

بررسی بیان مارکر CD8 و تکثیر لمفوسیت‌های خون محیطی زنان چندزا در مجاورت و هم‌کشتی سلول‌های توموری پستان، لاین MDA-231 و MCF-7 و مقایسه آن با زنان بدون فرزند نازنین قاسمی^۱، مه‌ری حاجی آقایی^۱، فاطمه رضایت^۱، دکتر مهرناز مصداقی^۲، دکتر نریمان مصفا^{۳*}، دکتر فهیمه رضانی تهرانی^۴

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

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

خلاصه

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

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

یافته‌ها: میانگین میزان تکثیر لمفوسیتی در گروه چندزا نسبت به گروه بدون فرزند، بالاتر و از نظر آماری در ۴۸ ساعت و در ۷۲ ساعت معنادار بود ($p < 0.001$). همچنین مقایسه تکثیر لمفوسیت‌های مادران مولتی‌پار در مقابل لاین‌های MCF-7 ($p = 0.026$) و MDA-231 ($p < 0.001$) در مقایسه با زنان بدون فرزند نتایج معناداری را نشان داد. تعیین درصد جمعیت لمفوسیت‌های سایتوتوکسیک (CD3+ CD8+) تفاوت معناداری را بین دو گروه تحت بررسی نشان نداد ($p = 0.603$).

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

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

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر نریمان مصفا؛ پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۹۷۰؛ پست الکترونیک: yasamaryan@gmail.com

مقدمه

تومورهای پستان در ایران، شایع‌ترین نوع سرطان تشخیص داده شده در بین زنان است (۱)؛ به طوری که در سال ۲۰۰۳ شیوع آن در ایران در هر ۱۰۰۰ نفر، ۶/۷ نفر بوده است (۲) و سالیانه میزان مرگ‌آوری آن نیز رو به افزایش است (۳). عوامل متعددی در ایجاد بدخیمی‌های پستان دخیل می‌باشند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تغییر الگوی باروری اشاره کرد (۴). نفوذ و گسترش لمفوسیتی خصوصاً سلول‌های $T CD8^+$ در اطراف توده تومور با تشخیص بهتر سرطان در ارتباط است (۵). آنالیز موقعیت، حجم و نوع سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته که تحت عنوان "ترکیب ایمنی" گفته می‌شود، می‌تواند امیدهایی برای تشخیص سریع‌تر بیماری و پاسخ بهتر به درمان باشد (۶). در این میان می‌توان به مهم‌ترین سلول و سایتوکاین ضدتوموری یعنی لنفوسیت‌های T و سیتوکاین $TNF-\alpha$ اشاره کرد: $T CD8^+$ در طول چند سال اخیر این سلول‌ها به عنوان مهم‌ترین سلول‌های ارتشاحی در روند سرطان‌های اپی تلیالی شناخته شده‌اند (۷). در سرطان پستان سلول‌ها با استفاده از برش هماتوکسلین/ اتوزین و تکنیک ایمونوهیستوشیمی در تشخیص‌های اولیه یا مراحل اولیه سرطان با ارتشاح لمفوسیتی و نتایج بالینی بهتر در ارتباطند (۸، ۹). خصوصاً شناسایی این سلول‌ها در اطراف بافت سرطان پستان که فاقد هر سه مارکر بدخیمی می‌باشند (توموری که در آن بیان PR ، ER و $HER2^2$ یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی منفی باشد)، در پیش آگهی تومور مؤثر است (۱۰). بنابراین ارتشاح این لمفوسیت‌ها با افزایش فعالیت ضد توموری در ارتباط است.

$TNF-\alpha^3$: این سایتوکاین یک واسطه التهابی است که در بروز سرطان نقش دارد (۱۱) و به عنوان یک شمشیر دو لبه، غلظت بالای آن می‌تواند پاسخ ضد توموری (۱۲) و غلظت پایین آن پاسخ توموری ایجاد کند (۱۳). مکانیسم آن در تحریک رشد تومور، با القای تولید

ROS^4 و RNS^5 است که می‌تواند منجر به آسیب DNA و کمک به روند ایجاد تومور شود (۱۴، ۱۵). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که بارداری می‌تواند اثرات متفاوت و دوگانه‌ای بر روی وقوع تومور و افزایش خطر سرطان پستان داشته باشد. مشخص شده است که هم پس از زایمان و در کوتاه مدت به دلیل تحریک رشد سلول‌هایی که در مراحل اولیه ترانسفورماسیون و بدخیمی می‌باشند، احتمال ابتلاء به بدخیمی افزایش می‌یابد، درحالی‌که در اثر بلند مدت بارداری که می‌تواند تا سال‌های بعد از تولد فرزندان به طول انجامد، شیوع سرطان پستان در مادران کاهش می‌یابد، زیرا تمایز سلول‌های بنیادی مستعد ایجاد تومور در پستان به دنبال تغییرات هورمونی شدت یافته و در نتیجه امکان بروز بدخیمی کاهش می‌یابد (۱۶، ۱۷).

با توجه به تغییرات پاسخ‌های دفاع ضد توموری در جریان بارداری‌های متعدد که در اثر تماس سیستم ایمنی مادر با آنتی ژن‌های مشترک توموری و سلول‌های جنینی رخ می‌دهد، می‌توان به پدیده میکروکایمریسم اشاره کرد. بنابر فرضیه وقوع میکروکایمریسم جنینی (FM)^۶ طول بارداری و تقویت رو به گسترش آن در مادران چندزا و رابطه بین شیوع کمتر سرطان پستان در این مادران، این روزها بحث برانگیز و مورد تحقیق بسیار قرار گرفته است. آمار و اطلاعات موجود در منابع نشان می‌دهد که در صورت وقوع میکروکایمریسم، سرطان پستان در زنان با سابقه بارداری متعدد مهار می‌شود و عکس آن نیز صادق است؛ بدین معنا که در انسان مبتلا به سرطان پستان اثر کمتری از وقوع میکروکایمریسم جنینی ملاحظه نمی‌شود. از آنجایی که یکی از وظایف مهم سیستم ایمنی مقابله با تومورها می‌باشد، این امکان وجود دارد که سیستم ایمنی مادران چندزا به دلیل کایمریسم‌های متعدد، قدرت مقابله با تومور پستان را در طی سال‌های متمادی کسب نموده و مقاومت این مادران به دلیل فعالیت ضدتوموری سیستم ایمنی باشد (۱۸-۲۰). بر اساس نتایج بسیاری از گزارشات و مقالات، وقوع

⁴ Reactive Oxygen Species

⁵ Reactive Nitrogen Species

⁶ Fetal Microchimerism

¹ Immune Contexture

² Human Epidermal growth factor Receptor

³ Tumor Necrosis Factor

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

روش کار

رده‌های سلول‌های توموری:

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

نمونه‌گیری:

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

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به روش گرادیان غلظتی به کمک فایکول هپاک ۱۰۷۷ (Gibco-USA) تخلیص گردید. پس از شمارش با لام نئوبار با کمک رنگ‌آمیزی با تریپان بلو، درصد حیات سلول‌ها

در بالای محدوده ۹۵٪ تعیین شد. شرکت‌کنندگان در این مطالعه با اعلام رضایت برای اخذ نمونه، فرم مخصوص را تأیید و امضا کردند. افراد مورد مطالعه داوطلبینی بودند که بر اساس اطلاعیه مربوط به پذیرش نمونه مراجعه کردند. معیارهای ورود و خروج در پرسشنامه مخصوص جمع‌آوری اطلاعات مشخص گردید معیار های ورود شامل: تعداد دفعات بارداری و تولد بالاتر از ۳ فرزند زنده و سالم برای مادران چندزا و نداشتن فرزند برای بانوان بدون فرزند، محدوده سنی برای انتخاب نمونه ها ۲۵ تا ۴۰ سال بود.

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

سیستم هم‌کشتی:

۱۲ ساعت قبل از هر مرحله هم‌کشتی، ابتدا در بستر چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای مخصوص سیستم هم‌کشتی (SPL-Korea) تعداد 5×10^5 سلول لاین توموری کشت داده شد. پس از تفرق کامل سلولی در روز بعد، تعداد 2×10^6 از سلول‌های تک هسته‌ای در هر یک از چنبرهای ترانس ول قرار داده شدند. به منظور کنترل شرایط آزمون سیستم هم‌کشتی یا تست-کنترل برای هر نمونه، کنترل بدون رده سلول توموری نیز در نظر گرفته شد.

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

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

جدول ۱- محتویات کنترل‌های کیت تکثیر سلولی BrdU

محتویات چاهک	بلانک	کنترل زمینه
محیط کشت سلولی	۱۰۰ μ.l	-
سلول‌ها	-	۱۰۰ μ.l
BrdU	۱۰ μ.l	-
Anti-BrdU-POD	۱۰۰ μ.l	۱۰۰ μ.l

واریانس و تی مستقل و در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود، از آزمون کروسکال والیس و من ویتنی استفاده شد. در تمام آزمایشات حدود اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

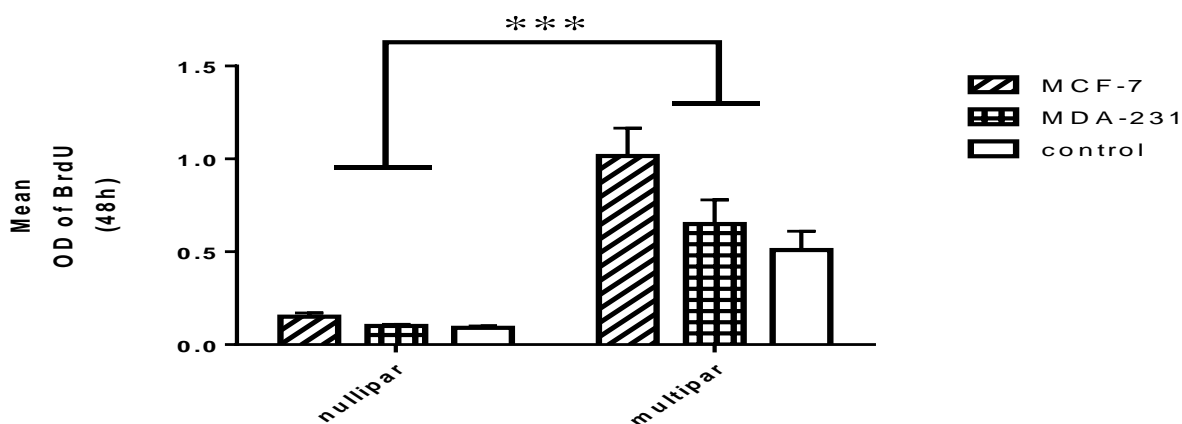
مقایسه تکثیر لمفوسیتی طی هم‌کشتی، بین دو گروه چندزا و بدون فرزند:

نتایج کامل میزان تکثیر لمفوسیتی طی هم‌کشتی با هر دو نوع سل لاین توموری و کنترل در دو گروه بدون فرزند و چندزا در هر دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، میانگین میزان تکثیر لمفوسیتی در گروه چندزا نسبت به گروه بدون فرزند بالاتر بود و این مقدار از نظر آماری در ۴۸ ساعت ($p < 0/001$) (نمودار ۱) و ۷۲ ساعت از نظر آماری معنادار بود ($p < 0/001$) (نمودار ۲).

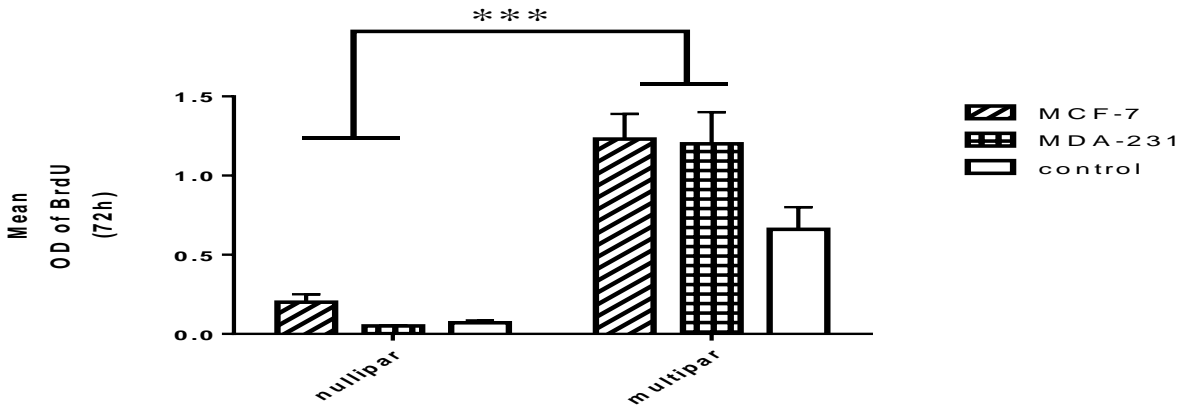
ایمونو فنوتایپینگ و بررسی بیان مارکر CD3 و CD8 توسط فلوسایتومتری:

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

تحلیل نتایج و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام گرفت. به‌منظور تعیین حجم نمونه از فرمول تعیین اختلاف معنی‌دار بین دو گروه و مقایسه بین میانگین‌ها استفاده گردید در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال بود، از آزمون آنالیز



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

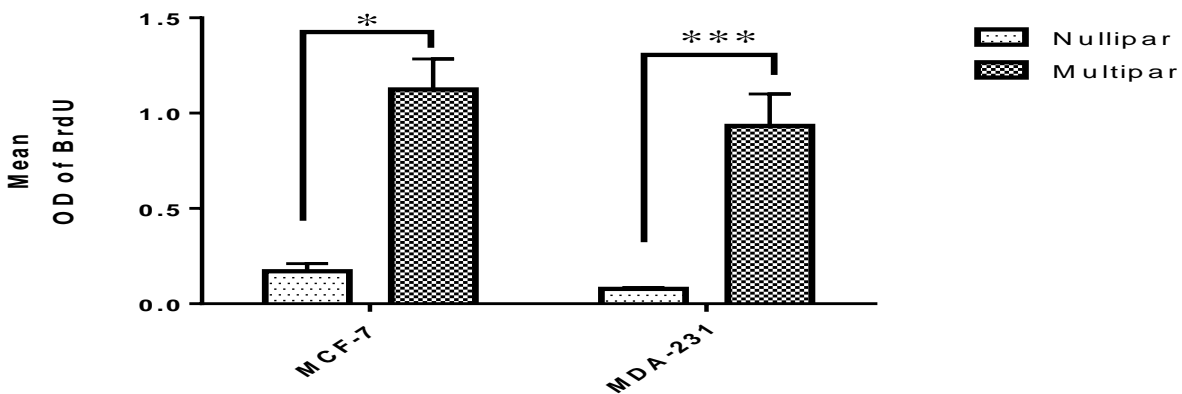


نمودار ۲- مقایسه میانگین تکثیر لمفوسیتی در دو گروه چندزا و بدون فرزند پس از هم کشتی در ۷۲ ساعت با هر دو نوع سل لاین و کنترل

بیشتر از MDA-231 بود. هم چنین این مقدار از نظر آماری برای سل لاین MCF-7 معنادار بود ($p=0/026$) و میانگین تکثیر لمفوسیتی برای سل لاین MDA-231 نیز معنادار شد؛ به طوری که در این لاین‌ها، میزان تکثیر گروه چندزا بیشتر از بدون فرزند بود ($p<0/001$) (نمودار ۳).

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

بر اساس نتایج مربوط به بررسی اثر مربوط به نوع سل لاین توموری که هم کشتی با لمفوسیت‌های هر دو گروه چندزا و بدون فرزند صورت گرفت، میانگین تکثیر لمفوسیتی در هر دو گروه، برای سل لاین MCF-7



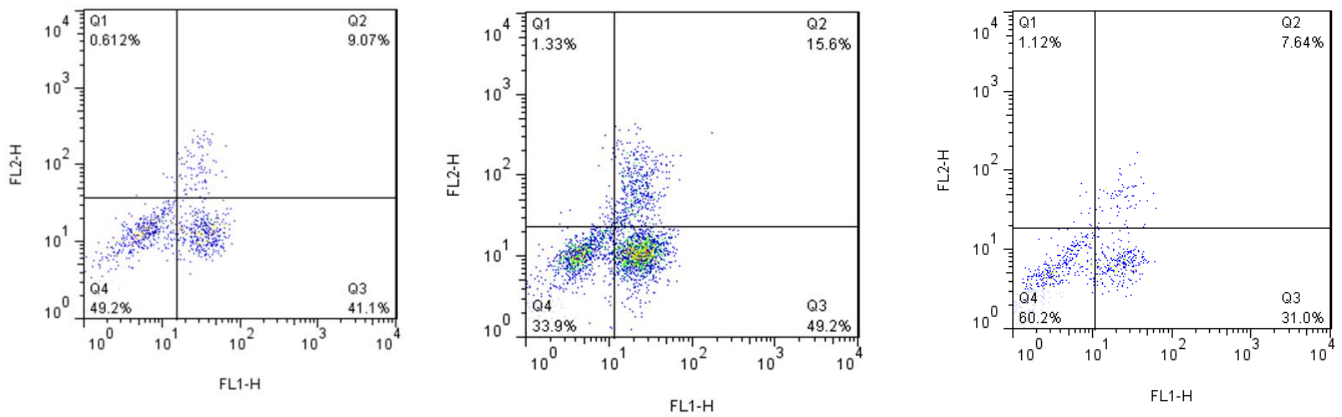
نمودار ۳- مقایسه میانگین تکثیر لمفوسیتی دو گروه طی هم کشتی با هر دو رده سل لاین توموری MCF-7 و MDA-231 (مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ با علامت یک ستاره (*) نشان داده شده اند)

جمعیت سلول‌های CD3 و CD8 در گروه A (بدون فرزند) نسبت به گروه B (چندزا) بیشتر بود که این می‌تواند به دلیل جوان تر بودن میانگین سنی زنان بدون فرزند نسبت به زنان چندزا باشد. همچنین تصویر ۱، چگونگی مقایسه بین درصد لمفوسیت‌های سایتوتوکسیک در گروه‌های مورد مطالعه در شرایط هم کشتی با دو مدل سل لاین توموری MCF-7 و MDA-231 را نشان می‌دهد.

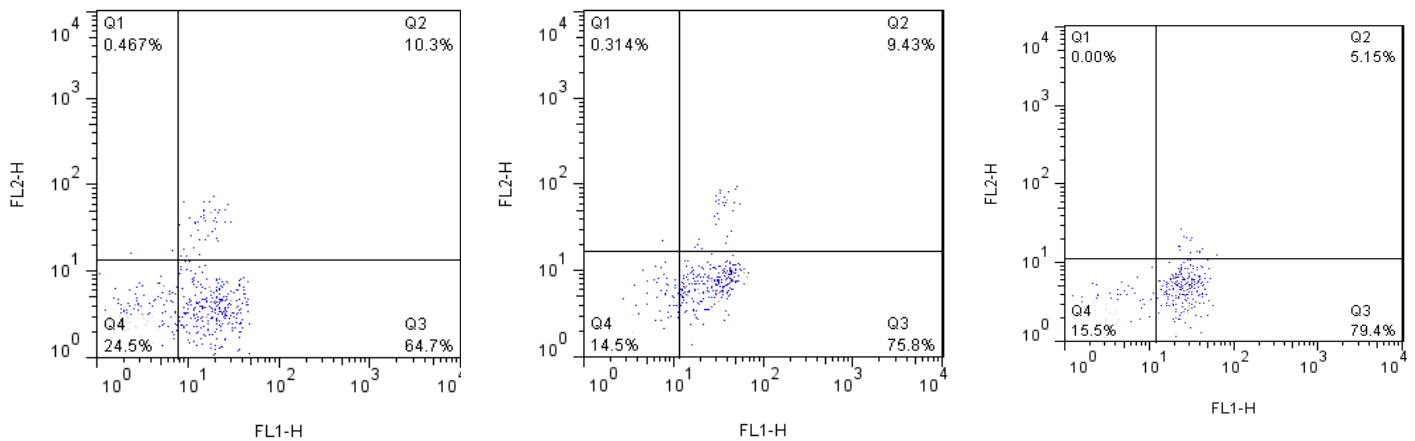
بررسی درصد جمعیت سلول‌های CD3 و CD8 در بین گروه‌های مورد مطالعه و شرایط مختلف در مطالعه حاضر با استفاده از روش فلوسایتومتری، درصد جمعیت سلول‌های CD3 و CD8 در بین دو گروه مورد مطالعه و در بین زمان انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعته تفاوت معناداری نداشت ($p=0/603$). بر اساس دیگرام‌های فلوسایتومتری در تصویر شماره ۱، درصد

A :

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



B :



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

بحث

که پدیده میکروکایمریسم می‌تواند واجد اثرات مفید و خوب باشد و در عین حال به دلیل برانگیختن پاسخ‌های ایمنی بر علیه پیوند نیمه بیگانه جنین، برای مادر مضر و خطرناک باشد که بدان میکرو کایمریسم بد اطلاق می‌نمایند. ولی به لحاظ ماهیت بسیار مشابه برخی سلول‌های توموری به خصوص تومورهای پستان با سلول‌های مزانشیمی جنینی، این امکان برای مادر باردار در طی بارداری‌های متعدد فراهم می‌شود که سیستم ایمنی فرصت شناسایی این ساختار مشترک را داشته باشند. از آنجایی که هر دو گروه سلولی بین سلول‌های

پدیده انتقال و بقای سلول‌های پروژنیاتور جنینی به داخل جریان خون مادری در طول بارداری، مورد توجه و تحقیق بسیاری از دانشمندان و پژوهشگران و حتی محققان بالینی قرار گرفته است. با توجه به ماهیت بنیادی بودن اکثریت این سلول‌های مستقر در بافت‌های مادری که منجر به رخدادهای مفید و سودمند در مادر می‌شود و به نوعی در ترمیم، اصلاح و بازپروری بافت‌های مادری نقش مهم دارد، می‌تواند منجر به وقوع پاسخ‌های دفاعی آلورژیک شود. بر این اساس میتوان ادعان داشت

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

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

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

پژوهشی وسیع با استناد بسیار متعدد به آن در سال ۱۹۹۵ انجام پذیرفت. پاسخ‌های لmfوسیت‌های T بر علیه یکی از شناخته شده‌ترین تومور مارکرهای سرطان پستان یعنی MUC-1 به لحاظ پاسخ‌های تکثیری مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا نویسندگان این گزارش معتقد بودند که چندزایی با محافظت بر علیه تومور پستان به شدت همراهی می‌نماید. آن‌ها آنتی‌ژن نوترکیب مناسبی به نام MUC-1 را با پالس به

سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به عنوان محرک سلول‌های تک هسته‌ای افراد مورد مطالعه (مادران با سابقه ۲ و یا بیشتر از ۲ بار بارداری و آقایان داوطلب) مورد آزمایش قرار دادند (۲۳). اثربخشی و اعتبار این واکسن سنتتیک از آنجایی مورد توجه قرار گرفت که T سل‌های پاسخ دهنده به آنتی‌ژن MUC-1 در مادران فوق، آن هم در سه ماهه اول بارداری مورد تعیین و ارزیابی قرار گرفته و ظهور آن‌ها در گردش خون زنان تحت تزریق به اثبات رسید. حضور فعال این T سل‌های پرایم شده را زنان بدون فرزند که تحت تزریق واکسن فوق قرار گرفتند نیز نشان دادند. بنابراین اهمیت MUC-1 در دوران بارداری به عنوان بخش مهمی از ایمونیزاسیون مادران بر علیه بافت‌های توموری به اثبات رسید.

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

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

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

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

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

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

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

پژوهش‌های تکمیلی و به خصوص در تعداد بیشتری از زنان است. نکتهٔ حائز اهمیت این بود که در گردآوری نمونه‌ها، نهایت سعی در انتخاب موارد مناسب انجام گرفت. به عنوان مثال روش زندگی داوطلبین تحت نمونه‌گیری و سوابق فامیلی به لحاظ عدم ابتلاء به سرطان در وابستگان و خویشاوندان نزدیک (شامل پدر- مادر- خواهر- برادر و بعضاً افراد درجه دوم فامیل) بر اعتبار نتایج حاصله می‌افزاید که شاید در یک پژوهش دیگر توجه به این نکته ضروری باشد که در مطالعه حاضر به دلیل مشکلات و محدودیت‌های اخذ نمونه از زنان تحت بررسی به دلیل نداشتن هماهنگی سن بین دو گروه که ناشی از میانگین سنی بالاتر مادران چندزا در برابر زنان بدون فرزند بود، نتایج مربوط به فعالیت لمفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (CD8+ / CD3+) تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان نداد. دلیل این امر همان جوان‌تر بودن زنان بدون فرزند در مقایسه با مادران چندزا بود که متأسفانه به دلیل شرایط فعلی اجتماعی، امکان اخذ نمونه از مادری جوان ولی چندزا فراهم نشد، به خصوص که کرایتریای دارو به مطالعه مانند شرایط زندگی و سابقه فامیلی بدخیمی نیز کاملاً در نظر گرفته شد. شاید با در دست داشتن نمونه‌های بیشتر بتوان نقش ژنتیک و عوامل محیطی دیگر را بر حساسیت یا مقاومت زنان چندزا بر پاسخ‌های فعالیتی تک هسته‌ای‌های خون محیطی مورد مطالعه و بررسی دقیق‌تر قرار دارد. لازم به ذکر است که زنان بدون فرزند داوطلب در این مطالعه نیز به لحاظ سوابق خانوادگی و روش زندگی، هماهنگی بسیار مثبتی را با گروه آزمایش یعنی زنان چندزا داشتند.

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

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

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

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

(۱) با توجه به تفاوت آشکار بین دو لاین سلولی MCF-1 و MAD-123 به لحاظ ساختار سلولی و مولکولی و به خصوص شباهت بسیار زیادی بین سلول‌های سرطانی شبیه به MSC در لاین MCF-7 می‌توان اذعان داشت که مادران چندزا قطعاً به دلیل همان میکروکایمریسم جنینی، در طول بارداری‌های متعدد پاسخ‌های سلولی پایداری را از خود منعکس می‌کنند که می‌تواند در سال‌های آینده آنان را در مقابل وقوع این نوع از تومورهای پستان، مصون نگه دارد. البته تأکید و استناد به این نظریه نیازمند انجام

تحریک و تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای زنان چندزا در مقایسه با زنان بدون فرزند و تولید سایتوکاین بیشتر توسط آن‌ها بدست آورد. از طرفی امکان بروز پاسخ‌های ایمنی توسط سلول‌های دفاع ذاتی نمونه‌های تحت بررسی در مواجهه با ریز محیط سلول‌های توموری بوده است. نقش سلول‌های لنفوسیتی دفاع اختصاصی بخصوص لنفوسیت‌های کمکی یا Th نیز که بر علیه آنتی‌ژن‌های مشترک سلول‌های توموری و سلول‌های بنیادی جنینی موجب تکثیر آن‌ها در شرایط درون لوله ایست نیز اهمیت دارد چرا که این پاسخ‌ها در طول بارداری شکل یافته‌اند. بنابراین لازم است در یک مطالعه بسیار جامع، با استفاده از سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و نیز بکارگیری از چند آنتی‌ژن توموری منجمله MUC-1, 16 به ارزیابی دفاع اختصاصی مادران چندزا بر علیه Ag های توموری پرداختند که انجام این پروژه نیاز به طراحی و ابداع یک متدولوژی پیشرفته می‌باشد که جداسازی و تخلیص سلول‌های دفاع ایمنی داوطلبین به صورت کاملاً دقیق صورت پذیرد. تفاوت بین فعالیت گروه‌های تحت بررسی در شرایط کشت با کنترل آزمون‌ها نشان دهنده تحت تأثیر قرار گرفتن جمعیت سلولی در مجاورت ریز محیط تومور سل لاین‌ها می‌باشد. (۳) با استناد به یافته‌های این پژوهش، لمفوسیت‌های مادران مولتی پار، پاسخ تکثیری قابل توجهی در مجاورت با لاین توموری MCF-7 نشان دادند که در مقایسه با زنان بدون فرزند به لحاظ تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p=0/026$). این یافته می‌تواند دلیل توانایی تکثیری لمفوسیت‌های مادران چندزا را با پدیده وقوع میکروکایمریسم بیان کند، زیرا لاین MCF-7 واجد تمام خصوصیات مولکولی و فنوتیپیک با سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. این مادران بارها تجربه برخورد و همجواری با سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی را در بافت‌های خود دارا می‌باشند و دلیل این توان تکثیری، وجود سابقه دفاع ایمنی در برخورد با سلول‌های فوق می‌باشد که به طور حفاظتی موجب مقاومت و تکثیر در مقابل سل لاین توموری فوق شده است. بدین ترتیب فرضیه میکروکایمریسم و مقاومت به تومور را تقویت می‌نماید (۲۴).

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

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

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

در سنین ازدواج و بارداری، باروری در جامعه افزایش یافته و یکی از راه‌های پیشگیری از وقوع بدخیمی پستان، در جامعه زنان گردد.

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

تشکر و قدردانی

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

نتیجه‌گیری

اپیدمیولوژی سرطان پستان در گروه مادران با سابقه تولد چند فرزند، در مقایسه با زنان بدون فرزند، موید این نظریه می‌باشد که تعدد باروری موجب مقاومت مادران به وقوع و متاستاز تومور پستان می‌گردد. امید است که با ارتقاء سطح آگاهی و وضعیت اقتصادی زنان

منابع

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

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