



تحقیقی

ارزیابی همزمان مولکول‌های تنظیمی $TGF\beta R II$ و $NKG2D$ ، $PD-1$ ، $CXCR3$ بر لنفوسیت‌های T بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص

اله آریان فر^۱، غزاله علیزاد^۱، دکتر علی معماریان^{۲*}

۱ کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۲ مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۳ دانشیار، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان محسوب شده و دومین علت مرگ و میر در زنان است. پاسخ‌های ایمنی می‌توانند نقش کلیدی در مهار شروع و پیشرفت این بیماری داشته باشند. با توجه به اهمیت نقش لنفوسیت T در شناسایی و جلوگیری از گسترش سلول‌های توموری سرطان پستان، این مطالعه به منظور ارزیابی همزمان مولکول‌های تنظیمی $TGF\beta R II$ و $NKG2D$ ، $PD-1$ ، $CXCR3$ بر لنفوسیت‌های T بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه مورد - شاهده روی ۲۶ بیمار (میانگین سنی $46/2 \pm 9/5$ سال) مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده در مراجعین به مرکز آموزشی درمانی ۵ آذر گرگان و ۱۲ فرد (میانگین سنی $42/9 \pm 9/9$ سال) غیرمبتلا به سرطان پستان از بین کارمندان و دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد. ابتدا خونگیری و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انجام شد. سپس با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری جمعیت‌های مختلف سلولی از نظر بیان $TGF\beta R II$ ، $NKG2D$ ، $PD-1$ ، $CXCR3$ ارزیابی شدند. سطح پلاسمایی $IFN\gamma$ و $MIC-A$ به روش الیزا مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین درصد جمعیت لنفوسیت‌های T در بیماران تازه تشخیص مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد سالم پایین‌تر بود ($P < 0/05$). همچنین میانگین درصد فراوانی لنفوسیت‌های T بیان‌کننده $PD-1$ و $TGF\beta R II$ در گروه مورد نسبت به گروه شاهد بالاتر و بیان $NKG2D$ و $CXCR3$ سطوح پایین‌تری را نشان دادند ($P < 0/05$). نتایج مقایسه غلظت پلاسمایی $IFN\gamma$ و $MIC-A$ حاکی از آن بود که گروه مورد نسبت به گروه شاهد سطح $MIC-A$ بالاتری داشتند ($P < 0/05$)؛ در حالی که از نظر $IFN\gamma$ تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد افزایش بیان $TGF\beta R II$ و $PD-1$ در کنار کاهش بیان $NKG2D$ و $CXCR3$ و کاهش سطح $MIC-A$ در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده با تنظیم و سرکوب زیاد ایمنی لنفوسیت‌های T و اختلال عملکردی آنها در بیماری سرطان پستان مرتبط باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، لنفوسیت T، گیرنده $CXCR3$ ، پروتئین $PD-1$ ، گیرنده $NKG2D$ ، گیرنده $TGF-beta$ ، اینترفرون گاما، زنجیره A مرتبط با MHC کلاس I

* نویسنده مسئول: دکتر علی معماریان، پست الکترونیکی: alimemarian@goums.ac.ir

نشانی: گرگان، ابتدای جاده قدیم گرگان به کردکوی، مجموعه آموزش عالی (شادروان فلسفی) دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، تلفن ۰۱۷-۳۲۴۵۱۶۵۳

وصول ۱۴۰۳/۸/۲۱ اصلاح نهایی ۱۴۰۳/۱۱/۱۷ پذیرش ۱۴۰۴/۲/۳ انتشار In Press

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان محسوب شده و علی‌رغم روش‌های غربالگری پیشرفته و گزینه‌های درمانی جدید همچنان این بیماری دومین علت مرگ و میر در زنان با وقوع ۲/۳ میلیون مورد جدید در جهان است.^۱ سرطان پستان در مردان به ندرت اتفاق می‌افتد. براساس آمار انجمن سرطان آمریکا، در ایالات متحده از ۲۶۲۰ مرد مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شده؛ در مجموع ۵۲۶ مورد مرگ و میر در سال ۲۰۲۰ گزارش شد.^۲

طبق مطالعه سال ۲۰۱۵ در ایران، میزان شیوع سرطان پستان ۲۳/۱ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر گزارش شد.^۳ در جهان بالاترین میزان شیوع این بیماری در سنین بالای ۷۰ سال رخ می‌دهد؛ اما در ایران میانگین سنی سرطان پستان در زنان ۴۵ سال است.^۴ جنسیت زن، جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2، پیشینه خانوادگی، مصرف الکل، چاقی، سن اولین زایمان بیشتر از ۳۵ سال، بلوغ زودرس، یائسگی دیررس، هرگز حامله نشدن یا حاملگی دیر هنگام از جمله عوامل مستعد کننده این بیماری شناسایی شده‌اند.^۵

بیشترین افزایش را در سلول‌های توموری دارد. پس از اتصال $TGF\beta$ به $TGF\beta RII$ ، دو مولکول $TGF\beta RII$ و دو مولکول $TGF\beta RI$ یک هتروترایمر تشکیل می‌دهند که $TGF\beta RII$ منجر به فسفویلاسیون $TGF\beta RI$ شده و نهایتاً منجر به تنظیم فاکتورهای رونویسی مربوطه می‌شوند. از این رو $TGF\beta RII$ به عنوان مولکول اصلی در ارزیابی وجود این گیرنده بررسی می‌شود.^{۱۵}

افزایش حضور و عملکرد لنفوسیت‌های T یک ویژگی و مشخصه لازم برای سنجش پیش‌آگهی سرطان است. در محیط‌های توموری، تیرهای بالا هر دو نوع IFN نوع یک و دو باعث ترشح کموکاین‌های CXCL9، CXCL10 و CXCL11 می‌شوند.^{۱۶} این لیگاند‌ها کموکاین‌های قدرتمندی در فراخوانی سلول‌های $CD4+Treg$ یا $CD8+Treg$ به سمت تومورهای جامد هستند و می‌توانند به جایگاه‌های التهابی مهاجرت کرده؛ تکثیر شوند و در نظارت ایمنی سرطان نقش داشته باشند.^{۱۷} چندین مطالعه از وجود رابطه بین بیان CXCR3 و سرطان پستان، کولون، کلیه و پروستات در انسان دلالت دارند.^{۱۸-۲۱} از طرف دیگر CXCR3 در انواع سلول‌های Treg ($CD4+Treg$ و $CD8+Treg$) نیز بیان می‌شود. بیان این مولکول بر سطح این دسته از سلول‌های T در بازگردش و فراخوانی این سلول‌ها در نواحی مختلف التهابی نقش مهمی را ایفا می‌کند.^{۲۲} PD-1 (CD279) یک گیرنده کنترلی سیستم ایمنی بوده^{۲۳} که بر روی برخی از سلول‌های بدن از جمله سلول‌های T، Tregs exhausted T cells، Natural killer (NK) cells و Natural killer T (NKT) cells به‌طور متغیر بیان می‌شود. PD-1 بر سطح سلول‌های T در حال استراحت بیان کمی دارد. درحالی‌که بر سطح سلول‌های T فعال به میزان بیشتری بیان می‌شود.^{۲۴} بیان PD-1 با استمرار در فعال‌سازی لنفوسیت‌های T روی این دسته از سلول‌ها تنظیم می‌شود و نتیجه تعاملات آن موجب مهار فعال‌شدن سلول‌های T، تکثیر و تولید سیتوکین و در نهایت فرسودگی لنفوسیت‌های T است.^{۲۵} از طرفی مهار مارکر PD-1 باعث کنترل تولید برخی سیتوکاین‌ها از جمله کاهش فاکتور رشد اندوتلیال عروقی شده و در نتیجه با ایمنی ضد توموری و کاهش رگ‌زایی مرتبط است.^{۲۶} با توجه به اهمیت نقش لنفوسیت T در شناسایی و جلوگیری از گسترش سلول‌های توموری سرطان پستان، این مطالعه به منظور ارزیابی همزمان مولکول‌های تنظیمی CXCR3، PD-1، $TGF\beta RII$ و $TGF\beta$ بر لنفوسیت‌های T بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مورد - شاهدی روی ۲۶ بیمار (میانگین سنی ۴۶/۲±۹/۵ سال) مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده در مراجعین به مرکز آموزشی درمانی ۵ آذر گرگان و ۱۲ فرد (میانگین

از آنجایی که پاسخ‌های ایمنی می‌توانند نقشی کلیدی در مهار شروع و پیشرفت این بیماری داشته باشند؛ شناخت دقیق ویژگی‌های تنظیمی سیستم ایمنی بسیار حائز اهمیت است. ایمونوترابی سرطان قدرت پاسخ‌های سیستم ایمنی را به شکل فعال یا غیرفعال علیه تومور افزایش می‌دهد. هدف ایمونوترابی غیرفعال تقویت پاسخ‌های ضد توموری موجود در بدن است و شامل استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، لنفوسیت‌ها و سیتوکاین‌ها است. ایمونوترابی فعال هدایت مجدد سیستم ایمنی برای حمله به سلول‌های سرطانی به‌وسیله هدف‌گیری آنتی‌ژن‌های بیان شده در سطح این سلول‌هاست. انواع سلول‌هایی که در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ سلول‌های کشنده طبیعی (Natural Killer: NK)، سلول‌های T کشنده و سلول‌های دندریتیک هستند. فعال‌سازی و فراخوانی سلول‌های سیستم ایمنی به خصوص لنفوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی به محیط تومور یکی از مکانیسم‌های درمانی اصلی سرطان پستان است.^۶

لنفوسیت‌های T در هر دو جزء ایمنی با واسطه سلولی و همورال نقش حیاتی دارند. مطالعات نشان داده‌اند که سرکوب و اختلال عملکردی این سلول‌ها با خطر بالای ابتلا به سرطان ارتباط دارد.^۷ با وجود مطالعات انجام شده در زمینه تعامل لنفوسیت‌های T با ریز محیط تومور، برخی از جنبه‌های مهم چگونگی این تعامل کمتر شناخته شده است. لذا بررسی دقیق‌تر به منظور آگاهی بیشتر از این جنبه‌ها و بهبود روش‌های درمانی سرطان امری ضروری است.

NKG2D یک پروتئین درون غشایی نوع ۲ بوده که بر روی سلول‌های NK، $CD8+T$ ، $CD4+T$ و $Ta\beta$ بیان می‌شود.^۸ NKG2D خانواده بزرگی از لیگاند‌های استرسی شامل MICB، MICA و خانواده پروتئین‌های متصل شونده به UL16 (ULBP1-6) را که بر روی سلول‌های توموری انسان بیان می‌شوند را شناسایی نموده و از طریق تعامل با آنها موجب تنظیم مرگ سلول توموری می‌شود.^۹ مطالعات نشان داده تشکیل تومورها می‌تواند به‌واسطه انتقال سیگنال NKG2D ممانعت شود.^{۱۰} همچنین بیان یک لیگاند NKG2D برای به راه اندازی سیتولیز به وسیله یک سلول افکتور بیان کننده NKG2D کافی است.^{۱۱} کشندگی به‌واسطه NKG2D در سلول‌های $CD8+T$ نیاز به فعال‌سازی همزمان گیرنده TCR دارد.^۸ همچنین فعال‌سازی همزمان NKG2D با TCR در سلول‌های $CD4+T$ باعث تکثیر و تولید سیتوکین‌های $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ می‌شود.^{۱۲}

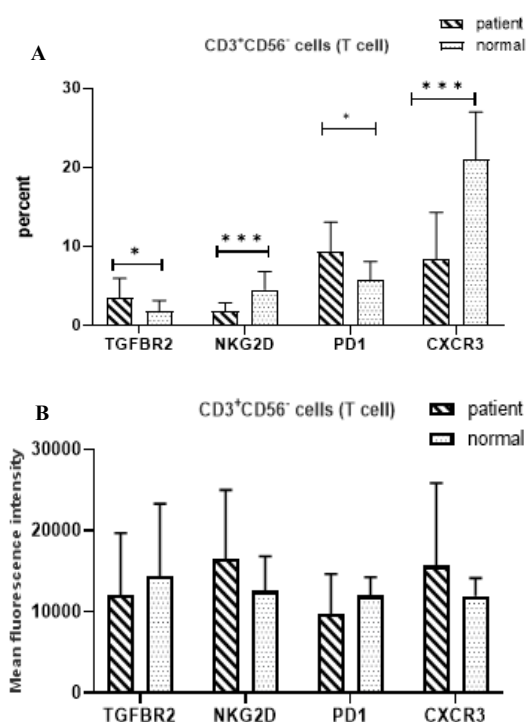
$TGF\beta$ به عنوان یکی از عوامل مهم سرکوب سیستم ایمنی در ریز محیط تومور شناخته شده^{۱۳} که می‌تواند موجب تسهیل رگ‌زایی، کاهش ترشح $IFN-\gamma$ از سلول‌های T، کاهش بلوغ سلول‌های T کمکی، کاهش بیان NKG2D و در نتیجه کاهش فعالیت کشندگی سلول‌های T و پیشرفت تومور در مقابل سلول‌های هدف شود.^{۱۴} در میان سه ایزوفرم خانواده بزرگ $TGF\beta$ پستانداران، $TGF\beta 1$

یافته‌ها

بین متغیرهای سن و جنس دو گروه مورد مطالعه تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت (جدول یک).

جدول ۱: فراوانی و درصد متغیرهای سن و جنس در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص و افراد سالم				
متغیرها	گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	P-value	
سن (سال)				
کمتر از ۵۰	۱۸ (۶۹/۲)	۹ (۰/۸۱)	۰/۴۸	
بیشتر مساوی ۵۰	۸ (۳۰/۸)	۲ (۰/۱۸)		
جنسیت				
زن	۲۵ (۰/۹۶)	۱۰ (۰/۹۰)	۰/۵۲	
مرد	۱ (۰/۰۴)	۱ (۰/۰۹)		

در بررسی جمعیت (T cell) $CD3+CD56-$ با استفاده از فلوسیتومتری چهار رنگ، درصد فراوانی این سلول‌ها در خون محیطی بیماران به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود ($P<0/001$) (نمودار یک). همچنین درصد بیان $TGF\beta RII$ و $PD-1$ در خون محیطی بیماران ($P<0/019$) نسبت به گروه شاهد ($P<0/011$) افزایش آماری معنی‌داری داشت. در حالی که درصد بیان $CXCR3$ و $NKG2D$ در بیماران به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود ($P<0/001$) (نمودار یک).



نمودار ۱: بیان $CXCR3$, $PD-1$, $NKG2D$, $TGF\beta RII$ در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص در مقایسه با گروه شاهد
(A) درصد بیان بر $CD3+CD56-$ T cells (B) شدت بیان بر $CD3+CD56-$ T cells
* $P<0/05$, ** $P<0/01$, *** $P<0/001$

سنی $42/9 \pm 9/9$ (سال) غیرمبتلا به سرطان پستان از بین کارمندان و دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل تایید بیماری توسط انکولوژیست و رضایت بیمار برای شرکت در مطالعه بودند. معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل دریافت داروهای سرکوبگر ایمنی برای بیماران و وجود بیماری زمینه‌ای یا التهابی در افراد سالم بود.^{۱۰}

ابتدا از همه شرکت‌کنندگان ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله هپارینه جمع‌آوری شد. پلاسما همه نمونه‌ها جداسازی و در فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای انجام تست الایزا نگهداری شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بعد از جداسازی با استفاده از گرادیان غلظت و محلول فایکول برای انجام تست فلوسایتومتری آماده شدند. با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کنژوگه با مواد فلورسنتی شرکت Biolegend (APC Anti human $CD3$ Antibody) جمعیت لنفوسیت‌های T ($FITC$ Anti human $CD56$ Antibody) و جمعیت سلول‌های NK نمونه همه بیماران و افراد تعیین گردید. در ادامه درصد فراوانی بیان مارکرهای $NKG2D$, $PD-1$, $CXCR3$ و $TGF\beta RII$ در جمعیت سلول‌های مذکور با استفاده از آنتی‌بادی‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند.

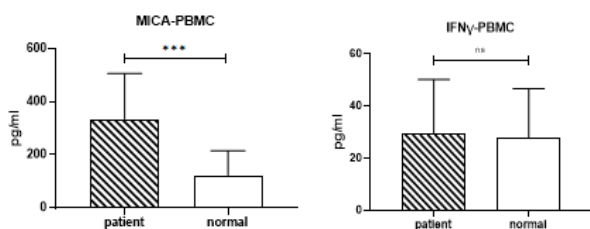
PerCP/Cyanine5.5 Antihuman $CXCR3$ Antibody
PE Anti human $PD-1$ Antibody
PerCP/Cyanine5.5
Anti human $NKG2D$ Antibody
 $TGF\beta$ RII PE-conjugated Antibody

نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD accuri c6) خوانش و آنالیز شدند. به منظور انجام تست الایزا طبق پروتکل پیشنهادی کیت شرکت Biolegend ($IFN\gamma$) و R&D (MIC-A) برای سنجش میزان غلظت $IFN\gamma$ و MIC-A از نمونه‌های پلاسما نگهداری شده در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد، استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از آزمون آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه متغیرهای کمی در دو گروه مجزا برای متغیرهای با توزیع نرمال (پارامتریک) از آزمون t مستقل (Independent sample t test) و برای متغیرهای با توزیع غیر نرمال (غیر پارامتریک) از آزمون من‌ویتنی (Mann Whitney test) استفاده شد. برای مقایسه متغیرهای کمی در بیش از دو گروه مجزا از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون‌های تعقیبی استفاده شد. در بررسی همبستگی بین متغیرهای کمی با توزیع نرمال (پارامتریک) با استفاده از محاسبه ضریب همبستگی توسط آزمون Pearson و برای همبستگی بین متغیرهای کمی با توزیع غیر نرمال (غیرپارامتریک) توسط آزمون Spearman انجام شد. سطح معنی‌داری تمام آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

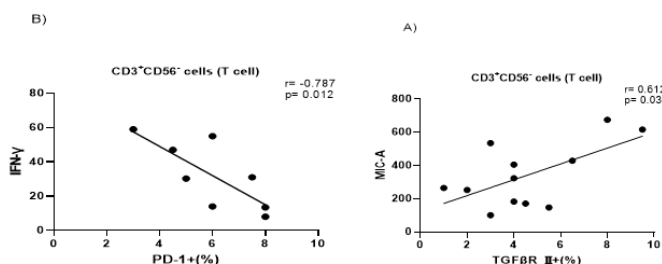
در جدول ۲ داده‌های پاتولوژیک بیماران شامل دسته‌بندی سائز تومور و همچنین درگیری پوست، نیپل و عضلات زیر پستان (T1 تا T4) براساس طبقه‌بندی TNM، بر پایه سائز تومور (T)، تعداد غدد لنفاوی درگیر (N) و وضعیت متاستاز (M)، به هفت Stage مختلف آمده است. علاوه بر این، بیماران به پنج subtype نیز گروه‌بندی شدند و اطلاعات بیان مولکول‌های ER, PR, HER2, Ki67 ارائه شده است. در مقایسه به عمل آمده میان تمامی متغیرهای بررسی شده شامل CXCR3, PD-1, NKG2D, TGFβRII با ویژگی‌های پاتولوژیک و آزمایشگاهی گروه‌های مورد و شاهد اختلاف آماری معنی‌داری یافت نشد (جدول‌های ۲ و ۳).

داده‌ها نشان دادند که میان درصد بیان TGFβRII (در جمعیت سلول‌های CD3+CD56) و غلظت پلاسمای MIC-A بیماران رابطه مثبت معنی‌داری وجود دارد ($P=0.034$ ، $r=0.612$). همچنین میان درصد بیان PD-1 در این سلول‌ها با غلظت پلاسمای IFN-γ در گروه شاهد رابطه معکوس معنی‌داری یافت شد ($P=0.012$ ، $r=-0.787$) (نمودار ۳).



نمودار ۲: میانگین غلظت IFN-γ و MIC-A در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص در مقایسه با گروه شاهد

* $P<0.05$ ، ** $P<0.01$ ، *** $P<0.001$ ، **** $P<0.0001$ ، NS: غیرمعنی‌دار



نمودار ۳: (A) آنالیز همبستگی بین بیان متغیرهای TGFβRII و MIC-A روی جمعیت CD3+CD56+ T cell در خون محیطی بیماران؛ (B) آنالیز همبستگی بین بیان متغیرهای PD-1 و IFN-γ روی جمعیت CD3+CD56+ T cell در خون محیطی گروه شاهد.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، سلول‌های T در بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده همراه با فنوتیپ مهارشده با افزایش بیان مارکرهای مهاری و کاهش بیان مارکرهای فعال‌کننده بودند که این یافته همراه با مطالعات گذشته منجر به نقص

نتایج حاصل از غلظت IFN-γ و MIC-A در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص افزایش آماری معنی‌دار MIC-A را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P<0.001$). در حالی که میان غلظت IFN-γ در خون محیطی گروه مورد با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد (نمودار ۲).

جدول ۲: برخی از داده‌های دموگرافیک و ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیک بیماران مبتلا به سرطان پستان

متغیرها	تعداد (درصد)
سن (سال)	کمتر از ۵۰: ۱۸ (۶۹/۲) بیشتر مساوی ۵۰: ۸ (۳۰/۸)
اندازه تومور	pT1: ۶ (۲۳/۱) pT2: ۱۴ (۵۳/۸) pT3: ۰ (۰) pT4: ۳ (۱۱/۵)
درگیری گره لنفی	pN0: ۱۱ (۴۲/۳) pN1: ۷ (۲۶/۹) pN2: ۴ (۱۵/۴) pN3: ۳ (۱۱/۵)
استیج TNM	I: ۳ (۱۱/۵) IIA: ۹ (۳۴/۶) IIB: ۳ (۱۱/۵) IIIA: ۳ (۱۱/۵) IIIB: ۲ (۴۲/۳) IIIC: ۳ (۱۱/۵)
گرید	I: ۳ (۱۱/۵) II: ۱۱ (۴۲/۳) III: ۴ (۱۵/۴)
زیر گروه	Luminal A: ۳ (۱۱/۵) Luminal B (HER2-): ۵ (۱۹/۲) Luminal B (HER2+): ۸ (۳۰/۸) HER2 positive: ۴ (۱۵/۴) Triple negative (TNBC): ۳ (۱۱/۵)
گیرنده استروژن (ER)	مثبت: ۱۵ (۵۷/۷) منفی: ۸ (۳۰/۸)
گیرنده پروژسترون (PR)	مثبت: ۱۳ (۵۰) منفی: ۱۰ (۳۸/۵)
وضعیت HER2	مثبت: ۱۲ (۴۶/۲) منفی: ۹ (۳۴/۶)
وضعیت P53	مثبت: ۶ (۲۳/۱) منفی: ۱۲ (۴۶/۲)

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار داده‌های آزمایشگاهی بیماران مبتلا به سرطان پستان

متغیرها	میانگین و انحراف استاندارد
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.05 ± 1.43
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4.32 ± 0.31
HBG (g/dl)	11.74 ± 1.54
LYMPH (%)	43.71 ± 7.44
CEA (ng/ml)	2.13 ± 1.61
CA15-3 (u/ml)	20.61 ± 11.19

عملکردی آنها در این بیماری خواهد شد که به طور عمده با تغییر فنوتیپی آنها مرتبط است.^{۲۷،۲۸} یکی از دلایل مهم پیشرفت، مقاومت به درمان و عود بیماری سرطان‌ها تنظیم کنترل نشده و سرکوب سیستم ایمنی و اجزای آن است.^{۲۹} سرکوب ایمنی در سطوح مختلفی برای انواع سلول‌های ایمنی در سرطان پستان مشاهده شده که از مهم‌ترین آنها سرکوب کنندگی ایمنی سلول‌های T است.^{۳۰} سیگنالینگ ناشی از گیرنده‌ها و مولکول‌های مهم، سرنوشت لنفوسیت‌های T در برابر سلول‌های سرطانی را تعیین می‌کند. همچنین حضور عوامل سرکوب کننده ریز محیط توموری می‌تواند با اثر بر تعامل گیرنده‌ها و لیگاند‌های سطحی، پاسخ ایمنی لنفوسیت‌های T را مختل کند.

در مطالعه حاضر، در بررسی جمعیت (T cell) CD3+CD56- مشخص شد که درصد فراوانی این سلول‌ها در خون محیطی بیماران به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد است. چندین مطالعه نیز کاهش در تعداد و فراوانی لنفوسیت‌های T در خون محیطی و بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان نسبت به گروه کنترل را نشان داده‌اند که با کاهش ظرفیت کشندگی این سلول‌ها همراه بوده است.^{۳۱} در مطالعه حاضر این کاهش فراوانی لنفوسیت‌های T می‌تواند بیانگر اثر منفی ریز محیط توموری بر تعداد و تمایز لنفوسیت‌های T در بیماران مبتلا به سرطان پستان و پیشرفت بیماری باشد.

در نتایج این مطالعه اختلاف‌هایی در بیان مولکول‌های موردنظر در جمعیت‌های سلولی T یافت شد که می‌تواند توجیهی بر کاهش فعالیت سایتوتوکسیتی این سلول‌ها و پیشرفت و تکامل تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان باشند که در ذیل به بحث آن‌ها پرداخته شده است.

تشکیل تومورها می‌تواند از طریق سیگنالینگ NKG2D (وابسته به ITAM و DAP10) و با آزادسازی مولکول‌های مرتبط با سایتوتوکسیتی، IFN γ و TNF α ممانعت شود.^{۱۱} شواهد تجربی و بالینی نشان داده‌اند که کاهش بیان رستپور NKG2D با کاهش سایتوتوکسیتی لنفوسیت‌های T و با افزایش تشکیل تومورهای تهاجمی ارتباط دارد.^{۳۲،۳۱} در همین راستا افزایش بیان لیگاند‌های NKG2D در انواع مختلفی از تومورها، از جمله سرطان تخمدان، سرطان روده بزرگ و سرطان پستان گزارش شده‌اند.^{۳۳،۳۲} به نظر می‌رسد افزایش بیان این لیگاند‌ها نتیجه فعال شدن عناصر رونویسی شوک حرارتی در پروموتورهای ژن‌های مربوط به این لیگاند‌ها، تخریب DNA و تغییر سطوح هورمونی در بسیاری از تومورها از جمله سرطان تخمدان و پستان باشد.^۹ بیان سطح سلولی لیگاند‌های NKG2D به وسیله ریزش پروتئولیتیک به واسطه ترشح متالوپروتئازها توسط سلول‌های توموری، کاهش می‌یابد. در نتیجه آن، افزایش فرم‌های محلول دمن‌های خارجی این لیگاند‌ها در سرم بیماران مبتلا

به سرطان مشاهده می‌شود.^{۱۱} طبق مطالعه مروری انجام شده سطح بالایی از MICA ترشحی در سرم افراد با بدخیمی‌ها و سرطان‌های مختلف و نه در افراد سالم شناسایی شده که با کاهش ایمونوزنستی سلول‌های سرطانی و پیشرفت تومور مرتبط است.^{۳۵} همچنین براساس مطالعه Jia و همکاران روی سرطان کلیه، سرم افراد مبتلا به این سرطان به‌طور قابل توجهی افزایش میزان سرمی MICA را نشان داد.^{۳۶} نتایج حاصل از مطالعه Groh و همکاران نشان داد که یک ارتباط قوی بین سطوح سرمی sMICA و کاهش بیان NKG2D در سلول‌های CD8+ T و پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به سرطان پروستات و سرطان معده وجود دارد.^{۳۷} همراستا با این مطالعات یافته‌های ما نیز حاکی از کاهش بیان گیرنده NKG2D در لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران، همچنین افزایش سطح سرمی MIC-A در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به گروه شاهد بود که می‌تواند با کاهش فعالیت سایتوتوکسیتی سلول‌های NK مرتبط باشد. چندین مطالعه نیز کاهش بیان NKG2D بر سطح لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان را گزارش کرده‌اند.^{۳۸،۳۱} این‌طور به نظر می‌رسد که ریزش پروتئولیتیک لیگاند‌های NKG2D نه تنها سبب کاهش بیان این لیگاند‌ها بر سطح سلول‌های توموری می‌شود؛ بلکه MIC-A ترشحی با اتصال به NKG2D سبب درونی‌سازی و تجزیه لیزوزومی آن بر سطح NK و CD8+ T می‌گردد.^{۱۱} از طرفی این موضوع نیز محتمل است که عوامل موجود در ریز محیط تومور مثل فاکتور رشد TGF- β که به‌وسیله سلول‌های توموری و سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ ترشح می‌شوند؛ می‌توانند موجب کاهش بیان NKG2D بر سطح سلول‌های T و کاهش لیگاند‌های آن بر سطح سلول‌های توموری شوند.^{۱۱}

در چندین مطالعه افزایش بیان PD-1 بر سطح لنفوسیت‌های T گزارش شده است که با پیش‌آگهی ضعیف بیماری در سرطان‌های مختلف مرتبط بوده است.^{۳۹-۴۱} نتایج حاصل از تحقیقات قبلی در سرطان پستان و ریه نیز نشان دادند که اگرچه لنفوسیت‌های T در محیط توموری سطوح بیشتری از CD25 را نشان داده؛ اما بیان بیشتری از مارکر کنترل سیستم ایمنی PD1 را داشتند که نشان می‌دهد اگرچه فعال شده‌اند؛ اما خسته شده و قادر به ایجاد هرگونه پاسخ ایمنی خاص ضد تومور نیستند.^{۴۱،۴۰} حضور فاکتورهای محلول در ریز محیط توموری می‌تواند در القای بیان PD-1 در سلول‌های CD8+ T نقش داشته باشد.^{۴۲} در مطالعه حاضر بیش از نیمی از بیماران مورد مطالعه در مراحل پیشرفته بیماری و در گریدهای بالا بودند که در کنار افزایش بیان این مولکول بر روی سطح لنفوسیت‌های T بیماران نسبت به گروه شاهد؛ می‌تواند با سرکوب این سلول‌ها و پیشرفت بیماری مرتبط باشد. علاوه بر این وجود یک همبستگی

به سرطان پستان باشد. Wendel و همکاران^{۵۰} نشان دادند که لیگندهای کموکاین رسپتور CXCR3 یعنی CXCL9 و CXCL10 موجب تخریب رشد تومور و متاستاز تومور از طریق فراخوانی لنفوسیت‌های T سرکوب کننده تومور می‌شوند. همچنین بیان بیش از حد CXCL9 mRNA با تعداد لنفوسیت‌های تجمع یافته در محیط تومور مرتبط است و این افزایش غلظت لیگندهای CXCR3 راهی برای افزایش مقابله با سرطان پستان است.^{۵۱} در همین راستا نشان داده شده که استفاده از IFN γ در محیط تومور می‌تواند موجب القای بیان کموکاین‌های رسپتور CXCR3 از سلول‌های توموری پستان، افزایش تجمع سلول‌های CXCR3+ NK و بقای طولانی مدت شود.^{۵۲} از آنجایی که افزایش بیان CXCR3 در سطح سلول‌های توموری با پیشرفت و آنژیوژنز تومور مرتبط است؛ کاهش بیان CXCR3 در سطح سلول‌های ایمنی مثل T و NK در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان در این مطالعه قابل انتظار است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش بیان TGF β R2 و PD-1 در کنار کاهش بیان NKG2D و CXCR3 و کاهش سطح MIC-A بیماران مبتلا به سرطان پستان تازه تشخیص داده شده با تنظیم و سرکوب زیاد ایمنی لنفوسیت‌های T و اختلال عملکردی آنها در بیماری سرطان پستان می‌تواند مرتبط باشد.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی گلستان (IR.GOUMS.REC.1398.020) قرار گرفت.

حمایت مالی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۱۱۰۶۳۲) مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود.

مشارکت نویسندگان

اله آریان فر: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله.
غزاله علیزاد: انجام پروژه، آنالیز داده‌ها، نوشتن نسخه اولیه مقاله و تایید نسخه نهایی مقاله.

دکتر علی معماریان: مدیریت و طراحی پروژه، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج و تایید نسخه نهایی مقاله.

تعارض منافع

بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه خانم اله آریان فر برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ایمنی شناسی پزشکی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. بدینوسیله از مرکز تحقیقات

معکوس بین IFN- γ در سرم بیماران و درصد PD-1 بر روی لنفوسیت‌های T می‌تواند تاییدی بر نظریه فرسودگی این سلول‌ها در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان باشد.

در مطالعه Viel و همکاران حذف زیر واحد TGF β R2 با افزایش فعالیت کشندگی سلول‌های NK، افزایش تولید IFN γ و سرکوب بهتر متاستاز ارتباط داشت.^{۴۳} در مطالعه Chang و همکاران که روی بیماران مبتلا به سرطان رحم انجام شد؛ بیان TGF β R2 در NK و Treg به‌طور قابل توجهی در محیط توموری نسبت به خون محیطی این افراد بیشتر بود که با کاهش توان کشندگی این سلول‌ها و تکامل تومور مرتبط بود.^{۴۴} در مطالعه حاضر افزایش بیان TGF β R2 در سطح لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد نرمال مشاهده شد. با توجه به این که کاهش بیان TGF β R2 در سطح سلول سرطانی منجر به افزایش مقاومت سلول به اثر مهار رشد TGF β و پیشرفت تومور و آنژیوژنز می‌شود؛ این موضوع قابل انتظار است که در سطح سلول‌های ایمنی مثل T افزایش بیان TGF β R2 و در نتیجه کاهش مقاومت به مهار رشد TGF β و سرکوب سیستم ایمنی در پیشرفت تومور مشاهده شود.^{۴۵ و ۴۶} از آنجایی که MIC-A به عنوان یک مارکر پیشرفت بیماری (Progression) در بیماران مبتلا به سرطان افزایش دارد؛ وجود ارتباط و همبستگی مستقیم بین مارکر مهار TGF β R2 با غلظت MIC-A ترشحی در سرم بیماران در مطالعه ما می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که بیماران دارای ایمونوساپرشن، Progression در آنها بیشتر و قوی‌تر است و بیان بالاتری از گیرنده‌های مهار TGF β R2 را در سطح سلول‌های T خود بیان می‌کنند که می‌تواند با اثر منفی سیگنالینگ TGF β از طریق TGF β R2 و ایمونوساپرشن لنفوسیت‌های T در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان مرتبط باشد.

افزایش نفوذ لنفوسیت‌های T در محیط‌های توموری، با پیش‌آگهی خوب بیماری در چندین سرطان همراه بوده است.^{۴۷} در چندین مطالعه بالینی و آزمایشگاهی افزایش بیان لیگندها و کموکاین رسپتور CXCR3 توسط سلول‌های توموری پستان گزارش شده است که با پیشرفت تومور و کاهش بقای مرتبط با بیماری همراه بوده است.^{۴۸ و ۴۹} افزایش IFN γ موجود در محیط توموری می‌تواند در القای بیان این کموکاین‌ها موثر باشد. این کموکاین‌ها می‌توانند از طریق فراخوانی سلول‌های توموری بیان کننده CXCR3، در تکامل و آنژیوژنز تومور نیز نقش داشته باشند.^{۴۹} در این مطالعه همزمان با تغییرات سایر مارکرها کاهش بیان رسپتور CXCR3 در سطح لنفوسیت‌های T و زیرمجموعه‌های آن در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که می‌تواند نشانگر کاهش تجمع لنفوسیت‌های T در محیط توموری افراد مبتلا

متخصص رادیوتراپی که در انجام پروژه و جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری داشتند؛ صمیمانه تشکر می‌گردد.

گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر حمایت مالی تشکر می‌نمایم. همچنین از جناب آقای دکتر سیدرضا خاندوزی

References

- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- Khan NAJ, Tirona M. An updated review of epidemiology, risk factors, and management of male breast cancer. *Med Oncol*. 2021 Mar;38(4):39. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01486-x>.
- Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and Mortality of Various Cancers in Iran and Compare to Other Countries: A Review Article. *Iran J Public Health*. 2018 Mar;47(3):309-16.
- Meshkani Z, Moradi N, Aboutorabi A, Farabi H, Moini N. A cost-benefit analysis of genetic screening test for breast cancer in Iran. *BMC Cancer*. 2024 Mar;24(1):279. <https://doi.org/10.1186/s12885-024-12003-4>.
- Ostroumova E, Preston DL, Ron E, Krestinina L, Davis FG, Kossenko M, et al. Breast cancer incidence following low-dose rate environmental exposure: Techa River Cohort, 1956-2004. *Br J Cancer*. 2008 Dec 2;99(11):1940-45. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604775>.
- Chamorro DF, Somes LK, Hoyos V. Engineered Adoptive T-Cell Therapies for Breast Cancer: Current Progress, Challenges, and Potential. *Cancers (Basel)*. 2023 Dec 26;16(1):124. <https://doi.org/10.3390/cancers16010124>.
- Philip M, Schietinger A. CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2022 Apr;22(4):209-23. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3>.
- Prajapati K, Perez C, Rojas LBP, Burke B, Guevara-Patino JA. Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cell Mol Immunol*. 2018 May;15(5):470-79. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.161>.
- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):781-90. <https://doi.org/10.1038/nri1199>.
- Arianfar E, Khandoozi SR, Mohammadi S, Memarian A. Suppression of CD56bright NK cells in breast cancer patients is associated with the PD-1 and TGF-βRII expression. *Clin Transl Oncol*. 2023 Mar;25(3):841-51. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-02997-3>.
- Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology*. 2007 Aug;121(4):439-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x>.
- Sáez-Borderías A, Gumá M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, López-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur J Immunol*. 2006 Dec;36(12):3198-206. <https://doi.org/10.1002/eji.200636682>.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>.
- Papageorgis P, Stylianopoulos T. Role of TGFβ in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). *Int J Oncol*. 2015 Mar;46(3):933-43. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2816>.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003 Oct;425(6958):577-84. <https://doi.org/10.1038/nature02006>.
- Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*. 2011 Feb;89(2):207-15. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.158>.
- Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1260-65. <https://doi.org/10.1038/ni1138>.
- Engl T, Relja B, Blumenberg C, Müller I, Ringel EM, Biecken WD, et al. Prostate tumor CXCL10 profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. *Life Sci*. 2006 Mar;78(16):1784-93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.019>.
- Rubie C, Kollmar O, Frick VO, Wagner M, Brittner B, Gräber S, et al. Differential CXCL10 receptor expression in colorectal carcinomas. *Scand J Immunol*. 2008 Dec;68(6):635-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02163.x>.
- Goldberg-Bittman L, Neumark E, Sagi-Assif O, Azenshtein E, Meshel T, Witz IP, et al. The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines. *Immunol Lett*. 2004 Mar;92(1-2):171-78. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2003.10.020>.
- Gacci M, Serni S, Lapini A, Vittori G, Alessandrini M, Nesi G, et al. CXCR3-B expression correlates with tumor necrosis extension in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2009 Feb;181(2):843-48. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.063>.
- Hoerning A, Koss K, Datta D, Boneschansker L, Jones CN, Wong IY, et al. Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *Eur J Immunol*. 2011 Aug;41(8):2291-302. <https://doi.org/10.1002/eji.201041095>.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887-95. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>.
- Grabie N, Gotsman I, DaCosta R, Pang H, Stavrakis G, Butte MJ, et al. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart. *Circulation*. 2007 Oct;116(18):2062-71. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.107.709360>.
- Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2012 Jun;209(6):1201-17. <https://doi.org/10.1084/jem.20112741>.
- John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potentially enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct;19(20):5636-46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-0458>.
- Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Feb;8:17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00017>.
- Formenti SC, Hawtin RE, Dixit N, Evensen E, Lee P, Goldberg JD, et al. Baseline T cell dysfunction by single cell network profiling in metastatic breast cancer patients. *J Immunother Cancer*. 2019 Jul;7(1):177. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0633-x>.

29. Bates JP, Derakhshandeh R, Jones L, Webb TJ. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018 May;18(1):556. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3>.
30. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Apr;33(4):547-62. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.012>.
31. Gharagozloo M, Kalantari H, Rezaei A, Maracy MR, Salehi M, Bahador A, et al. The decrease in NKG2D+ Natural Killer cells in peripheral blood of patients with metastatic colorectal cancer. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116(5):296-301. https://doi.org/10.4149/bll_2015_056.
32. Zhang Y, Li X, Zhang J, Mao L. Novel cellular immunotherapy using NKG2D CAR-T for the treatment of cervical cancer. *Biomed Pharmacother*. 2020 Nov;131:110562. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110562>.
33. McGilvray RW, Eagle RA, Rolland P, Jaffarji I, Trowsdale J, Durrant LG. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *Int J Cancer*. 2010 Sep;127(6):1412-20. <https://doi.org/10.1002/ijc.25156>.
34. de Kruijf EM, Sajat A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer*. 2012 Jan 18;12:24. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-24>.
35. Chen D, Gyllenstein U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*. 2014 Dec;35(12):2633-42. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu215>.
36. Jia HY, Liu JL, Yuan MZ, Zhou CJ, Sun WD, Zhao JJ, et al. Regulation Roles of MICA and NKG2D in Human Renal Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(9):3901-905. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.9.3901>.
37. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002 Oct;419(6908):734-38. <https://doi.org/10.1038/nature01112>.
38. Nieto-Velázquez NG, Torres-Ramos YD, Muñoz-Sánchez JL, Espinosa-Godoy L, Gómez-Cortés S, Moreno J, et al. Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. *Transl Oncol*. 2016 Oct;9(5):384-91. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.07.003>.
39. Zahran AM, Rayan A, Zahran ZAM, Mohamed WMY, Mohamed DO, Abdel-Rahim MH, et al. Overexpression of PD-1 and CD39 in tumor-infiltrating lymphocytes compared with peripheral blood lymphocytes in triple-negative breast cancer. *PLoS One*. 2022 Jan;17(1):e0262650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262650>.
40. Syed Khaja AS, Toor SM, El Salhat H, Faour I, Ul Haq N, Ali BR, et al. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2017 May;8(20):33159-71. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16565>.
41. Tøndell A, Wahl SGF, Sponaas AM, Sørhaug S, Børset M, Haug M. Ectonucleotidase CD39 and Checkpoint Signalling Receptor Programmed Death 1 are Highly Elevated in Intratumoral Immune Cells in Non-small-cell Lung Cancer. *Transl Oncol*. 2020 Jan;13(1):17-24. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.09.003>.
42. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*. 2015 Feb;212(2):139-48. <https://doi.org/10.1084/jem.20140559>.
43. Viel S, Marçais A, Guimaraes FS, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, et al. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal*. 2016 Feb 16;9(415):ra19. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1884>.
44. Chang WC, Li CH, Chu LH, Huang PS, Sheu BC, Huang SC. Regulatory T Cells Suppress Natural Killer Cell Immunity in Patients With Human Cervical Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2016 Jan;26(1):156-62. <https://doi.org/10.1097/igc.0000000000000578>.
45. Ko Y, Banerji SS, Liu Y, Li W, Liang J, Soule HD, et al. Expression of transforming growth factor-beta receptor type II and tumorigenicity in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *J Cell Physiol*. 1998 Aug;176(2):424-34. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4652\(199808\)176:2%3C424::aid-jcp21%3E3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4652(199808)176:2%3C424::aid-jcp21%3E3.0.co;2-1).
46. Soufla G, Porichis F, Sourvinos G, Vassilaros S, Spandidos DA. Transcriptional deregulation of VEGF, FGF2, TGF-beta1, 2, 3 and cognate receptors in breast tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2006 Apr;235(1):100-13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.022>.
47. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011 Mar;317(5):620-31. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.017>.
48. Mulligan AM, Raitman I, Feeley L, Pinnaduwa D, Nguyen LT, O'Malley FP, et al. Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry. *Clin Cancer Res*. 2013 Jan;19(2):336-46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-3314>.
49. Jafarzadeh A, Fooladseresht H, Nemati M, Assadollahi Z, Sheikhi A, Ghaderi A. Higher circulating levels of chemokine CXCL10 in patients with breast cancer: Evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. *Cancer Biomark*. 2016 Mar;16(4):545-54. <https://doi.org/10.3233/cbm-160596>.
50. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res*. 2008 Oct;68(20):8437-45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-1440>.
51. Bronger H, Kraeft S, Schwarz-Boeger U, Cerny C, Stöckel A, Avril S, et al. Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012 Feb;14(1):R30. <https://doi.org/10.1186/bcr3115>.
52. Kajitani K, Tanaka Y, Arihiro K, Kataoka T, Ohdan H. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jul;134(1):139-55. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1944-x>.