مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی هجدهم، شماره‌ی ۳، صفحه‌های ۱۹۶ ـ ۱۸۷ (مرداد ـ شهریور ۱۳۹۵)

مقاله‌ی پژوهشی

بررسی تکثیر، تولید سیتوکاین و بیان مارکر CD8 در لنفوسیت‌های خون محیطی بانوان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مجاورت و هم‌کشتی سلول‌های لاین توموری تخمدان A2780 و SKOV3

مهری حاجی آقایی[۱]، فاطمه رضایت[۱]، نازنین قاسمی[۱]، مهرناز مصداقی[۱]، امین سلیمانیان[۲]، دکتر نریمان مصفا[۳]، دکتر فهیمه رمضانی تهرانی[۳]

۱) گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۲) دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ۳) مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولید مثل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول**: مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولید مثل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دکتر نریمان مصفا؛ e-mail: yasamaryan@gmail.com

چکیده

مقدمه: سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به عنوان یک وضعیت پیش التهابی شناخته می‌شود که پیشرفت انحراف متابولیک و اختلال عملکرد تخمدان را در این بیماری پشتیبانی می‌کند. التهاب مزمن و سطوح افزایش یافته‌ی آندروژن‌ها در این بیماران و تاثیر آن بر سیستم ایمنی، امکان ایجاد شرایطی برای اختلال در فعالیت ضد توموری و در نتیجه بروز بدخیمی‌ها، از جمله سرطان تخمدان، را فراهم می‌آورد. مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مربوط به پنجاه نمونه‌ی بیمار و سالم به روش گرادیان غلظتی تخلیص شدند. در مدل هم‌کشتی، سل لاین‌های توموری تخمدان SKOV3 و A2780 در مجاورت با سلول‌های تک هسته‌ای به کمک سیستم ترانس ول، در دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، تکثیر سلولی لنفوسیت‌ها، غلظت سایتوکاین TNF-α و درصد لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک مورد سنجش قرار گرفتند. یافته‌ها: پاسخ تکثیری سلول‌های اجرایی در طی تحریک با سل لاین‌های توموری، با وجود کمتر بودن میانگین در گروه سالم، از لحاظ آماری تنها اختلاف معنی‌داری را در زمان ۷۲ ساعت نسبت به زمان ۴۸ ساعت در هر دو گروه نشان داد (P<۰/۰۱). ترشح TNF-α، طی هم‌کشتی با سل لاین A2780 در گروه مبتلایان و زمان ۴۸ ساعت، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت (P<۰/۰۵). نتیجه‌گیری: وجود التهاب مزمن در بیماران PCOS، افزایش پاسخ تکثیری سلول‌های اجرایی و نیز سطح ترشحی TNF-α، نسبت به گروه سالم، را مورد تایید قرار می‌دهد. با این وجود، افزایش احتمال ابتلا به بدخیمی‌ها در بیماران مبتلا به PCOS، نیازمند بررسی پاسخ‌های ضد توموری با حجم نمونه وسیع‌تری است.

واژگان کلیدی: سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، التهاب مزمن، سرطان تخمدان، سلول‌های لاین توموری تخمدان، A2780، SKOV3، هم کشتی.

دریافت مقاله: ۹۵/۱/۲۴ـ دریافت اصلاحیه: ۹۵/۳/۵ ـ پذیرش مقاله:۹۵/۳/۱۲

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) نوعی بیماری غددی است که شیوع آن در کشور ایران طبق تعریف AES[i]،[۱] ۱۱/۱ درصد و مبتنی بر تعریف رتردام[ii]،[۲] ۱۴/۶ درصد در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است.[۳] در بانوان مبتلا به PCOS، شیوع بیشتری از ابتلا به چاقی و در نتیجه خطر بالاتری از بیماری‌های سندروم متابولیک، وجود دارد.[۴،۵] در حال حاضر، بیماری PCOS به عنوان یک وضعیت پیش التهابی شناخته می‌شود و نتایج تحقیقات جدید، درجات پایینی از التهاب مزمن، پیشرفت انحراف متابولیک و اختلال عملکرد تخمدان را در این بیماری پشتیبانی می‌کند.[۶،۷]

روند التهاب مزمن با افزایش کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های پیش التهابی، از جمله IL-18، MCP-1[iii] و

i -The Androgen Excess Society
ii- The Rotterdam Consensus
iii-Monocyte chemoattractant protein-1

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

MIP-1[i]، همراه است که بیماری PCOS با افزایش هر یک از از این عوامل در ارتباط است.[۸-۱۰] بنا به دلایل فوق، مبتلایان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، دچار نوعی آشفتگی منتج به وقوع التهاب در سیستم ایمنی هستند و دور از ذهن نیست که شرایط فوق موجب استعداد آنان به انواع اختلالات سیستم ایمنی، نظر وقوع تومور شود.[۶]

نقش التهاب در ایجاد و توسعه‌ی تومور، برای اولین بار در سال ۱۸۶۳ توسط ویرچو[ii] ارائه شد.[۱۱-۱۳] التهاب، به یک عامل خطر جهت ایجاد سرطان، از طریق ارائه‌ی مولکول‌های بیواکتیو از سلول‌های نفوذ یافته به محیط تومور منجر به (۱) حفظ پایدار سرعت تکثیر، (۲) سیگنال‌های بقای سلول، (۳) تولید فاکتورهای پیش آنژیوژنیک و آنزیم‌های اصلاح ماتریکس خارج سلولی و (۴) تسهیل سایر فرآیندهای کارسینوژن، از جمله بی‌ثباتی ژنوم و فرار سیستم ایمنی، می‌شود.[۱۳،۱۴]

سرطان تخمدان، چهارمین عامل بدخیمی‌های کشنده در کشورهای توسعه یافته است[۱۵] و در مورد افزایش بروز آن در بانوان مبتلا به PCOS تحقیقات بسیاری انجام شده است.[۱۶،۱۷] بیشتر محققان به مقاله‌ای استناد می‌کنند که خطر ابتلا به سرطان تخمدان را در بین این بانوان، ۲/۵ برابر جمعیت عمومی گزارش کرده است.[۱۸] این سرطان از جمله تومورهای ایمونوژنیک است، ولی با استفاده از مسیرهای مهارکننده متنوع، از حذف توسط سیستم ایمنی می‌گریزد.[۱۹] علی‌رغم شناسایی روش‌های درمانی جدید در سرطان تخمدان، اکثریت بیماران پس از درمان اولیه، دچار عود مجدد می‌شوند که به علت تشخیص دیرهنگام، در زمانی است که بدخیمی پیشرفت کرده است.[۲۰-۲۴] در میان عوامل خطر متعدد ابتلا به سرطان تخمدان، PCOS به عنوان یک عامل مشکوک در افزایش خطر ابتلا مطرح است.[۲۵-۲۷]

یکی از راه‌های بررسی و مطالعه‌ی وضعیت ایمنی بانوان دچار PCOS در حساسیت به بروز بدخیمی‌ها، بررسی فعالیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی[iii] در مواجهه با ریز محیط توموری است. از آنجایی که، این سلول‌ها به عنوان اصلی‌ترین سلول‌های ایمنی ترشح‌کننده سایتوکاین در شرایط کشت آزمایشگاهی مطرح هستند، مجاورت آن‌ها با سلول‌های سرطانی، در یک سیستم هم کشتی فعال می‌تواند رخدادهایی که در شرایط درون تنی امکان وقوع می‌یابد را در ارزیابی فعالیت ضد توموری به نمایش بگذارد.[۲۸-۳۰]

مواد و روش‌ها

گروه‌های تحت بررسی

بیست و پنج نفر از بانوان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک که واجد پرونده‌ی ثبت شده در مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولیدمثل پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم و معیارهای استاندارد ورود به مطالعه به لحاظ شاخص‌های بالینی و آزمایشگاهی بودند، دراین مطالعه شرکت کردند. گروه سالم شامل بانوانی با محدوده‌ی سنی هماهنگ با گروه بیمار بود. معیارهای خروج از مطالعه، شامل سابقه‌ی ابتلابه انواع سرطان‌ها، نقایص ایمنی به دلیل دریافت داروهای سرکوب‌گر ایمنی و یا ابتلا به بیماری‌های عفونی و سیستمیک بود. افراد با سابقه‌ی ابتلا به سرطان در خانواده و هم‌چنین یائسگی زودهنگام و اعتیاد نیز از مطالعه حذف شدند. رعایت اصول اخلاقی پژوهش با کسب رضایت کتبی از داوطلبین امکان‌پذیر شد. هم‌چنین این پژوهش در کمیته‌ی اخلاق پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم با کد کمیته اخلاق ۶ECRIES -۹۳/۱۱/۲۶ و شماره طرح ۷۴۰ مورد تصویب قرار گرفت.

نمونه‌گیری

ده میلی‌لیتر خون وریدی توسط سرنگ حاوی صد واحد هپارین، از دو گروه بیست و پنج نفری، شامل بانوان مبتلا به PCOS و گروه سالم، اخذ شد. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه کشت سلولی انتقال یافتند.

کشت سلول‌های لاین توموری

سلول‌های لاین توموری A2780 و SKOV3 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها مطابق با دستورالعمل کشت انستیتو پاستور در محیط RPMI (Gibco, Invitrogen, USA) کامل شده با سرم جنینی گاوی (FBS) ۱۰ درصد (Gibco) و صد واحد بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (ATOCEL-AUSTRIA) در انکوباتور مخصوص با جریان عبور پنج درصد CO_2، رطوبت ۹۰ درصد و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رشد و تکثیر در فاز لگاریتمی، پاساژ و به مقدار کافی در انجماد ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

i-Macrophage inflammatory protein-1
ii-Rudolf Virchow
iii-Peripheral blood mononuclear cell

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

نمونه‌های خون هردو گروه تحت بررسی، توسط محیط کشت به نسبت یک به یک رقیق شدند. سپس به کمک گرادیان غلظتی با استفاده از فایکول ۱۰۷۷ (Sigma, USA) لایه‌گذاری شدند و در درجه حرارت محیط در دور g× ۴۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس فاز لایه بین فایکول و پلاسمای حاوی سلول‌های تک هسته‌ای به کمک پیپت پاستور استریل جدا شد و در محیط کشت سلول کامل (CTM^i) تعلیق شد. از از ته نشین سلولی، سوسپانسیون سلولی تهیه شد و توسط رنگ تریپان بلو شمارش سلولی و میزان حیات تعیین شد و غنی‌سازی صورت گرفت. لازم به ذکر است، کلیه مراحل فوق در زیر هود لامینار مخصوص کشت سلول انجام شد.

سیستم هم کشتی سلولی

به منظور کشت هم‌زمان سل لاین سرطانی و سلول‌های تک هسته‌ای خون، از پلیت‌های کشت ۲۴ خانه ترانس ول (SPL, Korea) با قطر منفذ چهار دهم میکرومتر استفاده شد. یک روز قبل از انجام هم کشتی، سلول‌های لاین A2780 و SKOV3، در هر چاهک، به تعداد ۵۰۰۰۰۰ کشت داده شدند و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به منظور چسبیدن سلول‌ها به بستر کشت انکوباسیون شدند. سپس سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شده از نمونه‌های خون افراد سالم و بیمار، شمارش شدند و تعداد ۲۰۰۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر برای هر چاهک از پلیت بیست و چهار خانه‌ای محاسبه شدند و در محفظه فوقانی پلیت (داخل ترانس ول) قرار داده شدند. نسبت سلول‌های اجرایی و هدف ۱ به ۴ در نظر گرفته شد. انکوباسیون تا مدت ۷۲ ساعت تحت دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 ادامه یافت. برای کنترل منفی آزمون، سلول‌های PBMC هر نمونه در چاهک‌ها در عدم حضور سلول توموری کشت داده شدند. از مایع رویی کشت سلول‌ها و نیز تک هسته‌ای‌های مستقر در محفظه ترانس ول ها به شکل جداگانه در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم کشتی نمونه‌برداری انجام شد.

بررسی پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای

میزان تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای، طی هم کشتی با سل لاین‌های توموری A2780 و SKOV3 و هم‌چنین بدون حضور سل لاین توموری به عنوان کنترل، در دو بازه ۴۸ و ۷۲ ساعت، توسط تست تکثیری BrdU (colorimetric), Roche) BrdU Diagnostic, REF:11647229001 Germany) ارزیابی شد. BrdU نوعی آنالوگ تیمیدین است و نشانگر متداولی جهت ارزیابی تکثیر سلولی و تشخیص وضعیت حیات سلولی است. این ماده می‌تواند به DNA در فاز سنتز از سیکل سلولی متصل شود و در نتیجه به عنوان یک مارکر برای تکثیر استفاده شود. بعد از اتصال BrdU به عنوان مارکر سلولی با روش Enzyme-LinkedAnti-BrduAntibodies، میزان تکثیر سلولی با خوانش دانسیته اوپتیک در دو طول موج رفرانس (۶۳۰ نانومتر) و طول موج سنجش (۴۵۰ نانومتر) با کمک دستگاه خواننده الایزا محاسبه شد.

بررسی غلظت سایتوکاین TNF-α

سایتوکاین TNF-α در مایع رویی حاصل از هم کشتی سلول‌های PBMC با سل لاین‌های توموری و کنترل بدون سل لاین توموری با تکنیک الایزای ساندویچ توسط کیت سنجش غلظت TNF-α انسانی Quantikine (R&D Systems, USA)، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده مورد سنجش قرار گرفت. نمونه‌ها به صورت دوبار تکرار سنجش شدند و میانگین جذب هر نمونه محاسبه شد و به کمک رسم منحنی استاندارد، غلظت این سایتوکاین به صورت پیکوگرم بر دسی‌لیتر گزارش شد.

ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های تک هسته‌ای:

درصد کل سلول‌های تک هسته‌ای و هم‌چنین درصد سلول‌های لنفوسیت T $CD_3^+CD_8^+$ (سایتوتوکسیک) در دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibur، به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه حاوی آنتی‌بادی متصل به PE بر ضد شاخص سطح سلولی انسانی CD_8و آنتی‌بادی متصل به FITC بر ضد شاخص سطح سلولی انسانی CD_3 (BD Biosciences, Cat No:340044) ارزیابی شد.

تحلیل آماری

تحلیل نتایج و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام گرفت. به منظور مقایسه‌ی بین میانگین‌ها، در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-wayANOVA) 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

i-Complete Tissue Medium

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

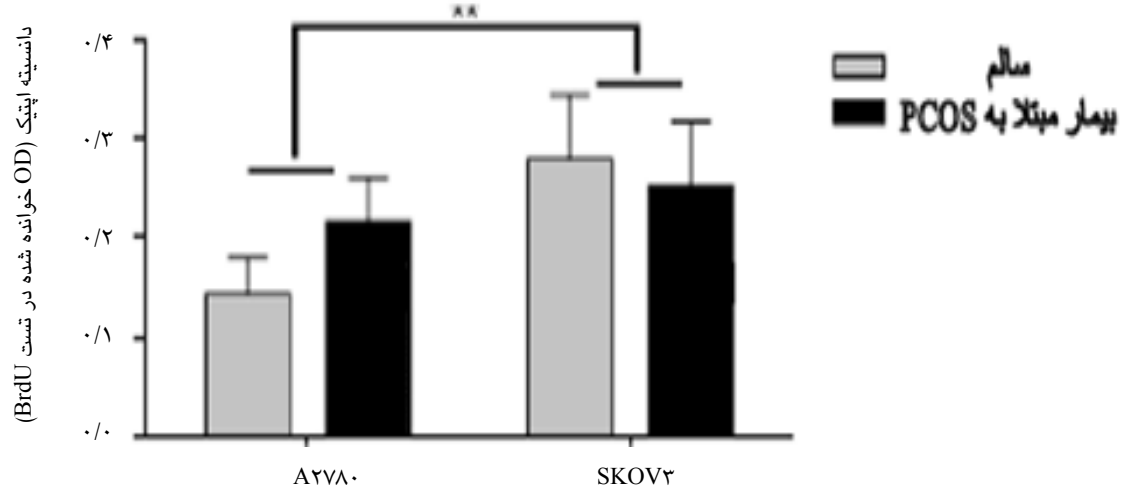
(Mann-Whiteny)، استفاده شد. نتایج به صورت میانگین±خطای معیار از میانگین (means±SEM) گزارش شده‌اند.

یافته‌ها

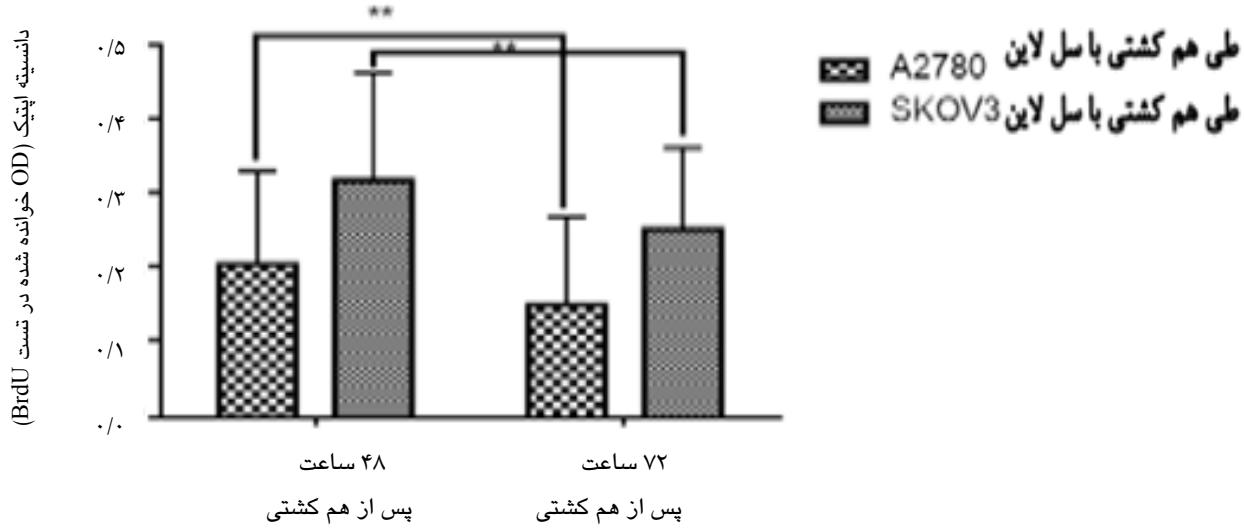
نتایج حاصل از بررسی تکثیر لنفوسیت ها در شرایط هم کشتی

تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای در مجاورت هر یک از لاین‌های سلولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱)، به طوری که، میانگین تکثیر لنفوسیتی برای سل لاین SKOV3 بیشتر از A2789 بود (نمودار ۱-A). با وجود بالاتر بودن میانگین میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه PCOS نسبت به گروه سالم، این مقدار از نظر آماری معنی‌دار نبود. هم‌چنین، اثر متغیر زمان معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۲)، به طوری که میانگین تکثیر لنفوسیتی در زمان ۷۲ ساعت در هر دو سل لاین برای هر دو گروه کمتر از زمان ۴۸ ساعت بود. لازم به ذکر است، دانسیته اوپتیک خوانده شده براساس میزان تکثیر اندازه‌گیری شده برای کنترل کشت از دانسیته اپتیک هم کشتی‌ها، به عنوان base line کسر شد و سپس داده‌های به دست آمده بین دو گروه سالم و مبتلا مورد مقایسه قرار گرفت (نمودار ۱-B).

A:



B:



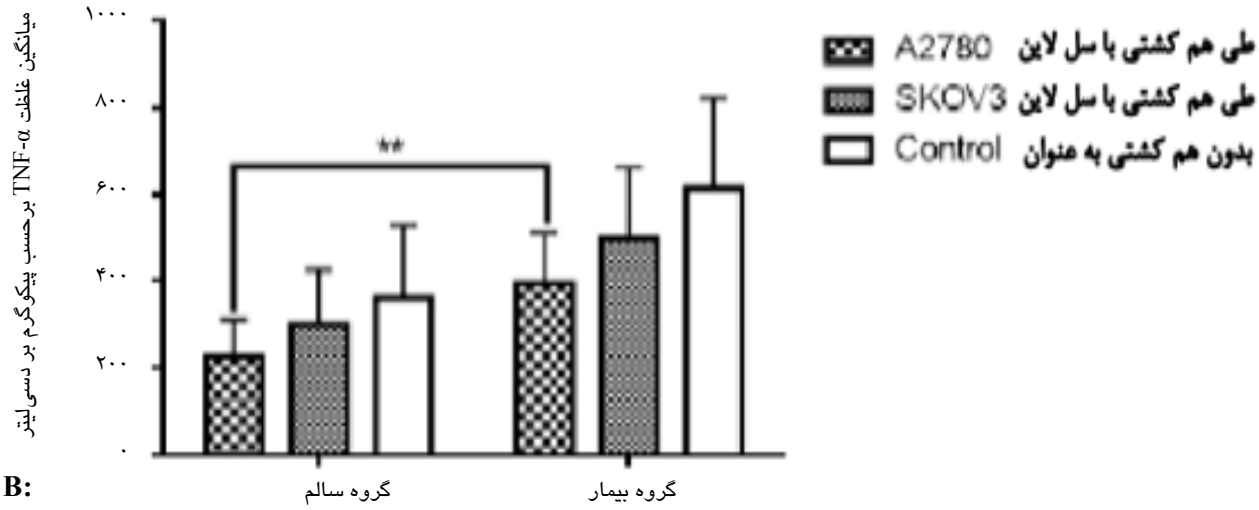
نمودار ۱- مقایسه‌ی میانگین تکثیر لنفوسیت‌ها در شرایط هم کشتی. A: مقایسه‌ی میانگین تکثیر لنفوسیتی، طی هم کشتی با هر دو رده‌ی سلولی A2780 و SKOV3. B: مقایسه‌ی میانگین تکثیر سلولی در دو بازه زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت طی هم کشتی با هر دو نوع سل لاین. دانسیته اپتیک خوانده شده براساس میزان تکثیر اندازه‌گیری شده برای کنترل کشت از دانسیته اوپتیک هم کشتی‌ها، به عنوان baseline کسر شد و سپس داده‌های به دست آمده بین دو گروه سالم و مبتلا مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین±خطای معیار از میانگین (means±SEM) گزارش شده‌اند.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

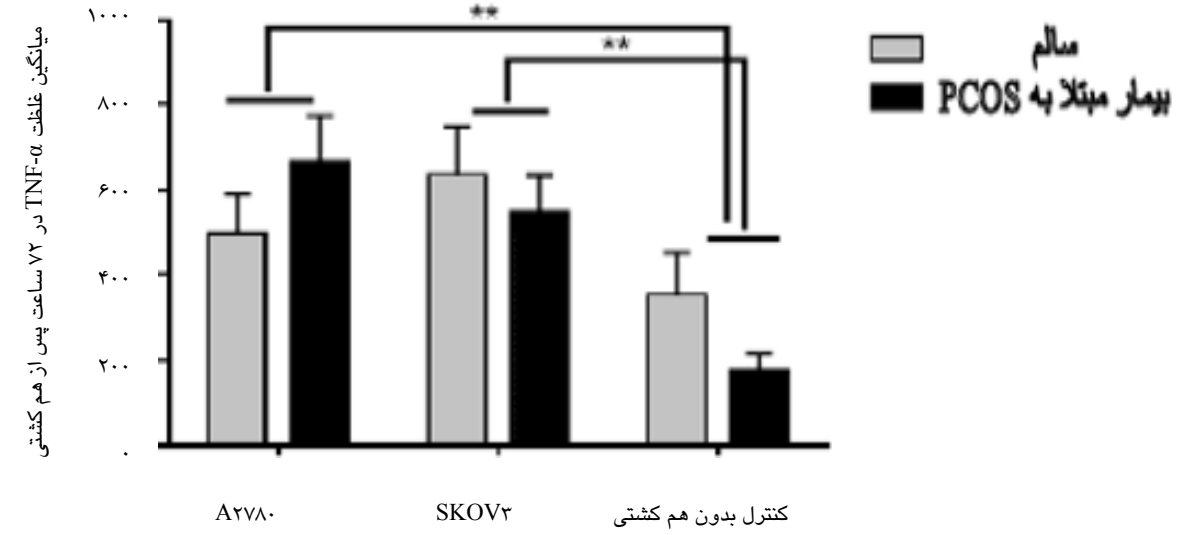
نتایج حاصل از سنجش غلظت TNF-α سوپرناتانت در شرایط هم کشتی

نمودار A-۲، با مقایسه‌ی وضعیت کلی میانگین غلظت TNF-α در دو گروه سالم و بیمار، اثر متغیر نوع نمونه را تنها برای هم کشتی با سل لاین A2780، معنی‌دار بیان می‌کند (P<۰/۰۳). به طوری که میانگین غلظت TNF-α در بیماران PCOS، پس از هم کشتی با سل لاین A2780، بالاتر از گروه سالم در مجاورت این سل لاین بود. هم‌چنین، با مقایسه‌ی میانگین غلظت TNF-α در نمودار B-۲، بین هر یک از سل لاین‌های توموری با کنترل بدون سل لاین، در هر دو گروه سالم و بیمار، پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت هم کشتی، مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین میانگین غلظت TNF-α ترشح طی هم کشتی ۷۲ ساعته‌ی (شامل گروه سالم و بیمار) هر یک از سل لاین‌های توموری A2780 و SKOV3 با کنترل بدون سل لاین وجود دارد (P<۰/۰۰۱) و این مقدار در هر دو سل لاین بالاتر از کنترل بود. از طرف دیگر، اثر متغیر زمان تنها برای هم کشتی لنفوسیت‌ها با سل لاین توموری A2780 معنی‌دار بود (P<۰/۰۴)، به طوری که میانگین غلظت TNF-α در زمان ۷۲ ساعت پس از هم کشتی در سل لاین A2780 برای هر دو گروه به طور معنی‌داری کمتر از زمان ۴۸ ساعت بود (نمودار C-۲).

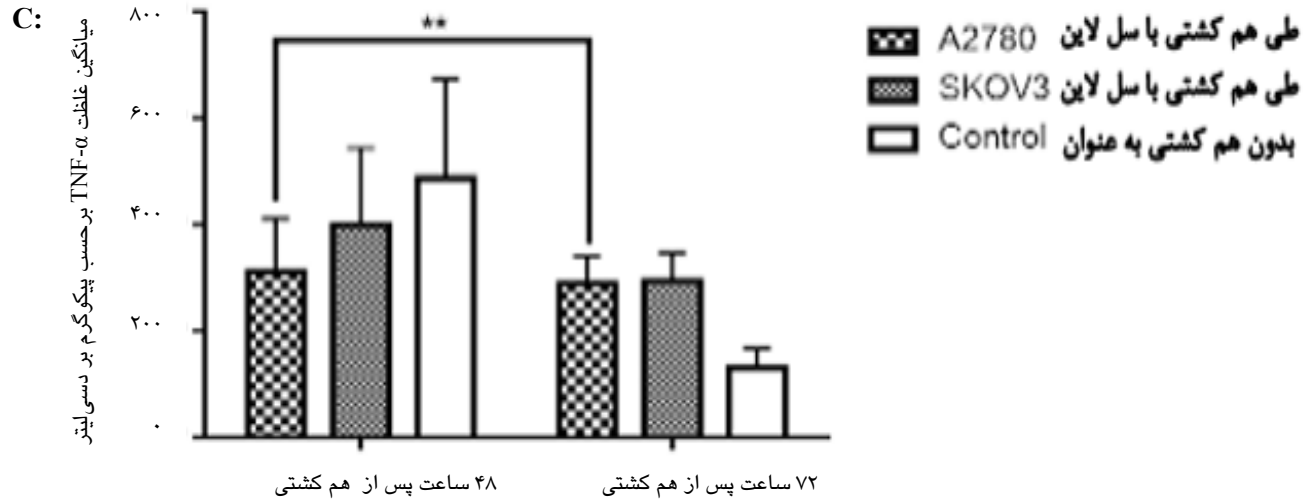
A:



B:



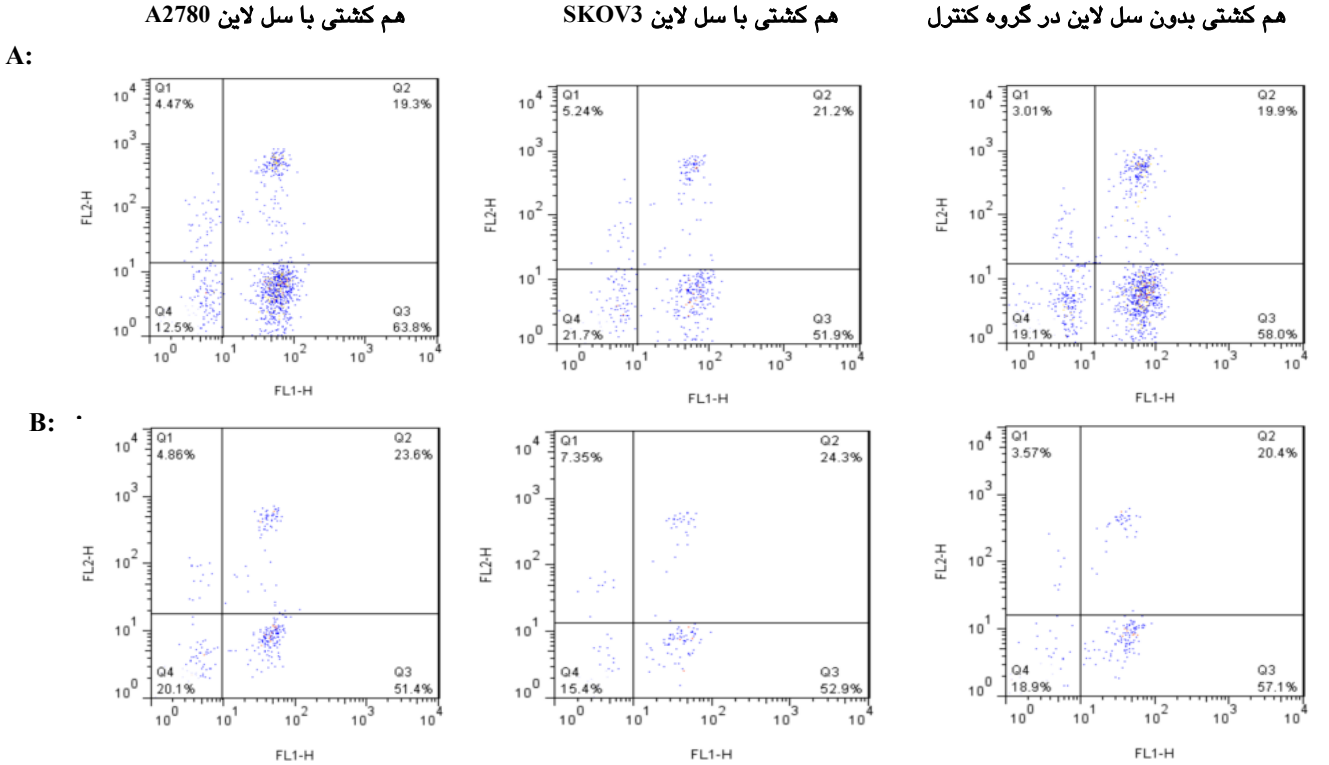
[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



نمودار ۲- مقایسه‌ی میانگین غلظت TNF-α سوپرناتانت در شرایط هم کشتی.A: مقایسه‌ی میانگین غلظت TNF alpha در دو گروه سالم و بیمار پس از هم کشتی با هر دو نوع سل لاین و کنترل. B: مقایسه‌ی میانگین غلظت TNFalpha در بین هر دو سل لاین با کنترل طی ۷۲ ساعت هم کشتی در دو گروه سالم و بیمار. C: مقایسه‌ی میانگین غلظت TNFalpha در دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت طی هم کشتی با هر دو نوع سل لاین. نتایج به صورت میانگین±خطای معیار از میانگین (means±SEM) گزارش شده‌اند.

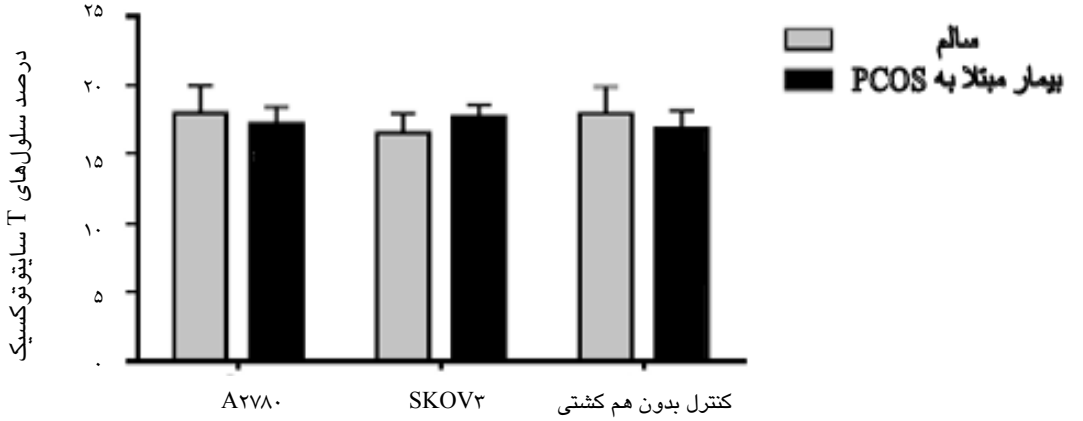
بیان مارکرهای CD_3 و CD_8 در سطح سلول‌های تک هسته‌ای تحت کشت

تعیین بیان مارکرهای CD_3 و CD_8، به منظور شناخت میزان درصد این جمعیت سلولی و بررسی وضعیت تحریک، در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم کشتی، مورد ردیابی توسط آنتی‌بادی‌های کونژوگه با رنگ‌های فلورسانس قرار گرفت. دیاگرام‌های فلوسایتومتری مربوط به بررسی درصد لنفوسیت‌های $TCD_3^+CD_8^+$، در کشت ۴۸ و ۷۲ ساعته در گروه بیمار در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در نمودار ۳ نیز مشاهده می‌شود، با مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های سایتوتوکسیک، بین دو گروه سالم و بیمار، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری گزارش نشد.



شکل۱- دیاگرام‌های فلوسایتومتری مربوط به بررسی درصد لنفوسیت‌های T CD3+ CD8+ در کشت. A: ۴۸ ساعته در فرد بیمار B: ۷۲ ساعته در فرد بیمار

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



نمودار ۳- مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های سایتوتوکسیک T CD3+ CD8+ در دو گروه سالم و بیمار پس از هم کشتی با هر دو نوع سل لاین و کنترل. درصد این سلول‌های سایتوتوکسیک در دو گروه سالم و بیمار از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

بحث

ایجاد یک تومور بالینی نیاز به پشتیبانی استرومای طبیعی محدوده‌ی تومور دارد که به عنوان ریزمحیط تومور شناخته می‌شود. سلول‌های التهابی و مدیاتورهای تنظیمی ایمنی مقیم در ریز محیط تومور، پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان را به سمت فنوتیپ اختصاصی در جهت توسعه تومور پیش می‌برند.[۳۱] بنابراین، ریزمحیط تومور، بازیگر مهمی در پیشرفت بدخیمی‌های تخمدان است و تومورهای تخمدان واجد فعال‌ترین و قوی‌ترین ریز محیط مولکولی هستند.[۳۲]

پاسخ ایمنی علیه کارسینومای تخمدان تحت تاثیر عوامل متعددی است که بر مقاومت ایمونولوژیک تاثیر گذاشته و در پیشرفت تومور اهمیت دارند. در واقع، تومورهای تخمدان، از جمله بدخیمی‌هایی هستند که به دلیل حضور فاکتورهای التهابی در ریز محیط تهاجمی تومور، می‌توانند سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند و در عین ایمونولوژیک بودن، پاسخ‌های ایمنی را دچار تحول کنند.[۳۳] از طرفی، شرایط خاص در مبتلایان به تومور، نظیر روش زندگی و تغذیه، که از پیش حاضر هستند نیز می‌توانند اثرات بسیار متفاوتی را در افراد مختلف اعمال کنند و مسیر پروفایلی رشد تومور را متحول سازند.[۱۲]

دو طیف از مکانیسم‌های فرار تومور براساس ویژگی‌های سلولی و مولکولی ریز محیط تومورهای مهاجم، هم‌چون تومور تخمدان، موجود است که در زیر به آن اشاره می‌شود.

۱. تولید T cell inflamed phenotype که در آن T سل‌هایی با فنوتیپ التهابی ارتشاح یافته در اطراف تومور تشکیل می‌شود و شامل پروفایل وسیع کموکاینی و اینترفرون تایپ I (که نشانی از دفاع ذاتی است) است. این تومورها مقاوم به حمله سایتوتوکسیک هستند و از طریق Dominant Effects Of Immune System Suppression Pathway عمل می‌کنند. در واقع زیر جمعیتی از سلول‌های T با عملکرد ذاتی و سرکوب‌کننده هستند که احیانا از نوع سلول‌های NKT و یا سلول‌های Tδγ هستند.

۲. آن دسته از افرادی که فاقد سلول‌های T التهابی ارتشاح یافته است و سیستم ایمنی را وادار به نادیده گرفتن تومور می‌کند و در واقع، به حمله سیستم ایمنی مقاوم هستند.[۳۳]

بنابراین، کاراکتریزاسیون ریز محیط تومور (سازمان بندی و تشکیل ریز محیط تومور) در مبتلایان به بدخیمی، مدرکی را برای فنوتیپ‌های متفاوت ایمونولوژیک، بر اساس حضور یا عدم حضور التهاب به واسطه سلول‌های T آشکار می‌کند.[۳۴،۳۵]

موضوع دیگر، وجود گوناگونی وسیع در انواع لاین‌های توموری و نیز بدخیمی‌های تخمدان در بیماران مبتلا است که این هتروژنسیتی به هیچ‌یک از موارد درجه‌ی بیماری و پاسخ به درمان مربوط نیست.[۳۳] تومورهای تخمدان بسیار مهاجم و کشنده هستند و در افراد مختلف، با توجه به زمینه‌های مختلف و روش زندگی، متفاوت هستند که اهمیت وجود علل زمینه‌ای، هم‌چون بیماری PCOS، را نشان می‌دهد. شرایط

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

التهابی سیستمیک در بیماران مبتلا به PCOS به عنوان یک الگوی زمینه‌ساز تومور در بسیاری از بررسی‌ها ثابت شده است که نقش سیستم ایمنی در طی مراحل بدخیمی تومور، سبب تغییرات بسیاری در تهاجم، گسترش و متاستاز سلول‌های توموری می‌شود.[۳۵] از جهت دیگر، خصوصیات تهاجمی سلول‌های توموری تخمدان و ماهیت التهابی این سلول‌ها[۳۶] در تولید IL-1، IL-6 و TNF-α موجب ایجاد تغییرات بسیاری در میزبان می‌شود که نشان‌دهنده‌ی تقابل فعال بین تومور و میزبان است.

لاین‌های توموری SKOV3 و A2780، به لحاظ تفاوت در بسیاری از زمینه‌های تهاجمی، مورد استفاده بسیاری در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، از جمله در تحقیق پیش رو، قرار می‌گیرند.[۳۶-۳۹] SKOV3 و A2780 جفت سلول‌های نامتشابه هستند که از اصلی‌ترین کارسینوماهای اپی‌تلیالی تخمدان هستند. یکی از عوامل مهم در تفکیک لاین‌های توموری، حضور MUC-۱۶ / CA-۱۲۵ است. MUC-۱۶ مسئول سرکوب سیستم ایمنی، اندومتریوز و فاکتور تولرانس بارداری است.[۳۶،۴۰] شدت بیان این مارکر در دو سل لاین مورد بحث، متفاوت است، به طوری که در SKOV3 با شدت بالاتری بیان می‌شود و این سل لاین فرم جدی‌تری از بیماری است.[۴۱،۴۲]

مطالعه‌ای بر روی سلول لاین توموری تخمدان SKOV3 نشان داد که FSH/LH، تولید پروستاگلاندین E۲ را از طریق افزایش سیکلواکسیژنازهای ۱ و ۲ و تهاجم سلولی افزایش می‌دهد. به علاوه، مشخص شده است که گیرنده‌های FSH و LH به شکل طبیعی بر روی سلول‌های اپی‌تلیال سطحی تخمدان و ۶۰ درصد از سلول‌های سرطانی بدخیم تخمدان حضور دارند. فولیکول‌های تکامل یافته، حاوی سطح بالایی از آندروژن‌ها هستند که ریز محیطی غنی از آندروژن‌ها را در اطراف سلول‌های اپی‌تلیال ایجاد می‌کنند.[۴۳] بنابراین، این موضوع دلیل دیگری در افزایش احتمال خطر ابتلا به سرطان اپی تلیال تخمدان در بیماری‌های هایپرآندروژنیک، همچون PCOS، هیرسوتیسم و آکنه، است.

سلول‌های لاین توموری تخمدان محتوی و تولیدکننده سایتوکاین‌های پیش التهابی، همچون IL-1،IL-6 و TNF-α، هستند.[۴۴] نقش بحرانی تولید IL-6، به ویژه در لاین سلولی SKOV3، به صورت اتوکراین موجب رشد تومور می‌شود.[۴۵] ارتباط بسیار قوی بین سطح بالایی از IL-6 و تشخیص ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان دیده شده است.[۴۶] نتایج مطالعاتی نیز نشان دادند که سل لاین سرطانی SKOV3 در مجاورت سلول‌های PBMC، هر یک به تنهایی، مقادیر بالایی از IL-6 را آزاد می‌کنند و تقابل این دو نوع سلول باعث تشدید تولید این سایتوکاین می‌شود.[۳۶،۴۷] به همین جهت، در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد که سطح تولید سایتوکاین TNF-α به عنوان یکی دیگر از سایتوکاین‌های پیش التهابی، در هم کشتی با سل لاین SKOV3، در هر دو گروه بیمار و سالم، بالاتر از هم کشتی با سل لاین A2780 بود که احتمالا به علت تولید این سایتوکاین به شکل اتوکراین توسط سل لاین SKOV3 است. از طرف دیگر، بر طبق گزارشات پیشین انتظار می‌رفت، سطح تولید این سایتوکاین در هم کشتیPBMC های بانوان مبتلا به PCOS با سل لاین SKOV3 به علت تشدید شرایط التهابی از گروه بدون حضور سل لاین توموری بیشتر باشد که در این مطالعه محقق نشد و قابل توجیه و تفسیر نیست.

نتایج این تحقیق نشان داد که وجود یک التهاب مزمن، اما خفیف، در بانوان مبتلا به PCOS و اثری که روی سلول‌های صلاحیت‌دار ایمنی، همچون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌گذارد،[۶،۷] در طی هم‌جواری با سلول‌های توموری تخمدان با فراهم نمودن یک ریز محیط اختصاصی در رشد و پیشرفت تومور بی‌تاثیر نیست، به طوری که براساس یافته‌های ما، میانگین سطح TNF-αدر گروه بیمار بدون هم کشتی با سل لاین توموری در مقایسه با این وضعیت در گروه سالم بالاتر بود و این نشان‌دهنده سطح بالاتری از ترشح سایتوکاین‌های التهابی هم‌چون TNF-αدر بیماران است که با به هم زدن تعادل بین پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی در درون‌ریز محیط تومور می‌تواند به نفع تومور عمل کند. هم‌چنین، وجود تفاوت معنی‌دار در ترشح این سایتوکاین در دو گروه سالم و بیمار طی هم کشتی با سل لاین A2780 در تایید فرضیه این پژوهش است. این موضوع می‌تواند یکی از دلایل شیوع سرطان تخمدان در بانوان مبتلا به PCOS باشد و سوالی در ذهن مطرح کند که آیا تومور تخمدان مبتلایان به PCOS با تومور سایر افراد غیرمبتلا متفاوت است یا خیر؟

از دیدگاهی دیگر مشاهده شد که هم کشتی با سل لاین SKOV3 منجر به افزایش معنی‌دار تحریک تکثیر سلولی، در مقایسه با سل لاین A2780، در هر دو گروه سالم و بیمار، می‌شود. در تفسیر این پدیده می‌توان به نقش خود سل لاین توموری اشاره کرد که حتی منجر به افزایش تحریک تکثیر

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

سلولی در PBMC های افراد سالم می‌شود و این میانگین تکثیر از گروه بیمار نیز بیشتر است که شاید به علت تشدید شرایط التهابی درون‌ریز محیط تومور است که باعث مرگ سلول‌های صلاحیت‌دار ایمنی می‌شود. همان طور که در مقاله‌ای نیز به افزایش فعالیت کموتاکتیک و یا کموکینتیک و در کل افزایش تهاجم سل لاین SKOV3، در هم کشتی با سایتوکاین‌های پیش التهابی اشاره شده است.[۴۷]

با این وجود، افزایش احتمال ابتلا به بدخیمی‌ها در بیماران PCOS، نیازمند اندازه‌گیری سطح سایر سایتوکاین‌های التهابی و نیز سایتوکاین‌های موثر در سرکوب پاسخ‌های سیستم ایمنی، همچون IL-10 و TGF-β، است. هم‌چنین، می‌توان میزان تکثیر و تهاجم سلول‌های لاین توموری تخمدان در مواجهه با سلول‌های تک هسته‌ای مورد سنجش قرار گیرد و نیز مطالعات مولکولی جهت بررسی بیان ژن مارکرهای سرطانی، از جمله C-MYC و HER-۲، انجام پذیرد. جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر، به ارتقای شرایط هم کشتی، تخلیص سلول‌های ایمنی مانند سلول‌های NK و نیز افزایش تعداد نمونه توصیه می‌شود.

سپاسگزاری: بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدردانی نویسندگان این مقاله، تقدیم به کلیه افرادی است که سخاوتمندانه با اهدای نمونه، ما را در انجام این پروژه یاری کردند. لازم به ذکر است، انجام پروژه مربوط به این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز انجام پذیرفت.

References

1. Rotterdam E, ASRM-Sponsored P. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Human Reprod 2004; 19: 41-7.
2. ESHRE/ASRM, Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004, 81: 19-25.
3. Tehrani FR, Simbar M, Tohidi M, Hosseinpanah F, Azizi F. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of Iranian population: Iranian PCOS prevalence study. Reprod Biol Endocrinol 2011; 9: 39.
4. Fanta M, Cibula D, Vrbikova J. Prevalence of nonclassic adrenal hyperplasia (NCAH) in hyperandrogenic women. Gynecol Endocrinol 2008; 24: 154–7.
5. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 453–62.
6. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Increased activation of nuclear factor kBtriggersinflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 1508–12.
7. Piotrowski P, Rzepczynska I, Kwintkiewicz J, Duleba A, editors. Oxidative stress induces expression of CYP11A, CYP17, star and 3 beta HSD in rat theca-interstitial cells. Journal of the Society for Gynecologic Investigation; 2005: ELSEVIER SCIENCE INC 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA.
8. Zirlik A, Abdullah SM, Gerdes N, MacFarlane L, Schonbeck U, Khera A, et al. Interleukin-18, themetabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study.Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27: 2043–9.
9. Furtado MV, Rossini AP, Campani RB, Meotti C, Segatto M, Vietta G, et al. Interleukin-18: anindependent predictor of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome after 6months of follow-up. Coron Artery Dis 2009; 20: 327–31.
10. de Jager SC, Kraaijeveld AO, Grauss RW, de Jager W, Liem SS, van der Hoeven BL, et al. CCL3(MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognosticpower for future ischemic events. J Mol Cell Cardiol 2008; 45: 446–52.
11. Virchow R. Die krankhaftengeschwulste [in German]. 3 vols. Berlin: a hirschwald, 1863–1865. From demons and evil spirits to cancer genes. 2000.
12. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 2001; 357: 539-45.
13. PerwezHussain S, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. Int J Cancer 2007; 121: 2373-80.
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144: 646-74.
15. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. Lancet 2009; 17: 1371–82.
16. Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. Steroids 2013; 78: 782–5.
17. Olsen CM, Green AC, Nagle CM, Jordan SJ, Whiteman DC, Bain CJ, et al. Epithelial ovarian cancer: testing the 'androgens hypothesis'. Endocr Relat Cancer 2008; 15: 1061–8.
18. Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. Obstet Gynecol 1996; 88: 554–9.
19. Ferrandina G, Ranelletti F, Lauriola L, Fanfani F, Legge F, Mottolese M, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2), epidermal growth factor receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2002; 85: 305-10.
20. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatinand paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel inpatients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study, J Clin Oncol 2003; 21: 3194-200.
21. Karg KJ, Canellos GP, Griffitth CT, Knapp RC, Parker LM, Welch WR, et al. Predictive factors for long-term survival in patients with advanced ovarian cancer, Gynecol Oncol 1989; 34: 88-93.
22. du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Mbus V, Costa S. A randomized clinical trial of cisplatin/p-

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

aclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first line treat ment of ovarian cancer. J Natl Cancer Inst 2003; 95: 1320-9.
23. Friedman GD, Skilling JS, Udaltsova NV, Smith LH. Early symptoms of ovarian cancer: a case–control study without recall bias. Family practice 2005; 22: 548-53.
24. Havrilesky LJ, Sanders GD, Kulasingam S, Myers ER, Reducing ovarian cancer mortality through screening: Is it possible, and can we afford it? Gynecol Oncol 2008; 111: 179-87.
25. Riman T, Dickman PW, Nilsson S, Correia N, Nordlinder H, Magnusson CM, Persson IR, Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer: results from a Swedish casecontrol study. Am J Epidemiol 2002; 156: 363-73.
26. Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. Steroids 2013; 78: 782-5.
27. Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. Reprod Bio med Online 2009; 19: 398-405.
28. Poggi A, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2006; 54: 323-33.
29. Yannelli JR, Tucker JA, Hidalgo G, Perkins S, Kryscio R, Hirschowitz EA. Characteristics of PBMC obtained from leukapheresis products and tumor biopsies of patients with non-small cell lung cancer. Oncology reports 2009; 22: 1459-71.
30. Nowak M, Klink M, Glowacka E, Sulowska Z, Kulig A, Szpakowski M, et al. Production of cytokines during interaction of peripheral blood mononuclear cells with autologous ovarian cancer cells or benign ovarian tumour cells. Scand J Immunol 2010; 71: 91-8.
31. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. Histochem Cell Biol 2008; 130: 1091-103.
32. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. Nature 2001; 411: 375-9.
33. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. Nature Immunology 2013; 14: 1014-22.
34. Burnette B, Fu Y-X, Weichselbaum RR. The confluence of radiotherapy and immunotherapy. Front Oncol 2012; 2: 3389.
35. Gajewski TF, Louahed J, Brichard VG. Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. Cancer J 2010; 16: 399-403.
36. Nowak M, Klink M, Glowacka E, Sulowska Z, Kulig A, Szpakowski M, et al. Production of cytokines during interaction of peripheral blood mononuclear cells with autologous ovarian cancer cells or benign ovarian tumour cells. Scand J Immunol 2010; 71: 91-8.
37. Shi Y, Fan X, Meng W, Deng H, Zhang N, An Z. Engagement of immune effector cells by trastuzumab induces HER2/ERBB2 downregulation in cancer cells through STAT1 activation. Breast Cancer Res 2014; 16: 33.
38. Lai D, Wang F, Chen Y, Wang C, Liu S, Lu B, et al. Human ovarian cancer stem-like cells can be efficiently killed by γδ T lymphocytes. Cancer Immunology, Immunotherapy 2012; 61: 979-89.
39. Lu J, Aggarwal R, Kanji S, Das M, Joseph M, Pompili V, et al. Human ovarian tumor cells escape γδ T cell recognition partly by down regulating surface expression of MICA and limiting cell cycle related molecules. PLoS One 2011; 6: e23348.
40. Dharma Rao T, Park KJ, Smith-Jones P, Iasonos A, Linkov I, SoslowRA, et al. Novel monoclonal antibodies against the proximal (carboxy-terminal)portions of MUC16. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2010; 18: 462-72.
41. Bast RC Jr, Spriggs DR. More than a biomarker: CA125 may contributeto ovarian cancer pathogenesis. Gynecol Oncol 2011; 121: 429–30.
42. Rao TD, Rosales N, Spriggs DR. Dual-fluorescence isogenic high-content screening for MUC16/CA125 selective agents. Molecular cancer therapeutics 2011; 10: 1939-48.
43. Lau MT, Wong AS, Leung PC. Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells. Endocrinology 2010; 151: 2985–93.
44. Burke F, Relf M, Negus R, Balkwill F. A cytokine profile of normal and malignant ovary. Cytokine 1996; 8: 578-85.
45. Rabinovich A, Medina L, Piura B, Segal S, Huleihel M. Regulation of ovarian carcinoma SKOV-3 cell proliferation and secretion of MMPs by autocrine IL-6. Anticancer Res 2007; 27: 267-72.
46. Tempfer C, Zeisler H, Sliutz G, Haeusler G, Hanzal E, Kainz C. Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients. Gynecologic oncology 1997; 66: 27-30.
47. Mielczarek-Palacz A, Sikora J, Kondera-Anasz Z, Mickiewicz P, Mickiewicz A. Effect of Th1/Th2 cytokine administration on proinflammatory SKOV-3 cell activation. 2015.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

Original Article

The Study of cell Proliferation, TNF-α Cytokine Production and Expression of CD8 Marker in Peripheral Blood Lymphocytes of Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by co-culture with Ovarian Tumor Cell Lines (SKOV3,A2780)

Hajiaghayi M[1], Rezayat F[1], Ghasemi N[1], Mesdaghi M[1], Soleymanian A[2], Mosaffa N[3], RamezaniTehrani F[3]

[1]Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, [2]Department of Paramedical, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences,[3]Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: yasamaryan@gmail.com

Received: 12/04/2016 **Accepted**: 01/06/2016

Abstract

Introduction: Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a proinflammatory state that underpins the development of metabolic aberration and ovarian dysfunction in the disorder. Chronic inflammation and increased levels of androgens in these patients and their impact on the immune system, may be able to disrupt antitumor activity and thus increase the risk of developing malignancies including ovarian cancer. Materials and Methods: Peripheral blood mononuclear cells of 50 patients with PCOS and healthy controls were purified by Ficoll density gradient centrifugation. We then measured cell proliferation and concentrations of cytokines TNF-α at different time intervals (48 and 72 hours) after co-culture of ovarian (SKOV3, A2780) and breast (MCF-7, MDA-468) tumor cell lines with PBMC in indirect contact of transwell system. Results: Proliferative response of executive cells during stimulation with tumor cell lines after 48 hours was not statistically significant between patients and healthy controls. Between the 2 groups, proliferation rates at the end of 72h were significantly higher than after 48h (P<0.01). The production of TNF-α in co-culture of A2780 cell lines significantly increased in the patient group in time compared to the controls (P<0.05). Conclusion: Our findings confirmed that, compared to healthy individuals low levels of chronic inflammation in patients with PCOS exhibit increased proliferative response of immune cells and TNF-α levels. An increased risk of cancers in patients with PCOS however requires investigation of other aspects of anti-tumor responses in vitro, with larger sample sizes.

Keywords: Polycystic ovarian syndrome, Chronic inflammation, Ovarian tumor cell lines, SKOV3, A2780, Co-culture

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]