

COMPARISON OF T HELPER 17 (TH17) CELL FREQUENCIES AND INTERLEUKIN 17 (IL-17) LEVELS IN THE PERIPHERAL BLOOD BETWEEN BREAST CANCER PATIENTS AND WOMEN WITH BENIGN BREAST TUMORS AND THEIR CORRELATION WITH TUMOR PROGRESSION

مقارنة نسبة الخلايا التائية المساعدة 17 (Th17) وتركيز الإنترلوكين 17 (IL-17) في الدم المحيطي عند مريضات سرطان الثدي ومريضات الأورام الحميدة في الثدي وعلاقتها مع تطور الورم

Maram Bilal, MD; Jumana Al-Saleh, MD; Faihaa Abo Fakher, MD

د. مرام بلال، د. جمانة الصالح، د. فيحاء أبو فخر

ABSTRACT

Objective: T-helper 17 (Th17) cells represent a particular subset of T helper lymphocytes characterized by high production of interleukin 17 (IL-17) and other inflammatory cytokines. While a role for Th17 cells in promoting inflammation and autoimmune disorders has been extensively demonstrated, it is still controversial whether and how Th17 cells influence tumor immunity. In this study, we examined the proportion of Th17 cells and the concentration of a related cytokine (IL-17) in peripheral blood from Syrian patients with breast cancer.

Methods: The study included 69 patients with breast tumors. They were divided into 2 categories: patients affected with benign breast tumors (n=28) with age range (26-79) years, and breast cancer patients (n=41) with age range (22-74) years. Th17 cells were evaluated in peripheral blood by flow cytometry and reported as a percentage of total CD4+ cells, and ELISA method has been used for estimation IL-17 levels in serum of studied groups. The present study also assessed the association of cell percentage and IL-17 levels with clinico-pathological parameters.

Results: Breast cancer samples had significantly higher concentrations of IL-17 compared with benign breast tumor samples, and this elevation was correlated with angiogenesis and metastasis. However, no significant difference of Th17 cell percentages was found between the two studied groups. Similarly, no significant association was recognized between Th17 frequency and clinico-pathological factors.

Conclusions: We observed significantly increased levels of IL-17 in serum of breast cancer patients, and a significant association between these levels and both angiogenesis and metastasis. The present findings suggest that IL-17 could be involved in the aggressiveness of breast tumors.

من السيتوكينات الالتهابية، وعلى الرغم من معرفة دور هذه الخلايا في تحريض الأمراض الالتهابية والمناعية الذاتية، فإن دورها في تحريض أو كبح المناعة الورمية ما زال مثار جدل. هدفت دراستنا هذه إلى تقييم نسبة الخلايا Th17 وتركيز أهم سيتوكيناتها (وهو الإنترلوكين IL-17)

ملخص البحث

هدف البحث: تمثل الخلايا التائية المساعدة 17 (Th17) نوعاً من اللعاقوبات التائية يتميّز بإنتاج عالٍ للإنترلوكين-17 (IL-17) وغيره

*Maram Bilal, Ph.D, Student, Immunology, Biochemistry and Microbiology Department, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syria.
E-mail:maramybilal86@gmail.com.

*Jumana Al-Saleh, Assisstant Professor, Biochemistry and Microbiology Department, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syria.

*Faihaa Abo Fakher, Associate Professor, Laboratory Medicine Department, Faculty of Medicine, Damascus University, Damascus, Syria.

الرثياني، التهاب العنبيبة uveitis، كما تلعب دوراً هاماً في استجابة رفض الطعم.³

إن التواجد العالي للخلايا Th17 في الأورام جعل الباحثين يختبرون قدرتها على تحريض أو كبح نمو الورم، ولكن الدراسات بيّنت الدور المعقد لهذه الخلايا في الأورام، حيث حدّت هذه الخلايا في بعض الحالات من نمو الورم،^{4,5} بينما علمت في حالات أخرى على تثبيط المناعة المضادة للورم وبالتالي ازدياد تطور الورم،^{6,7} حيث تبين أن الخلايا Th17 قد تتمتع بخصائص طليعة التهابية proinflammatory أو خصائص منظمة regulatory وذلك اعتماداً على المحفزات التي تتلقاها.⁸

تنتج الخلايا Th17 كميات كبيرة من IL-17A بالإضافة إلى IL-17F، IL-21، IL-22، واعتماداً على تمايزها وظروف البيئة المحيطة بها تنتج كميات مختلفة من TNF α و IFN γ و/أو GM-CSF. يحرض IL-17 شلال الإشارة في الخلية الهدف عبر ارتباطه بأحد مستقبله IL-17RA أو IL-17RC، حيث يتم التعبير عن هذين المستقبلين بشكل واسع في العديد من أنواع الخلايا مثل الخلايا الظهارية (بما فيها الخلايا اللمفية المتحوّلة)، والخلايا البطانية والخلايا البانية للعظم osteoblasts والأرومات الليفية والخلايا النخوية المختلفة.⁹

يحفّض IL-17 إنتاج السيتوكينات المحرّضة للالتهاب مثل IL-1 و IL-6 و TNF α ، بالإضافة إلى الكيموكينات الالتهابية، مما يزيد الجذب الكيميائي للخلايا الالتهابية إلى مكان الالتهاب.¹⁰ تزداد الأدلة حالياً حول إمكانية اعتبار IL-17 واسماً تشخيصياً هاماً في التمييز بين الحالات السرطانية والحميدة والتنبؤ بإندار المرض، حيث يمكن أن تمثل أداة هامة تسمح بالكشف المبكر.¹¹ تبين عند مرضى الانصباب الجنبي السرطاني أن مستويات IL-17 في المصل تكون أعلى وبشكل هام من المرضى ذوي الانصباب الجنبي الحميد أو الأصحاء، كذلك تبين ارتفاع مستوياته ضمن الانصباب الجنبي مع حساسية تصل إلى 76.8%، وتزداد الحساسية إلى 96.4% عند مشاركته مع الواسمات الأخرى مثل المستضد الجنيني السرطاني (CEA) carcinoembryonic antigen، مما يجعل التحري المشترك عن IL-17 و CEA أكثر فائدة في تفريق حالات الخباثة لدى مرضى الانصباب الجنبي.¹²

كذلك ظهرت علاقة هامة بين الورم النقوي المتعدد و IL-17، حيث يبدي المرضى ارتفاعاً ملحوظاً في مستويات IL-17 في كل من المصل وخزعات نقي العظم،¹³ كما ظهر ارتفاع هام في المستويات الدموية لـ IL-17 عند مرضى أورام الدماغ مقارنةً مع مجموعة الشاهد،¹⁴ وظهرت هذه العلاقة القوية بين مستويات IL-17 وتطور المرض في العينات النسيجية لمرضى سرطان المريء.¹⁵

في الدم المحيطي لدى مريضات سرطان الثدي السوريات.

طرق البحث: شملت الدراسة 69 مريضة من المصابات بورم في الثدي جرى تقسيمهنّ إلى مجموعتين: شملت المجموعة الأولى مريضات الأورام الحميدة في الثدي (وعددهن 28 مريضة) وقد تراوحت أعمارهن بين 26 و 79 سنة، بينما شملت المجموعة الثانية مريضات سرطان الثدي (وعددهن 41 مريضة) تراوحت أعمارهن بين 22 و 74 سنة. حدّت هذه الدراسة نسبة الخلايا Th17 في الدم المحيطي باستخدام طريقة التدفق الخلوي، وعُبر عن النتيجة كنسبة مئوية من مجموع الخلايا CD4+، كما استُخدمت طريقة المقايسة المناعية الامتزازية المرتبطة بالأنزيم ELISA لتقدير المستويات المصلية للإنترلوكين IL-17 لدى مجموعتي الدراسة أعلاه. كذلك دُرست العلاقة الملاحظة بين النتائج وبين خصائص الورم.

النتائج: ارتفعت تراكيز الإنترلوكين IL-17 بشكل هام عند مريضات سرطان الثدي لدى مقارنتها مع مريضات الأورام الحميدة في الثدي، كما ارتبط هذا الارتفاع مع تشكيل أوعية جديدة للورم ومع انتقال الورم إلى العقد اللمفاوية. بالمقابل لم تظهر اختلافات هامة في نسبة الخلايا Th17 باختلاف مجموعة الدراسة أو باختلاف خصائص الورم.

الاستنتاجات: بيّنت الدراسة الحالية وجود ارتفاع هام في مستويات الإنترلوكين IL-17 المصلية لدى مريضات سرطان الثدي، كما ارتبطت هذه المستويات مع تشكيل أوعية الورم وتشكيل النقائل، مما يشير إلى إمكانية مساهمة IL-17 في تطور الورم.

مقدمة

تمثل الخلايا Th17 نوعاً من الخلايا CD4+T الفاعلة بشكل مختلف عن Th1 و Th2، ولكن ما زالت الظروف التي تقود التمايز المثالي للخلايا Th17 عند البشر غير واضحة. بينت العديد من الدراسات أن العامل TGF- β غير ضروري في توليد هذه الخلايا، بينما بينت دراسات أخرى الدور الهام لهذا السيتوكين في تمايز الخلايا Th17. أظهرت إحدى الدراسات أن مشاركة TGF- β مع IL-21 (وليس IL-6) هي مشاركة فعالة في تحريض تمايز الخلايا Th17، بينما اقترحت دراسات أخرى أن IL-1 β لوحده أو بالمشاركة مع TGF- β ضروري كذلك لإنتاج Th17 عند البشر.¹

تتواجد الخلايا Th17 في الحالات الطبيعية بشكل خاص في القناة الهضمية والرئة، حيث تؤمن حماية هذه الأنسجة ضد العدوى الجرثومية والفطرية، ولكن عددها يرتفع في نسج أخرى كذلك أثناء الالتهاب.² تدعم الخلايا Th17 المناعة المتوسطة بالخلايا B، كما تساهم في نمو وتفعيل البلاعم والمعدلات، وتنظم تفعيل وانتشار الخلايا CD8+T، كما تتوسط هذه الخلايا العديد من الاستجابات المناعية الذاتية بما فيها التصلب المتعدد، داء كرون Crohn's، داء الصدف، التهاب المفاصل

(الموافقة المستنيرة). تُقَلَّت عينة الدم في الأنبوب الجاف بسرعة 2000 g مدة 10 دقائق بحرارة الغرفة، وحُفِظ المصل بدرجة حرارة -30°م حتى إجراء المقايسة المناعية الامتزازية المرتبطة بالأنزيم ELISA، بينما استخدمت العينة في أنبوب الـ EDTA لإجراء طريقة التدفق الخلوي.

عزل الخلايا وحيدة النواة Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

تم تمديد 4 مل دم مسحوب حديثاً -على أنبوب مطلي بمانع تخثر الـ EDTA- باستخدام حجم مماثل من Dulbecco's phosphate buffered Saline (DPBS، Sigma) مع المزج، وأضيف الدم الممدد إلى أنبوب تنقيت مخروطي حاوٍ على 4 مل من وسط العزل (Lymphoprep، Stemcell) مع مراعاة الهدوء الشديد في الإضافة، ثم نُقِل المزيج بسرعة 800 g مدة 30 دقيقة في حرارة 20°م.

التصنيف	العدد	%
1	4	9.8
2	22	53.6
3	12	29.3
غير محدد	3	7.3
دون 3.3	7	17.1
أكبر من 3.3	7	17.1
غير محدد	27	65.8
سرطان غير مترافق مع نقائل	23	56.1
سرطان مترافق مع نقائل M+	18	43.9
7-5	10	24.4
9-8	5	12.2
غير محدد	26	63.4
سرطان غير مترافق مع تشكل أوعية جديدة	27	65.9
سرطان مترافق مع تشكل أوعية جديدة	14	34.1
المجموع	41	100.0

الجدول 1. توزع مريضات سرطان الثدي

حسب المعلومات المتوفرة عن الورم.

نقلت طبقة الخلايا PBMCs (الطبقة الفاصلة بين البلازما ووسط العزل) إلى أنبوب تنقيت نظيف، ثم غُسلت الخلايا المعزولة بإضافة 10 مل من DPBS والتثقيت بسرعة 400 g مدة 5 دقائق بحرارة 4°م. بعد التخلص من الطافي تمت بعثرة الخلايا في 2 مل من DPBS، حيث قُدِّر تعداد الخلايا وحيويتها cell viability باستخدام عدادة نيوياور. جرى بعد ذلك غسل الخلايا مرة أخرى باستخدام 10 مل من DPBS ومن ثم بعثرة الخلايا في حجم مناسب من وسط Roswell Park Memorial Institute 1640 (PRMI 1640، sigma) بحيث يكون تركيز الخلايا $10^6 \times (1-2)$ خلية/مل (اعتماداً على تعداد

يأتي سرطان الثدي في المرتبة الثانية بين السرطانات الأكثر شيوعاً في العالم، وهو السرطان الأكثر حدوثاً بين النساء، ونظراً لتزايد الحالات التي لا تجدي فيها الطرق التقليدية في المعالجة كالعلاج الشعاعي والكيميائي أصبح من الهام تطوير أهداف جديدة للعلاج أو تحسين فعالية العلاجات المتبعة.

يعد الدم المحيطي الأكثر استخداماً في تقييم استجابة الجهاز المناعي، وتشكل الخلايا النائية المساعدة Th والسيتوكينات التي تحررها الجزء الأهم في هذه الاستجابة المناعية، وتلعب دوراً جوهرياً في تنظيمها. هدفت الدراسة الحالية إلى تقدير نسبة الخلايا Th17 وتركيز الإنترلوكين IL-17 في الدم المحيطي عند مريضات سرطان الثدي، ودراسة علاقة ذلك مع المعايير المرضية والسريرية، وتوضيح الدور المحتمل لكل منهما في تطور سرطان الثدي.

طرق البحث

تضمنت الدراسة 69 امرأة من المريضات المراجعات لقسم الجراحة العامة في مشفى المواساة الجامعي جامعة دمشق، وقسم الجراحة العامة في مشفى الأسد الجامعي بجامعة دمشق، وذلك في الفترة الواقعة بين شهر كانون الثاني لعام 2019 وشهر حزيران لعام 2019. تمت مقابلة المريضات عند مراجعتهم لقسم الجراحة العامة لأول مرة بتشخيص استئصال كتلة في الثدي، حيث اشتمت المريضات من وجود كتلة في الثدي، وبعد استجواب كل مريضة من قبل الأطباء وأخذ القصة المرضية الكاملة وقبل الخضوع للعمل الجراحي، سحبت عينة من الدم الوريدي (2 مل على أنبوب جاف و 4 مل على أنبوب EDTA). تم توزيع المريضات بعد خضوعهن للعمل الجراحي ضمن مجموعتين بناءً على نتائج التشريح المرضي للكتل المستأصلة، حيث ضمت المجموعة الأولى مريضات سرطان الثدي (41 مريضة، بنسبة 59.4%) وتراوحت أعمارهن بين 26 و 79 سنة، وضمت المجموعة الثانية مريضات أورام الثدي الحميدة (28 مريضة، بنسبة 40.6%)، وتراوحت أعمارهن بين 22 و 74 سنة.

جُمعت معلومات عن المريضات (من حيث درجة الورم، حجم الورم، تشكل النقائل، تشكل أوعية جديدة للورم ودرجة نوتنغهام Nott)، الجدول 1. استُبعد من المجموعة الأولى من أفراد الدراسة المريضات اللواتي تلقين أي نوع من المعالجة (شعاعية، كيميائية أو هرمونية)، كما استُبعد من المجموعتين المريضات المصابات سابقاً بأي نوع من الأورام، أو المصابات بأحد الأمراض الالتهابية أو الأمراض المناعية الذاتية، أو المريضات اللواتي يتناولن أيّاً من الأدوية المثبطة للمناعة. تم جمع المعلومات المتعلقة بكل من أفراد الدراسة في استمارة خاصة (استمارة الاستبيان)، وذلك بعد أخذ الموافقة من كل مريضة مشاركة وفق نموذج

تحليل أنواع الخلايا التائية المساعدة باستخدام جهاز التدفق الخلوي:
جرى تحليل العينات باستخدام جهاز التدفق الخلوي MACSQuant® (Miltenyi Biotec) Analyzer 10 Flow Cytometer، وتمّ تبويب gating للمفاويات ثمّ تبويب خلايا Th باعتبارها للمفاويات إيجابية التعبير عن CD4، ثمّ حُدِّت نسبة خلايا Th17 (ضمن خلايا Th) باعتبارها الخلايا CD4+ IL-17+.

طريقة المقاييس المناعية الامتزازية المرتبطة بالأنزيم ELISA:
جرى قياس تركيز الإنترلوكين IL-17 في المصل باستخدام مجموعة العمل الخاص به (IL-17 ELISA kits, Invitrogen, Austria) وذلك تبعاً لإرشادات المصنِّع، وتمت قراءة الامتصاصية عند طول موجة 450 نانومتر.

التحليل الإحصائي: استُخدم في التحليل الإحصائي برنامج SPSS (الإصدار 23)، واستُخدم كل من اختبار Student t، واختبار التباين ANOVA لاختبار الفروق في المتوسطات، مع اعتبار قيمة p (0.05) كمستوى دلالة على الأهمية الإحصائية.

النتائج

سُجِّل لكل عينة النسبة المئوية لخلايا Th17 من مجمل الخلايا Th، حيث تراوحت هذه النسبة بين 2.54% و 98.32%، حيث كان متوسط نسبة هذه الخلايا عند مجموعة مريضات سرطان الثدي (48.86%) أقل من المتوسط الملاحظ لدى مجموعة مريضات الأورام الحميدة (52.81%)، إلا أن هذا الفارق لم يكن ذو دلالة إحصائية هامة (قيمة p=0.402)، الجدول 2 والشكل 1.

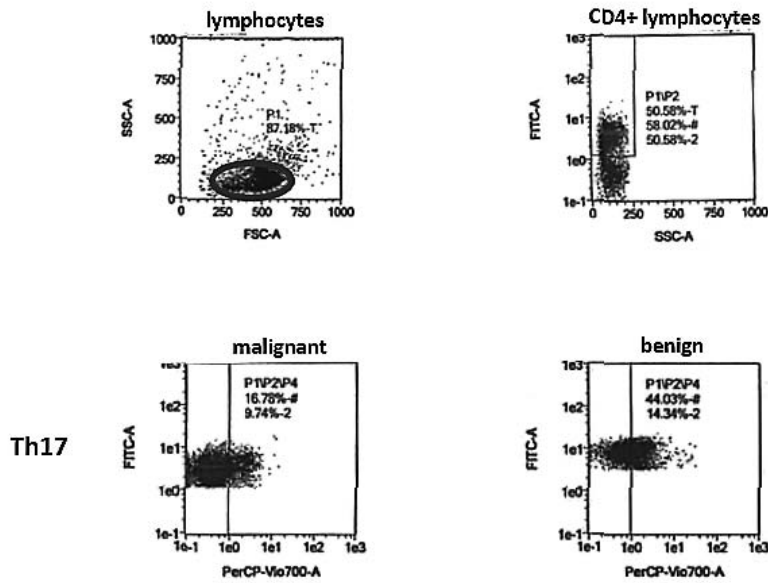
تراوح تركيز الإنترلوكين IL-17 بين 0 و 18.9 بيكوغرام/مل، حيث كان متوسط التركيز عند مجموعة مريضات سرطان الثدي (1.53 بيكوغرام/مل) أعلى من المتوسط الملاحظ لدى مجموعة مريضات الأورام الحميدة (0 بيكوغرام/مل)، لم يكن هذا الفارق أيضاً ذو دلالة إحصائية هامة (قيمة p=0.057)، الجدول 2.

تم حساب متوسط نسبة الخلايا Th17 عند مريضات سرطان الثدي، حيث بلغ في حال عدم وجود نقائل 44.49%، وهو أقل من المتوسط الملاحظ في حال وجود نقائل 54.44%. تناقص متوسط نسبة خلايا Th17 بازدياد درجة Nott في الأورام، فكان المتوسط ضمن المجال 8-9 (48.2%) بينما بلغ في الأورام ذات المجال 5-7 (48.54%)، كذلك كان متوسط نسبة الخلايا Th17 في الأورام غير المترافقة مع تشكل أوعية جديدة 48.91%، بينما تناقص المتوسط عند ترافق الورم مع تشكل أوعية جديدة 48.74%، وفيما يخص حجم الورم فقد ازداد متوسط نسبة الخلايا Th17 بازدياد حجم الورم، حيث بلغ القيمتين 41.64% و 47.89% في

الخلايا). حُفِظ معلق الخلايا حتى صباح اليوم التالي بدرجة حرارة 4°C. **تفعيل خلايا CD4+** أُضيف إلى كل 1 مل من معلق الخلايا في RPMI 2 ميكرولتراً من مزيج تفعيل الخلايا (cell stimulation cocktail, eBioscience) المؤلف من: phorbol myristate acetate (PMA) و ionomycin، بالإضافة إلى brefeldin A و monensin. وُضِع الأنبوب الحاوي على المعلق في حاضنة CO₂ مع ضبط الحرارة على 37°C وتركيز CO₂ على 5% وذلك مدة 4 ساعات. يعمل المزيج المضاف على تفعيل خلايا T إلى جانب تثبيط تحرير السيتوكينات من هذه الخلايا.

تلوين سطوح الخلايا: بعد انتهاء الحضانة نُقِل الأنبوب بسرعة 400 g مدة 5 دقائق بدرجة الغرفة، ثمّ أُضيف 3 مل من محلول BSA (Bovine serum albumin, Sigma) بتركيز 1%، ثمّ حُضِنَت الخلايا مدة 10 دقائق بدرجة الغرفة، وذلك لحجب الارتباطات غير النوعية. نُقِل الأنبوب ثمّ غُسِلَت الخلايا باستخدام 10 مل من DPBS والتخلص من الطافي. بُعِثَت الخلايا من جديد في 1 مل من DPBS لتقييم تعداد الخلايا وحيويتها مرة أخرى. تُبِع ذلك بتفعيل الأنبوب وبعثرة الخلايا في حجم مناسب من DPBS بحيث يحتوي كل 100 ميكرولتراً على 10⁶×(1-2) خلية/مل. نُقِل 100 مكل من المعلق الناتج إلى أنبوب إيندورف وأُضيف 5 ميكروليتر من أضداد CD4 (CD4 Monoclonal Antibody FITC, eBioscience) لتلوين سطوح الخلايا التائية المساعدة، مع المزج الجيد والحضانة مدة 30 دقيقة بدرجة 4°C في الظلام.

التلوين داخل الخلوي: بعد انتهاء الحضانة غُسِلَت الخلايا مرتين بإضافة 2 مل DPBS إلى الأنبوب، وبعثرت الخلايا في 100 مكل من DPBS، ثم أُضيف 100 مكل من وقاء التثبيت (Intracellular Fixation buffer, invirogen) مع المزج الجيد وذلك بغرض تثبيت الخلايا، وحُفِظ المزيج في الظلام بدرجة 4°C حتى صباح اليوم التالي. في اليوم التالي أُضيف إلى كل أنبوب 2 مل من وقاء زيادة النفاذية (permeabilization buffer, invirogen)، وبعد الحضانة 15 دقيقة بدرجة الغرفة في الظلام نُقِل الأنبوب (400 g لمدة 5 دقائق بدرجة الغرفة)، ثمّ غُسِلَت الخلايا مرة أخرى باستخدام 2 مل من وقاء النفاذية. جرى بعد ذلك بعثرة الخلايا في 100 ميكروليتر من وقاء النفاذية، ثمّ أُضيف 5 ميكروليتر من كل من الأضداد داخل الخلوية (IFN gamma Monoclonal Antibody و APC) و (IL-4 Monoclonal Antibody (PE) و PerCP) و IL-17A Monoclonal Antibody (Cyanine5.5) وكلها من إنتاج شركة (eBioscience)، وحُضِنَت الأنبوب مدة 60 دقيقة بدرجة الغرفة في الظلام. بعد انتهاء مدة الحضانة أُضيف 2 مل من وقاء النفاذية ونُقِل الأنبوب (400 g، 5 دقائق بدرجة الغرفة). أُضيف بعد التخلص من الطافي 2 مل من DPBS وأعيد التثقيب، ثمّ بُعِثَت الخلايا في 500 ميكرولتراً من DPBS.



الشكل 1. النسبة المئوية لخلايا Th17 ضمن خلايا CD4+T (في خلايا PBMCs) في الدم المحيطي لدى كل من مريضة سرطان الثدي (malignant) ومريضة بورم حميد في الثدي (benign). يظهر تبويب اللمفاويات ثم تبويب الخلايا CD4+T،

ثم نسبة خلايا Th17 ضمن خلايا CD4+T.

(PBMC: Peripheral blood mononuclear cells)

PerCP، FITC: المواد المتألقة المرتبطة بأضداد كل من CD4 و IL-17 على الترتيب.

العنصر المدروس	نوع الورم	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	قيمة F	قيمة p
Th17	ورم خبيث	41	48.86	19.55	3.05	0.843-	0.402
	ورم حميد	28	52.81	18.51	3.50		
IL-17	ورم خبيث	41	1.53	4.16	0.65	1.936	0.057
	ورم حميد	28	0.00	0.00	0.00		

الجدول 2. متوسط كل من نسبة Th17 وتركيز IL-17 بين مجموعتي أفراد الدراسة.

اختبار Student t أن هذه الفروق في قيم المتوسط ذات دلالة إحصائية هامة، حيث بلغت $p=0.038$ في اختلاف حالة النقايل، و 0.001 في اختلاف تشكل أوعية جديدة. ازداد متوسط تركيز الإنترلوكين IL-17 بازدياد درجة Nott. في الأورام، فكان المتوسط ضمن الأورام ذات المجال 7-5 (3.25 بيكوغرام/مل)، بينما بلغ في الأورام ذات المجال 7-5 (1.91 بيكوغرام/مل)، وفيما يخص حجم الورم فقد تناقص متوسط تركيز الإنترلوكين IL-17 بازدياد حجم الورم حيث بلغ القيم 2.51 بيكوغرام/مل و 2.49 بيكوغرام/مل في حالتي حجم الورم دون 3.3 سم وأكبر من 3.3 على الترتيب. تبين عند استخدام اختبار Student t لتقييم الفروقات في متوسط تركيز الإنترلوكين IL-17 أن قيم الأهمية $p < 0.05$ ، وبالتالي لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين متوسطات تركيز الإنترلوكين IL-17 ضمن مجموعة مريضات السرطان باختلاف درجة Nott. أو حجم الورم، الجدول 4.

حالي حجم الورم دون 3.3 سم وأكبر من 3.3 سم على الترتيب. تبين عند استخدام اختبار Student t لاختبار الفروقات في متوسط نسبة الخلايا Th17 أن قيمة p أكبر من 0.05، وبالتالي لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين متوسطات نسبة هذه الخلايا ضمن مجموعة مريضات السرطان باختلاف حالة النقايل أو درجة Nott أو حالة تشكل أوعية جديدة أو حجم الورم، الجدول 3.

تم حساب متوسط تركيز الإنترلوكين IL-17 عند مريضات سرطان الثدي، حيث بلغ في حال عدم وجود نقائل 0.35 بيكوغرام/مل، وهو أقل من المتوسط الملاحظ في حالات وجود نقائل (3.04 بيكوغرام/مل)، كذلك كان متوسط تركيز الإنترلوكين IL-17 في الأورام غير المترافقة مع تشكل أوعية جديدة (0 بيكوغرام/مل)، بينما بلغ المتوسط الملاحظ عند ترافق الورم مع أوعية جديدة (4.46 بيكوغرام/مل)، وتبين باستخدام

معرفة دور هذه الخلايا في سرطان الثدي عبر ربط النتائج مع خصائص الورم.

تناقشت في الدراسة الحالية نسبة الخلايا Th17 عند مريضات السرطان بالمقارنة مع مريضات الأورام الحميدة ولكن لم يكن هذا التناقص هاماً، إضافةً إلى عدم ظهور فروقات هامة عند مقارنة نسبة هذه الخلايا تبعاً لمعالم الورم. لم تظهر كذلك فروق هامة في نسبة الخلايا Th17 (من PBMCs) بين مريضات المراحل المبكرة لسرطان الثدي والنساء الصحيحات في دراسة قام بها Wang وزملاؤه، بينما تناقست نسبة هذه الخلايا عند مريضات المراحل المتقدمة بشكل هام عند مقارنتها مع النساء الصحيحات.¹⁶ اقتصرت دراسة أخرى على مريضات سرطان الثدي القنوي الغازي، حيث تزايدت فيها نسبة الخلايا Th17 في الدم المحيطي عند المريضات بالمقارنة مع النساء الصحيحات.¹⁷ وعندما أجريت دراسة على مرضى أنواع مختلفة من الأورام الصلبة من بينها سرطان الثدي تساوت نسبة الخلايا Th17 بين المرضى والأصحاء.¹⁸

اختلف متوسط نسبة الخلايا Th17 باختلاف درجة الورم، حيث بلغ قيمته الأعلى (51.12%) في الأورام ذات الدرجة 1 وقيمته الأقل (49.59%) في الأورام ذات الدرجة 2. اختلف كذلك متوسط تركيز الإنترلوكين IL-17 باختلاف درجة الورم، حيث بلغ قيمته الأعلى (1.94 بيكوغرام/مل) في الأورام ذات الدرجة 2 وقيمته الأقل (0.32 بيكوغرام/مل) في الأورام ذات الدرجة 1. وتبين عند استخدام اختبار ANOVA أن قيمة p كانت أكبر من 0.05، وبالتالي لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية باختلاف درجة الورم، الجدول 5.

المناقشة

جرى في الدراسة الحالية تحديد نسبة الخلايا Th17 وذلك بعد عزل الخلايا PBMCs من الدم المحيطي لمريضات سرطان الثدي ومريضات الأورام الحميدة في الثدي، كما جرى تحديد تركيز أهم سيتوكين تنتجه هذه الخلايا وهو الإنترلوكين IL-17، وذلك بهدف

قيمة p	قيمة F	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط	العدد	النقائل	
0.106	1.653-	3.96	19.01	44.49	23	لا يوجد نقائل	نقائل
		4.55	19.30	54.44	18	يوجد نقائل إلى العقد اللمفاوية	
0.961	0.050	4.04	12.78	48.54	10	7-5	نقاط Nott
		5.35	11.96	48.20	5	9-8	
0.979	0.026	3.91	20.32	48.91	27	عدم ترافق الورم مع أوعية جديدة	أوعية جديدة
		5.00	18.70	48.74	14	الورم مترافق مع أوعية جديدة	
0.451	0.780-	7.44	19.70	41.64	7	أقل من 3.3 سم	حجم الورم
		2.94	7.78	47.89	7	أكبر من 3.3 سم	

الجدول 3. اختبار Student t لمقارنة متوسط نسبة الخلايا Th17 عند مجموعة مريضات السرطان بحسب بعض خصائص الورم.

قيمة p	قيمة F	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط	العدد	النقائل	
0.038	2.145-	0.26	1.23	0.35	23	لا يوجد نقائل	نقائل
		1.38	5.87	3.04	18	يوجد نقائل إلى العقد اللمفاوية	
0.621	0.506-	1.01	3.20	1.91	10	7-5	نقاط Nott
		3.25	7.27	3.25	5	9-8	
0.001	3.741-	0.00	0.02	0.00	27	عدم ترافق الورم مع أوعية جديدة	أوعية جديدة
		1.67	6.26	4.46	14	الورم مترافق مع أوعية جديدة	
0.995	0.007	2.30	6.09	2.51	7	دون 3.3 سم	حجم الورم
		1.41	3.74	2.49	7	أكبر من 3.3 سم	

الجدول 4. اختبار Student t لمقارنة متوسط تركيز IL-17 عند مجموعة مريضات السرطان بحسب بعض خصائص الورم.

العنصر المدروس	درجة الورم	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	أدنى قيمة	أعلى قيمة	قيمة F	الأهمية
Th17	1	4	51.12	18.04	9.02	29.66	72.78	0.432	0.731
	2	22	49.59	21.57	4.60	17.44	98.32		
	3	12	49.89	15.56	4.49	23.60	70.48		
IL-17	1	4	0.32	0.64	0.32	0.00	1.29	0.214	0.886
	2	22	1.94	4.55	0.97	0.00	18.90		
	3	12	1.36	4.69	1.36	0.00	16.27		

الجدول 5. اختبار التباين ANOVA لمقارنة متوسط كل من نسبة الخلايا Th17 وتركيز IL-17 عند مجموعة مريضات السرطان بحسب درجة الورم.

أورام الثدي الخبيثة عند مقارنتها مع مريضات أورام حميدة في الثدي، مع وجود فروقات هامة.²⁴ كما ارتفع تركيز IL-17 في الدم المحيطي عند مرضى الأبيضاخ النقي الحاد AML،²⁰ وعند مريضات سرطان عنق الرحم لدى مقارنتها مع النساء الصحيحات.¹⁹ بينما لم تتغير مستوياته عند مرضى لمفوما لاهودجكن بخلايا B عند مقارنتها مع الأصحاء.²³

الاستنتاجات والتوصيات

أظهرت دراستنا هذه وجود علاقة هامة بين تراكيز الإنترلوكين IL-17 في المصل وبين انتقال سرطان الثدي إلى العقد اللمفية المجاورة، كذلك ارتبطت تراكيزه بشكل هام مع تشكل أوعية جديدة للورم. يشير ما سبق إلى أن الإنترلوكين IL-17 قد يساهم في زيادة عدائية سرطان الثدي، بينما لم ترتبط الخلايا Th17 مع تقدم الورم، ولكن تأكيد هذه النتائج يحتاج لإجراء دراسات إضافية تشمل عدداً أكبر من المرضى، أو لدراسات تصنف مريضات سرطان الثدي تصنيفاً نسيجياً (غاز أو لايد) أو تصنيفاً جزيئياً (حسب حالة مستقبلات الأستروجين والبروجسترون و Her-2). كل ما سبق يمكن أن يساعد في إيجاد أهداف علاجية جديدة عند مريضات سرطان الثدي.

تتأققت كذلك نتائج الدراسات المجراة على مرضى مصابين بسرطانات مختلفة، فعلى سبيل المثال ازدادت نسبة الخلايا Th17 في الدم المحيطي لمريضات سرطان عنق الرحم،¹⁹ ومرضى الأبيضاخ النقي الحاد AML،²⁰ ومرضى سرطان الخلايا الكلوية بالمقارنة مع الأصحاء، كما ظهرت زيادة هامة في نسبة هذه الخلايا بازدياد درجة ومرحلة الورم.²¹

كذلك ارتبطت زيادة نسبة هذه الخلايا بشكل هام مع مرحلة الورم وتشكيل النقائل إلى العقد اللمفية لدى مرضى سرطان المعدة.²² بينما تتأققت نسبة الخلايا Th17 في الدوران في دراسة على مرضى لمفوما لاهودجكن بخلايا B لدى مقارنتهم مع الأصحاء.²³

تم في هذه الدراسة أيضاً معايرة مستويات الإنترلوكين IL-17 (أهم سيتوكينات Th17) في المصل، حيث ارتفعت تراكيزه عند مجموعة مريضات سرطان الثدي بالمقارنة مع مريضات الأورام الحميدة دون ظهور أهمية في ارتفاعه هذا، بينما ازداد تركيزه بشكل هام عند ترافق الورم مع نقائل إلى العقد اللمفاوية المجاورة، أو ترافقه مع تشكل أوعية جديدة للورم. ارتفع تركيز الإنترلوكين IL-17 كذلك في دراسة على مريضات

REFERENCES

1. Yang L, Anderson D, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature* 2008;454:350-2.
2. Ouyang W, Kolls J, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28(4):454-67.
3. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalo-myelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 2009;183(11):7169-77.
4. Muranski P, Boni A, Antony P, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008;112:362-73.
5. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009;31(5):787-98.
6. He S, Fei M, Wu Y, et al. Distribution and clinical significance of TH17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci* 2011;12(11):7424-37.
7. Wang L, Yi T, Zhang W, et al. IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer*

- Res* 2010;70(24):10112-20.
8. Bailey S, Nelson M, Himes R, et al. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol* 2014;5:276-309.
 9. Welte T, Zhang X. Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease. *Medi Inflamm* 2015:1-6.
 10. Gaffen S. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009;9(8):556-67.
 11. Yang B, Kang H, Fung A, et al. The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis. *Medi Inflamm* 2014:1-11.
 12. Xu C, Zhan P, Yu L, et al. Diagnostic value of pleural interleukin 17 and carcinoembryonic antigen in lung cancer patients with malignant pleural effusions. *Tumor Biol* 2014;35(2):1599-603.
 13. Prabhala R, Pelluru D, Fulciniti M, et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood* 2010;115(26):5385-92.
 14. Doroudchi M, Pishhe Z, Malekzadeh M, et al. Elevated serum IL-17A but not IL-6 in glioma versus meningioma and schwannoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:5225-30.
 15. Chen D, Hu Q, Mao C, et al. Increased IL-17-producing CD4(+) T cells in patients with esophageal cancer. *Cell Immunol* 2012;272(2):166-74.
 16. Wang J, Cai D, Ma B, et al. Skewing the balance of regulatory T-cells and T-helper 17 cells in breast cancer patients. *J Int Med Res* 2011;39:691-701.
 17. Benevides L, Cardoso C, Tiezzi D, et al. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur J Immunol* 2013;43(6):1518-28.
 18. Noguchi A, Kaneko T, Naitoh K, et al. Impaired and imbalanced cellular immunological status assessed in advanced cancer patients and restoration of the T cell immune status by adoptive T-cell immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 2014;18:90-7.
 19. Zhang Y, Ma D, Zhang Y, et al. The imbalance of Th17/Treg in patients with uterine cervical cancer. *Clin Chim Acta* 2011;412:894-900.
 20. Wu C, Wang S, Wang F, et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol* 2009;158:199-204.
 21. Li L, Yang C, Zhao Z, et al. Skewed T-helper (Th)1/2- and Th17/T regulatory-cell balances in patients with renal cell carcinoma. *Molec Med Rep* 2015;11:947-53.
 22. Li Q, Chen J, Liu Y, et al. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncol Rep* 2013;30:1215-22.
 23. Lu T, Yu S, Liu Y, et al. Aberrant circulating Th17 cells in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *PLoS ONE* 2016;11(1):1-10.
 24. Rohani Borj M, Andalib AR, Mohammadi A, et al. Evaluation of IL-4, IL-17, and IFN- γ levels in patients with breast cancer. *Int J Basic Sci Med* 2017;2(1):20-4.