Iranian Journal of Breast Diseases. 2022; 15(2):50-62.

Original Article

Evaluation of Soluble Toll-Like Receptors 2, 4, 9 and Their Damps Signaling Molecules (HMGB1 & HSP70) in Breast Cancer Patients of Basrah Province

Abdulabbas NF[1*], Shani WS[1]

[1]Department of Biology, Colleg of Science, University of Basrah, Basrah, Iraq

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-25]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]

[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

Receive: 25/4/2022
Accepted: 28/5/2022

[*]**Corresponding Author:**
Noorfadhil_89@yahoo.com

Ethics Approval:
Not applicable

Abstract

Introduction: Toll-Like Receptors (TLRs) are members of pattern recognition receptors that recognize various molecules, including pathogen-associated molecular patterns and dead-associated molecular patterns. These receptors are expressed by immune, non-immune, and tumor cells. Some TLRs are implicated in tumor progression, while others are involved in tumor suppression. Our study aimed to evaluate soluble TLR2, TLR4, TLR9, HMGB1, and HSP70 in breast cancer patients' sera to further understand their roles in breast cancer development.

Methods: The study population includes 50 breast cancer patients and 25 healthy individuals .Patients provided written informed consent before participating in the study .Three milliliters of venous blood were drawn from each person, and serum samples were evaluated for Toll-Like Receptors (TLRs) titer by ELISA assay.

Results: Soluble TLR2, TLR9, HMGB1, and HSP70 were significantly higher in patients' serum than in healthy controls. It was shown that the serum levels of TLR9 and HMGB1 were more elevated in stages II and IV of the disease.

Conclusion: Our results suggest that soluble TLR2, 9, and HMGB1 may be a novel prognostic factor in breast cancer, and they could be a target for immunotherapy in the future. However, more evidence is needed before introducing this to the bedside.

Keywords: Breast Cancer, Toll-Like Receptors, HSP70, HMGB1

[Downloaded from ijbdicom.com on 2022-09-25]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in Basrah province, and its incidence has increased noticeably over the past few years (1). Toll-Like Receptors (TLR) are evolutionarily conserved glycoproteins and a member of pattern recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as HSPs and HMGB1(2). Previous studies have shown that TLRs are highly expressed in various tumor cells and have emerged as important participants in shaping the tumor microenvironment. They mediate both pro- and anti-tumorigenic pathways (3) .These receptors are activated by endogenous ligands, including HMGB1, the non-histone chromosomal protein, and double-stranded binding DNA without sequence specificity cells (2). Our study aimed to investigate the serum concentration level of TLR2, 4, 9, HSP70, and HMGB1 in breast cancer patients and their expression levels in different stages and grades of disease to determine their relationship with the tumor development.

Materials and Methods

This study was conducted on 50 breast cancer patients and 25 healthy individuals with no benign or malignant tumor referred to the Basrah Oncology center from January to September 2019. Inclusion criteria were aged 30-70 years and confirmed breast cancer by pathology report. The patient with a systematic illness, radiotherapy, or chemotherapy history was excluded from the study. Patients provided written informed consent before participating in the study. All research steps were carried out with the approval and supervision of the Basra Oncology Center.

Blood sample collection

Three milliliters of venous blood were drawn from each person and allowed to clot at room temperature for 30min. Then they were centrifuged at (1500 × g, 10 min). The obtained sera were stored at -20°C. The concentration of circulating TLR2, 4, 9, HMGB1, and HSP70 was measured using the ELISA kit from My BioSource Company USA.

Statistical analysis

The frequency and distribution of variables were reported using mean and standard deviation. Serum levels of TLR 2, 4, 9, HMGB1, and HSP70 patients were compared with healthy individuals by Student's t-test and ANOVA. Statistical analysis was performed by IBM SPSS Software version 19.0, and the statistical significance level of 0.05.

Results

There were no significant differences in the serum levels of TLR4 between breast cancer patients and the control group, while the serum levels of TLR2, 9, HMGB1, and HSP70 between breast cancer patients and healthy people were significantly different (Figure 1).

As shown in Table 1, the mean serum level of TLR2 was significantly higher in breast cancer patients (2.117± 1.026 ng/ml) compared with the control group (0.195±0.044 ng/ml). Similarly serum levels of TLR9 was elevated in patients (0.371±0.118ng/ml) compared with control group (0.09±0.077 ng/ml) ($p \leq 0.05$).

Serum levels of HMGB1 and HSP70 in breast cancer patients were 928.893±378 pg/ml and (66.370 ± 23.544 pg/ml, respectively, and their levels in the control

group were 89.588±75.832 pg/ml, and 32.250 ± 11.580 pg/ml respectively, which was more elevated in the patients (P≤ 0.05) The correlation between patients' serum levels of TLR 2, 4, 9, HSP70, and HMGB1 with age and clinical variables was summarized in Table 2. There was no difference between circulating TLR2, 4, 9, and patient's age, while HMGB1 serum level was higher in the sera of age group less than 50 years. The serum concentration of TLR9 and HMGB1 showed higher levels in stages II and IV of the disease compared with other stages (<0.0001). Neither TLRs (P-value=0.45) nor DAMPS (P-value=0.32) molecules showed significant differences between grades II and III of disease.

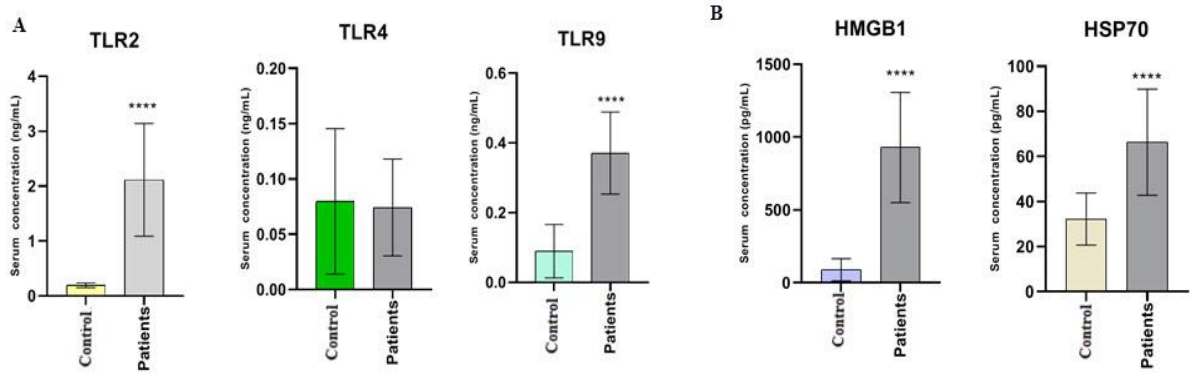


Figure 1: Serum Concentration of A.TLRs, B. HMGB1, and HSP70 Between the Control Group and Patients

Table 1: Serum Concentration of Tlrs, HMGB1, and HSP70 in Breast Cancer Patients and Control Group

Variables	Patients (n=50)	Control (n=25)	P _value
	Mean ± SD (pg/ml)	Mean ± SD (pg/ml)	
TLR2	2.117± 1.026	0.195±0.044	<0.0001*
TLR4	0.074±0.044	0.08±0.066	0.7
TLR9	0.371±0.118	0.09±0.077	<0.0001*
HMGB1	928.893 ± 378	89.588 ± 75.832	<0.0001*
HSP70	66.370 ± 23.544	32.250 ± 11.580	<0.0001*

Table 2: Correlation Between Patients' Serum Levels Of TLR 2, 4, 9, HSP70, and HMGB1 With Age and Clinical Variables

Variables		TLR2	TLR4	TLR9	HMGB1	HSP70
		Mean ± SD ng/ml	Mean ± SD ng/ml	Mean ± SD ng/ml	Mean ± SD pg/ml	Mean ± SD pg/ml
Age group	**≤ 50 (n=21)**	1.267±1.45	1.062±0.41	0.336±.123	788.27±581	40.7±40.05
	> 50 (n=29)	1.786±1.52	0.7776±0.332	0.260±.1634	565±271	49± 29.12
Stage	**II**	1.49±1.3	1.62±1.41	0.342±0.143	661.17±522	44.7±34.05
	III	1.786±1.03	0.59±0.39	0.205±0.142	307±251	52.59± 52.12
	IV	1.3±1.2	0.311±0.291	0.313±0.115	958±89	33.58±24
Grade	**II**	1.60±1.3	1.14±0.8	0.305±0.15	658.9±507	46.7±31
	III	1.3±1.1	0.11±0.106	0.268±0.13	480.7±309	37.3±28

[Downloaded from ijbd.com on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

[Downloaded from ijbdicom.com on 2022-08-25]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

Discussion

This study investigated the clinical value of soluble TLRs 2,4,9 HMGB1 and HSP70 as possible prognostic factors during breast cancer diagnosis and the roles of these receptors and proteins in breast cancer progression and suppression.

According to our data, soluble TLR2 (sTLR2) was higher in breast cancer patients than in the control group. A study in 2013 revealed elevated serum levels of TLR2 in breast cancer patients compared with healthy controls (4). TLR2 expressed on breast cancer cells has been implicated in cancer progression by initiating a signaling pathway ending with the activation of transcriptional factor NF-κB; the last was involved in breast cancer invasion and metastasis (5).

We found no significant differences between patients' serum levels of TLR4 and healthy groups, contrary to El-Kharashy et al., who revealed a significant increase of sTLR4 in breast cancer patients. This discrepancy may be because low amounts of TLR4 are secreted from cancer cells and the relatively small number of our study sample size, which is one of the limitations of this study. However, TLR4 was thought to be highly expressed on tumor cells. It was associated with tumor progression by initiating a signaling pathway ending with the activation of the NF-κB transcriptional factor. Consequently, the production of various pro-inflammatory cytokines (IL-6, MCP-1, MIF, GRO-α, etc.) and some anti-apoptotic proteins increases, facilitating a direct or indirect tumor-stimulating effect (6).

This study showed that the TLR9 serum level was higher in breast cancer patients than in the control group. Our study is the first research in Iraq that evaluates sTLR9 in breast cancer patients 'sera. Another study showed that TLR9 had been highly expressed by tumor cells in breast cancer; furthermore, it has been reported as a good prognostic factor in triple-negative breast cancer patients (7). In this study, the elevated levels of sTLR9 in breast cancer patients in stage II of the disease may prove that TLR9 is a good prognostic factor for breast cancer severity. Further studies are needed to understand the role of sTLR9 and the interference between this soluble form and the membrane-bound form.

We found that HMGB1 concentrations were significantly higher in patients compared to controls. Breast cancer cells chronically release HMGB1 during tumorigenesis (8), so HMGB1 might be a novel biomarker for breast cancer. But the role of this protein in tumorigenesis has not been fully understood. There is growing evidence that implicates the effect of HMGB1 in cancer metastasis by its activity to induce the expression of metalloproteinase. Our results demonstrated that HMGB1 was higher in stage II of the disease than in stage III. These data might support the positive role of HMGB1 in tumor suppression.

Our results revealed that circulating HSP70 was higher in sera of breast cancer patients than in healthy individuals. HSP70 is overexpressed in breast cancer cells. Upon release by necrotic cells, HSP70 has great immunogenic potential for initiating strong anti-tumor T cell response either bound to a tumor antigen or antigen-free. Perhaps measuring it in patients' serum may effectively determine the prognosis of the disease and personalize the treatment protocol. However, this study was

conducted on the sera obtained from Basrah breast cancer patients and needed to be extended to other countries and larger sample sizes to provide more accurate evidence in oncology.

Conclusion

The data revealed the potential of sTLR2, sTLR9, HMGB1, and HSP70 and not sTLR4 as prognostic factors in breast cancer. HMGB1 serum level was higher in stage II of the disease than in stage III, suggesting a possible anti-tumor effect of this molecule in different stages. The higher anti-tumor effect in stage II of the disease may be considered a small piece of evidence in treatment protocols.

[Downloaded from ijbdcom 2022-05-18]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]

[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

References

1. Abood RA. Breast cancer in Basra oncology center: a clinico-epidemiological analysis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP. 2018; 19(10):2943.
2. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. Molecular medicine. 2008; 14(7): 476-84.
3. Takeda K, Akira S. Toll- like receptors. Current protocols in immunology. 2015; 109(1):1-14.
4. Al-Ammiri HH, Al-Derzi AR. Validity of serum Toll-like receptor-2 (TLR-2) in women with breast tumor. Journal of the Faculty of Medicine Baghdad. 2013; 55(2):152-7.
5. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. The Journal of clinical investigation. 2004; 114(4):569-81.
6. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. Innate immunity: structure and function of TLRs. Medecine Sciences: M/S. 2007; 23(1):67-73.
7. Sandholm J, Selander KS. Toll-like receptor 9 in breast cancer. Frontiers in immunology. 2014; 5:330.
8. Sun S, Zhang W, Cui Z, Chen Q, Xie P, Zhou C, et al. High mobility group box-1 and its clinical value in breast cancer. OncoTargets and therapy. 2015;8:413.

فصلنامه بیماری های پستان ایران
۱۴۰۱؛ ۱۵(۲): ۵۰-۶۲

مقاله پژوهشی

بررسی گیرنده‌های شبه Toll ۲، ۴ و ۹ محلول و مولکول‌ها DAMPS سیگنال‌دهنده آن‌ها (HMGB1, HSP70) در بیماران مبتلا به سرطان پستان استان بصره

نور فدهیل عبدالعباس[1*]، وفا سادون شانی[1]

[1]گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه بصره، بصره، عراق

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۲/۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۷

[*] **نویسنده مسئول:**
Noorfadhil_89@yahoo.com

چکیده

مقدمه: گیرنده‌های شبه Toll (TLR)، اعضای گیرنده‌های تشخیص الگو هستند که انواع مولکول‌ها شامل الگوهای مولکولی مرتبط با بیماری‌زا (PAMPs) و الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMPs) را شناسایی می‌کنند. این گیرنده‌ها توسط سلول‌های ایمنی، غیرایمنی و توموری نیز بیان می‌شوند. برخی از TLRها در پیشرفت تومور و برخی دیگر در سرکوب تومور نقش دارند. هدف مطالعه ما ارزیابیTLR2، TLR4، TLR9، HMGB1 و HSP70 محلول در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان برای درک بهتر نقش آن‌ها در توسعه سرطان بود.

مواد و روش‌ها: جامعه مورد مطالعه شامل ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۲۵ فرد سالم بود. پس از کسب رضایت آگاهانه از شرکت‌کنندگان واجد شرایط ورود به مطالعه، از هر فرد ۳ میلی‌لیتر خون وریدی گرفته و پس از سانتریفیوز، نمونه سرم‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (ELISA) مورد آزمایش قرار گرفت و میزان سرمی گیرنده‌های فوق تعیین شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از بررسی سرم افراد نشاد داد که سطح سرمی TLR2، TLR9، HMGB1 و HSP70 محلول، در سرم بیماران به طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بود. همچنین مشخص شد که سطح سرمی TLR9 و HMGB1 در مرحله II و IV بیماری بالاتر است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی TLR9 محلول و HMGB1 ممکن است یک عامل پیش‌آگهی جدید در سرطان پستان باشند و می‌توانند به عنوان اهداف احتمالی جهت ایمونوتراپی در آینده در نظر گرفته شوند. اگرچه جهت معرفی این موضوع به حیطه بالینی، به شواهد بیشتری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، گیرنده، Toll-like، HMGB1، HSP70

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-05-18]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده و عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است (۱). میزان بروز سرطان پستان در کشورهای توسعه یافته بالاتر از کشورهای در حال توسعه گزارش شده است، اما این تفاوت ممکن است به دلیل وجود روش‌های تشخیصی بهتر در کشورهای توسعه یافته باشد (۲).

سرطان پستان بیشترین سرطان تشخیص داده شده در زنان شهر بصره است. همچنین بسیاری از شواهد حاکی از افزایش قابل توجه بروز آن در چند سال گذشته است (۲، ۳). این حقایق نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه را توجیه می‌کند، که احتمالاً می‌تواند منجر به معرفی رویکردهای جدید به منظور تشخیص زودرس و یا درمان شود.

گیرنده‌های شبه Toll[1] (TLRs) گلیکوپروتئین‌های تکاملی محافظت شده و عضو گیرنده‌های تشخیص الگو[2] (PRRs) هستند که الگوهای مولکولی مرتبط با بیماری‌زا[3] (PAMPs) (مانند لیپوپلی ساکارید، فلاژلین، RNA ویروسی و غیره) و الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب[4] (DAMPs) (مانند پروتئین‌های شوک حرارتی و HMGB1[5]) را شناسایی می‌کنند (۴). گیرنده‌های شبه Tollدر اکثر سلول‌های بدن انسان از جمله سلول‌های ایمنی و غیرایمنی (مانند سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست) بیان می‌شوند. آن‌ها می‌توانند در سطح سلول (TLR: ۱، ۲، ۵ و۶) یا در آندوزوم‌ها (TLR: ۳، ۷، ۸ ، و ۱۰) یا هر دو بیان شوند (۵).

اتصال TLR به لیگاندهای آن‌ها (DAMPS یاPAMPS) مسیرهای مختلف پیام‌دهی را آغاز می‌کند که در نهایت منجر به پاسخ‌های مختلف سلولی می‌شود که برای فعال شدن پاسخ ایمنی ذاتی بسیار مهم هستند. در سال‌های اخیر چندین مطالعه نشان داده‌اند که TLRها در سلول‌های توموری مختلف نیز به شدت بیان می‌شوند و به عنوان یک شرکت‌کننده مهم در شکل‌دهی ریز محیط تومور ظاهر شده‌اند، زیرا هم مسیرهای پیش تومورزایی و هم مسیرهای ضد توموری شدن را واسطه‌گری می‌کنند (۶-۸).

نقش TLR4 در سرطان پستان در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته و در پیشرفت سرطان پستان دخیل بوده است. Semlali و همکاران در سال ۲۰۱۷ پیشنهاد کردند که TLR4 ممکن است با نرخ بالاتر متاستاز و پیش آگهی ضعیف سرطان پستان مرتبط باشد (۹). مطالعات دیگری نیز نشان دادند که ارتباط آشکاری بین بیان بالای TLR4در سلول‌های تومور و تهاجم غدد لنفاوی در سرطان پستان وجود دارد (۱۰).

همچنین در مطالعات انجام شده در زمینه سرطان پستان، TLR9 توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به‌طوری‌که TLR9 با سرکوب سرطان ارتباط داشته است. مشخص شد که تحریک TLR9، سلول‌های دندریتیک پلاسماسیتوئید انسانی و سلول‌های B را فعال می‌کند، بنابراین پاسخ‌های ایمنی ذاتی قوی را در مدل‌های تومور پیش بالینی و همچنین در بیماران القا می‌کند (۱۱). Sandlhom در سال ۲۰۱۶ نشان داد که TLR9 در سرطان پستان سه‌گانه منفی به شدت بیان می‌شود و با پیش‌آگهی خوبی همراه است. TLR2 گیرنده دیگری است که به عنوان عامل پیشرفت متاستاز تومور پس از فعال شدن آن مطرح شده است (۱۲). همه این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای درون‌زا آزاد شده در طی استرس سلولی ناشی از آسیب یا مرگ سلولی (از جمله پروتئین HMGB 1، پروتئین کروموزومی غیرهیستونی موجود در هسته سلول‌های مهره‌داران، اتصال DNA دو رشته‌ای استاندارد بدون توالی اختصاصی)، فعال می‌شوند (۴). این پروتئین‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی احتمالی در بیماران مبتلا به

[1] Toll-like Receptors
[2] Pattern Recognition Receptors
[3] Pathogen Associated Molecular Patterns
[4] Damage-Associated Molecular Patterns
[5] High Mobility Group Box 1

[Downloaded from ijpbdi.com on 2022-09-28 05:18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

سرطان پستان شناسایی شدند، زیرا در سرم‌ها و بافت‌های این بیماران به میزان بالایی بیان می‌شوند (۱۳، ۱۴). مطالعه ما با هدف بررسی سطح غلظت سرمی TLR 2, 4, 9، HSP70[6] و HMGB1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام شد. همچنین به‌منظور بررسی ارتباط رشد تومور با پروتئین‌های ذکر شده، سطح بیان این پروتئین‌ها در مراحل و درجه‌های مختلف بیماری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه مقطعی بود که بر روی مبتلایان به سرطان پستان مراجعه کننده مرکز انکولوژی بصره در بازه زمانی دی ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۸و زنان به ظاهر سالم بدون تومور خوش‌خیم یا بدخیم انجام شد. حداقل حجم نمونه لازم با استفاده از نتایج مطالعه Al-Ammiri (۱۳) و با در نظر گرفتن ضریب خطای آلفا و بتای ۰/۰۵ و ۰/۲۰ و سطح سرمی TLR2 در گروه‌های مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم که به‌ترتیب بین ۲۷/۶-۰/۱۷۸ و ۴/۶۹۳ – ۰/۱ بود تعداد ۲۵ نمونه محاسبه شد. با توجه به لزوم اندازه‌گیری سطح سرمی سایر گیرنده‌های شبه toll، نهایتاً ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۲۵ فرد سالم وارد مطالعه شدند. معیارهای ورود شامل سن ۳۰-۷۱ سال و سرطان پستان تایید شده بر اساس نتایج بافت‌شناسی بودند. افراد مبتلا به بیماری سیستمیک، سابقه پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی قبلی از مطالعه خارج شدند. از کلیه شرکت‌کنندگان واجد شرایط، رضایت آگاهانه کسب شد. با توجه به عدم وجود کمیته اخلاق در دانشگاه، کلیه مراحل تحقیقاتی با تایید و نظارت مرکز انکولوژی بصره انجام شد.

جمع‌آوری نمونه خون

۳ میلی‌لیتر خون وریدی توسط سرنگ یک‌بار مصرف از شرکت‌کنندگان گرفته شد. هریک از نمونه خون‌ها در یک لوله ژل گذاشته و اجازه داده شد تا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق لخته شود، سپس در شرایط g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ شدند. سرم‌های به‌دست آمده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی غلظت سرمی مولکول‌ها

غلظت در گردش TLR2، TLR4، TLR9، HMGB1 و HSP70 با استفاده از کیت ساندویچی ELISA ساخت شرکت My BioSource آمریکا اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

فراوانی و پراکندگی متغیرها با استفاده از میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. به‌منظور مقایسه سطح سرمی TLR 2 , 4, 9، HMGB1 و HSP70 بیماران با افراد سالم از آزمون T student استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

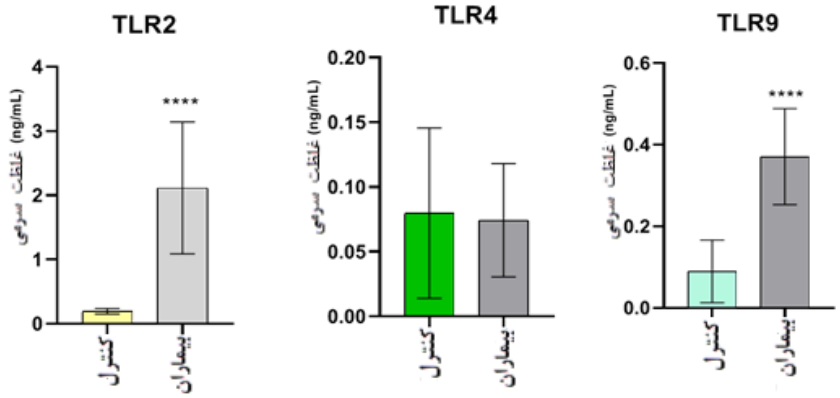
یافته‌ها

غلظت سرمی TLR 2, 4, 9، HSP70 و HMGB1 محلول

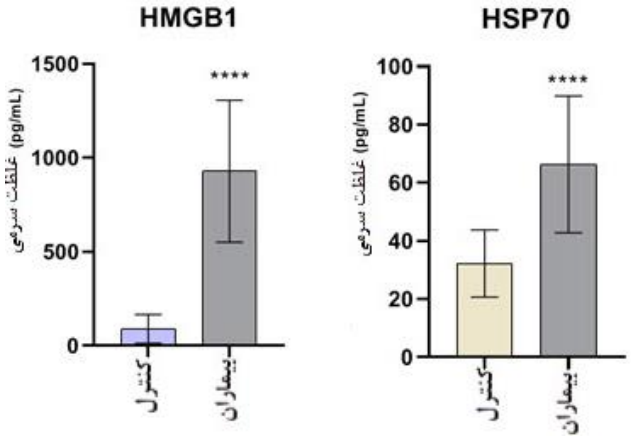
نتایج حاصل از روش ELISA نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین سطح سرمی TLR4 در مبتلایان به سرطان پستان و گروه کنترل وجود نداشت، در حالی که بین سطح سرمی TLR 2 & 9، HMGB1 و HSP70 بیماران با افراد سالم مورد مطالعه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت (شکل ۱ و ۲). همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، غلظت سرمی TLR2 و TLR9 در بیماران به‌ترتیب ng/ml ۱/۰۲۶±۲/۱۱۷ و ۰/۱۱۸±۰/۳۷۱ و در افراد سالم به‌ترتیب ng/ml ۰/۰۴۴±۰/۱۹۵ و ۰/۰۷۷±۰/۰۹ بود که به میزان قابل توجهی در مبتلایان به سرطان پستان بالاتر از افراد سالم گروه کنترل بود (P≤۰/۰۵). همچنین غلظت سرمی HMGB1 در بیماران (pg/ml ۳۷۸±۹۲۸/۸۹۳) و در افراد گروه کنترل (pg/ml ۷۵/۸۳۲±۸۹/۵۸۸) به‌دست آمد. غلظت سرمی HSP70 در بیماران (pg/ml ۲۳/۵۴۴±۶۶/۳۷۰) و در افراد سالم (pg/ml ۱۱/۵۸۰±۳۲/۲۵۰) بود (P≤۰/۰۵) (جدول ۲).

[6] Heat Shock Proteins 70 Kilo Dalton

[Downloaded from ijbdcom 2022-05-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]



شکل ۱: غلظت سرمی TLR 2, 4, 9 در بیماران و گروه کنترل



شکل ۲: غلظت سرمی HSP70 و HMGB1 در بیماران و گروه کنترل

جدول ۱: غلظت سرمی TLR 2, 4, 9 در بیماران و گروه کنترل (ng\ml)

متغیر	بیماران		کنترل		P_value
	تعداد	میانگین (± انحراف معیار)	تعداد	میانگین (± انحراف معیار)	
TLR2	۵۰	۲/۱۱۷ ±۱/۰۲۶	۲۵	۰/۱۹۵ ±۰/۰۴۴	<۰/۰۰۰۱*
TLR4	۵۰	۰/۰۷۴ ±۰/۰۴۴	۲۵	۰/۰۸ ±۰/۰۶۶	۰/۷
TLR9	۵۰	۰/۳۷۱ ±۰/۱۱۸	۲۵	۰/۰۹ ±۰/۰۷۷	<۰/۰۰۰۱*

ارتباط بین غلظت TLR 2,4,9، HSP70 و HMGB1 محلول با متغیرهای جمعیتی و بالینی

همان‌گونه که در جدول ۳ نمایش داده شده است، بر اساس آزمون t-student در مبتلایان به سرطان پستان ارتباط معنی‌داری بین سن و غلظت در گردش TLR 2, 4, 9 و HSP70 یافت نشد، در حالی که غلظت سرمی HMGB1 در بیماران ۵۰≤ سال بالاتر بود.

نتایج آزمون ANOVA نشان داد که سطح سرمی TLR9 و HMGB1در افراد با مرحله II وIV بیماری نسبت به مرحله III به‌طور قابل توجهی بالاتر بود (۰/۰۰۰۱>). تفاوت معنی‌داری از نظر سطوح سرمی TLR 2, 4 در مراحل مختلف بیماری یافت نشد (P-value=۰/۱۵). در بین درجات II و III بیماری، تفاوت معناداری بین سطوح سرمی مولکول‌های TLRs و DAMPs دیده نشد (P-value=۰/۳۲).

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-28]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

جدول ۲: غلظت سرمی HSP70 و HMGB1 در بیماران و گروه کنترل (pg\ml)

متغیر	بیماران		کنترل		P_value
	تعداد	میانگین (± انحراف معیار)	تعداد	میانگین (± انحراف معیار)	
HMGB1	۵۰	۹۲۸/۸۹۳ ±۳۷۸	۲۵	۸۹/۵۸۸ ±۷۵/۸۳۲	<۰/۰۰۰۱*
HSP70	۵۰	۶۶/۳۷۰ ±۲۳/۵۴۴	۲۵	۳۲/۲۵۰ ±۱۱/۵۸۰	<۰/۰۰۰۱*

جدول ۳: بررسی سطح سرمی TLR 2,4,9، HMGB1 و HSP70 به تفکیک سن، مرحله و درجه بیماری در بیماران مبتلا به سرطان پستان

متغیر		TLR2	TLR4	TLR9	HMGB1	HSP70
		میانگین (± انحراف معیار) (ng/ml)	میانگین (± انحراف معیار) (ng/ml)	میانگین (± انحراف معیار) (ng/ml)	میانگین (± انحراف معیار) (pg/ml)	میانگین (± انحراف معیار) (pg/ml)
گروه سنی	≤۵۰ (n=۲۱)	۱/۲۶۷±۱/۴۵	۱/۰۶۲±۰/۴۱	۰/۳۳۶±۰/۱۲۳	۷۸۸/۲۷±۰/۵۸۱	۴۰/۷±۴۰/۰۵
	>۵۰ (n=۲۹)	۱/۷۸۶±۱/۵۲	۰/۷۷۸±۰/۳۳۲	۰/۲۶۰±۰/۱۶۳	۵۶۵±۲۷۱	۴۹±۲۹/۱۲
مرحله بیماری	II	۱/۴۹±۱/۳	۱/۶۲±۱/۴۱	۰/۳۴۲±۰/۱۴۳	۶۶۱/۱۷±۵۲۲	۴۴/۷±۳۴/۰۵
	III	۱/۷۸۶±۱/۰۳	۰/۵۹±۰/۳۹	۰/۲۰۵±۰/۱۴۲	۳۰۷±۲۵۱	۵۲/۵۹±۵۲/۱۲
	IV	۱/۳±۱/۲	۰/۳۱۱±۰/۲۹۱	۰/۳۱۳±۰/۱۱۵	۹۵۸±۸۹	۳۳/۵۸±۲۴
درجه بیماری	II	۱/۶۰±۱/۳	۱/۱۴±۰/۸	۰/۳۰۵±۰/۱۵	۶۵۸/۹±۵۰۷	۴۶/۷±۳۱
	III	۱/۳±۱/۱	۰/۱۱±۰/۱۰۶	۰/۲۶۸±۰/۱۳	۴۸۰/۷±۳۰۹	۲۸±۳۷/۳

بحث

مطالعه حاضر ارزش بالینی TLR 2, 4, 9 محلول، HMGB1 و HSP70 را به‌عنوان عوامل پیش‌آگهی احتمالی در تشخیص سرطان پستان و همچنین نقش این گیرنده‌ها و پروتئین‌ها در پیشرفت و سرکوب سرطان پستان را بررسی نموده است.

بر اساس یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه، TLR2 محلول در مبتلایان به سرطان پستان بالاتر از گروه کنترل بود. در مطالعه مشابه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد، سطوح سرمی بالاتر TLR2 در بیماران با سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم گروه کنترل نشان داده شد (۱۳). TLR2 محلول می‌تواند با تقسیم پروتئاز یا با ترشح اکتودومین[7] تولید شود (۱۴، ۱۵) که منجر به حداقل ۶ پلی‌پپتید متمایز TLR2 محلول می‌شود که در شیر انسان، پلاسما و محیط کشت رویی مونوسیتی[8] شناسایی شده‌اند. TLR2 محلول به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی برای TLR2 متصل به غشاء توصیف شده است و TLR2 واسطه‌کننده التهاب را تا حدی با جلوگیری از اتصال به گیرنده CD14 سرکوب می‌کند و یا با TLR2 سلولی برای لیگاندهای میکروبی رقابت می‌کند (۱۶). از این رو سطوح بالای TLR2 محلول ممکن است نشان‌دهنده افزایش مکانیسم تنظیمی باشد که توسط TLR2 محلول برای تداخل با لیگاند درون‌زا TLR2 ایجاد می‌شود و از پاسخ ایمنی ناکافی جلوگیری می‌کند (۱۷). با این حال، TLR2 بیان شده بر روی سلول‌های سرطان پستان با شروع مسیر پیام‌دهی که با فعال شدن فاکتور رونویسی NF-kB ختم می‌شود، در پیشرفت سرطان نقش دارد، که فاکتور رونویسی NF-kB در تهاجم و متاستاز سرطان پستان موثر است (۱۸، ۱۹).

[7]Ectodomain Shedding

[8]Monocyte Culture Supernatant

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-09-25]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

در بخشی از نتایج مطالعه حاضر، غلظت TLR4 تفاوت معنی‌داری بین بیماران و گروه‌های سالم نداشت. در حالی‌که در مطالعه El-Kharashy و همکاران در سال ۲۰۲۱، مشخص شد که سطح TLR4 محلول در بیماران مبتلا به سرطان پستان به میزان قابل توجهی افزایش داشته است (۲۰). این اختلاف نتایج ممکن است به دلیل مقادیر بسیار کم TLR4 ترشح شده از سلول‌های سرطانی باشد. همچنین تعداد نسبتاً کم حجم نمونه به عنوان یکی از محدودیت‌های مطالعه ما می‌تواند خود دلیلی بر این تفاوت باشد. با این حال، تصور می‌شود که TLR4 به شدت در سلول‌های تومور بیان می‌شود و با شروع مسیر پیام‌دهی که با فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-kB ختم می‌شود، با پیشرفت تومور مرتبط است و متعاقباً افزایش تولید سیتوکین‌های مختلف التهابی (IL-6، MCP-1، MIF، GRO-α و غیره) و همچنین تعدادی از پروتئین‌های ضد آپوپتوز، یک اثر تحریک‌کننده تومور مستقیم یا غیرمستقیم را تسهیل می‌کند (۵). TLR4 در گردش به‌عنوان نشانگر زیستی احتمالی در سایر تومورها گزارش شده است. این پروتئین در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی مری و سرطان محل اتصال معده به مری در مقایسه با افراد سالم به‌طور قابل توجهی بالاتر بوده است (۶).

مطالعه ما نشان داد که سطح TLR9 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد، این یافته‌ها با نتایج مطالعه Diakowska و همکاران (۶) مطابقت دارد،گرچه آن‌ها انواع مختلفی از سرطان را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه Lee و همکاران نیز مشخص شد که TLR9 به طور پروتئولیتیکی در اکتودومین پردازش می‌شود تا یک رقیب محلول و متصل به لیگاند ایجاد نماید (۶، ۲۱). TLR9 یکی از گیرنده‌های Toll-like است که در غشاهای اندوزومی بیان می‌شود. لیگاندهای درون‌زا TLR9، DNA درون‌زا هستند (یعنی DNA CpG غیرمتیله) (۲۲). پژوهش حاضر اولین مطالعه در عراق است که TLR9 را در سرم بیماران سرطان پستان ارزیابی نموده است. ما دریافتیم که غلظت TLR9 محلول در بیماران نسبت به افراد سالم بالاتر است. مشخص شده است که TLR9 محلول با هیدرولیز TLR9 متصل به غشاء ایجاد می‌شود. TLR9 محلول می‌تواند به صورت رقابتی با TLR9 به لیگاندها متصل شود، که نقش تنظیمی را در مرحله اولیه مسیر پیام‌دهی TLR9 ایفا می‌کند (۲۲). بر اساس مطالعات قبلی، TLR9 به میزان زیادی توسط سلول‌های توموری در سرطان پستان بیان می‌شود. علاوه بر این، به عنوان یک عامل پیش آگهی خوب در بیماران مبتلا به سرطان پستان سه‌گانه منفی گزارش شده است (۱۲). نتایج به‌دست آمده از مطالعه ما مبنی بر سطوح بالایTLR9 محلول در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مرحله II بیماری، می‌تواند شواهدی در تایید نقشTLR9 به عنوان یک عامل پیش آگهی خوب ارائه نماید. پژوهش‌های بیشتری برای درک هرچه بهتر نقش TLR9 محلول و تداخل بین این فرم و فرم متصل به غشاء مورد نیاز است.

ما متوجه شدیم که غلظت HMGB1 در بیماران به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود. نتایج مطالعه Sun و همکاران نیز نشان‌دهنده غلظت بالاتر HMGB1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان و زنان با بیماری‌های خوش‌خیم پستان نسبت به افراد سالم بود (۲۳). سلول‌های سرطان پستان به‌صورت مزمن HMGB1 را در طول تومورزایی آزاد می‌کنند، بنابراین HMGB1 ممکن است یک نشانگر زیستی جدید برای سرطان پستان باشد (۲۳). اما نقش این پروتئین در تومورزایی به‌طور کامل شناخته نشده است. با این حال، شواهد رو به رشدی وجود دارد که تأثیر HMGB1 را در متاستاز سرطان با فعالیت آن برای القای بیان متالوپروتئیناز (جزء اصلی در طول تهاجم و متاستاز تومور) نشان می‌دهد. از سوی دیگر، در یک مطالعه نیز فعالیت سرکوب‌گری تومور را برای HMGB1 در تعامل با ژن‌های سرکوبگر تومور مانند p53 و p73 (اولین همولوگ شناسایی شده p53) مطرح نمود (۲۴). نتایج مطالعه ما نشان داد که غلظت HMGB1 در

[Downloaded from ijpbdi.com on 2022-09-25]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

بیماران در مرحله II بیماری نسبت به مرحله III بالاتر بود. این یافته‌ها ممکن است از نقش مثبت HMGB1 به‌عنوان سرکوب‌گر تومور حمایت کنند یا ممکن است منعکس‌کننده تداخل سطوحHMGB1 با عوامل دیگری مانند چاقی یا داروهای خاص باشد.

دو نوع HSP70 در گردش به شرح زیر شناسایی شده است:

۱. HSP70 اگزوزومی که توسط سلول‌های تومور مثبت غشایی آزاد می‌شود و منجر به تحریک سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود (۲۵).
۲. HSP70 که توسط سلول‌های سرطانی در حال مرگ آزاد می‌شود و به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMPs) عمل می‌کند (۲۶).

مطالعه حاضر نشان داد که HSP70 در گردش در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم بالاتر است، که مطابق با نتایج چندین مطالعه قبلی است که نشان داد HSP70 در سلول‌های سرطان پستان بیش از حد بیان می‌شود. پس از آزاد شدن توسط سلول‌های نکروزه، HSP70 دارای پتانسیل ایمونوژنیک بسیار خوبی برای شروع پاسخ قوی ضدتوموری سلول T است که به آنتی‌ژن تومور یا بدون آنتی‌ژن متصل می‌شود (۲۷، ۲۸).

شاید اندازه‌گیری آن در سرم بیماران بتواند در تعیین پیش‌آگهی بیماری و شخصی‌سازی درمان فرد اثرگذار باشد. یافته‌های مطالعه حاضر از بررسی سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان در بصره کسب شد و تایید این موضوع و اثرگذاری در پروتکل‌های درمانی قطعا نیاز به مطالعات وسیع‌تر بر روی جمعیت‌های مختلف دارد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج حاصل از این مطالعه پتانسیل TLR 2, 9 محلول، HMGB1 و HSP70 را به‌عنوان عوامل پیش‌آگهی در سرطان پستان نشان داد. سطح سرمی HMGB1 در مبتلایان به سرطان پستان و در مرحله II بیماری نسبت به مرحله III بالاتر بود که ممکن است نشان‌دهنده اثر ضدتوموری احتمالی این مولکول در مراحل مختلف باشد. این اثر ضدتوموری با انجام تحقیقات بیشتر می‌تواند برای پیشنهاد در پروتکل‌های درمانی در نظر گرفته شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اظهار می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی در ارتباط این مقاله ندارند.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians. 2018; 68(1):7-30.
2. Abood RA. Breast cancer in Basra oncology center: a clinico- epidemiological analysis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP. 2018; 19(10):2943.
3. Habib OS, Hameed LA, Ajeel NA, Al-Hawaz MH, Al-Faddagh ZA, Nasr GN, et al. Epidemiology of breast cancer among females in Basrah. Asian Pacific Journal of Cancer prevention. 2016; 17(3):191-5.
4. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. Molecular medicine. 2008; 14(7): 476-84.
5. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. Innate immunity: structure and function of TLRs. Medecine Sciences: M/S. 2007; 23(1):67-73.
6. Diakowska D, Nienartowicz M, Grabowski K, Rosińczuk J, Krzystek-Korpacka M. Toll-like receptors TLR-2, TLR-4, TLR-7, and TLR-9 in tumor tissue and serum of the patients with esophageal squamous cell carcinoma and

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-25]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]

gastro-esophageal junction cancer. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2019; 28(4):515-22.

7. Takeda K, Akira S. Toll- like receptors. Current protocols in immunology. 2015; 109(1): 1-14.
8. Wei F, Yang F, Li J, Zheng Y, Yu W, Yang L, et al. Soluble Toll-like receptor 4 is a potential serum biomarker in non-small cell lung cancer. Oncotarget. 2016; 7(26):40106.
9. Semlali A, Jalouli M, Parine NR, Al Amri A, Arafah M, Al Naeem A, et al. Toll-like receptor 4 as a predictor of clinical outcomes of estrogen receptor-negative breast cancer in Saudi women. OncoTargets and therapy. 2017; 10: 1207-16
10. Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H, et al. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. PloS one. 2014; 9(10):e109980.
11. González-Reyes S, Marín L, González L, González LO, del Casar JM, Lamelas ML, et al. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. BMC cancer. 2010; 10(1):1-9.
12. Sandholm J, Selander KS. Toll-like receptor 9 in breast cancer. Frontiers in immunology. 2014; 5:330.
13. Al-Ammiri HH, Al-Derzi AR. Validity of serum Toll-like receptor-2 (TLR-2) in women with breast tumor. Journal of the Faculty of Medicine Baghdad. 2013; 55(2):152-7.
14. Iwami K-i, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. The Journal of Immunology. 2000; 165(12): 6682-6.
15. Langjahr P, Diaz-Jimenez D, De la Fuente M, Rubio E, Golenbock D, Bronfman FC, et al. Metalloproteinase- dependent TLR2 ectodomain shedding is involved in soluble toll-like receptor 2 (sTLR2) production. PloS one. 2014; 9(12):e104624.
16. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR) 2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. The Journal of Immunology. 2003; 171(12):6680-9.
17. Ten Oever J, Kox M, van de Veerdonk FL, Mothapo KM, Slavcovici A, Jansen TL, et al. The discriminative capacity of soluble Toll-like receptor (sTLR) 2 and sTLR4 in inflammatory diseases. BMC immunology. 2014; 15(1):1-10.
18. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. The Journal of clinical investigation. 2004; 114(4):569-81.
19. Xie W, Huang Y, Xie W, Guo A, Wu W. Bacteria peptidoglycan promoted breast cancer cell invasiveness and adhesiveness by targeting toll-like receptor 2 in the cancer cells. PLoS One. 2010; 5(5):e10850.
20. El-Kharashy G, Gowily A, Okda T, Houssen M. Association between serum soluble Toll-like receptor 2 and 4 and the risk of breast cancer. Molecular and Clinical Oncology. 2021; 14(2):38.
21. Lee S, Kang D, Ra EA, Lee TA, Ploegh HL, Park B. Negative self-regulation of TLR9 signaling by its N-terminal proteolytic cleavage product. The Journal of Immunology. 2014; 193(7): 3726-35.
22. Chockalingam A, Cameron JL, Brooks JC, Leifer CA. Negative regulation of signaling by a soluble form of toll- like receptor 9. European Journal of immunology. 2011; 41(8):2176-84.
23. Sun S, Zhang W, Cui Z, Chen Q, Xie P, Zhou C, et al. High mobility group box-1 and its clinical value in breast cancer. OncoTargets and therapy. 2015; 8:413.
24. Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. Neoplasia. 2009; 11(7):615-28.
25. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. HSP70 multi-functionality in cancer. Cells. 2020; 9(3): 587-613.
26. Rückert M, Deloch L, Fietkau R, Frey B, Hecht M, Gaipl US. Immune modulatory effects of radiotherapy as basis for well-reasoned radioimmunotherapies. Strahlentherapie und Onkologie. 2018; 194(6): 509-19.
27. Daniels GA, Sanchez-Perez L, Diaz RM, Kottke T, Thompson J, Lai M, et al. A simple method to cure established tumors by inflammatory killing of normal cells. Nature biotechnology. 2004; 22(9):1125-32.
28. Willmer T, Contu L, Blatch GL, Edkins AL. Knockdown of Hop downregulates RhoC expression, and decreases pseudopodia formation and migration in cancer cell lines. Cancer letters. 2013; 328(2):252-60.

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.2.6.2]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.2.50]