

## بررسی فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بانوان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در هم‌کشتی با لاین‌های سلول‌های توموری پستان در مقایسه با بانوان سالم

فاطمه رضایت<sup>۱</sup>، مهری حاجی‌آقایی<sup>۱</sup>، دکتر نریمان مصفا<sup>۲</sup>، دکتر فهیمه رضانی تهرانی<sup>۲</sup>، دکتر مهرناز مصداقی<sup>۱</sup>

۱) گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۲) مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، دکتر فهیمه رضانی تهرانی؛ e-mail: ramezani@endocrine.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین اختلالات غددی در بانوان است. حضور سیستمیک انواع سایتوکاین‌های التهابی، به ویژه TNF- $\alpha$ ، در این مبتلایان دلیل عمده برای وقوع اختلالات ایمونولوژیک است. بسیاری از تظاهرات PCOS، از جمله ناباروری، هایپراندروژنیسم، چاقی و التهاب مزمن، جزو عوامل خطر برای سرطان پستان در نظر گرفته می‌شوند. خطر شکل‌گیری سرطان پستان در بانوان مبتلا به PCOS در برخی مطالعات اپیدمیولوژیک در حال بررسی است. در این پژوهش، از طریق هم‌کشتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) مبتلایان به PCOS با سلول‌های رده توموری پستان، جنبه‌ای از پاسخ ضد توموری این سلول‌ها مورد ارزیابی تجربی و آزمایشگاهی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: سلول‌های تک‌هسته‌ای (PBMCs) از ۵۰ نمونه‌ی خون محیطی (در دو گروه مبتلا به PCOS و افراد سالم) به وسیله‌ی گرادیان فایکول جداسازی و تخلیص شدند. رده‌های توموری پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) به عنوان سلول‌های هدف کشت شدند و در مجاورت با سلول‌های تک‌هسته‌ای، در سیستم هم‌کشتی ترانسول قرار گرفتند. در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم‌کشتی، تکثیر سلولی با تست تکثیر سلولی بروموداکسی یوریدین بررسی شد. تعیین درصد لنفوسیت‌های CD3+ CD8+ به عنوان سلول‌های اجرایی، به وسیله‌ی تکنیک فلوسایتومتری انجام گرفت. یافته‌ها: پاسخ تکثیری PBMCs، پس از ۴۸ ساعت هم‌کشتی با سلول‌های لاین توموری MDA-468 ( $P=0/002$ ) و MCF-7 ( $P=0/021$ ) به طور معنی‌داری در گروه مبتلا به PCOS نسبت به گروه سالم بیشتر بود. تفاوت قابل توجهی در تعداد سلول‌های CD3+CD8+ T بین گروه‌های سالم و مبتلا مشاهده نشد ( $P>0/05$ )، اما پس از ۷۲ ساعت هم‌کشتی، درصد سلول‌های CD3+CD8+ T بیشتر نمونه‌ها افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از هم‌کشتی با MDA-468 و MCF-7 در هیچ‌کدام از تست‌ها مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: آستانه‌ی تحریک سلول‌های تک‌هسته‌ای بانوان مبتلا به PCOS کاهش یافته است و تفاوت بین دو گروه سالم و مبتلا به PCOS از لحاظ قدرت تکثیر سلول‌های اجرایی می‌تواند به دلیل وجود وضعیت التهابی مزمن در این مبتلایان باشد.

**واژگان کلیدی:** سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، سرطان پستان، هم‌کشتی، لنفوسیت‌های CD3+ CD8+، BrdU.

دریافت مقاله: ۹۴/۱۱/۱۲ - دریافت اصلاحیه: ۹۵/۲/۲۸ - پذیرش مقاله: ۹۵/۳/۱۲

## مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک<sup>i</sup> (PCOS) اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط دو پزشک متخصص بیماری‌های زنان به نام‌های استن<sup>ii</sup> و لونتال<sup>iii</sup> در شیکاگو معرفی شد.<sup>۱</sup> این سندرم، نوعی اختلال ناهمگون است که با عدم وقوع تخمک‌گذاری، افزایش آندروژن (هایپروآندروژنیسم)، تخمدان‌های پلی‌کیستیک و کاهش توان باروری مشخص می‌شود.<sup>۲,۳</sup> PCOS با مقاومت به انسولین، تجمع چربی در ناحیه شکمی و چاقی (نمایه‌ی توده‌ی بدنی بیشتر از ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع) همراه است، که مجموعه‌ی این علائم در تقریباً ۵۰ درصد از بانوان مبتلا به PCOS دیده می‌شود.<sup>۴</sup> سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، شایع‌ترین اختلال غددی و متابولیک در بانوان، طی سنین باروری است که شیوع آن بسته به تعریف رایج شده از آن، ۱۰-۵ درصد گزارش شده است.<sup>۵</sup> شیوع این اختلال در کشور ایران، با انجام یک مطالعه‌ی کشوری، ۱۴/۶ درصد اعلام شده است.<sup>۶</sup> تغییر در غلظت هورمون‌های جنسی در بدن، فعالیت سیستم دفاعی را از طریق تغییر فراوانی زیر جمعیت‌های لکوسیتی تحت تأثیر قرار می‌دهد، به طوری که مشاهده شده در افراد مبتلا به PCOS، کاهش تعداد لنفوسیت‌های  $CD8^+$  T و سلول‌های NK مشاهده می‌شود.<sup>۷</sup> به طور کلی، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به عنوان یک وضعیت التهابی خفیف در نظر گرفته می‌شود. برخی مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داده‌اند که سطح سرمی اینترلوکین ۱۸ (IL-18)، به عنوان یک سایتوکاین التهاب‌زا، در مبتلایان به PCOS افزایش می‌یابد که باعث القای تولید فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF- $\alpha$ ) می‌شود.<sup>۸</sup> همچنین، در این افراد التهابات مزمن و اختلالات خود ایمنی شیوع بیشتری دارند که نشان‌گر تغییر در عملکرد سلول‌های اجرایی سیستم ایمنی بدن است.<sup>۹</sup> بسیاری از فاکتورهای التهابی افزایش یافته در افراد مبتلا توسط آدیپوسیت‌ها تولید می‌شوند و همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، PCOS در اغلب موارد اختلالی همراه با بروز چاقی تلقی می‌شود؛ بنابراین داده‌های حاصل از مطالعه بروی افراد دارای اضافه وزن و چربی موضعی در مورد مبتلایان به PCOS نیز می‌تواند قابل تعمیم باشد.<sup>۱۰-۱۴</sup>

نتایج مطالعه انجام شده توسط پاولزاک<sup>iv</sup> نشان داده که TNF- $\alpha$  سرمی در مبتلایان به PCOS دچار چاقی و اضافه وزن، از افراد سالم دارای اضافه وزن و چاقی بیشتر است. تا به امروز ارتباط بین ابتلا به PCOS و بروز برخی از سرطان‌ها، از جمله سرطان اندومتر، بررسی و اثبات شده است.<sup>۱۵</sup> با وجود تحقیقات گسترده در این زمینه، هنوز مطالعات در جهت اثبات ارتباط معنی‌داری بین ابتلا به PCOS و افزایش احتمال بروز سرطان پستان ادامه دارد و تاکنون داده‌های اندکی مبنی بر تأیید این رابطه به دست آمده است.<sup>۱۶,۱۷</sup> سرطان پستان دومین سرطان شایع در جهان است و ۲۵ درصد از انواع بدخیمی‌ها را شامل می‌شود.<sup>۱۸</sup> از جمله اصلی‌ترین فاکتورهای خطر اثبات شده برای آغاز و پیشرفت سرطان پستان، تغییرات غلظتی هورمون‌های تخمدانی، افزایش وزن و چاقی هستند.<sup>۱۹-۲۲</sup> در هنگام چاقی، حضور شرایط التهابی خفیف و در نتیجه‌ی آن، بیان خارج از تنظیم سایتوکاین‌های التهابی و آدیپوکین‌ها، از جمله IL-1، IL-6، TNF- $\alpha$  و لپتین در بافت چربی، سلول‌های التهابی و سرطانی می‌تواند باعث شکل‌گیری و پیشرفت سرطان گردد.<sup>۲۳</sup>

این مطالعه با هدف بررسی وجود ارتباط بین ابتلاء به PCOS و احتمال بروز سرطان پستان، از دیدگاه‌های مولکولی، یعنی بررسی سطح ایمنی ضدتومور در بانوان مبتلا به PCOS در مواجهه با لاین سلول‌های توموری پستان انجام شد، که به این منظور، پاسخ سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بانوان مبتلا به PCOS در همجواری با دو رده‌ی سلول‌های توموری (MCF-7 و MDA-468) سرطان پستان مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی عملکرد سلول‌های ایمنی افراد مبتلا به PCOS در مقابل سلول‌های توموری در شرایط آزمایشگاهی، از روش هم‌کشتی<sup>v</sup> استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

## رده‌های سلولی توموری

رده‌های سلولی آدنوکارسینومای انسانی پستان به نام‌های MCF-7 و MDA-MB-468 از بانک سلولی مرکز ذخیره ژنتیک ایران، به صورت گسترده شده در فلاسک، خریداری شد. به منظور تکثیر لاین‌های فوق، باتوجه به رشد

i - Polycystic ovary syndrome

ii - Stein

iii - Leventhal

iv - Pawelczak

v - Co-Culture

محفظه ترانسول‌های چاهک‌ها قرار داده شدند. سلول‌های حاضر در هر یک از چاهک‌های دارای ترانسول از نظر محیط کشت مطابق با اختصاصیت رده سلولی کشت شده در محفظه پایینی چاهک، تطبیق داده شدند. به منظور کنترل شرایط آزمون هم‌کشتی، برای هر نمونه، کشت در چاهک بدون رده سلولی توموری نیز در نظر گرفته شد.

#### سنجش سطح سایتوکاین TNF- $\alpha$

غلظت TNF- $\alpha$  در مایع رویی کشت در ابتدای کشت و در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعته با استفاده از روش الایزای ساندویچ و براساس کیت R&D (R&D SYSTEMS, USA) و با حساسیت پیکوگرم در دسی‌لیتر تعیین شد.

#### پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای

بررسی میزان تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم‌کشتی به وسیله‌ی آزمون تکثیر لئوسیتی<sup>iv</sup> (BrdU) بروموداکسی یوریدین (Roche Diagnostic, Germany) انجام شد، بدین ترتیب که طبق دستورالعمل کیت، تعداد  $5 \times 10^4$  سلول از هر چاهک مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های در حال تکثیر بوسیله BrdU نشانه‌گذاری شدند و پس از فیکس شدن آن‌ها در بستر پلیت، با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه با آنزیم، رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت جذب نوری پس از افزودن سوپسترای رنگ‌زا به محیط، تعیین شد.

#### ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های تک هسته‌ای

به منظور تعیین درصد لئوسیت‌های T سایتوتوکسیک ( $CD3^+CD8^+$ ) به عنوان سلول‌های اجرایی در پاسخ‌گویی به تحریکات حاصله در ریز محیط توموری، از آنتی‌بادی مونوکلونال کوکتل حاوی آنتی‌بادی ضد شاخص CD3 انسانی متصل به PE<sup>v</sup> (anti CD3-PE conjugated) و آنتی‌بادی ضد شاخص CD8 انسانی متصل به FITC<sup>vi</sup> (BD Bioscience)، از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد و رنگ‌آمیزی نمونه‌های سلولی برداشت شده از چاهک‌ها در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

لگاریتمی سلول‌ها، از محیط کشت (Gibco) DMEM<sup>i</sup> دارای ۱۰ درصد FBS<sup>ii</sup> و ۵ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین استفاده شد. رده سلولی MCF-7 در محیط (Gibco) RPMI 1640<sup>iii</sup> دارای ۱۰ درصد FBS و ۵ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین کشت داده شد. انکوباسیون سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و اتمسفر دارای ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۸۰ درصد انجام شد. ذخیره سازی در انجماد -۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

#### نمونه‌گیری

به منظور تهیه‌ی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، از بانوان مراجعه کننده به دفتر ثبت موارد ابتلاء به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم استفاده شد. معیارهای ورود به مطالعه براساس آخرین راهنمای بالینی تنظیم شده توسط فوق تخصص اندوکرینولوژی تعیین شد. عدم وجود سابقه‌ی سقط و سن ۲۲ تا ۴۵ سال به عنوان معیارهای ورود به مطالعه در نظر گرفته شدند و معیارهای خروج از مطالعه، برخی از عوامل تأثیرگذار بر سیستم ایمنی بدن، شامل یائسگی، برداشت تخمدان‌ها، اختلالات ایمنولوژیک، بیماری‌های زمینه‌ای، مصرف الکل و سیگار و ابتلا به انواع سرطان تعیین شدند. رعایت اصول اخلاقی پژوهش با کسب رضایت کتبی از داوطلبین و آگاهی کامل این افراد امکان پذیر شد (کد کمیته اخلاق: 5SECRIES93/11/26). از افراد تحت بررسی، شامل دو گروه ۲۵ نفری از مبتلایان به PCOS و افراد سالم از نظر ابتلا به این سندروم، ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی هپارینه گرفته شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای، با روش سانتریفوژ گرادیان غلظتی با استفاده از فایکول-هایبیک ۱۰۷۷ (Gibco, U.K) از نمونه‌ی خون کامل هپارینه شده جداسازی و تخلیص شدند. پس از شمارش به کمک لام نئوبار، به وسیله رنگ‌آمیزی با تریپان بلو، درصد حیات سلول‌ها در بالای محدوده ۹۵ درصد، تعیین شد.

#### سیستم هم‌کشتی

۱۲ ساعت قبل از مرحله کشت، ابتدا در بستر چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای مخصوص سیستم هم‌کشتی (SPL, Korea) تعداد  $5 \times 10^5$  سلول توموری کشت داده شدند. پس از اطمینان از تفرق کامل سلولی، به تعداد  $2 \times 10^6$  سلول تک هسته‌ای در

iv- 5-bromo-2'-deoxyuridine

v -Phytoerythrin

vi -Fluorescein Isothiocyanate

i- Dulbecco's Modified Eagle's medium

ii -Fetal Bovine Serum

iii -Roswell Park Memorial Institute

## تحلیل آماری

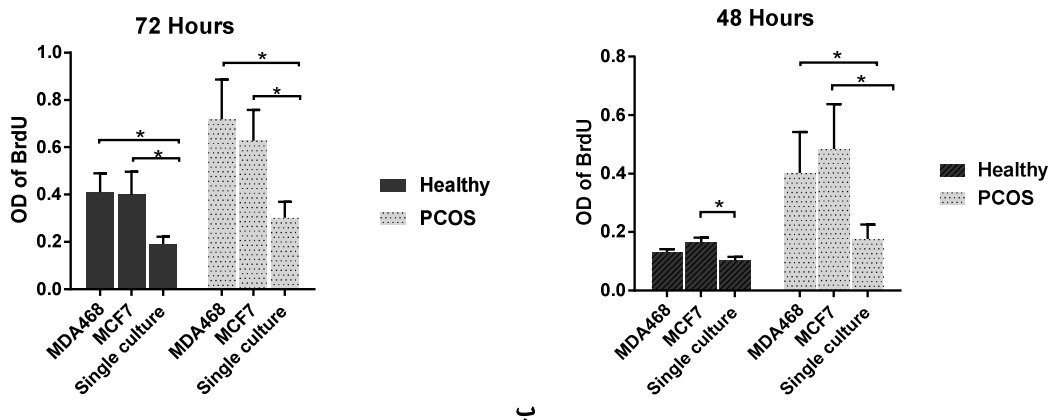
تحلیل نتایج و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد. به منظور مقایسه‌ی بین میانگین‌ها، در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و  $t$  مستقل (Independent-sample T test) و در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود، از معادل ناپارامتری آن‌ها، به ترتیب، کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis) یا من-ویتنی (Mann-Whitney) استفاده شد. در تمام آزمایشات، حدود ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و  $P$  value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب شد.

## یافته‌ها

## افزایش میانگین تکثیر در سلول‌های تک هسته‌ای تحت

## هم‌کشتی نسبت به کشت کنترل

در ابتدا، افراد گروه مبتلا به PCOS از نظر بالا بودن سطح سایتوکاین  $TNF-\alpha$  به عنوان شاخصی برای وجود التهاب مزمن در بدن این افراد مورد تأیید قرار گرفتند. میزان تکثیر لنفوسیت‌ها بین هم‌کشتی با هر کدام از رده‌های سلولی توموری MDA-468 و MCF-7 و همچنین شرایط کشت در غیاب سلول‌های توموری (single culture) مقایسه شدند که نتایج آن در نمودار ۱ نمایش داده شده است.



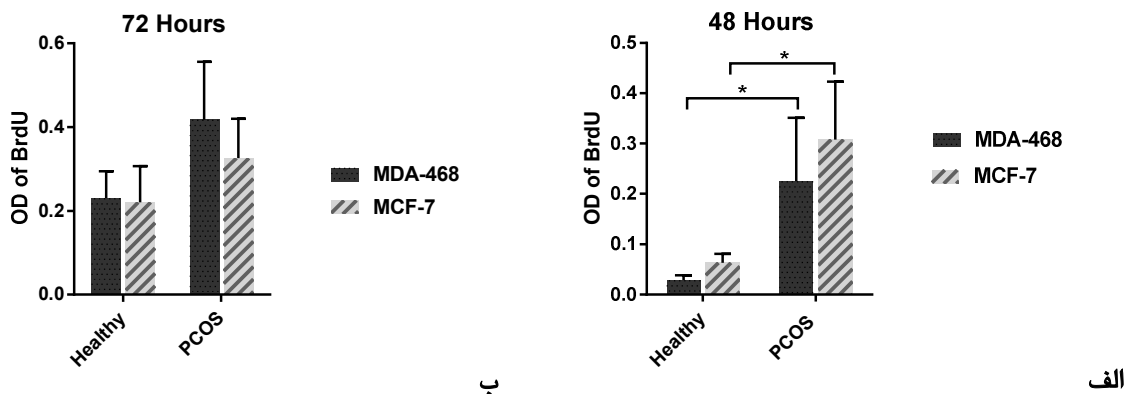
نمودار ۱- مقایسه‌ی میانگین تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای تحت شرایط هم‌کشتی با رده‌های سلولی توموری پستان و کشت کنترل. در هر دو گروه مورد مطالعه، میزان تکثیر در PBMCs طی هم‌کشتی ۴۸ ساعته (الف) و ۷۲ ساعته (ب) با رده‌های سلولی توموری به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به کشت کنترل (single culture) بیشتر بود. تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تکثیر سلولی، بین چاهک‌های تحت هم‌کشتی با MDA-468 و MCF-7 مشاهده نشد. علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) است.

براساس یافته‌های حاصل از این آزمون مشخص شد که تکثیر لنفوسیت‌ها طی هم‌کشتی ۴۸ ساعته با رده‌های سلولی توموری پستان، شامل MDA-468 ( $P = 0.002$ ) و MCF-7 ( $P = 0.021$ )، به طور معنی‌داری بین دو گروه سالم و مبتلا متفاوت است و قدرت پاسخ تکثیری در مبتلایان به PCOS بیشتر از افراد سالم است.

## مقایسه‌ی میزان تکثیر لنفوسیتی طی هم‌کشتی، بین دو

## گروه سالم و مبتلا به PCOS

با توجه به وجود رشد اندک در چاهک‌های کشت کنترل، در ابتدا جذب نوری خوانده شده برای کشت کنترل از جذب نوری خوانده شده از چاهک‌های تحت هم‌کشتی (به عنوان سطح پایه) کسر شد و سپس داده‌های به دست آمده بین دو گروه سالم و مبتلا مورد مقایسه قرار گرفتند (نمودار ۲).

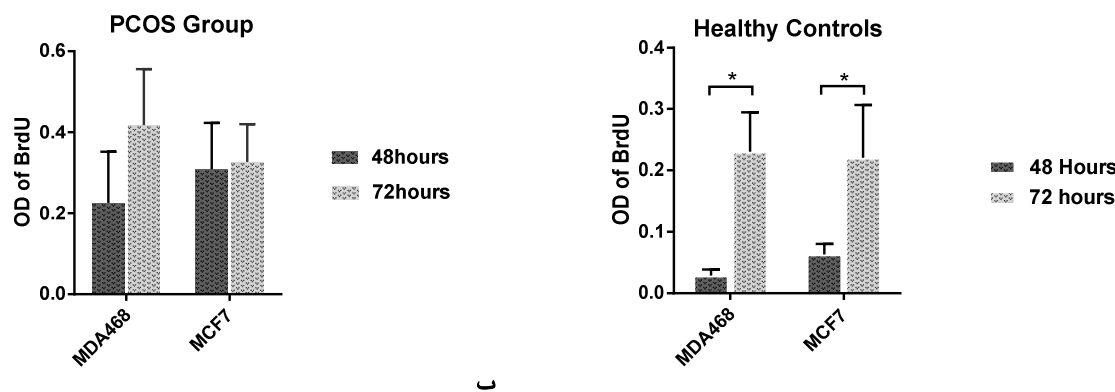


نمودار ۲- مقایسه‌ی میانگین تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای تحت هم‌کشتی با هر کدام از رده‌های سلولی توموری، در دو گروه سالم و مبتلا به PCOS. میانگین تکثیر در هم‌کشتی ۴۸ ساعته (الف) در گروه مبتلا به طور معنی‌داری نسبت به گروه سالم بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). میانگین تکثیر در هم‌کشتی ۷۲ ساعته (ب) نیز در گروه مبتلا به PCOS نسبت به گروه سالم افزایش داشت. این نتایج برای هم‌کشتی با هر دو رده سلول توموری مشابه بود. علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) است.

( $P < 0.05$ ) در کشت ۷۲ ساعته افزایش داشت. داده‌های حاصل از مقایسه‌ی میزان تکثیر لنفوسیتی در هم‌کشتی‌ها با هر دو رده سلولی توموری، بین دو زمان انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار ۳ نشان داده شده است.

بررسی روند افزایشی میزان تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای تا ۷۲ ساعت هم‌کشتی

میزان تکثیر در مورد هم‌کشتی با هر دو رده سلولی توموری (با MDA-468 و MCF-7)، به طور معنی‌داری



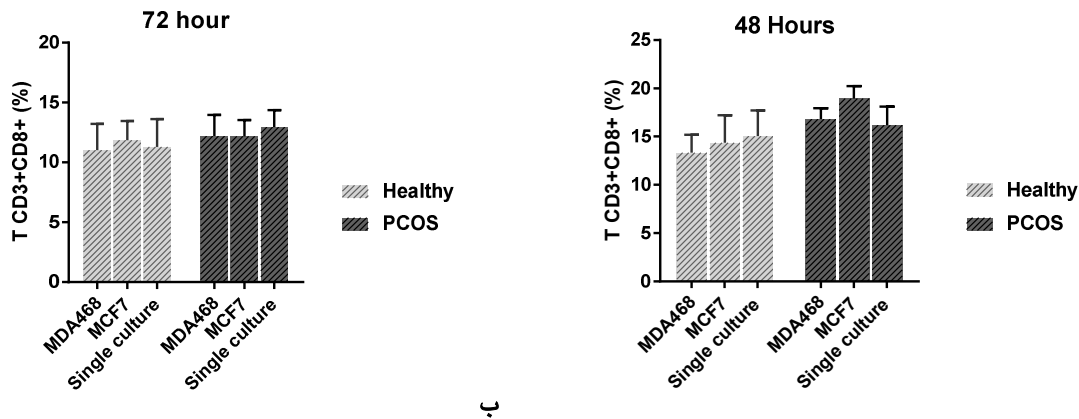
نمودار ۳- مقایسه‌ی میانگین تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای در هم‌کشتی‌های ۴۸ و ۷۲ ساعته با رده‌های سلولی توموری. میزان تکثیر طی ۷۲ ساعت هم‌کشتی به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به کشت ۴۸ ساعته در گروه سالم (الف) افزایش داشت. در گروه مبتلا نیز، میانگین تکثیر PBMCs طی ۷۲ ساعت هم‌کشتی روند افزایشی را نشان داد، اما این تغییرات از سطح معنی‌داری آماری برخوردار نبودند (ب). علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) است.

پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (نمودار ۴). تعداد لنفوسیت‌های  $T CD3^+ CD8^+$  (دوگانه مثبت در دیاگرام‌ها) در سه مرحله، شامل قبل از کشت، انکوباسیون ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته تعیین شد و در اکثر نمونه‌ها تعداد این سلول‌ها پس از قرار گیری در ریز محیط توموری افزایش یافت، اما این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۵).

وضعیت بیان مارکرهای CD8 و CD3 در سطح

لنفوسیت‌های تحت کشت

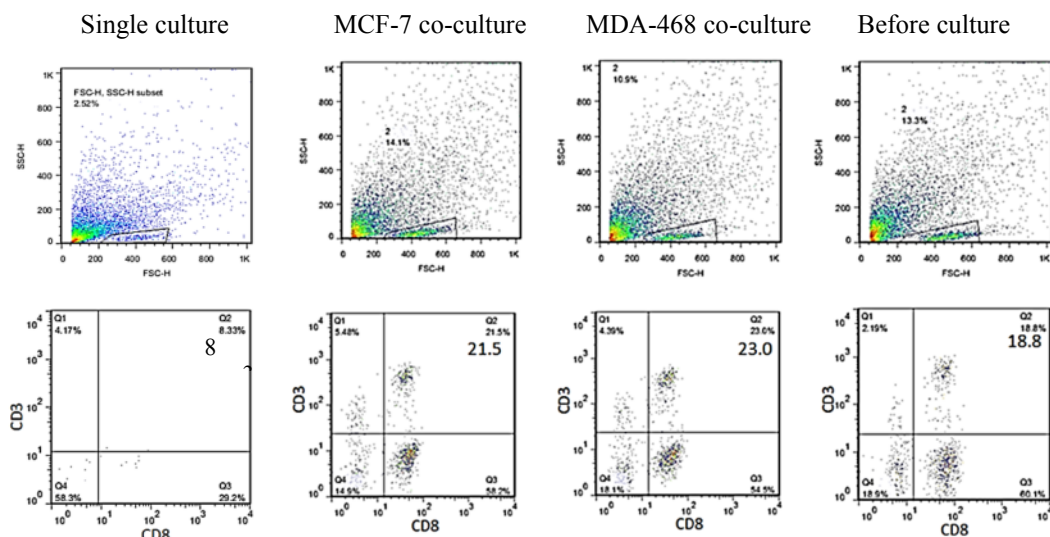
تعیین بیان مارکرهای CD8 و CD3، به منظور بررسی وضعیت تحریک جمعیت لنفوسیتی و اطمینان از نوع جمعیت سلولی پاسخ دهنده انجام شد. برای دستیابی به این هدف، تغییر در تعداد نسبی لنفوسیت‌های  $T CD3^+ CD8^+$  (CTL) در میان PBMCs کشت شده، در گروه‌های سالم و مبتلا،



ب

الف

نمودار ۴- تعداد نسبی لنفوسیت‌های  $T CD3+CD8+$  پس از ۴۸ ساعت (الف) و ۷۲ ساعت (ب) کشت در مجاورت سلول‌های رده توموری پستان، بین گروه‌های سالم و مبتلا، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P>0.05$ ). همچنین تغییر در درصد این سلول‌ها بین دو بازه زمانی مورد بررسی و نیز بین رده‌های سلولی توموری مورد استفاده، تفاوت قابل توجهی را نشان نداد.



نمودار ۵- دیاگرام‌های فلوسایتومتری مربوط به بررسی درصد لنفوسیت‌های  $T CD3+ CD8+$  قبل از کشت و پس از ۷۲ ساعت هم‌کشتی با رده‌های سلولی توموری پستان. در اکثر نمونه‌ها (متعلق به هر دو گروه مورد مطالعه)، درصد سلول‌های  $T CD3+ CD8+$  پس از ۷۲ ساعت کشت در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافت، اما این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P>0.05$ ).

در مواجهه با سلول‌های توموری پستان، به عنوان پارامتری برای سنجش میزان پاسخ‌گویی سلول‌های ایمنی این مبتلایان در ریز محیط توموری مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده از تست تکثیر لنفوسیتی، پاسخ تکثیری PBMCs متعلق به گروه مبتلا به PCOS، در مقایسه با گروه کنترل، از قدرت بیشتری برخوردار بود و این پاسخ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون و کشت در شرایط آزمایشگاهی نیز ادامه یافت. البته، روند افزایشی تکثیر این سلول‌ها با گذشت زمان کاهش یافت، در حالی که میانگین تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای گروه سالم در ابتدا کم بود، ولی با گذشت زمان

## بحث

تاکنون مطالعات بسیاری در رابطه با بررسی وجود احتمال ابتلای بانوان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به سرطان پستان انجام شده است. این مطالعات بیشتر به جنبه‌های جمعیتی و اپیدمیولوژیک این ارتباط پرداخته‌اند و وجود رابطه مثبتی بین ابتلا به PCOS و شکل‌گیری و پیشرفت بدخیمی پستان از دیدگاه ایمونولوژیک مورد توجه و مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه، پاسخ تکثیری سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، به ویژه لنفوسیت‌های  $T CD3+ CD8+$  بانوان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک،

لنفوسیت‌های بانوان مبتلا باشد. این یافته هم‌سو با نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده در زمینه‌ی بررسی وجود خودایمنی در مبتلایان به PCOS است.<sup>۲۵</sup> تفاوت بین دو گروه سالم و مبتلا به PCOS از لحاظ قدرت تکثیر سلول‌های

اجرائی می‌تواند به دلیل وجود زمینه‌ی التهابی خفیف در مبتلایان به PCOS باشد، زیرا با دور شدن این سلول‌ها از شرایط فیزیولوژیک بدن و وضعیت التهابی مزمن، پاسخ گویایی این سلول‌ها به تحریکات محیطی در حال کاهش بود.

از سوی دیگر، عدم هماهنگی تغییرات در پاسخ تکثیری و تعداد نسبی لنفوسیت‌های  $CD8^+$  T، به عنوان جمعیت اصلی در شکل دهی پاسخ ضد توموری، نشان‌دهنده‌ی فقدان توانایی PBMCs این مبتلایان در شکل‌گیری یک پاسخ ضد توموری کارآمد است.

در این پژوهش، به دلیل محدود بودن تعداد افراد مورد مطالعه و ناهمگون بودن جمعیت مبتلایان به PCOS، ممکن است نتایج به دست آمده از تعمیم‌پذیری بالایی برخوردار نباشند و مطالعه بر روی این مبتلایان باید در جمعیت گسترده‌تری انجام گیرد. همچنین، برای اثبات وجود زمینه‌ی ابتلا به سرطان پستان در مبتلایان به PCOS، لازم است عملکرد سایر سلول‌های دفاعی و دیگر ابعاد پاسخ‌های ضدتوموری در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدن (*in vivo*) در این رابطه مورد سنجش قرار گیرند.

**سپاسگزاری:** انجام این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم انجام پذیرفت. بدین‌وسیله، مراتب سپاس و قدردانی نویسندگان این مقاله تقدیم به کسانی می‌شود که موجب هموار شدن مسیر تحقیق بودند، سرکار خانم فرحید عزیزپور مسئول محترم درمانگاه اندوکرینولوژی پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، و به خصوص تمامی بانوانی که با اهدای نمونه‌ی خون خود ما را در این مطالعه یاری رساندند.

و حضور این سلول‌ها در ریز محیط توموری، میزان تکثیر افزایش قابل توجهی داشت، به طوری که تفاوت میزان تکثیر در این گروه، بین فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، از سطح آماری معنی‌داری برخوردار شد.

نتایج به دست آمده از بررسی ارتشاح لنفوسیت‌های  $CD8^+$  T به بافت‌های توموری پستان در مطالعه انجام شده توسط محمود و همکاران نشان داده است که این لنفوسیت‌ها بدون تغییر در تعداد کل در خون محیطی، به بافت‌های توموری مهاجرت می‌کنند و تعداد این سلول‌ها در نواحی توموری افزایش می‌یابد.<sup>۲۴</sup> این در حالی است که در این مطالعه، تعداد سلول‌های  $CD8^+$  T اجرائی، طی هم‌کشتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با سلول‌های توموری پستان و حضور در ریز محیط توموری در شرایط آزمایشگاهی تغییر مشخصی را نشان نداد و افزایش در تعداد نسبی این سلول‌ها، تنها به میزان اندک در هر دو گروه سالم و مبتلا به PCOS مشاهده شد. در مطالعات گذشته در رابطه با بررسی وضعیت سیستم ایمنی افراد مبتلا به این سندرم گزارش شده است که تعداد سلول‌های  $CD8^+$  T در خون محیطی بانوان مبتلا به PCOS کمتر از افراد طبیعی است،<sup>۷</sup> اما یافته‌های حاصل از آزمون فلوسایتومتری و بررسی نمونه‌های اخذ شده در این مطالعه، این یافته را تأیید نکرد و تعداد این سلول‌ها در خون محیطی بانوان مبتلا و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. البته عدم دست‌یابی به برخی نتایج حاصل از مطالعات پیشین در این مطالعه، ممکن است بر اثر محدود بودن تعداد نمونه‌های مورد بررسی در آزمون فلوسایتومتری باشد.

با توجه به وجود یک زمینه‌ی التهابی خفیف و مزمن در مبتلایان به PCOS، بالا بودن پاسخ تکثیری ابتدایی PBMCs این بانوان در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و سپس کاهش پاسخ‌گویی این سلول‌ها به تحریکات آنتی‌ژنیک سلول‌های توموری می‌تواند نشانگر کاهش آستانه‌ی تحریک

## References

- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *AM J Obstet Gynecol* 1935; 29: 181-9.
- Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 12.
- Frank S. Polycystic ovary syndrome. *New Engl J Med* 1995; 333: 853-61.
- Azziz R, Woods K.S, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2745-9.
- Howell A, Sims AH, Ong KR, Harvie MN, Evans DG, Clarke RB. Mechanisms of disease prediction and prevention of breast cancer cellular and molecular interactions. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 635-46.
- Ramezani Tehrani F, Simbar M, Tohidi M, Hosseinpahan F, Azizi F. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of Iranian population: Iranian PCOS prevalence study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011; 9: 39.

7. Turi A, Prospero F, Mazzarini A, Costa M, Cignitti M, Garzetti GG, et al. Lymphocytes subset in hyperandrogenic women with polycystic ovarian disease. *Acta Euro Fertil* 1988; 19: 155-7.
8. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JJ, Villuendas G, Sancho J, San Millan JL. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovarian syndrome: Relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 806-11.
9. Lahita RG. Gender disparity in systemic lupus erythematosus, thoughts after the 8th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, Shanghai, China. *J Clin Rheumatol* 2008; 14: 185-7.
10. Deligeoroglou E, Vrachnis N, Athanasopoulos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Iliodromiti S, et al. Mediators of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 974.
11. Sun L, Hu W, Liu Q, Hao Q, Sun B, Zhang Q, et al. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients. *J Proteome Res* 2012; 11: 2937.
12. Xiong YL, Liang XY, Yang X, Li Y, Wei LN. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 159: 148.
13. Repaci A, Gambineri A, Pasquali R. The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 35: 30.
14. Sathyapalan T, Atkin SL. Mediators of inflammation in polycystic ovary syndrome in relation to adiposity. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 758656.
15. Dumesic D, Lobo G. Cancer risk and PCOS. *Steroids* 2013; 78: 782-5.
16. Barry J, Azizia M, Hardiman P. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2014; 20: 748-58.
17. Kim J, Mersereau JE, Khankari N, Bradshaw PT, McCullough LE, Cleveland R, et al. Polycystic ovarian syndrome (PCOS), related symptoms/sequelae, and breast cancer risk in a population-based case-control study. *Cancer Causes and Control* 2016; 27: 403-14.
18. GLOBOCAN. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World Health Organization. IARC.
19. Jasienska G, Thune I. Lifestyle, hormones and risk of breast cancer. *Br Med J* 2001; 322: 586-7.
20. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G, Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 606-16.
21. Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, et al. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1406-15.
22. Ballard Barbash R, Friedenreich C, Slattery M, Thune I. Obesity and body composition. *Cancer epidemiology and prevention*, 3rd Ed. New York, NY: Oxford University Press, 2006.
23. Newman G, Gonzalez-Perez RR. Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 570-82.
24. Mahmoud S, Paish E C, Powe D, Macmillan D, Grainger M, Lee A, et al. Tumor-infiltrating cd8 lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin oncol* 2011; 29: 1949-55.
25. Mobeen H, Afzal N, Kashif M. Polycystic ovary syndrome may be an autoimmune disorder. *Scientifica (Cairo)* 2016; 2016: 4071735.



Original Article

# The Study of Peripheral Blood Mononuclear Cells Activity of Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by co-culture with Breast Cancer Cell Lines Compared with the Healthy Controls

Rezayat F<sup>1</sup>, Hajiaghahi M<sup>1</sup>, Mosaffa N<sup>1</sup>, Ramezani Tehrani F<sup>2</sup>, Mesdaghi M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Faculty of Medicine, & <sup>2</sup>Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: ramezani@endocrine.ac.ir

Received: 02/02/2016 Accepted: 01/06/2016

## Abstract

**Introduction:** Polycystic ovary Syndrome (PCOS) is one of the most prevalent endocrinology disorders in women, in whom the state of systemic inflammatory cytokines, especially TNF- $\alpha$  is the main reason for immunological disturbances. Some PCOS manifestations such as infertility, hyperandrogenism, obesity and chronic inflammation are considered as risk factors for breast cancer. The risk of developing breast cancer in women with PCOS is being investigated in some epidemiological studies. In this research, the ability of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of women with PCOS to develop antitumor response was studied and evaluated using an experimental co-culture approach between PBMCs and breast tumor cell lines. **Materials and Methods:** PBMCs were isolated from 50 heparinized venous blood samples (patient and healthy groups) by density gradient centrifugation by ficoll. Breast cancer cell lines (MDA-MB-468 and MCF-7) were incubated as two target cells and were cultured adjacent to PBMCs in a transwell co-culture system. At different time intervals (48 and 72 hours) after co-culture, the proliferation rate of the effectors cells was evaluated by the BrdU cell proliferation assay. Determination of T CD3+CD8+ lymphocytes was determined by flow cytometry. **Results:** The proliferation of PBMCs after 48 hours of co-culture with MDA-468 (P=0.002) and MCF-7 (P=0.021) was significantly higher in the PCOS group compared to healthy controls. No pronounced differences were observed in T CD3+CD8+ cell numbers between the PCOS group and healthy controls (P>0.05) although T CD3+CD8+ percentage increased after 72 hours of co-culture in most samples. There was no statistically significant difference between MDA-468 and MCF-7 co-cultures in any of the tests. **Conclusion:** The stimulation threshold for mononuclear cells was reduced in women with PCOS. Differences between proliferation responses of PCOS and control groups may be caused by a chronic inflammatory condition in these patients.

**Keywords:** Polycystic ovarian syndrome, Breast cancer, co-culture, CD3+CD8+, BrdU