

مقایسه میزان بیان کموکاین های CCL₂/CCR₂ و CCL₅/CCR₅ در بیماران مبتلا به ترانزیشنال سل کارسینومای مثانه در سطح mRNA و پروتئین قبل و بعد از جراحی رزکسیون ترانس اورترال (TUR)

مژگان موگوئی^{۱*}، غلامحسین حسن شاهی^۲، حسین خرمدل آزاد^۳، مریم موگوئی^۴، شیرین فتح پور^۵

(۱) گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

(۲) مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

(۳) گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

(۴) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۵

چکیده

مقدمه: شبکه پیچیده کموکاین ها و رسپتور آن ها نقش مهمی در گسترش و متاستاز تومورها دارد. این مطالعه به بررسی میزان بیان mRNA ی CCR₂ و CCR₅ و هم چنین سطح سرمی CCL₂ و CCL₅ در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول های ترانزیشنال مثانه قبل و بعد از عمل TUR می پردازد.

مواد و روش ها: در این تحقیق پیش رو ۴۰ نفر بیمار مرد مبتلا به Transitional Cell Carcinoma (TCC) و ۴۰ نفر مرد سالم وارد مطالعه شدند. نمونه های خون قبل از TUR و ۲۸ روز بعد از آن جمع آوری شد. هم چنین از ۱۲ نفر از این بیماران، بافت توموری و بافت نرمال در حین عمل گرفته شد. بیان ژن CCR₂ و CCR₅ از نمونه بافت سالم و توموری به صورت ظاهری (Gross) و هم چنین در PBLs با استفاده از تکنیک Real-Time PCR مشخص شد. سطح پروتئین CCL₂ و CCL₅ در PBLs با استفاده از تکنیک الیزا بررسی شد. یافته ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با سطح معنی داری $P < 0.05$ آنالیز شد.

یافته های پژوهش: بیان ژن CCR₂ و CCR₅ در بافت توموری نسبت به بافت سالم و در PBLs بعد از عمل TUR نسبت به قبل از عمل، افزایش معنی داری نشان می دهد ($P < 0.05$). در بررسی سطح سرمی CCL₂ و CCL₅ در افراد مبتلا به TCC نسبت به افراد نرمال افزایش معنی داری نشان می دهد ($P < 0.05$). در این بررسی سطح سرمی CCL₂ و CCL₅ رفتار متمایزی نشان می دهد، بدین صورت که سطح سرمی CCL₂ بعد از عمل TUR به طور معنی داری افزایش و سطح سرمی CCL₅، به طور معنی داری کاهش دارد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده تغییرات محور کموکاین/رسپتور CCL₂/CCR₂ در بافت توموری نسبت به بافت سالم و هم چنین در PBLs است که بعد از عمل TUR نسبت به قبل از عمل، افزایش معنی داری نشان می دهد تغییرات محور کموکاین/رسپتور CCL₅/CCR₅ متفاوت می باشد و سطح سرمی CCL₅، به طور معنی داری کاهش پیدا کرده است. به نظر می رسد ماهیت سلول های توموری در تولید و بیان CCL₂/CCR₂ و CCL₅/CCR₅ متفاوت عمل کرده است. در حالی که به طور کلی انتظار داریم با پیشرفت تومور میزان لیگاند و رسپتور افزایش پیدا کرده باشد که حائز اهمیت بوده و نیاز به بررسی های بیشتر آن به خصوص در تومورهای توپر را نشان می دهد. از طرفی حذف فیزیکی تومور نقش عمیقی در بیان و ترشح کموکاین های مورد نظر نداشته است.

واژه های کلیدی: کارسینوم سلول های ترانزیشنال، CCR₂، CCR₅، CCL₂، CCL₅

* نویسنده مسئول: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

Email: mozhganmoogooei@yahoo.com

مقدمه:

کارسینوم مثانه از نظر بروز، چهارمین سرطان شایع در مردان و در خانم ها هشتمین سرطان شایع است. این تومور ۶/۲ درصد از کل بدخیمی های مردان و ۲/۵ درصد از کل بدخیمی های زنان را تشکیل می دهد. تومورها در یک ریز محیط غنی سلولی قرار گرفته اند که تعامل آن با محیط سلولی اطراف در بقا، پیشرفت و متاستاز تومور موثر است. شناخت این محیط و واسطه های آن در شناخت ماهیت سرطان بسیار حائز اهمیت است (۱). بسیاری از سرطان ها یک شبکه قوی از کموکاین ها و گیرنده آن ها را بیان می کنند (۲). سلول های توموری به کمک بیان ژن های کموکاین و سایتوکاین ها سبب تحریک سلول های اندوتلیال شده که در نتیجه مهار تماسی خود را از دست می دهند و به کمک مهاجرت، تکثیر و تمایز رگ های جدید را به وجود می آورند (۳). این رگ ها علاوه بر تامین نیازهای متابولیکی سلول های سرطانی، به عنوان راهی برای تهاجم و متاستاز سلول های سرطانی به بافت های دیگر عمل می کنند (۴). CXC کموکاین ها بر روی لنفوسیت ها و نوتروفیل ها اثر گذاشته و باعث فراخوان این سلول ها به سمت سلول های سرطانی می شود (۵) از طرفی CC کموکاین ها با اثر بر ماکروفاژها باعث تولید گروهی از پروتئازها می شود که این پروتئازها از بدخیمی و رگزایی سلول های توموری جلوگیری می کند (۶،۷). بنا بر این، CC کموکاین ها دارای نقش موثری در تحریک یا مهار آنژیوژن دارند. در واقع در بسیاری از سرطان ها یک توازن بین فعالیت های رگزایی و ضد رگزایی تومور وجود دارد که بقاء و پیشرفت تومور را متأثر از خود می کند که مسئولیت این عملکرد مهم را CC کموکاین ها بر عهده دارند (۸). مطالعات نشان می دهد TNF α و IL-1 β سبب افزایش ترشح CCL₂ و CCL₅ در سلول های توموری می شوند علاوه بر این TNF α و IL-1 β سبب افزایش فعالیت های تومور زایی می شود که این عمل در ارتباط با توانایی و عملکرد CCL₂ و CCL₅ در ایجاد و پیشرفت سرطان است. بنا بر این مسیر التهابی سبب افزایش سیتوکین ها می شود و نهایتاً سیتوکین ها بر کموکاین ها اثر افزایشی دارند. TGF- β که به

عنوان یک فاکتور عروق زایی شناخته شده است. افزایش میزان TGF- β در بیماران مبتلا به برخی سرطان ها سبب افزایش واسکولاریتی (پر عروقی) بافت توموری شود. TGF- β به عنوان یک فاکتور عروق زایی، توسط CCL₂ هدایت می شود؛ به این صورت که ایجاد هایپوکسی در سلول های توموری سبب برانگیختگی سلول های اپیتلیالی شده و در نتیجه آن CCL₂ افزایش یافته و به دنبال آن TGF- β افزایش می یابد و سبب افزایش پیشرفت و متاستاز در سرطان می شود (۹،۱۰).

مطالعات نشان می دهند در واقع شاخصه های اصلی و بازوی اصلی گسترش تومور (tumor supporting)، CCL₂ و CCL₅ است. MCP-1 (CCL₂ پروتئین جاذب مونوسیت ۱ (۱۱))، کموکاینی است از دسته کموکین های گروه CC که توسط مونوسیت ها و ماکروفاژها و سلول های دندریتیک در حال آزدگی تولید و باعث فراخواندن مونوسیت ها و بازوفیل ها می شود (۱۲).

کموکاین CCL₅ (RANTES) (۱۳): کموکاینی است از دسته کموکاین های گروه CC که به طور عمده توسط Tcell و پلاکت ها تولید می شود و باعث فراخواندن مونوسیت ها و ماکروفاژها و Tcell ها می شود و همین طور دارای خاصیت آنژیوژنک نیز می باشد (۱۴). CCL₂ و CCL₅ در محل تومور همانند یک فاکتور جذب کننده لکوسیت ها عمل می کنند و باعث فراخوانی مونوسیت ها به موضع تومور می شوند (۱۵،۱۶). مونوسیت ها در تومور به tumor associated macrophage (TAM) تمایز پیدا می کنند. TAM فاکتورهایی را تولید می کنند که در رگزایی بسیار موثرند. از جمله این فاکتورها می توان به VEGF (vascular epidermal growth factor) و EGF (epidermal growth factor) اشاره کرد (۱۷،۱۸). VEGF از فاکتورهای مهم رگزایی در TCC است (۱۹).

CCL₂ و CCL₅ بر هم زنده های بالانس لکوسیتی در محل تومور به نفع افزایش فعالیت تومور می باشند. به این صورت که باعث افزایش مهارکننده های مشتق از میلوئید (MDC) و به طبع آن باعث

فراخوانی Treg و TH17 به محل تومور می شود. برابند فراخوانی این سلول ها موجب مهار سلول های کشنده تومور و مهار پاسخ های ایمنی سلولی و ایمنی همورال و فرار تومور از مکانیسم های دفاعی بدن و در نتیجه رشد تومور می شود. هم چنین CCL2 سبب مهاجرت سلول های اندوتلیال به سایت تومور می شود که باعث رشد تومور می شود (۱،۲۰). علی رغم بررسی های انجام شده، دانش ما در ارتباط با کموکاین ها و تغییرات بیان ژن و سطح لیگاند آن در کارسینوم مثانه در انسان محدود است. از این رو در این مطالعه مقطعی به بررسی بیان محور کموکاین/رسپتور CCR2/CCL2 و CCR5/CCL5 که نقش مهمی در گسترش تومور توپر و متاستاز آن دارند، در بیماران مبتلا به TCC مثانه قبل و بعد از عمل TUR پرداخته شد. این بررسی با اندازه گیری بیان ژن رسپتور CCR2/CCR5 در بافت تومورال TCC و مقایسه آن با بافت سالم به صورت ظاهری (GROSS) در جراحی TUR و در PBLs قبل و ۲۸ روز بعد از عمل TUR انجام شد. هم چنین سطح CCL2/CCL5 در نمونه سرم بیماران قبل و ۲۸ روز بعد از عمل TUR و مقایسه آن با افراد سالم همسان انجام شد تا نتیجه حذف فیزیکی تومور توسط عمل TUR در بیان ژن و ترشح این کموکاین ها بررسی شود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر می تواند پیش زمینه ای جهت بررسی تغییرات rich cell microenvironment در بیماران مبتلا به کارسینوم مثانه و شناخت مکانیسم (های) تغییرات آن باشد.

مواد و روش ها

انتخاب بیماران: در یک مطالعه در بیمارستان شهید باهنر کرمان، یکی از استان های ایران، به مطالعه دو محور کموکاین/رسپتور CCR2/CCL2 و CCR5/CCL5 در طول دو سال (۱۳۹۱-۱۳۹۳) در بیماران مبتلا به TCC مثانه پرداخته شد. بیماران که کاندیدای جراحی TUR برای حذف کامل تومور بودند به شرط این که هیچ گونه داروی شیمی درمانی دریافت نکرده و در صورتی که تومور در مرحله T1 باشد وارد مطالعه این طرح شدند. بیماران با سابقه بیماری هایی مانند آسم، آلرژی، آرتریت روماتوئید، تروما، عفونت های دستگاه ادراری، دیابت، HIV و هر

گونه عفونت شدید در ۶ ماه گذشته از مطالعه حذف شدند. هم چنین بیمارانی که بعد از عمل ب.ت.ژ. (BCG) یا میتومايسين دریافت کرده بودند، به دلیل افزایش التهاب و ایجاد تداخل در بررسی صحیح سطح سرمی و میزان بیان RNA این دو کموکاین از مطالعه خارج شدند. نمونه گیری در سه مرحله اصلی صورت گرفت که قبل از عمل جراحی TUR، هنگام عمل و ۲۸ روز بعد از عمل جراحی بوده است. ۱cc از خون بیمار جهت استخراج RNA و ۴ سی سی از خون بیمار جهت جداسازی سرم مورد استفاده قرار گرفت. در هنگام عمل، مقداری از نمونه بافت سالم (بافت مجاور سلول های توموری) و توموری به صورت ظاهری (Gross) طبق تشخیص جراح جهت بررسی (تحت شرایط حفظ زنجیره سرد توسط تانک ازت) به آزمایشگاه دانشکده علوم پزشکی رفسنجان جهت تخلیص RNA و مقدار دیگری از آن جهت تشخیص و تعیین درجه به دپارتمان پاتولوژی ارسال شده است. از نمونه بافت سالم و توموری به صورت ظاهری (Gross) بیماران ۲۸ روز پس از عمل فراخوانده شده و از آن ها برای انجام تست های ESR و CRP نمونه گیری می شود. این کار به منظور بررسی التهاب ناشی از جراحی و عفونت های ناشی از آن و اطمینان از مرتفع شدن آن به عمل می آید که در صورت منفی بودن، بیماران در مطالعه حفظ شدند. از ۴۰ نفر از افراد مراجعه کننده غیر مبتلا به TCC که با گروه مبتلا به TCC تقریباً در یک گروه سنی بودند به عنوان گروه کنترل طبق روش بالا نمونه خون جمع آوری شد. این افراد نیز از لحاظ بیماری هایی مثل آسم، آلرژی، آرتریت روماتوئید، تروما، عفونت های دستگاه ادراری، دیابت، HIV و هر گونه عفونت شدید در ۶ ماه گذشته تظاهرات مثبت نداشته اند. این مطالعه با تصویب و بر طبق پروتکل کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی باهنر انجام شد. در صورت عدم رضایت بیماران در ورود به طرح یا خروج از آن، هیچ گونه تداخلی در خدمات و پیگیری بیماران به وجود نیامد.

استخراج RNA: جهت تعیین میزان بیان ژن CCR2 و CCR5 استخراج mRNA از بافت ها و PBLs توسط کیت شرکت پارس طوس طبق پروتکل

پروتئین را مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱). پس از سنتز cDNA (۲۲) طراحی پرایمرها توسط نرم افزار Beacon designer V ۷,۹۱ جهت انجام تست RT-PCR صورت گرفت (جدول شماره ۱).

کیت انجام شد. برای اطمینان از خلوص RNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و رنگ اتیدیوم بروماید استفاده می گردد که این روش سالم بودن RNA را تأیید می کند. در انتها با استفاده از اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر میزان RNA و

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه به همراه ژن کنترل

gene	Forward	Reverse
CCR ₂	AGCCACAAGCTGAACAGAGA	CTTCACCGCTCTCGTTGGTA
CCR ₅	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC	CCTGTGCCTCTTCTCTCATTTCG
Bactin	ACTCTTCCAGCCTTCCTT	TACAGGTCTTTGCGGATG

یافته های پژوهش

نتایج برآمده از آنالیزهای RT-PCR برای بررسی بیان ژن CCR₂ نشان می دهد که میزان بیان ژن CCR₂ در PBLs قبل و بعد از TUR به ترتیب ۱/۰۰±۰/۳۰ و ۳/۴۹±۱/۰۳ می باشد (P=۰,۰۰۱۱) این میزان برای ژن CCR₅ به ترتیب ۱/۰۰±۰/۳۹ و ۴/۹۱±۳/۰۸ می باشد. بیان ژن CCR₂ و CCR₅ بعد از TUR افزایش معنی داری نشان می دهد (P=۰,۰۰۶۵) (نمودار شماره ۱).

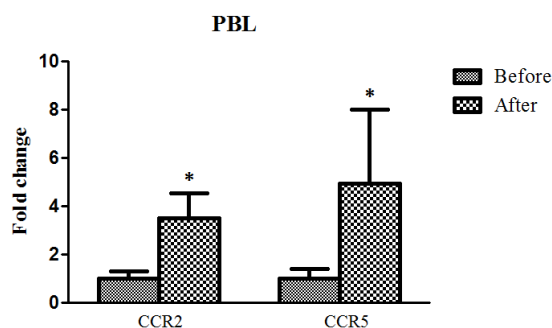
هم چنین میزان بیان ژن CCR₂ و CCR₅ در بافت توموری با میزان بیان ژن در بافت نرمال (Bystander) خود بیمار (به عنوان کنترل) مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در نمودار شماره ۲ مشخص است، این میزان برای ژن CCR₂ در بافت توموری و نرمال به ترتیب ۲/۹۴±۰/۶۳ و ۱/۲±۰/۱۵ (P=۰,۰۰۰۶) و برای ژن CCR₅ در بافت توموری و نرمال به ترتیب ۴/۵۲±۰/۸۷ و ۱/۰۰±۰/۱۹ می باشد (P=۰,۰۰۸۲) که در بافت تومورال افزایش معنی داری نشان می دهند (نمودار شماره ۲). سطوح mRNA کدکننده ژن های اختصاصی یاد شده با روش RT-PCR که نسبت به سطح mRNA بتا اکتین (ژن خانه گزین) سنجش شده است. همه گروه ها بر اساس فرمول $2^{-\Delta Ct}$ method سنجیده شده است. میانگین میزان سطح سرمی CCL₂ قبل از TUR، ۲۸ روز بعد از TUR و هم چنین در افراد نرمال به ترتیب برابر با ۱۱۵۱±۶۶/۷۶ pg/ml

تست الایزا جهت تعیین سطح سرمی CCL₂ و CCL₅ برای انجام تست الایزا از کیت ۹۶ تستی کمپانی R&D (طبق پروتکل) استفاده شد. نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانش شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده به همراه استانداردها را داخل چاهک ها ریخته پس از انکوبه کردن و شست و شو آنتی بادی ضد CCL₂/CCL₅ را اضافه می کنیم و مجدداً انکوبه کرده و عمل شست و شو را انجام می دهیم. سپس آنزیم HRP را به چاهک ها اضافه می کنیم و روی چاهک ها می پوشانیم و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه می کنیم. عمل شست و شو را مجدد انجام داده و پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا را اضافه می کنیم و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی مجدد انکوبه می کنیم. سپس محلول متوقف کننده را اضافه کرده و در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانش می کنیم.

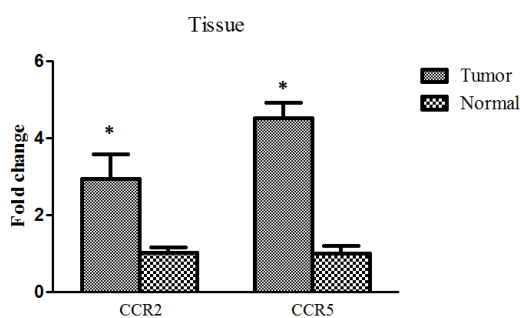
روش تجزیه و تحلیل آماری: پس از جمع آوری داده ها، داده ها را به صورت کد ویژه وارد رایانه نموده و سپس برای تجزیه و تحلیل آن از نرم افزار SPSS ۲۱.۰ و آزمون آماری با توجه به این که الگوی بیانی ژن پروتئین پیش التهابی و میانگین سطح سرمی پروتئین پیش التهابی متغیر کمی پیوسته می باشند بنا بر این برای مقایسه در زمان های مختلف از آزمون T-TEST استفاده شد.

۳۳۰/۷±۹/۴۹۵ pg/ml، ۱۲۹۰±۶۳/۰۲ pg/ml
 ۲۲۵/۴±۱۷/۴۸ pg/ml گزارش شده
 است(نمودار شماره ۴). سطح سرمی CCL۵
 قبل از TUR نسبت ۲۸ روز بعد از آن به طور
 معنی داری کاهش یافته است. این سطح
 در مقایسه با افراد نرمال افزایش معنی داری
 دارد.

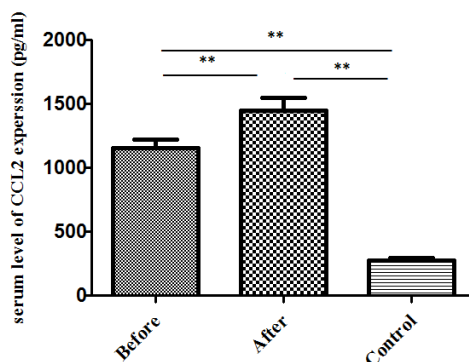
۱۴۴۷±۱۰۱/۴ pg/ml، ۲۷۵/۰±۱۵/۷۸ pg/ml به
 دست آمد(نمودار شماره ۳). سطح سرمی CCL۲ در ۲۸
 روز بعد از TUR به طور معنی داری افزایش یافته
 است. این میزان نسبت در مقایسه با افراد نرمال
 افزایش معنی داری را نشان می دهد. در بررسی دیگر
 میانگین میزان سطح سرمی CCL۵ قبل از TUR، ۲۸
 روز بعد از TUR و در افراد نرمال به ترتیب برابر با



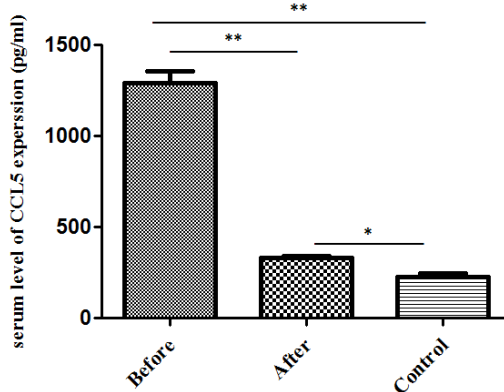
نمودار شماره ۱. تغییرات بیان ژن CCR^۲ و CCR^۵ در PBL قبل و بعد از TUR
 (Mean±SD)(P<۰.۰۵) * اختلاف معنی دار



نمودار شماره ۲. تغییرات بیان ژن CCR^۲ و CCR^۵ در بافت توموری و بافت نرمال
 (Mean±SD)(P<۰.۰۵) * اختلاف معنی دار



نمودار شماره ۳. تغییرات میزان سطح سرمی پروتئین CCL₂ قبل، بعد از TUR و گروه کنترل
* اختلاف معنی دار (Mean±SD) $P < 0,005$



نمودار شماره ۴. تغییرات میزان سطح سرمی پروتئین CCL₅ قبل، بعد از TUR و گروه کنترل
* اختلاف معنی دار (Mean±SD) $P < 0,005$

بحث و نتیجه گیری

عملکرد CCL₂ به عنوان یک جاذب شیمیایی (Chemoattractant) از طریق اتصال به گیرنده خود روی مونوسیت ها، ماکروفاژها و لنفوسیت ها می باشد. در پاسخ های التهابی حاد، CCL₂ به طور فعال در فراخوان مونوسیت ها به محل التهاب نقش دارد. در سرطان پروستات سطح سرمی CCL₂ در بیماران با متاستاز نسبت به سطح CCL₂ در موضع پروستات بیشتر می باشد که نشان از اهمیت این کموکاین دارد (۲۳). چندین بررسی دیگر نیز نشان داده اند که CCL₂ در سرم بیماران مبتلا به سرطان افزایش می یابد (۲۴، ۲۵). در یک مطالعه از ۳۹ بیمار مبتلا به

سرطان پروستات، در مراحل مختلف نشان داده شده است که افزایش CCL₂ سرم، با بیماری های متاستاز استخوانی مرتبط است که امکان استفاده از CCL₂ سرمی را به عنوان نشانگر پیش آگهی فراهم می سازد. علاوه بر این، سطح افزایش یافته ای از CCL₂ در سرم و در ارتباط با درجه تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان تخمدان و سرطان ریه گزارش شده است (۸) Hsiao-Ying Chiu و همکاران نشان دادند که میزان تولید CCL₂ به وسیله TCC (transitional cell carcinoma) با عود مجدد بیماری و پروگنوز ضعیف آن (۲۶)، رابطه مستقیم دارد (۲۷).

مطالعه حاضر ابتدا نشان داد میزان بیان $CCR2$ در بافت توموری با میزان بیان آن در بافت به ظاهر سالم مجاور مقایسه شد که میزان بیان $mRNA$ $CCR2$ در بافت توموری اختلاف معنی داری را نشان داد (نمودار شماره ۲). سطح سرمی $CCL2$ در بیماران مبتلا به TCC نسبت به سطح سرمی آن در افراد نرمال بیشتر می باشد. در گام بعدی با بررسی سطح سرمی $CCL2$ و میزان بیان $mRNA$ $CCR2$ در PBLs این بیماران قبل و بعد از TUR، شاهد افزایش قابل توجهی در سطح سرمی و میزان بیان $CCL2/CCR2$ بودیم که نشان دهنده افزایش یافتن هم زمان لیگاند و رسپتور است که با برهم خوردن Microenvironment تومور در اثر TUR، تولید این کموکاین ها در جهت گسترش تومور افزایش پیدا کرده است. در نتیجه حذف فیزیکی تومور که به صورت gross توسط جراح دیده می شود، تاثیری در کاهش بیان ژن و ترشح کموکاین نداشته است. این موضوع هم چنین می تواند در نتیجه افزایش درجه grade تومور باشد. در مطالعه Chiu, H.-Y و همکاران (۲۷) نشان داده شده است که سلول های سرطانی با درجه بالا high grade نسبت به low grade سطوح بالاتری $CCL2$ بیان می کنند و فعالیت مهاجرت بیشتری نشان می دهند. اگر چه فعال شدن سیگنال های $CCL2/CCR2$ به طور محسوسی روی رشد سلول تاثیر نمی گذارد، باعث مهاجرت سلولی و تهاجم از طریق فعال شدن پروتئین کیناز C و فسفوریلاسیون تیروزین در paxillin می شود. مسدود کردن $CCL2$ و $CCR2$ با small heparin RNA ($shCCL2$) باعث مهار مهاجرت سلول از طریق $CCL2/CCR2$ شده است (۲۷). به نظر می رسد این افزایش بیان $CCR2/CCL2$ در بافت توموری و PBLs در کموتاکسی و فراخوان سلول های عمل کننده ایمنی به محل بافت تومور و روند گسترش سلول های توموری جهت فراگیرتر شدن بافت تومور کمک می نماید.

تمرکز ما در ادامه روی $CCL5$ و گیرنده آن، $CCR5$ بوده است. $CCL5$ ، ژن هدف فعالیت NF- κ B است که توسط لنفوسیت های T، ماکروفاژها، پلاکت ها، فیبروبلاست های سینوویال و اپیتلیوم و

انواعی از سلول های توموری بیان می شود. NF- κ B توسط محرک های مختلف مانند $CD40L$ و یا $IL-15$ تولید $CCL5$ را القاء می کند. $CCL5$ دارای نقش مهمی در فراخوان انواع لکوسیت ها از جمله سلول های T، ماکروفاژها، ائوزینوفیل ها و بازوفیل به محل های التهابی است. $CCL5$ با همکاری برخی از سایتوکاین ها که توسط سلول های T (مانند $IL-2$ و $IFN-\gamma$) ترشح می شود باعث فعال شدن و گسترش سلول های کشنده طبیعی خاص می شود که باعث افزایش تولید CC chemokine های سلول های کشنده می شود (۲۸). تعامل $CCL5/CCR5$ ممکن است به نفع رشد تومور به شکل های مختلف، از جمله عامل رشد، محرک رگزایی، تعدیل کننده ماتریکس خارج سلولی، فراخوان کننده سلول های التهابی و شرکت در مکانیسم های فرار تومور از سیستم ایمنی بدن باشد.

در این مطالعه نشان داده شد که سطح سرمی $CCL5$ در بیماران مبتلا به TCC نسبت به سطح سرمی آن در افراد نرمال بیشتر می باشد. در ادامه به بررسی سطح سرمی $CCL5$ و میزان بیان $mRNA$ $CCR5$ در PBLs این بیماران قبل و بعد از TUR پرداختیم. برخلاف نتایج بررسی $CCL2/CCR2$ ، شاهد کاهش در سطح سرمی $CCL5$ با وجود افزایش بیان $CCR5$ در PBLs هستیم. از طرفی میزان بیان $mRNA$ $CCR5$ در بافت تومور نسبت به بافت ظاهراً سالم مجاور (Bystander) مانند $CCR2$ افزایش معنی داری را نشان داده است (نمودار شماره ۲) اگر چه مطالعات نشان می دهد $CCL5/CCR5$ در پیشرفت تومور در کانسر پستان افزایش می یابد (۲۹)، مطالعات محدودی در مورد تغییرات $CCL5/CCR5$ در تومورهای توپر solid وجود دارد. از طرفی این نقش ها از موثر بودن پاسخ ایمنی در مقابل تومور (۳۰) تا نقش آن در پیشرفت و متاستاز سرطان متغیر بوده است (۲۸).

به نظر می رسد ماهیت سلول های توموری در تولید و بیان $CCL2/CCR2$ و $CCL5/CCR5$ متفاوت عمل کرده است. در حالی که به طور کلی انتظار داریم با پیشرفت تومور میزان لیگاند و رسپتور افزایش پیدا کرده باشد، بررسی های بیشتری به صورت

در افزایش و یا کاهش رسپتور ها را تحت تاثیر قرار دهد. در واقع برد سایتوکاین ها در این ناحیه آن قدر نیست که بتواند در سلول های bystander بیان رسپتور های کموکاین ها را افزایش دهد. در این صورت در نمای gross تومور، فاصله بین سلول های درگیر (تومور سل) و سالم می تواند واقعی باشد. جهت بررسی برد سایتوکاین های موثر در بیان افزایش یافته رسپتور، می توان از مدل حیوانی مبتلا به کارسینوم مثانه استفاده کردو با تهیه بلوک های سریال، میزان بیان رسپتورها را با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی کرد. هم چنین با آنالیز فلوسایتومتری و یا با روش هایی مانند ایمونوهیستوشیمی میزان بیان و نیز شدت بیان این گیرنده ها (CCR₂, CCR₅) در سلول های توموری TCC و نسبت مداخله این مدیاتورهای بیولوژیک در سرطان زایی و نیز میزان درگیری بافت های سرطانی را می توان مشخص کرد.

این مطالعه دارای محدودیت هایی می باشد. در درجه نخست، بیان لیگاند ها و رسپتور های مورد نظر در افرادی که TUR شده با وجود تومور خوش خیم مثانه بررسی نشده که بدانیم که آیا بیان لیگاندها و رسپتورها تحت تاثیر TUR بوده است یا نه. هم چنین ما به بررسی سلول های ایمنی در گیر در بافت قبل و بعد از عمل پرداخته ایم تا بتوانیم کلید بهتری برای تفسیر نتایج حاصل داشته باشیم. بررسی های تکمیلی با رده سلولی CELL LINE و مدل حیوانی می تواند به تبیین بهتر نقش کموکاین ها در rich cell microenvironment تومور مثانه کمک کند. مطالعه حاضر نشان دهنده تغییرات متفاوت محور کموکاین/رسپتور CCL₂/CCR₂ و CCL₅/CCR₅ می باشد که حائز اهمیت و نیاز بررسی های بیشتر آن به خصوص در تومورها توپر را نشان می دهد.

References

1. Benbaruch A. The tumor promoting flow of cells into within and out of the tumor site regulation by the inflammatory axis of TNF α and chemokines. *Cancer Microenviron* 2012; 5: 151-64.
2. Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* 2007; 26: 75-85.

بررسی مدل حیوانی و رده های سلول سرطانی CELL LINE برای بررسی نتایج قطعی مورد نیاز است. از طرفی حذف فیزیکی تومور به صورت gross تاثیر عمیقی بر بیان ژن و ترشح سیتوکاین ها نداشته است. این نتایج می بایست با نتایج عود این تومور در به نظر می رسد علاوه بر پیشرفت درجه تومور TUMOR GRADE، دست کاری ناحیه توموری هنگام TUR و نیز ترومای ناشی از آن باعث فراخوان سلول های بیان کننده گیرنده ها از یک سوی و تولید لیگاندهای آن ها در سوی دیگر و هم چنین آزاد شدن سلول های توموری و سلول های ایمنی مانند، Tcell و ماکروفاژ در موضع تومور باعث افزایش تولید سایتوکاین و کموکاین ها شود. طول عمر سلول آزاد شده ایمنی از محل تومور در هنگام دستکاری که گردش قرار گرفته اند و احتمالاً بیان کننده CCR₅ هستند، ممکن است دلیل افزایش CCR₅ باشند، در حالی که میزان لیگاند CCL₅ در بررسی سرم پایین است. هم چنین عمل TUR ممکن است مواجهه بسیاری از سلول های بیان کننده کموکاین را با سایتوکاین های خاص موضع تومور افزایش دهد که در نتیجه این مواجهه مضاعف، میزان بیان CCR₅ در سلول های ایمنی در گردش افزایش یافته به نظر رسد. این در حالی است که به علت حذف تومور یا ماهیت متفاوت محور کموکاین/رسپتور CCL₅/CCR₅ شاهد کاهش لیگاند در PBLs هستیم.

افزایش بیان رسپتور ها در بافت توموری نسبت به بافت bystander قابل انتظار است و در مورد هر دو محور کموکاین/رسپتور CCL₂/CCR₂ و CCL₅/CCR₅ دیده می شود. به نظر می رسد مشخصات بافت همبند در این ناحیه به گونه ای است که می تواند نفوذ و میزان توانایی سایتوکاین های موثر

3. Albin A. Somatostatin controls Kaposi sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J* 1999; 13: 647-55.
4. Bechara C. Growth related oncogene- α induces endothelial dysfunction through oxidative stress and downregulation of eNOS in porcine coronary arteries. *Am J*

- Physiol Heart Circ Physiol ۲۰۰۷;۲۹۳: ۳۰۸۸-۹۵.
۵. Kucukgergin C. The role of chemokine and chemokine receptor gene variants on the susceptibility and clinicopathological characteristics of bladder cancer. *Gene* ۲۰۱۲;۴۵: ۱۲۵.
۶. Micheli A. Contrasts in cancer prevalence in Connecticut Iowa and Utah. *Cancer* ۲۰۰۲; ۹۵: ۴۳۰-۳۹.
۷. Vandamme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine protease interactions in cancer. *Cancer Biol* ۲۰۰۴; ۲۲: ۱۳۱-۷.
۸. Zhang J, Lu Y, Pienta KJ. Multiple roles of chemokine (CC motif) ligand ۲ in promoting prostate cancer growth. *J National Cancer Ins* ۲۰۱۰; ۱۰۲: ۵۲۲-۲۸.
۹. Soria G. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL۲ and CCL۵ and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* ۲۰۱۱; ۱۱: ۱۳۰.
۱۰. Wilson TJ. Cathepsin G-mediated enhanced TGF-beta signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1. *Cancer Let* ۲۰۱۰; ۲۸۸: ۱۶۲-۹.
۱۱. Lin ZY, Chuang YH, Chuang WL. Cancer-associated fibroblasts up-regulate CCL۲, CCL۲۶, IL۶ and LOXL۲ genes related to promotion of cancer progression in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacotheraper* ۲۰۱۲; ۱۳: ۱۷۰-۵.
۱۲. Stuart M, Baune B. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. *Neurosci Behavior Rev* ۲۰۱۴; ۴۲: ۹۳-۱۱۵.
۱۳. Chang LY. Tumor derived chemokine CCL۵ enhances TGF- β -mediated killing of CD4+ T cells in colon cancer by t-regulatory cells. *Cancer Res* ۲۰۱۲; ۷۲: ۱۰۹۲-۱۰۲.
۱۴. Baggiolini M, Ewald BD, Moser B. Human chemokines an update. *Ann Rev Immunol* ۱۹۹۷; ۱۵: ۶۷۵-۷۰۵.
۱۵. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer balance tolerance and diversity. *Current Opin Immunol* ۲۰۱۰; ۲۲: ۲۳۱-۷.
۱۶. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Let* ۲۰۰۸; ۲۶۷: ۲۰۴-۱۵.
۱۷. Barcelos LdS. Production and in vivo effects of chemokines CXCL۱-۳/KC and CCL۲/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res* ۲۰۰۴; ۵۳: ۵۷۶-۸۴.
۱۸. Qian BZ. CCL۲ recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* ۲۰۱۱; ۴۷۵: ۲۲۲-۵.
۱۹. McDougal WS. Campbell-walsh urology. ۱۰th ed. Saunders; ۲۰۱۱. P. ۲۳۴۲.
۲۰. Salcedo R. Human endothelial cells express CCR۲ and respond to MCP-1 direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* ۲۰۰۰; ۹۶: ۳۴-۴۰.
۲۱. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Asp Med* ۲۰۰۶; ۲۷: ۱۲۶-۳۹.
۲۲. Does WP. Polymerase Chain Reaction. *J Inv Dermatol* ۲۰۱۳; ۱۱: ۱۳۳.
۲۳. Lu Y, et al. Activation of MCP-1/CCR۲ axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clin Exp Metastasis* ۲۰۰۹; ۲۶: ۱۶۱-۹.
۲۴. Loberg RD. CCL۲ is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia* ۲۰۰۶; ۸: ۵۷۸-۸۶.
۲۵. Tao LL. Expression of monocyte chemotactic protein-1/CCL۲ in gastric cancer and its relationship with tumor hypoxia. *World J Gastroenterol WJG* ۲۰۱۴; ۲۰: ۴۴۲۱.
۲۶. Amann B. Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer. *British J Urol* ۱۹۹۸; ۸۲: ۱۱۸-۲۱.
۲۷. Chiu HY. Autocrine CCL۲ promotes cell migration and invasion via PKC activation and tyrosine phosphorylation of paxillin in bladder cancer cells. *Cytokine* ۲۰۱۲; ۵۹: ۴۲۳-۳۲.
۲۸. Aldinucci, D. and A. Colombatti the inflammatory chemokine CCL۵ and cancer progression. *Mediators Inflamm* ۲۰۱۴; ۸: ۲۳۴-۸.
۲۹. Gao DF, Fish EN. A role for CCL۵ in breast cancer cell metabolism. *Cytokine* ۲۰۱۳; ۶۳: ۲۶۴.
۳۰. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* ۲۰۱۲; ۲۱: ۳۰۹-۲۲.

Distinct Pattern of CC Chemokine γ and δ in Post-Transurethral Resection of Bladder Cancer

Moogooei M^{1*}, Hasanshahi G², Jafarzadeh A³, Khoramdelazad H⁴, Moogooei M², Fatahpour S²

(Received: April ۲۰, ۲۰۱۵)

Accepted: August ۱۶, ۲۰۱۵)

Abstract

Introduction: The complex network of chemokines and their receptors play an important role in development and metastasis of tumors. This study examines the mRNA expression rate of CCR γ and CCR δ and also the serum levels of CCL γ and CCL δ in patients with bladder transitional cells carcinoma before and after transurethral resection (TUR) surgery.

Materials & methods: In the present study, ۴۰ male patients with transitional cell carcinoma (TCC) and ۴۰ healthy subjects were included in the study. The blood samples were collected before TUR surgery and ۲۸ days thereafter. Also, tumor and normal tissue samples were collected during the operation from ۱۲ of these patients. The CCR γ and CCR δ gene expressions of normal and tumor tissues were determined grossly and also in PBLs using real-time PCR technique. The protein levels of CCL γ and CCL δ in PBLs were investigated using ELISA technique.

Findings: The CCR γ and CCR δ gene expression in tumor tissue compared to normal tissue, and in PBLs after TUR surgery compared to pre-surgery rate showed a significant increase ($P < 0.05$). In examination, the serum levels of CCL γ and CCL δ in patients with cancer compared to

normal subjects showed a significant increase ($P < 0.05$). In this study, the serum levels of CCL γ and CCL δ showed a distinct behavior; thus, the post-operative serum levels of CCL γ significantly increased, while the serum levels of CCL δ significantly reduced ($P < 0.05$).

Discussion & Conclusions: This study showed variations of chemokine / receptor axis of CCL γ / CCR γ which in tumor tissue compared to normal tissue, and in PBLs after TUR surgery compared to pre-surgery rate showed a significant increase. variations of chemokine / receptor axis of CCL δ / CCR δ is so different, serum levels of CCL δ significantly reduced. It seems that the nature of the tumor cells acts differently in producing and expressing CCL γ / CCR γ and CCL δ / CCR δ . While it is generally expected that with tumor progression, the ligand and the receptor rates will increase which is important and requires further research, particularly regarding solid tumors. However, physical removal of the tumor has not a profound role in expression and secretion of studied chemokines.

Keywords: Transitional cells carcinoma, CCL γ , CCL δ , CCR γ , CCR δ

¹. Dept of Immunology, Faculty of Medicien, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

^۲. Molecular and Celular Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

^۳. Dept of Immunology, Faculty of Medicien, Shahid sedoghi Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran

^۴. Dept of Biochemistry, Faculty of Medicien, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

* Correspondin author Email: mozhganmoogooei@yahoo.com