

CIRCULATING FREQUENCIES OF T HELPER (TH1, TH2, AND TH17) CELLS IN BREAST CANCER PATIENTS AND WOMEN WITH BENIGN BREAST TUMORS

نسب الخلايا التائية المساعدة (Th1، Th2، وTh17) في الدوران لدى مريضات
سرطان الثدي ومريضات الأورام الحميدة في الثدي

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

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

ABSTRACT

Objective: Dysfunction of systemic immunity may be involved in the establishment of advanced breast cancer. Therefore, it is important to understand immune-regulation via estimation of T helper (Th1, Th2 and Th17) cell frequencies in peripheral blood of breast cancer patients.

Methods: Sixty nine patients with breast tumors were enrolled in this study. Based on pathologic diagnostic assessment, patients were divided into two 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. This study investigated the distribution of Th1 (CD4+IFN_γ+), Th2 (CD4+IL-4+) and Th17 (CD4+IL-17+) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from two studied groups. Cells were evaluated by flow cytometry and reported as a percentage of total CD4+ cells. The present study also assessed the association of cell percentages with clinicopathological parameters.

Results: Compared with patients of benign breast tumors, an increase in the peripheral percentages of Th1 and Th2 was observed in breast cancer patients, while the percentage of Th17 cells increased. However; no significant difference of cell percentages was found between the two studied groups. Elevation of Th2 frequency in breast cancer patients correlated with lymph node metastasis. However; no significant association was recognized between the frequencies of other cell subtypes and clinicopathological factors.

Conclusions: We observed significantly increased percentage of circulating Th2 cells in breast cancer patients with metastasis. These results indicate that Th2 may play an important role in metastasis of breast malignancy.

ملخص البحث

في الدم المحيطي لدى مريضات سرطان الثدي.

طرق البحث: ضمّت الدراسة الحالية 69 مريضة بورم في الثدي تم تقسيمهن بناءً على تقرير التشريح المرضي إلى مجموعتين: الأولى مجموعة مريضات الأورام الحميدة في الثدي وشملت 28 مريضة تراوحت أعمارهن بين 26 و79 سنة، والثانية مجموعة مريضات سرطان الثدي

هدف البحث: قد يساهم خلل المناعة الجهازية في تطور حالات سرطان الثدي، ولذلك فمن الأهمية بمكان تقييم التنظيم المناعي عبر تحديد نسب الخلايا التائية المساعدة (Th1، Th2، وTh17)

*Maram Bilal, Ph.D. Student, Immunology-Biochemistry and Microbiology Department, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria.

E-mail: maramybilal86@gmail.com

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

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

الفطري⁴. تتواسط الخلايا Th2 المناعة الخلوية، حيث تحرر الأضداد وتستهدف المتعضيات الطفيلية. تعد هذه الخلايا فعالة ضد الطفيليات خارج الخلية متضمنة الديدان، وتلعب دوراً هاماً في تحريض واستمرار الربو وغيره من الأمراض التحسسية.⁵ بينت الدراسات على مرضى السرطان أن خلايا Th2 على علاقة مع تطور الأورام، حيث ظهر انزياح في التوازن Th1/Th2 نحو Th2.^{6,7}

جرى عام 2005 اكتشاف الخلايا Th17، وهي نوع جديد من الخلايا التائية المساعدة Th مختلف عن Th1 وTh2. تحرر خلايا Th17 الإنترلوكينات (IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF α)، وتلعب دوراً هاماً في الالتهاب وتفعيل المعتدلات للتخلص من الجراثيم خارج الخلية، كما تم إثبات دورها في تطور الأمراض المناعية الذاتية، ولكن دورها في الاستجابة المناعية للورم مازال غير واضح، حيث حرّضت نمو الورم في بعض الدراسات، بينما ارتبطت مع تراجع الورم في دراساتٍ أخرى.⁸

أحد التفسيرات التي اقترحت لتناقض أدوار Th17 أن اختلاف نوع الورم يؤدي إلى توليد خلايا Th17 بأنماطٍ مختلفة،⁹ وعلى الرغم من ذلك فإن عدد الدراسات المجراة على كل نوع من السرطان محدود جداً، ولا يمكن من خلاله تحديد فيما إذا كان نوع السرطان هاماً في تأثير Th17 على بقيا المرضى.¹⁰

عزى الباحثون الدور المحرض للورم الذي تمارسه الخلايا Th17 إلى عدة عوامل تحتاج إلى المزيد من الدراسات لإثباتها، حيث تبين أن الخلايا Th17 تعبر عن أنزيمات ectonucleotidases وبشكل خاص CD39 وCD73، حيث يقوم CD39 بتحويل ADP أو ATP إلى AMP، أما CD73 فيحول AMP إلى أدينوزين، حيث يبدي الأخير خصائص كابحة للمناعة عبر تثبيط تكاثر الخلايا T وإنتاج السيتوكينات.¹¹ من ناحيةٍ أخرى فقد تبين وجود علاقة هامة بين كثافة ارتشاح الخلايا Th17 إلى الورم وبين زيادة تشكيل أوعية جديدة للورم في العديد من السرطانات عند البشر.¹²⁻¹⁵ من جانبٍ آخر بيّنت الدراسات أن الخلايا Th17 يمكن أن تمارس دوراً مضاداً للورم من خلال حشد وتفعيل خلايا مناعية أخرى معروفة بدورها في كبح نمو وتكاثر الخلايا الورمية مثل خلايا CD8+T.¹⁶

مما سبق تبرز أهمية تقييم الاستجابة المناعية عبر تحديد نسب أنواع الخلايا التائية المساعدة في الدم المحيطي عند مريضات سرطان الثدي وربطها مع تقدم الورم، أملاً في أن يكون ذلك خطوة في محاولة وضع استراتيجيات جديدة للعلاج عند المريضات غير المستعيدات من طرق المعالجة الحالية.

وشملت 41 مريضة تراوحت أعمارهن بين 22 و74 سنة. جرى في هذه الدراسة التحري عن نسب تواجد الخلايا التائية (CD4+IFN γ + Th1 والخلايا (CD4+IL-4+ Th2) والخلايا (CD4+IL-17+ Th17) في الدم المحيطي لدى مجموعتي الدراسة وذلك باستخدام قياس التدفق الخلوي، حيث تم التعبير عن النتائج كنسبة مئوية من مجموع الخلايا CD4+. قيّمت هذه الدراسة أيضاً ارتباط النسب المئوية للخلايا مع معايير تطور الورم.

النتائج: بيّنت هذه الدراسة ارتفاع نسبة كل من الخلايا Th1 والخلايا Th2 عند مريضات سرطان الثدي بالمقارنة مع مريضات الأورام الحميدة في الثدي، بينما تناقصت نسبة الخلايا Th17 دون فروق هامة إحصائياً في تغيرات النسب هذه. دُرست كذلك العلاقة بين نسبة كل من الخلايا وبين خصائص الورم، حيث اقتصرَت الأهمية الإحصائية على علاقة الارتفاع في نسبة الخلايا Th2 مع حدوث النقائل إلى العقد اللمفاوية لدى مريضات السرطان.

الاستنتاجات: أظهرت الدراسة الحالية زيادة هامة في نسبة الخلايا Th2 في الدم المحيطي عند مريضات سرطان الثدي المترافق مع نقائل إلى العقد اللمفية. تشير النتائج هذه إلى أن الخلايا Th2 قد تلعب دوراً هاماً في تحريض تشكل النقائل الورمية في سرطان الثدي.

مقدمة

يعدّ سرطان الثدي أكثر أنواع السرطانات انتشاراً بين النساء بشكل عام في العالم وفي سورية على وجه الخصوص، حيث شكّلت حالات الإصابة بسرطان الثدي بين النساء في سورية عام 2018 نسبة 38.5% من مجمل حالات السرطان، كما كانت نسبة الوفيات من النساء بسبب سرطان الثدي 27.3% من حالات الوفيات بسبب السرطان.¹

يحرص السرطان استجابات مناعية تقود إلى إزالة أو تطور الورم، ويُطلق على هذا الدور الثنائي للجهاز المناعي في كبح أو تحريض نمو الورم مصطلح التعديل المناعي السرطاني cancer immune-editing.² تعدّ الخلايا التائية المساعدة T-helper من أهم الخلايا المناعية التي يمكن أن تلعب دوراً ثنائياً بين مضادة للورم ومحرضة له.³

تتميز الخلايا Th إلى عدة أنواع من الخلايا بوظائف حيوية مختلفة، حيث تلعب الخلايا Th1 دوراً هاماً في المناعة الخلوية، كما تحرر الإنترفيرون غاما (IFN γ) والعامل النخر للورم بيتا tumor necrosis factor (TNF β)، مما يجعلها فعالة بشكل خاص ضد العدوى داخل الخلية. يزيد IFN γ كذلك من قدرة الجهاز المناعي على ضبط نمو الورم أو على التخلص منه، وذلك عبر زيادة إنتاج الكيموكينات المضادة للورم، وعبر حشد وتفعيل خلايا الجهاز المناعي

طرق البحث

والتثقيف بسرعة 400 غ مدة 5 دقائق بحرارة 4°م. بعد التخلص من الطافي تمت بعثرة الخلايا في 2 مل من DPBS، حيث قُدِّرَ تعداد الخلايا وحيويتها cell viability باستخدام عداة 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 الخلايا). حُفِظَ معلق الخلايا حتى صباح اليوم التالي بحرارة 4° C.

النسبة المئوية	العدد	التصنيف	
9.8	4	1	درجة الورم grade
53.6	22	2	
29.3	12	3	
7.3	3	غير محدد	حجم الورم (سم)
17.1	7	دون 3.3	
17.1	7	أكبر من 3.3	
65.8	27	غير محدد	تشكل النقائل إلى العقد المقفية
56.1	23	لا يوجد نقائل	
43.9	18	يوجد نقائل	
24.4	10	7-5	درجة Nott.
12.2	5	9-8	
63.4	26	غير محددة	
65.9	27	غير مترافق	تشكل أو عية جديدة للورم
34.1	14	مترافق	
100.0	41		المجموع

الجدول 1. توزع مريضات سرطان الثدي حسب

المعلومات المتوفرة عن الورم.

تفعيل خلايا CD4+: أُضيف إلى كل 1 مل من معلق الخلايا في RPMI 2 ميكرو لتر من مزيج تفعيل الخلايا (cell stimulation cocktail, eBioscience) المؤلف من: ionomycin و phorbol myristate acetate (PMA) بالإضافة إلى brefeldin A و monensin. وُضِعَ 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 السيبتوكينات من هذه الخلايا.

تلوين سطوح الخلايا: بعد انتهاء الحضانة نُقِلَ الأنبوب بسرعة 400 غ مدة 5 دقائق بحرارة الغرفة، ثم أُضيف 3 مل من محلول BSA (Bovine serum albumin, Sigma) بتركيز 1%، ثم حُضِنَت الخلايا مدة 10 دقائق بحرارة الغرفة، وذلك لحجب الارتباطات

مرضى الدراسة: تضمنت الدراسة 69 امرأة من المريضات المراجعات لقسم الجراحة العامة في مشفى المواساة الجامعي جامعة دمشق، وقسم الجراحة العامة في مشفى الأسد الجامعي جامعة دمشق، وذلك في الفترة الواقعة بين شهر كانون الثاني لعام 2019 وشهر حزيران لعام 2019. تمت مقابلة المريضات عند مراجعتهم لقسم الجراحة لأول مرة بتشخيص اسنتصال 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، جرى سحب عينة دم وريدي (4 مل دم على أنبوبي EDTA).

وُزِعَت المريضات ضمن مجموعتين -بعد خضوعهن للعمل الجراحي- بناءً على نتائج التشريح المرضي للكتل المستأصلة، حيث ضمت المجموعة الأولى مريضات سرطان الثدي (41 مريضة بنسبة 59.4%) تراوحت أعمارهن بين 26 و 79 سنة، وضمت المجموعة الثانية مريضات أورام الثدي الحميدة (28 مريضة بنسبة 40.6%) تراوحت أعمارهن بين 22 و 74 سنة. جُمِعت معلومات عن المريضات (درجة الورم، حجم الورم، الغزو، نوع 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 (الموافقة المستنيرة).

عزل الخلايا وحيدة النوى:

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، وأُضيف الدم الممدد إلى أنبوب تثقيف مخروطي حاوٍ على 4 مل من وسط العزل (Lymphoprep, Stemcell) مع مراعاة الهدوء الشديد في الإضافة، ثم نُقِلَ المزيج بسرعة 800 غ مدة 30 دقيقة في حرارة 20°م. نُقِلَت طبقة خلايا PBMCs (الطبقة الفاصلة بين البلازما ووسط العزل) إلى أنبوب تثقيف نظيف، ثم غُسِلَت الخلايا المعزولة بإضافة 10 مل من DPBS

وبرنامج الإكسل (Excel software, Office Microsoft 2016)، وتم التعبير عن النتائج كمتوسط حسابي مع حساب الانحراف المعياري. استخدم اختبار student t لتحديد كون الفارق بين المتوسطات ناتجاً عن المصادفة أم أنه فارق يعتد به إحصائياً. بينما استخدم اختبار التباين ANOVA للمقارنة بين المتوسطات لأكثر من مجموعتين، مع اعتبار قيمة $p (0.05)$ كمستوى دلالة على الأهمية الإحصائية.

النتائج

تراوحت النسبة المئوية للخلايا Th1 (من الخلايا Th) بين 2.31% و100%، وكان متوسط نسبة هذه الخلايا عند مجموعة مريضات سرطان الثدي (79.86%) أعلى من المتوسط الملاحظ لدى مجموعة مريضات الأورام الحميدة في الثدي (76.84%)، ولكن هذه الزيادة لم تكن ذات دلالة إحصائية ($p=0.605$). بينما تراوحت النسبة المئوية للخلايا Th2 بين 0.24% و89.47%، وكان متوسط نسبة هذه الخلايا عند مجموعة مريضات سرطان الثدي (42.06%) أعلى من المتوسط لدى مجموعة مريضات الأورام الحميدة (40.19%)، ولكن هذه الزيادة أيضاً لم تكن ذات دلالة إحصائية ($p=0.665$). كما تراوحت النسبة المئوية للخلايا Th17 بين 2.54% و98.32%، وكان متوسط نسبة هذه الخلايا عند مجموعة مريضات الأورام الحميدة (52.81%)، ولكن هذه الزيادة لم تكن ذات دلالة إحصائية ($p=0.402$)، الجدول 2، الشكل 1.

تم حساب متوسط نسبة الخلايا Th1 عند مريضات سرطان الثدي، حيث بلغ في حال عدم وجود نقائل (84.94%) وهو أعلى من المتوسط في حال وجود نقائل (73.36%)، كما ازداد متوسط نسبة خلايا Th1 بازدياد درجة Nott. في الأورام فكان المتوسط ضمن المجال 8-9 (91.34%) بينما بلغ في الأورام ذات المجال 5-7 (81.09%)، كذلك كان متوسط نسبة Th1 في الأورام غير المترافقة مع أوعية جديدة (80.54%)، بينما تناقص المتوسط عند ترافق الورم مع أوعية جديدة (78.56%)، وفيما يخص حجم الورم فقد ازداد متوسط نسبة Th1 بازدياد حجم الورم حيث بلغ قيمتي 78.03% و86.16% في حالتي حجم الورم دون 3.3 وأكبر من 3.3 على الترتيب. وتبين عند استخدام اختبار student t لتقييم الفروق في متوسط نسبة الخلايا Th1 أن قيم p أكبر من 0.05، وبالتالي لا توجد فروقات ذات دلالة إحصائية بين متوسطات نسبة هذه الخلايا ضمن مجموعة مريضات السرطان باختلاف حالة النقائل أو درجة نوتنغهام أو حالة تشكل أوعية جديدة أو حجم الورم، الجدول 3.

تم حساب متوسط نسبة الخلايا Th2 عند مريضات سرطان الثدي،

غير النوعية. نُقِلَ الأنبوب ثم غُسِلت الخلايا باستخدام 10 مل من DPBS والتخلص من الطافي. بُعِثَت الخلايا من جديد في 1 مل من DPBS لتقييم تعداد الخلايا وحيويتها مرة أخرى. تُبَع ذلك بتثقيف الأنبوب وبعثرة الخلايا في حجم مناسب من DPBS بحيث يحتوي كل 100 ميكرو لتر على $10^6 \times (2-1)$ خلية/مل. نُقِلَ 100 ميكرو لتر من المعلق الناتج إلى أنبوب إيبندورف وأضيف 5 ميكرو لتر من أضداد CD4 (CD4 Monoclonal Antibody FITC, eBioscience) لتلوين سطوح الخلايا التائية المساعدة، مع المزج الجيد والحضن مدة 30 دقيقة بدرجة $4^\circ C$ في الظلام.

التلوين داخل الخلوي: بعد انتهاء الحضن غُسِلت الخلايا مرتين بإضافة 2 مل DPBS إلى الأنبوب، وبعثرت الخلايا في 100 ميكرو لتر من DPBS، ثم أضيف 100 ميكرو لتر من وقاء التثبيت (Intracellular Fixation buffer, invirogen) مع المزج الجيد وذلك بغرض تثبيت الخلايا، وحُفِظ المزيج في الظلام بدرجة $4^\circ C$ حتى صباح اليوم التالي.

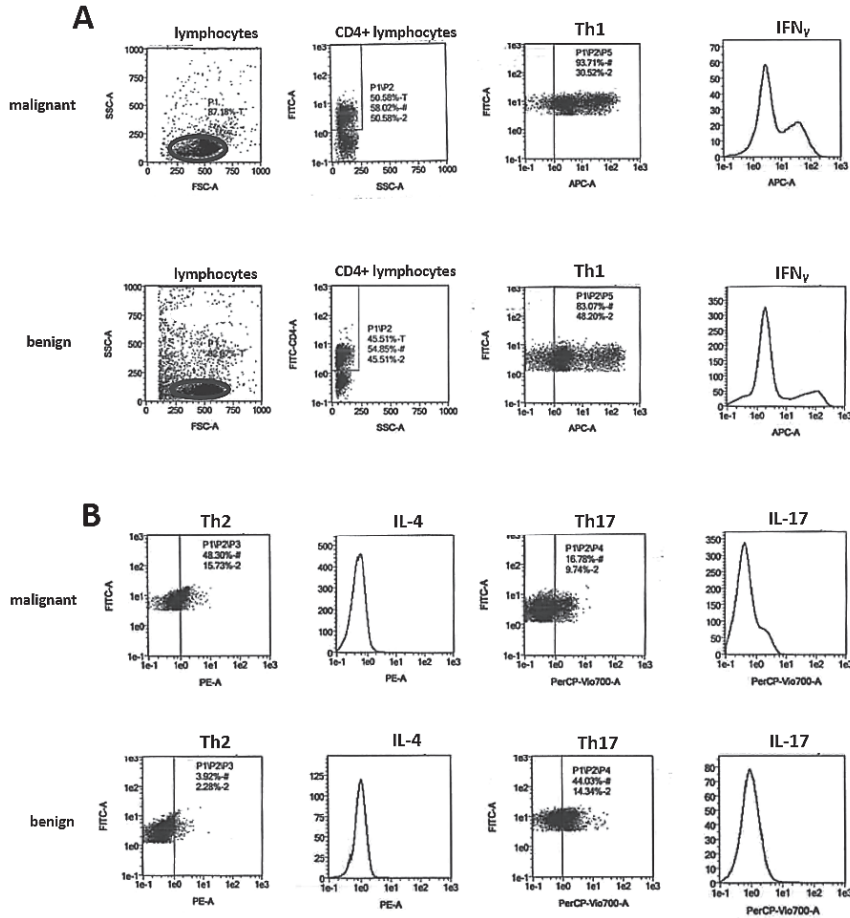
في اليوم التالي أُضيف إلى كل أنبوب 2 مل من وقاء زيادة النفاذية (permeabilization buffer, invirogen)، وبعد الحضن 15 دقيقة بدرجة الغرفة في الظلام نُقِلَ الأنبوب (400 غ، 5 دقائق، حرارة الغرفة)، ثم غُسِلت الخلايا مرة أخرى باستخدام 2 مل من وقاء النفاذية. جرى بعد ذلك بعثرة الخلايا في 100 ميكرو لتر من وقاء النفاذية، ثم أضيف 5 مكل من كل من الأضداد داخل الخلوية (IFN gamma Monoclonal Antibody (APC) و IL-4 Monoclonal Antibody (PE) و IL-17A Monoclonal Antibody (PerCP-Cyanine5.5)) وكلها من إنتاج شركة (eBioscience)، وحُضِن الأنبوب مدة 60 دقيقة بدرجة الغرفة في الظلام. بعد انتهاء مدة الحضن أضيف 2 مل من وقاء النفاذية ونُقِلَ الأنبوب (400 غ، 5 دقائق، حرارة الغرفة). أُضيف بعد التخلص من الطافي 2 مل من DPBS وأعيد التثقيف، ثم بُعِثَت الخلايا في 500 ميكرو لتر من DPBS.

تحليل أنواع الخلايا التائية المساعدة باستخدام جهاز التدفق الخلوي: جرى تحليل العينات باستخدام جهاز التدفق الخلوي MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec)، وتم توبيي gating للمفاويات ثم توبيي الخلايا Th باعتبارها للمفاويات إيجابية التعبير عن CD4، ثم حُدِدَت نسب الخلايا Th1 وTh2 وTh17 (ضمن الخلايا Th) باعتبارها الخلايا $CD4+ IFN\gamma+$ و $CD4+ IL-4+$ و $CD4+ IL-17+$ على الترتيب.

استُخدم في التحليل الإحصائي برنامج SPSS (الإصدار 23)

الخلايا Th2 بازدياد درجة Nott. في الأورام فكان المتوسط ضمن المجال 8-9 (49.13%)، بينما بلغ في الأورام ذات المجال 5-7 (40.47%)، كذلك كان متوسط نسبة Th2 في الأورام غير المترافقة مع

حيث بلغ في حال عدم وجود نقائل (35.77%) وهو أقل من المتوسط في حال وجود نقائل (50.11%)، وتبين عند استخدام اختبار student t أن هذا الفرق ذو دلالة إحصائية (p=0.014). ازداد متوسط نسبة



الشكل 1. يوضح النسب المئوية للخلايا Th1 و Th2 و 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 (A) نسبة للمقاويات من الخلايا PBMCs، ونسبة الخلايا CD4+T من المقاويات، ونسبة الخلايا Th1 من الخلايا CD4+T وفق مخططات نقطية dot plots إضافة إلى رسم بياني histogram لمستوى التعبير عن IFN γ ضمن الخلايا Th1. يظهر (B) مخططات نقطية تبين نسبة كل من Th2 و Th17 ضمن الخلايا CD4+T إضافة إلى رسوم بيانية لمستوى التعبير عن كل من IL-4 ضمن خلايا Th2 و IL-17 ضمن خلايا Th17. PBMC: peripheral blood mononuclear cells. PE، APC، FITC، PerCP، IL-4، IL-17، IFN γ ، CD4 المرتبطة بأضداد كل من IL-4، IL-17، IFN γ ، CD4 على الترتيب.

العنصر المدروس	مجموعة المريضات	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	p-value
Th1	سرطان	41	79.86	24.14	3.77	0.605
	ورم حميد	28	76.84	23.04	4.35	
Th2	سرطان	41	42.06	18.98	2.96	0.665
	ورم حميد	28	40.19	15.27	2.88	
Th17	سرطان	41	48.86	19.55	3.05	0.402
	ورم حميد	28	52.81	18.51	3.50	

الجدول 2. مقارنة متوسطات نسب الخلايا بين مجموعتي أفراد الدراسة.

قيمة p	قيمة F	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط	العدد		
0.129	1.551	3.86	18.53	84.94	23	لا يوجد نقائل	النقائل إلى العقد اللمفية
		6.86	29.11	73.36	18	يوجد نقائل	
0.133	-1.604	5.74	18.14	80.74	10	7-5	درجة Nott.
		1.38	3.09	94.09	5	9-8	
0.807	0.246	4.82	25.04	80.54	27	غير مترافق	ترافق الورم مع أوعية جديدة
		6.19	23.16	78.56	14	مترافق	
0.544	-0.625	11.61	30.72	78.03	7	دون 3.3	حجم الورم أكبر من 3.3
		5.85	15.47	86.16	7	أكثر من 3.3	

الجدول 3. اختبار student t لمقارنة متوسط نسبة الخلايا Th1 عند مجموعة مريضات السرطان بحسب بعض خصائص الورم.

قيمة p	قيمة F	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط	العدد		
0.014	-2.561	3.69	17.71	35.77	23	لا يوجد نقائل	النقائل إلى العقد اللمفاوية
		4.22	17.89	50.11	18	يوجد نقائل	
0.382	-0.905	6.57	20.79	40.47	10	7-5	درجة Nott.
		1.98	4.43	49.13	5	9-8	
0.388	0.873	3.72	19.34	43.93	27	غير مترافق	ترافق الورم مع أوعية جديدة
		4.92	18.42	38.46	14	مترافق	
0.392	0.392	3.73	9.86	43.88	7	دون 3.3	حجم الورم أكبر من 3.3
		4.72	12.48	41.52	7	أكثر من 3.3	

الجدول 4. اختبار student t لمقارنة متوسط نسبة الخلايا Th2 عند مجموعة مريضات السرطان بحسب بعض خصائص الورم.

بازدياد حجم الورم حيث بلغ قيمتي 41.64% و 47.89% في حالتي حجم الورم دون 3.3 وأكبر من 3.3 على الترتيب. تبين عند استخدام اختبار student t لاختبار الفروق في متوسط نسبة الخلايا Th17 أن قيم p أكبر من 0.05، وبالتالي لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين متوسطات نسبة هذه الخلايا ضمن مجموعة مريضات السرطان باختلاف حالة النقائل أو درجة نوتنغهام أو حالة تشكل أوعية جديدة أو حجم الورم، الجدول 5.

اختلف متوسط نسبة الخلايا Th1 باختلاف درجة الورم حيث بلغ قيمته الأعلى (91.64%) في الأورام ذات الدرجة 1، وقيمته الأخفض (74.76%) في الأورام ذات الدرجة 2. ازداد متوسط نسبة Th2 بازدياد درجة الورم حيث بلغ قيمة (34.71%) في الأورام ذات الدرجة 1 و(46.92%) في الأورام ذات الدرجة 3. اختلف متوسط نسبة Th17 باختلاف درجة الورم حيث بلغ قيمته الأعلى (51.12%) في الأورام ذات الدرجة 1 وقيمته الأخفض (49.59%) في الأورام ذات الدرجة 2. وتبين عند استخدام اختبار التباين ANOVA أن قيم p أكبر من 0.05، وبالتالي لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين متوسطات نسب الخلايا ضمن مجموعة مريضات السرطان باختلاف درجة الورم، الجدول 6.

أوعية جديدة (43.93%)، بينما تناقص المتوسط عند ترافق الورم مع أوعية جديدة (38.46%)، وفيما يخص حجم الورم فقد تناقص متوسط نسبة Th2 بازدياد حجم الورم حيث بلغ القيمتين 43.88% و 41.52% في حالتي حجم الورم دون 3.3 سم وأكبر من 3.3 سم على الترتيب. تبين عند استخدام اختبار student t لاختبار الفروق في متوسط نسبة الخلايا Th2 أن قيم p أكبر من 0.05، وبالتالي لا توجد فروقات ذات دلالة إحصائية بين متوسطات نسبة هذه الخلايا ضمن مجموعة مريضات السرطان باختلاف درجة نوتنغهام أو حالة تشكل أوعية جديدة أو حجم الورم، الجدول 4.

تم حساب متوسط نسبة الخلايا Th17 عند مريضات سرطان الثدي، حيث بلغ في حال عدم وجود نقائل (44.49%) وهو أقل من المتوسط في حال وجود نقائل (54.44%). تناقص متوسط نسبة الخلايا 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 Th17 في الأورام غير المترافقة مع أوعية جديدة (48.91%)، بينما تناقص المتوسط عند ترافق الورم مع أوعية جديدة (48.74%)، وفيما يخص حجم الورم فقد ازداد متوسط نسبة Th17

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

الجدول 5. اختبار student t لمقارنة متوسط نسبة الخلايا Th17 عند مجموعة مريضات السرطان بحسب بعض خصائص الورم.

قيمة p	قيمة F	أعلى قيمة	أدنى قيمة	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط	العدد	الدرجة	
0.481	0.839	98.08	81.81	3.47	6.95	91.64	4	1	Th1
		98.02	2.31	5.21	24.46	74.76	22	2	
		100.00	11.45	8.26	28.60	83.08	12	3	
0.566	0.686	58.77	7.50	10.51	21.03	34.71	4	1	Th2
		89.47	0.24	5.00	23.47	39.80	22	2	
		54.84	26.40	2.29	7.93	46.92	12	3	
0.731	0.432	72.78	29.66	9.02	18.04	51.12	4	1	Th17
		98.32	17.44	4.60	21.57	49.59	22	2	
		70.48	23.60	4.49	15.56	49.89	12	3	

الجدول 6. اختبار التباين ANOVA لمقارنة متوسطات نسب الخلايا عند مجموعة مريضات السرطان بحسب درجة الورم.

المناقشة

أجريت على مرضى أنواع مختلفة من الأورام الصلبة من بينها سرطان الثدي¹⁸ كذلك في دراسة Li وزملائه جرت مقارنة نسبة الخلايا Th1 لدى مرضى سرطان الخلايا الكلوية مع نسبتها لدى مجموعة الأصحاء، حيث ظهر تناقص يعتد به في نسبة هذه الخلايا لدى المرضى، وعندما قورنت هذه النسبة مع خصائص الورم ظهرت علاقة هامة إحصائياً بين تناقص خلايا Th1 وازدياد درجة الورم.¹⁹

بالمقابل بينت دراسة Lu وزملائه تزايد نسبة الخلايا Th1 في الدوران عند مرضى لمفوما لاهودجكن بخلايا B مقارنة مع الأصحاء.²⁰ وبشكل مشابه ازدادت نسبتها في الدم المحيطي لمريضات بسرطان عنق الرحم، وعند مقارنة هذه النسبة مع خصائص الورم لدى مجموعة المرضى كانت النتائج مشابهة لدراستنا، حيث لم تظهر أي علاقة هامة مع حجم أو درجة الورم أو مع تشكل أوعية جديدة للورم.²¹ يتبين مما سبق أن نسبة الخلايا Th1 لم تختلف عند مرضى السرطان في بعض الدراسات ومنها دراستنا، بينما ازدادت أو تناقصت في البعض الآخر وقد يُعزى هذا الاختلاف إلى اختلاف نوع الورم.

جرى في الدراسة الحالية تحديد مستويات أنواع الخلايا التائية المساعدة Th1 وTh2 وTh17 وذلك بعد عزل خلايا PBMCs من الدم المحيطي لمريضات بسرطان الثدي ومريضات بأورام حميدة في الثدي، وذلك بهدف معرفة دور هذه الخلايا في سرطان الثدي عبر ربط نسب هذه الخلايا مع معالم الورم. تم التعبير عن مستويات الخلايا كنسبة مئوية من مجموع خلايا Th (CD4+).

حُدِّدَت نسبة الخلايا Th1 باعتبارها المفاويات إيجابية CD4+ المنتجة لـ IFN γ ، وتبين أن نسبتها عند مريضات السرطان أعلى منها عند مريضات الأورام الحميدة دون أهمية تُذكر، كذلك لم تختلف هذه النسبة بشكل هام باختلاف معالم الورم عند مريضات السرطان. بشكل مشابه لم تتغير نسبة الخلايا Th1 في الدم المحيطي للمرضى مقارنة مع الأصحاء في دراسة Liu وزملائه على مرضى سرطان المعدة.¹⁷ بينما تناقصت نسبة Th1 بالمقارنة مع الأصحاء في دراسة

اقتصرت دراسة أخرى على مريضات سرطان الثدي القنوي الغازي، حيث تزايدت فيها نسبة الخلايا Th17 في الدم المحيطي عند المريضات بالمقارنة مع الصحيحات.²⁴ وعندما أُجريت دراسة على مرضى أنواع مختلفة من الأورام الصلبة من بينها سرطان الثدي تساوت نسبة Th17 بين المرضى والأصحاء.¹⁸ يمكن أن يُفسر هذا التباين في النتائج حول نسبة Th17 باختلاف تصنيف المريضات في كل دراسة، حيث صُنفت المريضات اعتماداً على مرحلة الورم في دراسة Wang وعلى غزو الورم وتوضّعه في نسيج الثدي في دراسة Benevides الذي اختار مجموعة مريضات السرطان القنوي الغازي دون غيرهن من المريضات، بينما ضمّت دراستنا مريضات سرطان الثدي تم تصنيفهنّ حسب درجة الورم (وليس المرحلة stage) وحسب نوع الورم (توضّعه) وغزو الورم دون أي استبعاد لاحق لأي صنف من المريضات.

تناقضت كذلك نتائج الدراسات حول نسبة Th17 على مرضى بسرطانات مختلفة، فعلى سبيل المثال ازدادت نسبة الخلايا Th17 في الدم المحيطي لمريضات سرطان عنق الرحم،²⁵ دون وجود علاقة هامة مع حجم أو درجة الورم أو تشكيل أوعية جديدة،²¹ كما ارتفعت نسبة الخلايا Th17 لدى مرضى ابيضاض الدم النقوي الحاد AML،²⁶ ومرضى سرطان الخلايا الكبدية²⁷ ومرضى سرطان الخلايا الكلوية بالمقارنة مع الأصحاء، كما ظهرت زيادة هامة لنسبة هذه الخلايا مع زيادة درجة الورم.¹⁹ ظهرت كذلك زيادة هامة في نسبة الخلايا Th17 عند مرضى سرطان المعدة،¹⁷ وارتبطت هذه الزيادة بشكل هام مع تشكّل النقائل إلى العقد اللمفية.²⁸ وبالمقابل أظهرت دراسة Lu وزملائه نتائج مناقضة لما سبق حيث تناقصت نسبة الخلايا Th17 في الدوران لدى مرضى لمفوما لاهودجكن بخلايا B لدى مقارنتهم مع الأصحاء.²⁰

وفي محاولة تفسير النتائج المتناقضة حول دور Th17 في الورم فقد بيّنت الدراسات أن الخلايا Th17 يمكن أن تتواجد بأنماط ووظائف مختلفة تبعاً لنوع الورم وحسب المحفزات التي تلقاها، ولكن ذلك يحتاج إلى المزيد من الإثبات نظراً لقلّة عدد الدراسات المجراة على كل نوع من السرطان.¹⁰

الاستنتاجات والتوصيات

ظهر في دراستنا زيادة هامة في نسبة الخلايا Th2 (دون Th1 أو Th17) في الدم المحيطي عند مريضات سرطان الثدي المترافق مع نقائل إلى العقد اللمفية. تشير النتائج هذه إلى أن الخلايا Th2 قد تلعب دوراً هاماً في تحريض تشكّل النقائل في سرطان الثدي. يحتاج تأكيد النتائج هذه إلى إجراء دراسات إضافية تشمل عدداً أكبر من المريضات،

حُدّدت نسبة الخلايا Th2 باعتبارها للمفاويات إيجابية CD4+ المنتجة لـ IL-4، وتبين أن نسبتها عند مريضات السرطان أعلى منها عند مريضات الأورام الحميدة دون أهمية تُذكر، وعند ربط نسبتها مع معالم الورم عند مريضات السرطان اقتصرت الأهمية الإحصائية على تزايد نسبتها في الحالات المترافقة مع نقائل إلى العقد اللمفية، الأمر الذي يشير إلى فعالية الخلايا Th2 المحرّضة لتشكّل النقائل. أوضحت دراسة Denardo وزملائه على نماذج فأرية لسرطان الثدي أن دور الخلايا Th2 في زيادة الغزو والنقائل يتم عبر تنظيم ووظائف البالعات المتعلقة بالورم، الأمر الذي ينتج عنه تفعيل إشارة مستقبل عامل النمو البشري EGFR في الخلايا الظهارية الثديية السرطانية مما يزيد من تشكّل النقائل.²²

ازدادت كذلك نسبة Th2 عند مجموعة المرضى زيادة هامة مقارنة مع الأصحاء في دراسة أُجريت على 47 مريضاً ومريضة بأنواع مختلفة من الأورام الصلبة من بينهم 3 مريضات بسرطان الثدي، حيث تم اختيار جميع المرضى ممن يعانون من أورام متقدمة مترافقة مع نقائل متعددة،¹⁸ وهذا يتوافق مع دراستنا حول دور هذه الخلايا (Th2) في تشكّل النقائل.

اختلفت الدراسة الحالية مع دراسة Li وزملائه على مرضى سرطان الخلايا الكلوية تبيّن فيها زيادة نسبة الخلايا Th2 بالمقارنة مع الأصحاء، وعند مقارنة هذه النسبة مع خصائص الورم تبيّن وجود علاقة يعبّر بها مع درجة الورم، حيث اعتمد Li في قياس نسبة الخلايا Th2 على طريقة التدفق الخلوي عبر تلوين سطوح الخلايا بأضداد CD4 وتلوين داخل الخلايا باستخدام أضداد عامل الانتساخ GATA-3 الخاص بالخلايا Th2،¹⁹ بينما اعتمدنا في دراستنا على أضداد IL-4 في التلوين داخل الخلوي باعتبارها السيتوكين الأساسي الذي تنتجه الخلايا Th2.

حُدّدت نسبة الخلايا Th17 باعتبارها للمفاويات إيجابية CD4+ المنتجة لـ IL-17، وتبين أن نسبتها لدى مريضات السرطان أقل منها لدى مريضات الأورام الحميدة ولكن لم يكن هذا التناقض هاماً، إضافةً إلى عدم ظهور فروق هامة عند مقارنة نسب هذه الخلايا تبعاً لمعالم الورم. قام كذلك Wang وزملائه بتحديد نسبة الخلايا Th17 في الدم المحيطي لدى 27 مريضة سرطان الثدي تم تقسيمهنّ حسب مرحلة المرض إلى مريضات المراحل المبكرة (مريضات المرحلة I) ومريضات المراحل المتقدمة (مريضات المراحل VI-II)، حيث لم تظهر فروقات يعبّر بها في نسبة الخلايا Th17 بين مريضات المراحل المبكرة لسرطان الثدي والصحيحات، بينما تناقصت نسبة هذه الخلايا عند مريضات المراحل المتقدمة عند مقارنتها مع الصحيحات.²³

وHer-2). كل ما سبق يمكن أن يساعد في إيجاد أهداف علاجية جديدة عند مريضات سرطان الثدي.

أو تصنف مريضات سرطان الثدي تصنيفاً نسيجياً (غاز أو لابند) أو تصنيفاً جزيئياً (حسب حالة مستقبلات الاستروجين والبروجسترون

REFERENCES

1. International agency for research on cancer. www.iarc.fr.
2. Mittal D, Gubin M, Schreiber R, et al. New insights into cancer immune-editing and its three component phases: elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014;27:16-25.
3. Hadrup S, Donia M, Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment* 2013;6:123-33.
4. Terhune J, Berk E, Czerniecki B. Dendritic cell-induced Th1 and Th17 cell differentiation for cancer therapy. *Vaccines* 2013;1:527-49.
5. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8:223-46.
6. Huang M, Wang J, Lee P, et al. Human non small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 1995;55:3847-53.
7. Ubukata H, Motohashi G, Tabuchi T, et al. Evaluations of interferon- γ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2010;102(7):742-7.
8. Kaiko G, Horvat J, Beagley K, et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2007;123:326-38.
9. Bailey S, Nelson M, Himes R, et al. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol* 2014;5:276-309.
10. Punt S, Langenhoff J, Putter H, et al. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review. *Onco Immunol* 2015;4(2):1-10.
11. Guéry L, Hugues S. Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity. *Bio Med Res Intern* 2015:1-11.
12. Amicarella F, Muraro M, Hirt C, et al. Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut* 2017;66(4):692-704.
13. Zhang J, Yan J, Xu J, et al. Increased intra-tumoral IL-17 producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009;50(5):980-9.
14. 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.
15. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, et al. Tumor-infiltrating CD4+Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol Rep* 2011;25(5):1271-7.
16. 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.
17. Liu T, Peng L, Yu P, et al. Increased circulating Th22 and Th17 cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer. *J Clin Immunol* 2012;32:1332-9.
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. *Intern Immunopharmacol* 2014;18:90-7.
19. 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.
20. 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.
21. Zhang W, Tian X, Mumtahana F, et al. The existence of Th22, pure Th17 and Th1 cells in CIN and cervical cancer along with their frequency variation in different stages of cervical cancer. *BMC Cancer* 2015;15:717-27.
22. DeNardo D, Baretto J, Andreu P, et al. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009;16:91-102.
23. 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 Intern Med Res* 2011;39:691-701.
24. 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.
25. 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.*
26. 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.
27. Qin S, Ma S, Huang X, et al. Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chin J Cancer Res* 2014;26(2):135-41.
28. 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.