

## Comparison of the Expression Level of TLR2, TLR4, NLRP3 and NOS2 Genes in Peripheral Blood Monocytes of Colorectal Cancer Patients and Healthy Controls

Mohsen Mohammadi<sup>1</sup>, Norouz Delirezh<sup>2\*</sup>, Jalil Mehrzad<sup>3</sup>, Abbas Abdollahi<sup>4</sup>

1. Ph.D of Immunology, Microbiology Group, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor, Microbiology Group, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Professor, Microbiology and Immunology Group, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 2019/09/16

Accepted: 2019/11/05

### Abstract

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer diagnosed and the second leading cause of cancer related death for both men and women in the United States of America (US) and also, is the third and fourth common cancer in Iranian men and women, respectively. It is curable in its early stages; we hypothesized "the inflammatory gene expression level of the peripheral monocytes of CRC patients is different from control healthy persons". Therefore, this research was done with the aim of finding of the role of inflammation in the formation of CRC to help diagnosis and treatment of CRC in its early stages on the basis of its immunopathological view.

**Materials and Methods:** In this case-control study, the expression level of TLR2, TLR4, NLRP3 and NOS2 genes was compared following RNA extraction and cDNA synthesis from isolated monocytes of stage II CRC patients (confirmed by TNM method and before any chemotherapy and radiotherapy n=12) versus non-CRC healthy/controls (referred for CRC screening n=12) by qPCR method. The  $\beta$ -actin gene was used as the reference gene in this research.

**Results:** In CRC patients' monocytes, the expression levels of TLR2 and TLR4 genes were significantly less than those of healthy controls ( $P < 0.05$ ). The NLRP3 gene expression level in CRC group was slightly higher but, not significant. In contrast, the expression level of NOS2 gene in CRC group was significantly higher than that of in healthy controls ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** On the basis of the variations of the gene expression levels of TLR2, TLR4 and NOS2 in monocytes of stage II CRC patients and the role of inflammation in its formation, it is possible using this variations as CRC prognosis and in time treatment along with other methods; though, it needs more investigations.

**\*Corresponding Author:** Norouz Delirezh  
**Address:** Associate Professor,  
Microbiology Group, Faculty of Veterinary  
Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
**Tel:** 09144432650  
**E-mail:** delirezhn@gmail.com

**Keywords:** Beta actin, Colorectal cancer, Nitric oxide synthase 2, NLR family pyrin domain-containing protein3 (NLRP3), Toll- like Receptor 2, Toll- like Receptor 4

**How to cite this article:** Mohammadi M., Delirezh N., Mehrzad J., Abdollahi A. Comparison of the Expression Level of TLR2, TLR4, NLRP3 and NOS2 Genes in Peripheral Blood Monocytes of Colorectal Cancer Patients and Healthy Controls, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):521-532.

## Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer diagnosed and the second leading cause of cancer related death for both men and women in the United States of America (US). This cancer apparently is among the commonest cancers in Iran. Although, colorectal cancer has the more relationship to chronic inflammation among the all kinds of cancers, but, the relationship between inflammation and its pathogenesis is not clear. Colonoscopy is a priority for the screening and primary diagnosis of CRC; but, because of aggressive identity of this technique that may lead to pain and colonic perforation, it is not compliance method. Therefore, it is necessary to conduct research about a simple and non-aggressive procedure to screen CRC in its early stages. On the basis of some researches, the peripheral blood cell gene expression profile, particularly at CRC patients' neutrophils, monocytes and finally macrophages, is different from healthy ones. In this regard, a group of immune system's cells that have important roles in primary and rapid host responses to infections and cancers, are monocytes which form 2 to 10 percent of white blood cells. These cells, start the inflammatory responses via phagocytosis, inflammatory cytokine releasing, oxygen free radicals and nitric oxide (NO) releasing as well as immune response homeostasis, tissue repair and cancer combating such as CRC. Hence, the estimation of TLR2, TLR4, NLRP3 and NOS2 gene's expression level as the inflammatory genes, in CRC peripheral blood monocytes, to investigation on the promotion of this cancer and to help the current screening techniques especially in Iran, is a necessity. By the mentioned aim, this research was conducted on the monocyte's TLR2, TLR4, NLRP3 and NOS2 gene's expression level in 12 CRC patients as well as 12 healthy referring persons to Ghaem hospital, Mashhad, IRAN, by qPCR technique.

## Methodology

This case - control research was conducted by the estimation of TLR2, TLR4, NLRP3 and NOS2 genes in 12 (Tumor Node Metastasis) TNM confirmed CRC patients and 12 healthy referring persons to Mashhad Ghaem hospital, by the qPCR method.

## I- SAMPLING

This research conducted in Iran, University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Microbiology and Immunology Department, matching with Mashhad's Ghaem hospital, approved by the Ethical Committee of Mashhad University of medical sciences by ethical code: ID IR.FUBS.REC.1395.42456 with the commitment of the principles of the declaration of Helsinki. All subjects signed their informed consents before participation (January 2017 to December 2019).

Samples (venous blood samples of healthy and stage II CRC male individuals, n=12, 65±11 years old) were obtained with signed consent forms and questionnaires, colonoscopy, and CT scan. Before conducting any sampling, colonoscopy, CT scan, and biopsy of site of the CRC were carried out for early detection and confirmation of the type and the stage of CRC by Tumor-Node-Metastasis (TNM) method. Patients who died during study or underwent to chemotherapy or were excluded.

## II- Monocyte isolation, RNA extraction and cDNA synthesis from samples

Very briefly, The PBMCs were isolated using density gradient centrifugation (Eppendorf) on a Histopaque- 1.077 gradient Ficol (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Centrifugation was performed at room temperature, 400 g, for 30 min. Then, cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) with 2% fetal calf serum (FCS) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and 1 mM EDTA (Merck Millipore, Burlington, MA). Subsequently, Monocytes were isolated by plastic adhesion method. In this way, The PBMCs were washed 2 times with cold RPMI- 1640 medium, and then,  $5 \times 10^6$  PBMCs /ml were plated in 1 Nuclon™ Delta surface treated T-75 cell culture flasks (ThermoFisher Scientific). After incubation for 2 hrs at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% moisture, the non-adherent cells were removed by thorough washing with RPMI-1640 medium and the adherent monocytes on the bottom of the plate, harvested and resuspended by RPMI-1640 enriched with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml gentamycin, and 0.3 mg/ml L-glutamin. RNA extraction was performed using Cinnacolon kit (Cinnagen-IRAN), by Trizole reagent. Briefly, by adding 1 ml Trizole reagent to any cell pellet

ingredients; the microtubes were incubated 5 min at room temp and then 200 $\mu$ l cold chloroform added them on ice for 5 min and then, centrifuged at 12000rpm 4°C . Then, isopropanol was added and incubated for 15 min on ice and again centrifuged at 12000rpm 4°C. finally, the 75% ethanol added to pellet and centrifuged for 5 min at 7500rpm and incubated at room temp to form RNA mass. RNA integrity was then, assessed using an RNA 2000C nanodrop(Thermo Scientific,USA). RNA integrity number was more than 1.6. RNA was solubilized in DEPC treated water and maintained until the next use, at -80°C. For each sample, 200 ng of total RNA was reversed transcribed into cDNA, using Revert Aid FIRST Strand cDNA synthesis(Thermo Scientific,USA).

### III- qPCR

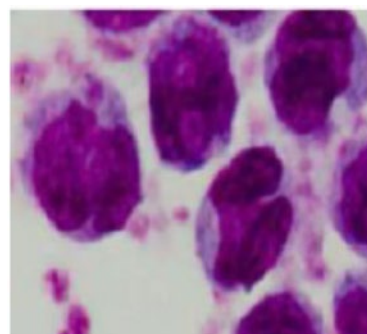
After primer designing for mentioned genes, by Oligo7 software (DBA Oligo,Inc,USA), and achieving their genuinity by NCBI-BLAST, The gradient PCR was conducted to obtain the annealing temperatures for primers, and then, The qPCR technique was performed(using Quiagen Rotor gene Q series) by 0.25ng cDNA from each sample, using Yekta Tajhiz Azma Co IRAN, CYBR Green mastermix including 400 $\mu$ mol each dNTPs, 5mMol MgCL<sub>2</sub>, and 0.1U/  $\mu$ L Taq DNA polymerase enzyme. In each amplification, the specific primer was used by 0.2 $\mu$ MOL. The cycling programs, on the basis of Annealing temperature, were as: 10 min at 95°C(Hold 1), 40 cycles, 10sec at 95°C, 20sec at 61°C(for TLR<sub>2</sub>,TLR<sub>4</sub>,NLRP<sub>3</sub>,NOS<sub>2</sub> genes) and 58°C( for ACTB as reference gene), 20sec at 72°C, 1min at 95°C(Hold 2) with melt. Relative results calculated by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method as previously done.

### V- Statistical Analysis

The data was assessed by SAS statistical software (Version 21.C, USA). Meanwhile, the plots was drawn by Graphpad Prism (Soft98 Version,IRAN). Regarding to Abnormality of distribution, and also, low sample numbers, the Mann-whitney Test was applied for comparing gene expression alterations between CRC and Healthy persons, and  $p < 0.05$  was considered as significant difference between groups.

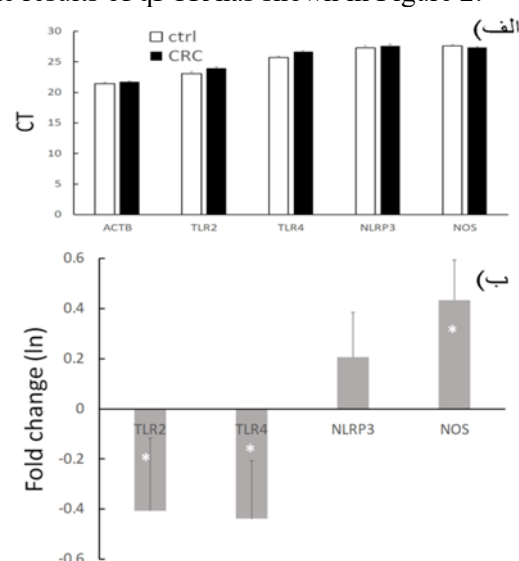
### Result

A representative of pure isolated monocytes stained by giemsa (Figure 1).



**Figure 1.** A sample picture from giemsa stained smear of monocytes, isolated by plastic adhesion technique in this research ( $\times 1000$ )

The results of qPCR has shown in Figure 2:



**Figure 2.** The bars of  $C_t$  (up) and fold change (down) of interested expressed genes from isolated monocytes of CRC patients against healthy controls. As shown by fold change bars, the expression rate of TLR2 and TLR4 genes in CRC comparing to control has significant decreased, NOS2 gene has significant increased and NLRP3 gene was increased non significantly. The DATA here, is on the basis of base 2 logarithm ( $L_n$ ). The\* indicates significancy  $p < 0.05$  was considered significant

### Discussion

By the hypothesis “the CRC peripheral blood monocyte’s inflammatory gene expression level is different from healthy persons” this research was conducted to find the role of inflammation in CRC promotion on the basis of its immunopathological view, for early diagnosis.

This research was conducted with the aim of CRC diagnosis and potential therapy on the basis

of immunopathology. The expression rates of TLR2, TLR4 and NOS2 genes, were significantly decreased, decreased and increased, respectively. This issue may imply to a variability or unstability of mRNA level of mentioned genes. Accordingly, expression profiles of such genes in monocytes of CRC patients are different from non-CRC healthy persons. However, in our study the NLRP3 gene expression rate was not significant in CRC group. This may be due to its mRNA instability following inefficient alternative splicing, which may be affected by cytokines in tumor microenvironment even secreted to blood stream; this points needs more investigation. Essentially, the difference of gene expression level can be related to the immune system's interactions against the tumor cells. On the other side, the kind of infiltrated inflammatory cells depends on the tumor microenvironment and cancer stage. Our finding can be used for tumor prognosis and even immunotherapy. One of the primed finding of this research was the increased level of NOS2 gene in monocytes of the CRC patients. This may be related to monocyte's infiltration to tumor microenvironment that followed by their development to macrophages which leads to more NO secretion, as stated from

Ye Xu and et al. Also, as Sara Benkhalifa et al, this may due to CRC stage of the CRC. It is stated in all used reference here mentioning the expression rates of these four important inflammatory genes can be estimated. Our study shows here that, on the basis of the variations of the gene expression levels of TLR2, TLR4 and NOS2 in monocytes of stage II CRC patients and the role of inflammation in its formation, it is possible using this variations as CRC prognosis therapy and needs more investigations.

### **Conclusions**

Considering the CRC promotion and its' relationship to inflammation, the study of the immune cell gene expression variations, is an indication of immunopathological side of CRC. Also, this conditions affected by inhibitory cytokine secretion in the tumor microenvironment. Hence, it is possible using these variations for CRC prognosis and targeted treatment in its early stages.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

## مقایسه میزان بیان ژن های TLR2، TLR4، NLRP3 و NOS2 در منوسیت های خون افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ و گروه شاهد سالم

محسن محمدی<sup>۱</sup>، نوروز دلیرز\*<sup>۲</sup>، جلیل مهرزاد<sup>۳</sup>، عباس عبداللهی<sup>۴</sup>

۱. دکتری ایمنی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادگروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. دانشیار گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان روده بزرگ، سومین سرطان متداول و دومین عامل مرگومیر ناشی از سرطان در ایالات متحده آمریکا و همچنین، به ترتیب سومین و چهارمین سرطان متداول در مردان و زنان ایرانی محسوب می گردد. این بیماری در صورت تشخیص در مراحل اولیه، قابل درمان است. لذا با این فرضیه که میزان بیان ژن های آماسی منوسیت های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ با افراد سالم، متفاوت است؛ این پژوهش با هدف پی بردن به نقش آماس در تکوین سرطان روده بزرگ با تکیه بر نمای ایمونوپاتولوژیک آن به منظور کمک به تشخیص در مراحل اولیه انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش که به صورت موردی- شاهدهی انجام شد میزان بیان ژن های TLR2، TLR4، NLRP3 و NOS2 در ۱۲ بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ تأیید شده stage II با روش TNM و ۱۲ فرد سالم مراجعه کننده برای غربالگری این سرطان، پس از استخراج RNA از منوسیت های خون دو گروه و ساخت cDNA، با استفاده از روش qPCR مقایسه شد. در این مطالعه از ژن β-actin به عنوان ژن مرجع استفاده گردید.

**یافته ها:** میزان بیان TLR2 و TLR4 در سطح mRNA در مبتلایان به سرطان روده بزرگ در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0.05$ ). میزان بیان NLRP3 در گروه مبتلایان به سرطان روده بزرگ در مقایسه با گروه کنترل سالم، افزایش نسبی نشان داد اما معنی دار نبود. در مقابل، میزان بیان ژن NOS2 در گروه مبتلایان به سرطان روده بزرگ در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی داری افزایش داشت ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به تغییرات معنی دار بیان ژن TLR2، TLR4 و NOS2 در منوسیت های بیماران مبتلا به گرید II سرطان روده بزرگ و نقش واکنش های آماسی در تکوین این سرطان، می توان از این یافته ها نیز در کنار سایر روش ها برای تشخیص و تعیین پیش آگهی این نوع سرطان استفاده کرد. هر چند این امر نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

\* نویسنده مسئول: نوروز

دلیرز

نشانی: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، شهرک نازلو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۴۴۳۲۶۵

رایانامه:

delirezhn@gmail.com

شناسه ORCID:

0000-0002-1748-5361

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0002-4706-1826

نیتریک اکساید سینتاز ۲،

پروتئین ۳ حاوی دمن پاپرین از

خانواده گیرنده شبه نود، گیرنده

شبه تول ۲، گیرنده شبه تول ۴

### ۱. مقدمه

متداول ترین سرطان ها است به گونه ای که طبق برآورد آمار جهانی سرطان در سال ۲۰۱۲، به ترتیب، سومین و چهارمین سرطان متداول در مردان و زنان ایرانی می باشد (۲). هر چند سرطان روده بزرگ در میان انواع سرطان ها بیشترین ارتباط را با آماس مزمن دارد، ولی ارتباط آماس با پاتوژن این سرطان

سرطان روده بزرگ، سومین سرطان متداول و دومین عامل مرگومیر ناشی از سرطان در مردان و زنان در ایالات متحده آمریکا محسوب می گردد (۱). این بیماری در ایران یکی از

آماسی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و NO (نیتریک‌اکساید) آغازگر پاسخ‌های آماسی در قالب سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند. اساساً کنترل هومئوستاز پاسخ‌های آماسی نظیر کاهش یا افزایش بیان ژن‌های خاص در موارد پاسخ‌های آماسی توسط منوسیت‌ها، در راستای تنظیم پاسخ‌های ایمنی اهمیت ویژه‌ای دارد. این سلول‌ها علاوه بر نقش در هومئوستاز پاسخ‌های ایمنی، در ترمیم بافت و مبارزه با سرطان‌هایی مثل سرطان روده بزرگ نیز اهمیت دارند (۱۴).

بر سطح منوسیت‌ها گیرنده‌های مختلف شناساگر الگو مخصوصاً TLR ۱ها وجود دارند که با شناسایی حضور میکروب‌ها و محصولات آنها در مسیر پیام‌رسانی خود، آغازگر پاسخ‌های ایمنی اولیه علیه عفونت و آسیب‌های بافتی هستند (۱۵-۱۸).

2 NLRها هم به‌عنوان گروه دیگری از گیرنده‌های شناساگر الگودر منوسیت‌ها با راه‌اندازی چندین مسیر پیام‌رسان آماسی منجر به راه‌اندازی مجموعه اینفلامازوم و ترشح اشکال بالغ IL-1 $\beta$  و IL-18 شده که شرایط مزمن آماسی را در ریزمحیط سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کنند (۱۸).

از طرف دیگر، عوامل پیش‌آماسی نظیر NO نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های آماسی دارند. تولید و ترشح مقادیر زیاد NO توسط ماکروفاژهای فعال ارتشاح‌یافته و مقیم اطراف سلول سرطانی ممکن است سبب بقا و طولانی شدن زمان آسیب بافتی گردد. به دنبال تحریک منوسیت‌ها و ماکروفاژها به واسطه لیپوپلی ساکارید یا سایتوکاین‌های آماسی نظیر TNF- $\alpha$ ، آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی فعال می‌گردد که سبب ترشح نیتریک اکساید می‌شود. فعال شدن این آنزیم منجر به تولید مقادیر افزایش یافته و بالقوه سایتوتوکسیک NO در درازمدت می‌گردد که به‌نوبه خود منجر به افزایش رگ‌زایی اطراف سلول‌های سرطانی و تسهیل متاستاز آنها می‌شود (۱۹)؛ بنابراین بررسی پروفایل بیانی ژن‌های آماسی بیان شده توسط منوسیت‌های افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ به‌منظور بررسی نقش آماس مزمن در تکوین این سرطان و کمک به روش‌های رایج غربالگری آن با تکیه بر نمای ایمونوپاتولوژیک موجود به‌ویژه در ایران با توجه به خلأ پژوهش در این زمینه ضروری است. بر این اساس، در پژوهش حاضر پس از کسب رضایت از گروه‌های بیماران سرطانی روده بزرگ stage II و افراد کنترل سالم با روش اخلاق پزشکی

هنوز به‌درستی مشخص نشده است. به‌طور کلی این بیماری با اختلال تنظیم ایمنی در حضور سلول‌ها و مولکول‌هایی که ایجاد محیط آماسی می‌کنند همراه است (۳).

در غربالگری و تشخیص اولیه سرطان روده بزرگ، روش کولونوسکوپی مقدم است لکن به دلیل ماهیت تهاجمی این روش و ایجاد مشکلاتی اعم از احتمال پارگی روده و درد و ناراحتی حاصل از آن، از این روش تشخیصی برای غربالگری، چندان استقبال نمی‌شود. لذا پژوهش حاضر، در پی یافتن روشی آسان و غیرتهاجمی برای غربالگری این سرطان در مراحل اولیه، ضروری می‌باشد (۴). به‌طور کلی، استفاده از اجزای مختلف سلولی و مولکولی خون به‌عنوان ابزار غیرتهاجمی در غربالگری اولیه سرطان روده بزرگ و تشخیص به‌موقع آن مورد بحث است (۵). با توجه به اینکه آماس مزمن، نقش مهمی در پیشرفت سرطان مخصوصاً سرطان روده بزرگ دارد، انواعی از مارکرهای آماسی به‌عنوان مارکرهای مفید در بیماران مبتلا به سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ گزارش شده‌اند. در این میان، شمارش منوسیت‌های خون محیطی و بررسی پروفایل بیانی ژن‌های آماسی در آنها به‌عنوان مارکرهای آماسی در پیش‌آگهی ضعیف سرطان روده بزرگ مطرح هستند (۶). فعالیت آماسی در ماتریکس سرطان‌های مهاجم بسته به نوع سلول‌های ایمنی درگیر، تعداد سلول در میلی‌مترمربع و مکان استقرار سلول‌های ایمنی از عواملی هستند که در پیش‌آگهی این سرطان مؤثر می‌باشند (۷).

اساساً، پروفایل بیان ژنی سلول‌های خون محیطی به‌ویژه نوتروفیل‌ها، منوسیت‌ها و ماکروفاژهای افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ با افراد سالم، متفاوت است (۸). در این رابطه، گروهی از سلول‌های سیستم ایمنی که در پاسخ اولیه و سریع میزبان نسبت به عفونت‌ها و سرطان‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند منوسیت‌ها هستند که ۲ تا ۱۰ درصد گلبول‌های سفید خون انسان را تشکیل می‌دهند (۹). منوسیت‌ها از پیش‌سازهای میلوئیدی موجود در مغز استخوان موسوم به منوبلاست ساخته می‌شوند سپس وارد جریان خون می‌گردند و در حضور سایتوکاین‌های آماسی در فضای بافتی به ماکروفاژها یا سلول‌های دندرتیک تبدیل می‌شوند که نقش مهمی در دفاع بدن مقابل سرطان دارند (۱۰). این سلول‌ها براساس گیرنده‌های فنوتایپی خود حداقل سه زیرمجموعه را شامل می‌شوند: ۱- با بیان میزان بالایی از گیرنده سطحی CD14 ۲- بیان کم CD14 همراه با بیان CD16 ۳- بیان زیاد CD14 و بیان کم CD16 (۱۱-۱۴).

منوسیت‌ها از طریق فاگوسیتوز، ترشح سایتوکاین‌های

1 Toll like Receptor  
2 Nod like receptor

### ۳.۲. جداسازی منوسیت‌های خون محیطی

این کار با استفاده از گرادینت فایکول هایپک (p=1.077) و سانتریفیوژ شیب غلظت انجام گرفت (۲۰). سپس جداسازی منوسیت‌ها با روش چسبندگی به پلاستیک مطابق روش مهرزاد و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد (۲۱، ۲۲). به‌طور خلاصه، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) پس از برداشت ۲ بار با محیط RPMI-1640 سرد شستشو گردید، تعداد و میزان زنده بودن آنها با روش تریپان بلو تعیین شد. سپس تعداد  $5 \times 10^6$  سلول در هر میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای ریخته شد که پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^\circ\text{C}$ ، ۵٪  $\text{CO}_2$  و رطوبت ۹۵ درصد سلول‌های نجسبیده جدا شدند و منوسیت‌های چسبیده به کف پلیت در محیط RPMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد FBS،  $100 \text{ unit/ml}$  پنی‌سیلین،  $110 \text{ g/ml}$  جنتامایسین و  $0.3 \text{ mg/ml}$  ال-گلوتامین کشت و جداسازی شدند.

### ۴.۲. استخراج RNA و تهیه cDNA

برای استخراج RNA و ساخت cDNA ژن‌های موردنظر از نمونه‌های منوسیت خون محیطی، RNA با استفاده از کیت رNX شرکت سیناکلون با استفاده از معرف تراپزول استخراج شد و با استفاده از کیت Revert Aid FIRST Strand cDNA synthesis با استفاده از پرایمرهای Oligo-dT و راندوم هگزامر، طبق دستورالعمل‌های مربوطه به cDNA تبدیل شد.

### ۵.۲. انجام qPCR (quantitative polymerase chain reaction)

در تکنیک qPCR ابتدا به‌منظور یافتن دمای اتصالی بهینه پرایمرها، دو نمونه cDNA تهیه شده از منوسیت‌های بیماران سرطانی با استفاده از master mix کیت شرکت یکتا تجهیز، دو دمای اتصالی  $58^\circ\text{C}$  و  $61^\circ\text{C}$  آزمایش گردید. با توجه به منحنی‌های melting، دمای اتصالی  $61^\circ\text{C}$  در مورد ژن‌های فوق، بهینه تشخیص داده شد. همچنین به‌منظور حصول اطمینان از عملکرد بهینه پرایمرهای طراحی شده و صحت عملکرد qPCR، ژن‌های تکثیریافته محصول qPCR روی ژل آگارز  $1/5$  درصد الکتروفورز شدند (شکل ۱ ب و ج).

آزمایش qPCR با پروتوکل ۱۰ دقیقه در دمای  $95^\circ\text{C}$ ، چرخه‌های PCR (۱۰ ثانیه در دمای  $95^\circ\text{C}$ ، ۲۰ ثانیه در دمای  $61^\circ\text{C}$  و ۲۰ ثانیه در دمای  $72^\circ\text{C}$ ) به تعداد ۴۰ چرخه بلافاصله با برنامه مشخص شده melting با دمای  $55^\circ\text{C}$  با استفاده از سیستم نرم‌افزاری Rotor-Gene Q series software در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه

اقدام به خون‌گیری از آنان شد. سپس منوسیت‌های مبتلایان به سرطان روده بزرگ و گروه کنترل با روش چسبندگی به پلاستیک جدا گردید و میزان بیان ژن‌های TLR2، TLR4، NLRP3 و NOS2 در این دو گروه در سطح mRNA با روش qPCR ارزیابی شد.

### ۲. مواد و روش‌ها

نوع این مطالعه، موردی-شاهدی بود که به‌صورت توصیفی-تحلیلی با توجه به هدف این مطالعه طی مراحل زیر صورت پذیرفت:

#### ۱.۲. انتخاب گروه‌های مورد مطالعه و معیارهای ورود و خروج

در این پژوهش، طبق هماهنگی به‌عمل آمده با بیمارستان قائم (عج) شهر مقدس مشهد، از بین بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ تأیید شده stage II بر حسب طبقه‌بندی TNM ۱ که با روش‌های کولونوسکوپی، سی‌تی اسکن و بافت‌شناسی تشخیص داده شده بودند، پیش از انجام شیمی‌درمانی و رادیوتراپی ۱۲ نفر انتخاب و وارد مطالعه شدند. همچنین ۱۲ نفر از مراجعان برای غربالگری این بیماری نیز از جنس مذکر و محدوده سنی  $65 \pm 11$  سال که در فاصله سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ به این بیمارستان مراجعه کرده بودند، به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. معیار ورود به این پژوهش، جنسیت یکسان بیماران سرطانی و افراد سالم و تأیید stage یکسان بیماران سرطانی با روش TNM و انجام نشدن شیمی‌درمانی و رادیوتراپی بر بیماران بود. آن دسته از بیماران سرطانی که شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی شده بودند یا جنسیت آنها با گروه کنترل متفاوت بود یا در زمان انجام مطالعه فوت کرده بودند، از روند مطالعه خارج شدند.

#### ۲.۲. اخذ نمونه خون وریدی از بیماران سرطانی و افراد سالم

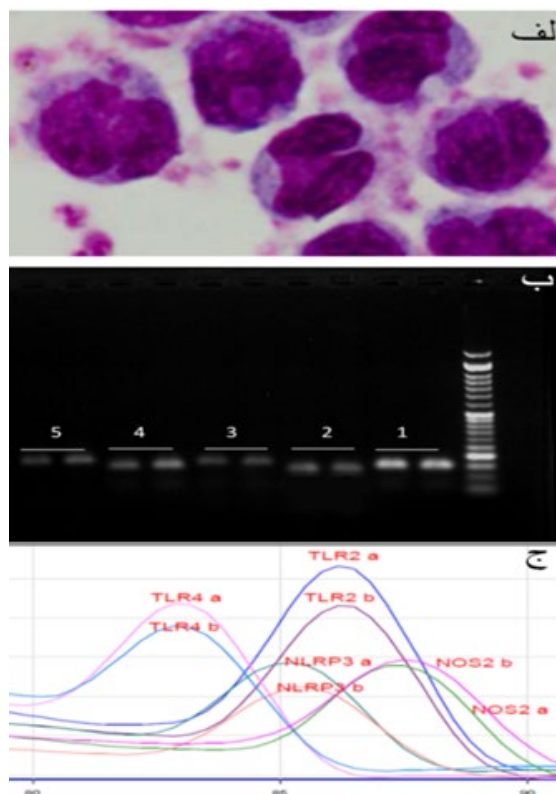
پس از پر کردن فرم‌های مربوطه و کسب رضایت افراد هر دو گروه، با رعایت اخلاق پزشکی و تحت نظارت کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد به کد اخلاقی IR.FUBS.REC.1395.42456 نمونه خون وریدی در ویال‌های هپارینه هریک به میزان ۱۰ سی‌سی اخذ گردید که تحت شرایط سرد و در اسرع وقت برای جداسازی منوسیت‌ها و استخراج RNA به آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شد.

روده بزرگ و افراد شاهد سالم، ابتدا منوسیت‌های خون محیطی دو گروه با استفاده از روش چسبندگی به پلاستیک جدا شدند که پس از جداسازی و تأیید میزان زنده‌مانی ۹۵ درصد از آنها اسمیر تهیه و با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند. سپس سایر کارهای مولکولی انجام شد (شکل ۱).

تهران برای چهار ژن  $\beta$ -actin، TLR2، TLR4، NLRP3 و NOS2 (به‌عنوان مرجع) با تکرار دوتایی اجرا و میزان  $\Delta\Delta Ct$  حاصل از ژن‌ها با روش آماری مان-ویتنی ارزیابی گردید.

### ۳. یافته‌های پژوهش

در این پژوهش پس از خون‌گیری از گروه مبتلایان به سرطان



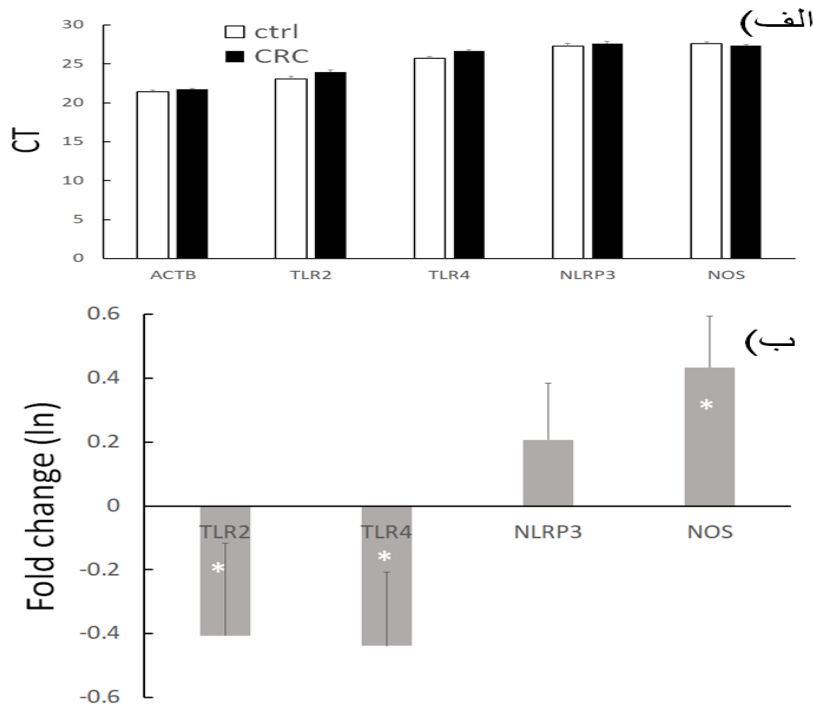
شکل ۱. الف) نمونه‌ای از منوسیت‌های خون محیطی انسان با خلوص بالا. ب) آگارز ژل الکتروفورز محصول ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش. شماره‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب شامل ژن‌های TLR2، TLR4، NLRP3، NOS2 و  $\beta$ -actin همراه با خط‌کش مولکولی 50bp و کنترل منفی (سمت راست لادر) می‌باشند و ج) منحنی‌های melting ژن‌های TLR2، TLR4، NLRP3 و NOS2 پس از انجام qPCR. هر ژن به صورت دوتایی با روش qPCR تکثیر شده است.

شد (شکل ۱.ب).

پس از استخراج RNA و ساخت cDNA از منوسیت‌های هر دو گروه، بیماران سرطانی و شاهد سالم و انجام آزمایش qPCR، نتایج حاصل از آزمایش توسط سیستم نرم‌افزار آماری spss و با روش مان-ویتنی آنالیز شدند که این نتایج در نمودارهای شکل ۲.الف و ب مشاهده می‌شوند.

به‌منظور اطمینان از عملکرد پرایمرهای به‌کار رفته در این پژوهش، پس از انجام qPCR روی ژن‌های مربوطه الکتروفورز بر ژل آگارز ۱/۵ درصد نیز انجام شد که نتایج حاصل از ژل الکتروفورز نیز تأییدکننده منحنی‌های melting بودند. در واقع هر باند تکی در این شکل، معرف عملکرد اختصاصی پرایمرهای مربوطه بود و در مورد تمامی ژن‌ها باند تک حاصل





شکل ۲. الف) نمودار میزان سیکل آستانه (CT) ژن های مورد بررسی در گروه های بیماران سرطانی روده بزرگ و افراد سالم کنترل در آزمایش qPCR. مستطیل های سفید، میانگین سیکل آستانه گروه کنترل و مستطیل های سیاه، میانگین سیکل آستانه گروه بیماران سرطانی است. ب) نمودار فولد چنج ( $\Delta\Delta ct$ ) میزان بیان ژن های TLR2، TLR4، NLRP3 و NOS2 حاصل از انجام آزمایش qPCR روی cDNA های مختلف به دست آمده از منوسیت های خون محیطی گروه های بیماران سرطانی (n=12) در برابر افراد گروه شاهد سالم (n=12). (داده های فولد چنج نسبت به گروه کنترل بر مبنای لگاریتم پایه ۲ (ln) نمایش داده شده و علامت \* نمایانگر معنی دار بودن ( $p < 0.05$ ) میزان بیان ژن گروه بیماران سرطانی در برابر گروه شاهد سالم می باشد).

شد. نتایج این پژوهش، توصیفی از وضعیت نسبی ایمونوپاتولوژیک ۱۲ نمونه منوسیت استحصالی از بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ stage II پذیرش شده بیمارستان قائم مشهد و ارزیابی بیان ژن های کلیدی آماسی در این سلول ها بود که در مقایسه با منوسیت های افراد شاهد سالم، تغییرات بیانی معنی داری را در ژن های TLR2، TLR4 و NOS2 نشان داد. ژن های مورد مطالعه در این پژوهش، هریک به نوعی درگیر در پاسخ های ایمنی بودند. البته نتایج این پژوهش تا حدی با نتایج chang و همکاران در سال ۲۰۱۴ همخوانی داشت (۲۳). واضح ترین نتیجه این پژوهش، افزایش بیان ژن NOS2 و کاهش بیان ژن های TLR2 و TLR4 در منوسیت های بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ بود. میزان فولد چنج سه ژن مذکور در منوسیت های افراد گروه سرطانی نسبت به کنترل اختلاف معنی داری ( $p < 0.05$ ) داشت و این امر تا حدودی شاید دال بر تولید میزان متغیر یا ناپایداری mRNA ژن های مذکور در منوسیت های گروه بیماران باشد.

طبق مطالعه M. Honda و همکاران در سال ۲۰۱۰ پروفایل

بر اساس نمودارهای الف و ب، میزان بیان ژن های TLR2، TLR4 و NOS2 در منوسیت های گروه بیماران سرطانی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری به ترتیب، کاهش، کاهش و افزایش داشت ( $P < 0.05$ ). ژن NLRP3 ظاهراً در بیماران سرطانی افزایش نسبی نشان داد ولی این افزایش در برابر گروه شاهد سالم، معنی دار نبود. در افراد سرطانی TLR2 بیشترین کاهش معنی دار میزان بیان را نسبت به گروه شاهد سالم داشت. به عبارت دیگر، در این سری تغییرات، بیان ژن NOS2 در بیماران سرطانی روده بزرگ با تنظیم افزایشی اما بیان ژن های TLR2 و TLR4 در بیماران سرطانی نسبت به کنترل با تنظیم کاهشی همراه بود و بیان ژن NLRP3 در بیماران سرطانی، تنظیم افزایشی داشت ولی در مقایسه با گروه کنترل، معنی دار نبود.

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

این پژوهش با هدف تشخیص و درمان به موقع سرطان روده بزرگ با تکیه بر نمای ایمونوپاتولوژیک این سرطان در مراحل اولیه انجام

سرطان روده بزرگ و سرطان پستان سلول‌های سرطانی موجود در گردش خون (CTCs) به‌واسطه ترشح سایتوکاین‌های مهارتی گفته شده می‌توانند بر میزان بیان ژنی TLR2 و TLR4 سلول‌های خونی من جمله منوسیت‌ها تأثیر کاهنده داشته باشند (۲۵، ۲۶).

طبق مطالعه Kesselring و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که مولکول IRAK-M که توسط سلول‌های سرطانی بیان می‌گردد، یکی از تنظیم‌کننده‌های منفی بیان TLRها، کاهنده پیام‌رسانی پایین‌دست آن و کاهش میزان NF- $\kappa$ B است (۲۷). این امر به‌نوبه خود شاید بتواند توجیه دیگری در کاهش میزان بیان ژن‌های TLR2 و TLR4 در منوسیت‌های افراد سرطانی باشد.

یافته دیگر این پژوهش، افزایش بی‌معنی بیان ژن NLRP3 در منوسیت بیماران سرطانی در مقایسه با افراد گروه کنترل بود که به‌نظر می‌رسد به دلیل فعال کردن کمپلکس اینفلامازوم و تولید دو سایتوکاین IL-18 و IL-1 $\beta$  برای ایجاد آماس در برخورد با لیگاند‌های حاصل از تخریب سلول‌های سرطانی ناپایدار مثل سلول‌های سرطانی مهاجر در گردش خون و ایجاد ایمنی ضدسرطان بوده است ولی ظاهراً بیان این مولکول نیز رو به کاهش بود که احتمالاً یکی از دلایل آن، آزادسازی عوامل مهارکننده از این سلول‌های سرطانی است؛ همان‌گونه که Taryn و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود ابراز داشته‌اند (۲۶). از طرفی طبق مطالعه Qin He و همکاران (۲۰۱۸)، نقش دقیق اینفلامازوم‌ها در سرطان‌ها بستگی شدیدی به ناهمگونی سلول‌های سرطانی و سلول‌های همراه آنها نظیر فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال و همچنین کمبود میزان اکسیژن در ریزمحیط سرطان دارد که عملکرد اینفلامازوم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۸). این امر شاید دلیل دیگری مبنی بر معنی‌دار نبودن افزایش بیان NLRP3 در افراد مبتلا به سرطان باشد. از جهتی ناپایداری mRNA این ژن نکته قابل‌تأملی است. البته اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

در این پژوهش با توجه به افزایش میزان بیان ژن NOS2 در منوسیت‌های بیماران سرطانی stage II به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن‌های مربوط به پیام‌رسانی در پایین‌دست TLRها در منوسیت‌های خون محیطی احتمالاً مربوط به ارتشاح منوسیت‌ها از جریان خون به سمت بافت سرطانی همراه با تبدیل این سلول‌ها به ماکروفاژ یا تنظیم افزایشی اولیه بیان TLRها بر سطح این سلول‌ها پیرو تحریک آنها نسبت به رشد سلول سرطانی است که این امر سبب تحریک ترشح بیشتر NO می‌گردد. همچنان که در مطالعه Ye Xu و همکاران (۲۰۱۳) نیز مطرح شده است (۲۹).

به‌علاوه، طبق مطالعه Sara benkhelifa و همکاران (۲۰۱۹) بیان mRNA مربوط به NOS2 ارتباط معنی‌داری با stage سرطان روده بزرگ داشته است (۳۰). در پژوهش حاضر همین ارتباط

بیان ژنی منوسیت‌های بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ نسبت به افراد نرمال، متفاوت است (۸). براساس یافته‌های این پژوهش، بیان سه ژن TLR2، TLR4 و NOS2 در منوسیت‌های افراد سرطانی در مقایسه با افراد نرمال به‌ترتیب به‌طور معنی‌داری کاهش، کاهش و افزایش داشت. با این وجود، میزان بیان ژن NLRP3 در منوسیت‌های افراد سرطانی نسبت به افراد طبیعی، افزایش معنی‌داری نداشت. این مسئله تا حدودی شاید ناشی از اتصال متناوب در mRNA این ژن و در نتیجه تولید mRNA ناکارآمد این ژن در منوسیت افراد سرطانی یا متأثر از افزایش بیان ژن NOS2 باشد که البته به بررسی بیشتری نیاز دارد. طبق پیشنهاد W.H.Fridman، اساساً تغییر در میزان بیان ژنی نشان از واکنش سیستم ایمنی در مقابله با سرطان دارد، از طرفی نوع سلول‌های آماسی ارتشاح‌یافته به ریزمحیط سرطانی بستگی به نوع سرطان و stage آن دارد و می‌توان از این مطلب در پیش‌آگهی، تشخیص به‌هنگام و حتی ایمنی درمانی بیمار استفاده کرد (۲۴).

از طرفی از آنجا که شمارش منوسیت‌های خون محیطی، منعکس‌کننده تعداد ماکروفاژهای همراه سرطان در هر میلی‌متر مربع از ریزمحیط سرطان است، عامل پیش‌آگهی مهمی در جستجوی مراحل ابتدایی تکوین این سرطان است (۶).

با توجه به افزایش میزان بیان ژن NOS2 در منوسیت‌های بیماران سرطانی، به‌نظر می‌رسد که پس از جلب منوسیت‌ها به ریزمحیط سرطانی روده بزرگ با توجه به از بین رفتن سد اپی‌تلیوم و البته نفوذ میکروب‌های مستقر در لومن روده به ناحیه لامینا پروپریا، در ابتدا به‌منظور شناسایی این عوامل میکروبی ممکن است افزایش میزان بیان mRNA TLR2 و TLR4 و نیز NLRP3 برای شروع پاسخ ایمنی اتفاق افتاده باشد، سپس با پیام‌رسانی در پایین‌دست این گیرنده‌ها، افزایش تولید سایتوکاین‌های آماسی و عوامل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، NO، رادیکال سوپراکسید و ... در منوسیت‌ها حادث می‌گردد. البته همکاری این عوامل با TNF- $\alpha$  در افزایش رگ‌زایی در ریزمحیط سرطان قابل‌توجیه می‌باشد. از طرفی، بیان بالای NO نوعی اثر مهارکنندگی سرطان دارد ولی نظر به بالا بودن میزان سایتوکاین‌های مهارکننده ایمنی مثل IL-10، TGF- $\beta$  و PGE2 در ریزمحیط سرطان که عمدتاً توسط ماکروفاژهای M2 و نیز با فراخوانی سلول‌های MDSC ۱ از مغز استخوان در ریزمحیط سرطان ترشح و وارد خون، بافت‌های لنفاوی و سرطانی می‌شوند و نیز مهارت‌هایی اعمال شده توسط NO، IL-10، TGF- $\beta$  و PGE، کاهش بیان دو ژن TLR2 و TLR4 در سطح منوسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های اجرایی اصلی ایمنی ذاتی قابل‌ملاحظه بود. طبق بررسی Taryn L و همکاران در سال ۲۰۱۳ در برخی سرطان‌ها مثل

### پیشنهادها

با در نظر گرفتن سایر پروفایل‌های بیان ژنی سلول‌های خون محیطی براساس جداسازی زیرگروه‌های منوسیتی و مطالعه بر تعداد نمونه‌های بیشتر مخصوصاً با تفکیک جنسیتی و stage‌های بیماری و البته لحاظ کردن عوامل دیگری به‌غیر از پاسخ ایمنی می‌توان به روش‌های تشخیصی دقیق‌تری برای این بیماری دسترسی پیدا کرد. لذا مطالعات بیشتری در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه دکتری تخصصی (Ph.D) ایمنی‌شناسی مصوب دانشگاه ارومیه به شماره ثبت ۱۲۰۴/پد/۳ و به کد اخلاقی IR.FUBS.REC.1395.42456 کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشد که در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد. از تمامی پرسنل این آزمایشگاه و همچنین پرسنل بخش جراحی بیمارستان قائم مشهد که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

به‌صورت معنی‌دار در مورد stage II سرطان روده بزرگ مطرح است. البته در این مورد هنوز به تحقیقات بیشتری نیاز است. در کلیه منابعی که در اجرای این پژوهش از آنها بهره گرفته شده است تنها بر برخی معیارهای محدودی در زمینه ایمونوپاتولوژی سرطان روده بزرگ تأکید شده است، حال اینکه در پژوهش حاضر، بیان چهار ژن مهم آماسی در بیماران مبتلا به stage II سرطان روده بزرگ ارزیابی گردیده است.

نظر به ارتباط ایجاد سرطان روده بزرگ با آماس، مطالعه تغییرات بیان ژنی سلول‌های ایمنی و بالخصوص منوسیت‌ها به‌عنوان بازیگران اصلی ایمنی ذاتی، نموداری از وضعیت ایمونوپاتولوژیک سرطان روده بزرگ می‌باشد؛ زیرا بیان ژن‌ها با توجه به شرایط ای‌ژنتیکی که بر آنها حاکم است، متفاوت می‌باشد. از جهتی این شرایط در ریزمحیط سلول‌های سرطانی با ترشح سایتوکاین‌های مهارکننده سیستم ایمنی به‌صورت مہاری بر بیان ژن‌ها تأثیر دارد؛ به نحوی که این سایتوکاین‌های مہاری با ترشح در خون و لنف نیز بر بیان ژن‌های آماسی منوسیت‌های محیطی اثر مہاری دارند؛ بنابراین می‌توان از این تغییرات با توجه به گرید پاتولوژیک سرطان روده بزرگ به‌عنوان پیش‌آگهی بیماری و یک زمینه تشخیصی در آینده در کنار سایر روش‌های تشخیصی به‌منظور درمان هدفمند این سرطان در مراحل اولیه استفاده کرد.

### References

- [1]. Ansa BE, Coughlin, Steven S, Alema-Mensah, Ernest Smith, Selina A., AL E. Evaluation of colorectal cancer incidence trends in the United States (2000-2014). *Journal of Clinical Medicine*. 2018;7(2):22.
- [2]. Dolatkah R, Somi, MH, Bonyadi, MJ, Asvadi Kermani, I, Farassati, F, Dastgiri, S., et al. e. Colorectal cancer in iran: molecular epidemiology and screening strategies. *J Cancer Epidemiol*. 2015;2015:643020
- [3]. Rafa H, Benkhelifa, S, AitYounes, S, Saoula, H., et al. e. All-Trans Retinoic Acid Modulates TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Targeting TNF- $\alpha$  and Nitric Oxide Synthase 2 Expression in Colonic Mucosa during Ulcerative Colitis and Colitis Associated Cancer. *Mediators of Inflammation*. 2017:1-16.
- [4]. M. Ramos ML, M. Esteva, . et al. "Knowledge and attitudes of primary healthcare patients regarding population based screening for colorectal cancer,". *BMC Cancer*. 2011: 11:408,1-11.
- [5]. Hanash SM BC, Kallioniemi, et al. Emerging molecular biomarkers-blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8:142-150.
- [6]. Masatsune Shibutani KM, Hisashi Nagahara, Tatsunari Fukuoka, Shigetomi Nakao, Shinji Matsutani, Kosei Hirakawa and Masaichi Ohira, et al. The peripheral monocyte count is associated with the density of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of colorectal cancer: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2017;17:404:1-7.
- [7]. Mairi H. McLean GIM, Keith N. Stewart, et al. The Inflammatory Microenvironment in Colorectal Neoplasia. *plos one*. 2010;6:1-8.
- [8]. M. Honda YS, T. Yamashita, et al. "Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers,". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;400,no.1: 7-15.
- [9]. Ziegler H, Ancuta, P, Crowe, S, Dalod, M, Grau, V, Hart, DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
- [10]. Coillard A, Segura, Elodie. In vivo differentiation of human monocytes. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1907.
- [11]. Carlin LM, et al. Nr4a1-dependent Ly6c low monocytes monitor endothelial cells and orchestrate disposal. *Cell*. 2013;153(2):362-75.
- [12]. Imhof BA, et al. CCN1/CYR61-mediated meticulous patrolling by LY6c low monocytes fuels vascular inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;201607710.
- [13]. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research*. 2014;2(1):1-9.
- [14]. Stanilova. NSSDMGDPJMC A, et al. Monocytes expression of IL-12 related and IL-10 genes in association with development of colorectal cancer. *molecular biology reports*. 2012;39:10895-902.
- [15]. Hennessy E, Parker, AE/Neill, LAJ, et al. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010;(9):293-307.
- [16]. Basith S MB, Yoo TH, Kim SG, Choi S, et al. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res*. 2012;35:1297-316.
- [17]. Chow MT, Möller, Andreas, Smyth, Mark J, editor. *Inflammation and immune surveillance in cancer*. Elsevier

- Seminars in cancer biology; 2012;(22):23-32.
- [18]. Kolb RL, Janowski AM, Sutterwala FS, et al., Inflammasomes in cancer: a double-edged sword Protein, Cell. 2014;5 (1):12-20.
- [19]. Janakiram NB, Chinthalapally V. The role of inflammation in colon cancer. *Inflammation and cancer*. 2014:25-52.
- [20]. N.S. Stanilov ZGDSAS, et al. Higher TNF-Alpha Production Detected in Colorectal Cancer Patients Monocytes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2012:107-10.
- [21]. Mehrzad J, Bahari A, Bassami MR, et al., Immunobiologically relevant level of aflatoxin B1 alters transcription of key functional immune genes, phagocytosis and survival of human dendritic cells. */jimlet*. 2018;197:44-52.
- [22]. Ali Ghorbani Ranjbary, Jalil Mehrzad, Hesam Dehghani AASH, et al. Variation in Blood and Colorectal Epithelia's Key Trace Elements Along with Expression of Mismatch Repair Proteins from Localized and Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Biological Trace Element Research*. 2019;194:66-75.
- [23]. Chang Y-T, Huang Chi-Shuan, Yao Chung-Tay, Su Sui-Lung, Terng Harn-Jing, Chou Hsiu-Ling, et al. Gene expression profile of peripheral blood in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(39):14463.
- [24]. Fridman W, Pagès F, Sautès-Fridman C, and Galon J, al. e. "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome," *Nature Reviews Cancer*. 2012;12,no.4:298-306.
- [25]. Zhang F, Wang H, Wang X, et al. e. TGF- $\beta$  induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a proinflammatory phenotype. *Oncotarget*. 2016;(7):52294-306.
- [26]. Taryn L, Santos MF, Ahmed A, et al. Toll-like receptor (TLR) expression of immune system cells from 2 metastatic breast cancer patients with circulating tumor cells. *Experimental and Molecular Pathology*. 2014;97(1):44-8.
- [27]. Rebecca Kesselring JG, 2 Andreas Hiergeist, et al. IRAK-M Expression in Tumor Cells Supports Colorectal Cancer Progression through Reduction of Antimicrobial Defense and Stabilization of STAT3. *Cancer Cell*. 2016;29:684-96.
- [28]. Qin He1 YF, Dean Tian1, Wei Yan1, et al. The contrasting roles of inflammasomes in cancer. *Am J Cancer*. 2018;8(4):566-83.
- [29]. Ye X Q, X, al. e. Gene Expression Analysis of Peripheral Blood Cells Reveals Toll-Like Receptor Pathway Deregulation in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2013;8(5):e62870.
- [30]. Sarra Benkhalifa HR, said Belhadeh, Hayat Ait-kaci, oussama Medieber Morad, et al. Aberrant upregulation of iNOS/NO system is correlated with an increased abundance of Foxp3+ cells and reduced effector/memory cell markers expression during colorectal cancer: immunomodulatory effects of cetuximab combined with chemotherapy. *Inflammopharmacology*. 2019;27(4):685-700.