز نشان داده شد که افزایش بیان GM-CSF، باعث افزایش حساسیت ردهٔ سلولی سرطان پستان MCF-7 به داروهای ضد سرطان از جمله

FU5، سیس پلاتین و دوکسوروبیسین می‌شود [۲۳]. در مقابل گزارش‌ها متعددی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد که بسیاری از سلول‌های توموری نیز این فاکتور را تولید می‌کنند و حضور آن می‌تواند رشد سلول‌های توموری را تحریک کند [۱۰، ۱۲، ۱۳]. هرچند در مطالعهٔ ما تفاوتی بین دو گروه بیمار و کنترل دیده نشد اما افزایش سطح سرمی GM-CSF در بیماران مبتلا به سرطان ریه [۲۴] و کولورکتال [۹] گزارش شده است و وجود این سایتوکاین را شاخصی برای پیشرفت بیماری در نظر گرفتند. تفاوت در نتایج مشاهده شده را شاید بتوان به تفاوت در نوع تومور یا حجم نمونه نسبت داد.

فاکتور دیگری که در این مطالعه بررسی شد فاکتور محرک ماکروفاژی یا M-CSF بود. ماکروفاژها نقش مهمی در تکامل بافت طبیعی پستان ایفا می‌کنند و در سرطان پستان با تهاجم و پیش‌آگهی بد تومور همراه است [۲۵]. ماکروفاژهای وابسته به تومور، فاکتورهایی از جمله ماتریکس متالوپروتئینازها و فاکتورهای رشد اندوتلیوم عروق را تولید می‌کند که باعث تسهیل تهاجم و آنژیوژنز می‌شود [۲۶، ۲۷]. در تعدادی از مطالعات وجود رونوشت کد کننده M-CSF در رده‌های سلول‌های توموری نشان داده شده است [۲۸]. علاوه بر این تومورهای دارای درصد بالای سلول‌های بیان‌کننده M-CSF، بیشتر مورد نفوذ ماکروفاژها قرار می‌گیرند و این گروه از تومورها تهاجمی‌تر هستند و قویاً با پروگنوز ضعیف در ارتباط هستند [۲۹، ۳۰]. همچنین بسیاری از تومورهای پستان نیز M-CSF ترشح می‌کنند [۳۱]. در این بیماران سطح سرمی M-CSF با اندازهٔ تومور، متاستاز و نتایج ضعیف سرطان ارتباط نشان می‌داد [۳۲-۳۴]. به‌طوری‌که در یکی از مطالعات انجام شده، M-CSF به‌عنوان تومور مارکر مناسبی در سرطان پستان معرفی شد [۳۵]. در تأیید این مطلب در مدلی موشی کمبود M-CSF سبب حفاظت در برابر متاستاز سرطان پستان می‌شد و بیان مجدد آن در بافت پستان باعث بازگشت فعالیت متاستاتیک سلول‌ها شد [۳۲]. همچنین نتیجهٔ یک مطالعهٔ مشابه نیز نشان می‌داد که سطح سرمی M-CSF به‌طور چشمگیری در سرطان‌های کولورکتال نسبت به افراد سالم افزایش یافته است و این افزایش با مرحلهٔ بیماری و متاستاز به لنف نود نیز در ارتباط است [۱۰، ۱۱]. اما در مطالعهٔ حاضر تفاوتی در سطح سرمی این سایتوکاین بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و گروه کنترل و همچنین فاکتورهای کلینیکی و پاتولوژیکی بیماری دیده نشد که بخشی از این تفاوت در نتایج می‌تواند به دلیل بررسی بیماران در مراحل مختلف بیماری باشد چنانچه در مطالعهٔ McDermott و همکاران سطح پلاسمایی فاکتور M-CSF در بیماران پیشرفته سرطان پستان بررسی شد [۳۳]، در حالی که در این مطالعه بیماران در تمامی مراحل و عمدتاً در مرحلهٔ II بیماری حضور داشتند.

فاکتور سومی که در این مطالعه بررسی شد فاکتور رشد گرانولیستی یا G-CSF بود. حضور یا افزایش بیان این سایتوکاین در تومور در مطالعات متعددی نشان داده شده است. سرطان‌های ریه اولیه و متاستاتیک دارای بیش‌ترین شیوع در میان سرطان‌های تحریک شده توسط ترشح نابجای G-/GM-CSF است [۳۶، ۳۷]. افزایش غلظت G-CSF در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و پستان نیز مشاهده شد و سطح سرمی این فاکتور در سرطان کولورکتال با مرحله تومور در این بیماران در ارتباط بود [۱۰، ۳۸]. در این مطالعه نیز ما مشاهده کردیم که سطح سرمی G-CSF در بیمارانی که دارای حداقل یک غدهٔ لنفی مثبت بودند (بیماران +LN) و همچنین بیمارانی که دارای تهاجم لنفاوتیک هستند یک روند نسبتاً افزایشی دارد، هرچند که این افزایش به لحاظ آماری معنادار نبود. این نتایج در هماهنگی با نتایج مطالعهٔ بردبار و همکاران است که نشان دادند سطح G-CSF در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان در بیماران فاز N3 که بیش از ۳ غدهٔ لنفی درگیر دارند افزایش می‌یابد [۳۹]. مجموع این شواهد می‌تواند حاکی از نقش تومورژنیک این سایتوکاین در بیماران مبتلا به سرطان پستان باشد. در همین راستا نتایج یکی از مطالعات، G-CSF را فاکتوری دارای پتانسیل برای تحریک تکامل سرطان از طریق توانایی آن در تحریک آنژیوژنز وابسته به تومور معرفی می‌کند [۱۷، ۱۸]. همچنین G-CSF باعث تحریک تهاجم در رده سلولی انسانی در محیط آزمایشگاهی می‌شود [۱۸، ۴۰]. مطالعات همچنین نشان داده‌اند که سلول‌های سرطانی پستان نیز در محیط آزمایشگاهی قادر به تولید این فاکتورهای رشد هستند [۲۹]. در یکی از مطالعات انجام شده در لهستان با هدف بررسی ارزش تشخیصی G-CSFو مقایسهٔ آن با تومور مارکرهای کلاسیک مانند CEA و CA25-9 در سرطان کولون، نتایج به دست آمده حاکی از مفید بودن این مارکر در تشخیص سرطان کولورکتال بود اما این فاکتور ارزشی در افتراق تومورهای سرطانی از پولیپ‌ها را نداشت [۴۱].

نتیجه‌گیری نهایی

در مجموع کاهش میزان GM-CSF در تومورهای پیشرفته می‌تواند نقش آنتی تومورژنیک برای این سایتوکاین را در سرطان پستان مطرح سازد؛ اما در مقابل افزایش نسبی G-

CSFدر بیمـــاران دارای تهـــاجم بیـــانگر نقـــش احتمـــالی پروتومورژنیک ایـن فـاکتور در سـرطان پسـتان اسـت. هرچنـد ارتباطی بین سطح سرمی M-CSF و سـرطان پسـتان مشـاهده نشد اما همبستگی مستقیم مشاهده شده بین فاکتورهـای مـورد بررسـی بـا یکـدیگر در هـر دو گـروه بیمـار و کنتـرل بیـانگر مکانیسم‌های کنترل‌کننده یا هماهنگ‌کننـده مسـیر تولیـد ایـن سایتوکاین‌ها یا اثر متقابل آن‌ها بر یکدیگر است. تأیید این نتـایج نیازمند انجام مطالعات کامل‌تر با حجم نمونهٔ بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این طرح توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز، معاونت تحقیقات و فنـاوری (شـماره طـرح: ۱۱۲۹۸-۹۵) و بـا کـد اخـلاق IR.SUMS.REC.1395.S222 حمایت مالی شده است.

References

[1]. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. Journal of Cancer. 2017; 8(5): 761-73.
[2]. Hamilton JA, Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. Trends in immunology. 2013; 34(2): 81-9.
[3]. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. Blood. 2008; 111(2): 485-91.
[4]. Zhao CL, Zhang GP, Xiao ZZ, Ma ZK, Lei CP, Song SY, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor promotes preinvasive and invasive estrogen receptor-positive tumor development in MMTV-erbB2 mice. Journal of breast cancer. 2015; 18(2): 126-33.
[5]. Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, Mueller MM. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. Cancer research. 2006; 66(16): 8026-36.
[6]. Ohmi C, Matsuyama H, Tei Y, Yoshihiro S, Shimabukuro T, Ohmoto Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor may promote proliferation of human bladder cancer cells mediated by basic fibroblast growth factor. Scandinavian journal of urology and nephrology. 2003; 37(4): 286-91.
[7]. Matsuoka Y, Arai G, Okada Y, Aida J. Prostate cancer-producing granulocyte colony-stimulating factor. Urologia internationalis. 2009; 82(1): 113-5.
[8]. Fukutomi T, Kohno M, Izumi Y, Watanabe M, Hayashi Y, Nomori H. Pulmonary pleomorphic carcinoma producing granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: report of a case. Surgery today. 2012; 42(3): 288-91.
[9]. Demirci U, Coskun U, Sancak B, Ozturk B, Bahar B, Benekli M, et al. Serum granulocyte macrophage-colony stimulating factor: a tumor marker in colorectal carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2009; 10(6): 1021-4.
[10]. Mroczko B, Szmitkowski M, Okulczyk B. Hematopoietic growth factors in colorectal cancer patients. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2003; 41(5): 646-51.
[11]. Mroczko B, Szmitkowski M, Wereszczyńska-Siemiątkowska U, Okulczyk B, Kędra B. Pretreatment serum levels of hematopoietic cytokines in patients with colorectal adenomas and cancer. International journal of colorectal disease. 2007; 22(1): 33-8.
[12]. Ławicki S, Bedkowska GE, Gacuta-Szumarska E, Szmitkowski M. Hematopoietic cytokines as tumor markers in gynecological malignancies: a multivariate analysis with ROC curve in endometrial cancer patients. Growth Factors. 2012; 30(1): 29-36.
[13]. Ławicki S, Bedkowska G, Gacuta-Szumarska E, Czygier M, Szmitkowski M. The plasma levels and diagnostic utility of selected hematopoietic growth factors in endometrial cancer patients and with myoma uteri. Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego. 2010; 28(167): 354-8.
[14]. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. Cancer immunology research. 2013; 1(6): 351-6.
[15]. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. Journal of leukocyte biology. 2016; 100(3): 481-9.
[16]. Hong IS. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. Experimental & molecular medicine. 2016; 48(7): e242.
[17]. Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Biochemical and biophysical research communications. 2002; 297(4): 1058-61.
[18]. Aliper AM, Frieden-Korovkina VP, Buzdin A, Roumiantsev SA, Zhavoronkov A. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. Cancer medicine. 2014; 3(4): 737-46.
[19]. Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Critical reviews in immunology. 2005; 25(5): 405-28.
[20]. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. Journal of leukocyte biology. 2016; 100(3): 481-9.
[21]. Takahashi G, Andrews D. 3d., Lilly MB, Singer JW, Alderson MR. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes Blood. 1993; 81: 357.
[22]. Eubank TD, Roberts RD, Khan M, Curry JM, Nuovo GJ, Kuppusamy P, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. Cancer research. 2009; 69(5): 2133-40.
[23]. Chaubey N, Ghosh SS. Overexpression of granulocyte macrophage colony stimulating factor in breast cancer cells leads towards drug sensitization. Applied biochemistry and biotechnology. 2015; 175(4): 1948-59.
[24]. Hamilton JA. GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential. Expert review of clinical immunology. 2015;11(4):457-65.
[25]. Sapi E. The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update. Experimental biology and medicine (Maywood, NJ). 2004; 229(1): 1-11.
[26]. Eubank TD, Galloway M, Montague CM, Waldman WJ, Marsh CB. M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes. The Journal of Immunology. 2003; 171(5): 2637-43.
[27]. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. Carcinogenesis. 2004; 25(8): 1543-9.
[28]. Asschert J, Vellenga E, Hollema H, Van Der Zee A, De Vries E. Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), interleukin-6 (il-6), interleukin-1β (IL-Iβ), interleukin-11 (IL-11) and tumour necrosis factor-α (TNF-α) in p53-characterised human ovarian carcinomas. European Journal of Cancer. 1997; 33(13): 224.

[29]. Yee LD, Liu L. The constitutive production of colony stimulating factor 1 by invasive human breast cancer cells. Anticancer research. 2000; 20(6B): 4379-83.
[30]. Richardsen E, Uglehus RD, Johnsen SH, Busund LT. Macrophage-colony stimulating factor (CSF1) predicts breast cancer progression and mortality. Anticancer research. 2015; 35(2):865-74.
[31]. Sapi E. The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update. Experimental Biology and Medicine. 2004; 229(1): 1-11.
[32]. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. Journal of Experimental Medicine. 2001;193(6): 727-40.
[33]. McDermott RS, Deneux L, Mosseri V, Védrenne J, Clough K, Fourquet A, et al. Circulating macrophage colony stimulating factor as a marker of tumour progression. European cytokine network. 2002; 13(1): 121-7.
[34]. Scholl SM, Lidereau R, De La Rochefordière A, Le-Nir CC-S, Mosseri V, Noguès C, et al. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. Breast cancer research and treatment. 1996; 39(3): 275-83.
[35]. Ławicki S, Szmitkowski M, Wojtukiewicz M. The pretreatment plasma level and diagnostic utility of M-CSF in benign breast tumor and breast cancer patients. Clinica chimica acta. 2006; 371(1): 112-6.
[36]. Lammel V, Stoeckle C, Padberg B, Zweifel R, Kienle DL, Reinhart WH, et al. Hypereosinophilia driven by GM-CSF in large-cell carcinoma of the lung. Lung Cancer. 2012; 76(3): 493-5.
[37]. Bahar B, Cavci B, Coskun U, Buyukberber S, Benekli M, Yildiz R. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) as potential tumor markers in non-small cell lung cancer diagnosis. Asian Pacific J Cancer Prev. 2010; 11: 709-12.
[38]. Ławicki S, Czygier M, Wojtukiewicz M, Szmitkowski M. The plasma levels and diagnostic utility of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) in patients with I and II stage of breast cancer. Przeglad lekarski. 2009; 66(7): 365-9.
[39]. Bordbar E, Malekzadeh M, Ardekani MT, Doroudchi M, Ghaderi A. Serum levels of G-CSF and IL-7 in Iranian breast cancer patients. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2012;13(10):5307-12.
[40]. Pei X-H, Nakanishi Y, Takayama K, Yatsunami J, Bai F, Kawasaki M, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes invasion by human lung cancer cell lines in vitro. Clinical & experimental metastasis. 1996; 14(4): 351-7.
[41]. Mroczko B, Wereszczyñska-Siemiatkowska U, Groblewska M, Lukaszewicz M, Szmitkowski M, Gryko M, et al. The diagnostic value of hematopoietic cytokines measurement in the sera of gastric cancer and gastric ulcer patients. Clinica Chimica Acta. 2006; 374(1): 165-7.

Serum Level of Colony Stimulating Factors, Granulocyte, Monocyte and Granulocyte-Monocyte, in Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer

Mahboobeh Razmkhah[1], Parisa Karimzadeh[2], Fatemeh Eghbali[3], Somayeh Rezaeifard[4], Zahra Faghih[5*]

1. Associate Professor of Immunology, Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. ORCID: 0000-0002-0875-2851
2. General Physician, Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. General Physician, Namazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
4. Ph.D. in Cancer Immunology, Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. Assistant Professor of Immunology, Shiraz Institute for Cancer Research, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Abstract

Background and Aim Colony Stimulating Factors (CSFs) are a group of diverse glycoproteins, which induce and regulate proliferation and differentiation of hematogenic progenitors in the bone marrow. However, increasing evidence also shows that these factors can affect and provoke proliferation of non-hematopoietic cells including tumor cells. Therefore, we assessed Granulocyte (G-CSF), Monocyte (M-CSF) and Granulocyte-Monocyte (GM-CSF) colony stimulating factors the serum of breast cancer (BC) and their association with pathological and paraclinical factors of the disease.

Materials & Methods Sixty-two untreated patients with BC as well as 54 age-sex matched controls without any history of cancer and autoimmunity in themselves and their first degree relatives were enrolled. After assigning a consent form, 5 milliliters of peripheral blood were obtained and their serums were separated. The levels of growth factors were then checked by cytokine bead array methods. The data were analyzed by SPSS 18 and P-values less than 0.05 were considered as significant.

Results The mean expression of G-CSF, M-CSF and GM-CSF was measured to be 14.18±13.61, 6.11±5.62 and 63.48±83.22 in the serum of BC patients, respectively. However, there was no significant difference between patients and controls (P>0.05), further analysis revealed that with increase in the stage of disease from I to III, the serum level of GM-CSF significantly elevated (P=0.016).

Conclusion The results collectively suggest an anti-tumorigenic role for GM-CSF in breast cancer, however, it needs to be confirmed in a more comprehensive studies with more sample size.

Received: 2018/10/06
Accepted: 2018/12/09

Keywords: breast cancer, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, peripheral blood.