میزان بیان پروتئین BRCA1 در کارسینوم های مهاجم و درجای پستان و ارتباط آن با مارکر سلول های بنیادی سرطان پستان (CD44) و عوامل پیش آگهی تومور

دکتر عادل کریمی کیوی: دستیار آسیب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشی –درمانی تهران، تهران، ایران
***دکتر زهرا مجد:** استادیار و متخصص ایمونوپاتولوژی، مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه های شهید چمران و همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشی –درمانی تهران، تهران، ایران (*مولف مسئول)
دکتر فروغ هاشمی: دانشیار و متخصص آسیب شناسی، مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشی –درمانی تهران، تهران، ایران
دکتر سعادت مولانایی: متخصص پاتولوژی، بیمارستان میلاد، تهران، ایران

* این مقاله خلاصه ای است از پایان نامه دکتر عادل کریمی کیوی جهت دریافت درجه دکترای تخصصی آسیب شناسی به راهنمایی دکتر زهرا مجد و مشاوره دکتر فروغ هاشمی، سال ۱۳۸۹.

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان (Breast Cancer) شایع ترین علت سرطان و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در میان زنان می‌باشد. علی رغم پیشرفت‌های چشمگیر در درمان، حدود ۲۵٪ بیماران مبتلا به سرطان پستان سالانه جان خود را به علت این بیماری از دست می‌دهند. شواهد بالینی، مولکولی و پاتولوژیک در بیماران سرطان پستان حامل ژن جهش یافته BRCA1 این نظریه را مطرح می‌کند که این ژن به عنوان یکی از عوامل تنظیم کننده سلول‌های بنیادی سرطان عمل می‌کند.در این مطالعه ارتباط بین BRCA1 و مارکر سلول‌های بنیادی سرطان (CD44) و خصوصیات پاتولوژیک تومور بررسی گشت.

روش کار: در این مطالعه علوم پایه ۱۵۶نمونه بیماران مبتلا به سرطان پستان مربوط به سال‌های ۸۵ تا ۱۳۸۶ بررسی شدند. میزان رنگ‌پذیری کلی لام برای پروتئین BRCA1 به تفکیک در سیتوپلاسم و هسته توسط روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. ارتباط جهش‌های BRCA1 با متغیرهایی نظیر سن و خصوصیات پاتولوژیک تومور و نیز میزان بیان مارکر سلول‌های بنیادی سرطان پستان(CD44) با روش آنالیز مجذور کای سنجیده شد. اطلاعات به دست آمده در نرم افزار SPSS V. 16 (Chicago, IL) ثبت گردید.

یافته‌ها: جهش‌های BRCA1 در تومورهای با گرید بالا و با پیش آگهی بدتر مشاهده شد(p=۰/۰۰۶). سن بیماران همچنین با جهش‌های هسته‌ای BRCA ارتباط معنی‌داری داشت و در زنان زیر ۴۰ سال شایع‌تر بود(p=0.04). جهش‌های هسته‌ای BRCA1 با ظهور مارکرCD44 ارتباط معنی‌داری داشت(p=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که جهش هسته‌ای BRCA1 به عنوان یک مارکر بدخیمی تومور مطرح می‌باشد و با مارکر سلول‌های بنیادی سرطان پستانCD44 مرتبط می‌باشد. مشاهده ارتباط بروز مارکرCD44 با این جهش‌های هسته‌ای BRCA1 می‌تواند نشانه‌ای از ارتباط میان سلول‌های بنیادی سرطان با این جهش‌های BRCA1 در سرطان پستان باشد و تایید کننده این نظریه می‌باشد که جهش‌های BRCA1 باعث تغییرات تجمعی ژنتیکی و ناپایداری سلول‌های بنیادی پستان شده که زمینه‌ساز مراحل بعدی ایجاد سرطان در این سلول‌ها می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان ، سلول های بنیادی سرطان، عوامل پیش اگهی، CD44، BRCA1

مقدمه

سرطان پستان رایج ترین سرطان در زنان می‌باشد[۱] به طوری که از هر دوازده زن یک نفر قبل از رسیدن به سن ۷۰ سالگی به این سرطان مبتلا می‌شود. از این تعداد فقط بخش کوچکی (تقریبا ۵ تا ۱۰ درصد) در اثر جهش‌های اتوزومال غالب به این بیماری مبتلا می‌شوند. تغییرات کروموزومی خاصی که با سرطان پستان مرتبط هستند عبارتند از: موتاسیون در ژنBRCA1 روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ و موتاسیون ژن BRCA2 روی کروموزوم ۱۳. BRCA1 به عنوان نخستین ژن مستعد جهش سر طان پستان شناخته شده است. این ژن درسال ۱۹۹۰ شناسایی و نقشه برداری و در سال ۱۹۹۴ کلون گردید و محل دقیق ان در ۲۱q۱۷ قرار دارد.

در ۴۵٪ از بیمارانی که سرطان پستان ارثی دارند و ۹۰٪ بیمارانی که سرطان همزمان پستان و تخمدان

www.SID.ir

دارند BRCA1 مثبت است. خطر ایجاد سرطان تخمدان مرتبط با BRCA1 در طول زندگی ۴۵٪ است.[۲-۴]

زمینه‌های ژنتیکی از جمله جهش‌های BRCA1 در بیماران جوان‌تر مبتلا به سرطان پستان شایع‌تر می‌باشد به طوری که مطالعات نشان می‌دهد خطر شروع زودرس سرطان پستان (در سنین زیر ۴۰ سال) در حاملین جهش‌های BRCA1 حدوداً ۲۰ برابر بیشتر از سایر افراد جامعه بوده وخطر ابتلا به سرطان پستان در طول زندگی این افراد ۸۵-۶۰٪ می‌باشد.[۵]

سرطان پستان را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد. دسته اول که ۱۰ درصد از سرطان‌های پستان را در خانم‌ها به خود اختصاص می‌دهد، نوع وراثتی با الگوی اتوزوم غالب است که از شاخصه‌های آن بروز تومور در سنین پایین و تجمع افراد مبتلا به سرطان پستان و تخمدان در یک خانواده است. دسته دوم سرطان نوع فامیلی است که با بروز کمتر نسبت به گروه اول و تحت تاثیرعوامل ژنتیکی و محیطی ایجاد می شود و ۲۰ درصد از تومورهای پستان را در بر می گیرد .دسته سوم که در ۷۰ درصد سرطان‌های پستان دیده می‌شود از نوع تک‌گیر می‌باشد. در این نوع سرطان خطر برای همه خانم‌ها بدون سابقه فامیلی یکسان می‌باشد. اینگونه تومورها احتمالا "دراثر عوامل محیطی از قبیل هورمون درمانی و تغذیه نامناسب پدید می‌آیند. جالب توجه است که عوامل محیطی دیگری مانند تعداد بارداری و تغذیه کودک با شیر مادرخطر ابتلا به این نوع سرطان را در خانم‌ها کاهش می‌دهد.[۲]

فرضیه سلول‌های بنیادی سرطان (Cancer Stem Cells)، عامل عود و مقاومت دارویی سرطان را به سلول‌های بنیادی سرطان نسبت داده است. این گروه از سلول ها در بسیاری از تومورها از جمله بدخیمی‌های خونی، تومورهای مغزی وتومورهای پستان شناسایی شده‌اند.[۶-۸] سلول‌های بنیادی سرطان پستان (Breast Cancer Stem Cells) گروهی از سلول‌ها در تومور پستان هستند که قادر به تولید مجدد سلول‌های سرطانی پس ازیک دوره طولانی بهبودی از بیماری می‌باشند که این امر منجر به عود و متاستاز سرطان و در نهایت مرگ بیمار می‌گردد.[۹] مطالعات متعدد نشانگر آن است که سلول‌های بنیادی سرطان پستان برخی مارکرها از جمله CD44را بیان نموده و متقابلاً از نظر برخی مارکرها از جمله CD_{24} منفی می‌باشند.[۱۰و۱۱]

CD_{44}، خانواده ای از گلیکوپروتئین‌های اتصالی سطح سلول است که توسط ژن واحدی بر کروموزوم 11 ساخته می‌شوند. پژوهش های مختلف نشان داده‌اند که مولکول CD44 در دو مرحله از آبشار تهاجمی شامل اتصال به ماتریکس خارج سلولی و تحرک سلول‌های سرطانی نقش مهمی دارد. همچنین، در متاستاز، سلول‌های توموری موجود در گردش باید به آندوتلیوم اتصال یابند که بر اساس مدل‌های تجربی، این کار با واسطه افزایش بروز CD44 بر سطح سلول‌های تومورال انجام می‌گیرد.[۱۲و۱۳]

BRCA1 دارای نقش کلیدی در ترمیم DNA و کنترل سیکل سلولی است و باعث حفظ پایداری ژنتیکی سلول‌های پستان شده[۱۴و۱۵] و جهش‌های آن منجر به تغییرات ژنتیکی و ناپایداری سلول های بنیادی پستان و در نهایت سرطان‌زایی می‌گردد. علاوه بر ان برخی مطالعات بیانگر نقش مهم BRCA1 به عنوان رگولاتور و تنظیم کننده سلول های بنیادی پستان می‌باشد.[۱۶-۱۸]

اگرچه مطالعات فراوانی در مورد نقش BRCA1 در سرطان های پستان فامیلیال انجام گرفته است، اما هنوز در مورد میزان بیان و نقش آن در تومورهای پستان اسپورادیک اختلاف نظر وجود دارد.[۱۹-۲۱] از طرفی تاکنون هیچ گونه مطالعه‌ای جهت بررسی ارتباط بین پروتئین BRCA1 و مارکرهای سلول‌های بنیادی سرطان پستان در بافت‌های تومورال انسانی انجام نشده است. لذا، در این مطالعه ارتباط بین میزان بیان پروتئین BRCA1 در تومور پستان بابیان مارکر شناخته شده سلول‌های بنیادی سرطان پستان(CD44) بررسی گشت.

روش کار

در این مطالعه علوم پایه (Experimental) تعداد ۱۵۶ نمونه بافتی سرطان پستان جمع آوری شده از بخش پاتولوژی بیمارستان میلاد از بیمارانی که بین سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ جهت تشخیص و یا درمان کارسینوم تحت ماستکتومی و یا بیوپسی قرار گرفته بودند، مورد بررسی قرارگرفتند. پس از بررسی نمونه‌ها، جمع‌آوری اطلاعات مربوط به بیماران و برش ۵

Archive of SID
www.SID.ir

میکرونی، آزمایش ایمونوهیستوشیمی روی نمونه های بافتی پارافینی در بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)به روش استانداردصورت پذیرفت.[۲۲و۲۳]

برش‌های دریافتی قبل از آزمایش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry-IHC) به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد فور گذاشته شد. سپس بافت ها به مدت۱۰-۱۵ دقیقه در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد داخل فور قرار داده شد. مراحل دپارافینیزاسیون و رهیدراسیون و بلاکه کردن بافت ها به ترتیب داخل گزیلول، الکل اتانول سریال ومحلول هیدروژن پروکسیداز/ متانول انجام گرفت. بافت‌های مورد مطالعه پس ازآنتی ژن رتریوال به مدت ۱۰ دقیقه داخل اتوکلاو در ظرف حاوی بافر مناسب (سیترات بافر pH6) به ترتیب به مدت ۱ ساعت در تماس با آنتی بادی اولیه، یک ساعت در تماس با آنتی بادی ثانویه و سپس نیم ساعت در تماس با HRP labelled streptavidin complex قرار داده شد.

جهت ظاهر شدن رنگ آمیزی، از محلول آماده DAB و سپس هماتوکسیلین استفاده شد. لام‌های رنگ آمیزی شده زیر میکروسکوپ نوری بر اساس شدت رنگ آمیزی و درصد سلول‌های مثبت از نظر مارکر مورد نظر، score و تفسیر گردید. سلول‌ها از نظر شدت Intensity رنگ آمیزی به چهار گروه تقسیم شدند:

گروه یک: صفر یعنی بدون رنگ آمیزی یا Non staining، گروه دو: رنگ آمیزی ضعیف یا Weakly staining، گروه سه: رنگ آمیزی متوسط یا Moderate staining و گروه چهار: رنگ آمیزی قوی یا Strong staining ازنظر درصد رنگ‌پذیری (Percentage) به چهار گروه تقسیم شدند:

گروه یک: کمتر از ۲۵٪، گروه دو: ۵۰-۲۵٪ ، گروه سه: ۷۵-۵۰٪ و گروه چهار: بالاتر از ۷۵٪ از سلول‌ها رنگ شده‌اند.

H-score: این معیار از حاصل ضرب BRCA1 intensity در درصد سلول‌های مثبت به دست می‌آید که از نظر تئوری می‌تواند عددی بین ۰ تا ۳۰۰ باشد.

BRCA1 intensity× percentage of positive cells = H-score

مشاهده و تفسیر لام ها توسط محققین انجام شد و در بیش از ۹۵٪ موارد توافق حاصل گردید. سپس اطلاعات به دست آمده در نرم افزار SPSS version 16 (Chicago, IL) ثبت گردیده و ارتباط میان متغیرهای کیفی با روش آنالیز مجذور کای انجام پذیرفت. کلیه اطلاعات مربوط به آنتی‌بادی‌ها و مواد مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

یافته‌ها

اطلاعات مربوط به بیماران

تعداد ۱۵۶ نمونه تومور پستان از نظر میزان بیان BRCA1 مورد مطالعه ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند که اطلاعات کلینیکی و پاتولوژیک تعدادی از این نمونه‌ها در پرونده‌هایشان ثبت نگردیده بود.

بیمارانی که اطلاعات مربوط به سن آن‌ها در پرونده ثبت شده بود (۱۳۳ بیمار) در ۴ گروه سنی بررسی شدند: افراد زیر ۴۰ سال، ۳۳ بیمار (۲۵٪)، افراد ۴۰ تا ۵۰ سال ۴۳ نفر (۳۲٪)، بیماران ۵۱ تا ۶۰ سال، ۳۵ نفر (۲۶٪) و افراد بالای ۶۰ سال ۲۲ بیمار (۱۷٪) (جدول شماره ۲).

از ۱۵۲تومور که اطلاعات مر بوط به گرید (Grade) آن‌ها در پرونده وجود داشت: ۱۸ تومور گرید ۱(۱۲٪)، ۶۴ تومور (۴۲٪) گرید ۲ و ۷۰ بیمار (۴۶٪) گرید ۳

جدول شماره ۱- آنتی بادی و مواد مورد استفاده در آزمایش ایمونوهیستوشیمی

نوع ماده مصرفی	مختصات ماده مصرفی	شرکت سازنده
انتی بادی اولیه	BRCA1 monoclonal antibody (clone MxH GLK2)	(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
انتی بادی ثانویه	biotinylated goat anti-mouse/rabbit IgG	(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
HRP	(horseradish peroxidise) labelled streptavidin complex	(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
DAB	3, 3'-diaminobenzidine	(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- ارتباط بین بیان BRCA1 و سن بیماران مبتلا به سرطان پستان

سن بیماران (به تفکیک در چهار گروه)	درصد بیماران در هرگروه (تعداد)	بیان سیتوپلاسمیک BRCA1 (p-value)	بیان هسته‌ای BRCA1 (p-value)
سن (سال)			
<۴۰	۲۵ (۳۳)	۰/۳۸	۰/۰۴
۴۰-۵۰	۳۲ (۴۳)		
۵۰-۶۰	۲۶ (۳۵)		
>۶۰	۱۷ (۲۲)		

جدول ۳- ارتباط بین بیان BRCA1 وخصوصیات پاتولوژیک تومورهای پستان

خصوصیات تومور	درصد بیماران در هرگروه (تعداد)	بیان سیتوپلاسمیک BRCA1 (p-value)	بیان هسته‌ای BRCA1 (p-value)
گرید هیستولوژیک			
گرید ۱(Grade 1)	۱۲ ٪(۱۸)	۰/۵۸	۰/۰۰۶
گرید ۲(Grade 2)	۴۲٪(۶۴)		
گرید ۳(Grade 3)	۴۶٪(۷۰)		
متاستاز لنفاوی			
منفی	۳۱٪(۳۰)	۰/۲۷	۰/۴۳
مثبت	۶۹٪(۶۶)		
تهاجم عروقی			
منفی	۶۰٪(۶۲)	۰/۰۷	۰/۱۷
مثبت	٪ ۴۰(۴۱)		
اندازه تومور(cm)			
≤ 3	۶۴٪(۹۳)	۰/۶۲	۰/۷۹
>3	۳۶٪(۵۲)		
نوع تومور			
داکتال کارسینوم مهاجم (Invasive ductal ca)	٪۸۹ (۱۲۰)	۰/۱۳۹	۰/۰۵
سایر تومورها (داکتال کارسینوم درجا کارسینوم لوبولار مهاجم ،کارسینوم مدولاری)	٪۱۱ (۱۵)		

داشتند. از میان بیمارانی که اطلاعات مربوط به متاستاز به غدد لنفاوی آن ها در پرونده ثبت شده بود(۹۶ بیمار) ۳۰ بیمار (۳۱٪) متاستاز لنفاوی نداشتند و ۶۶ بیمار (۶۹٪) متاستاز لنفاوی داشتند.

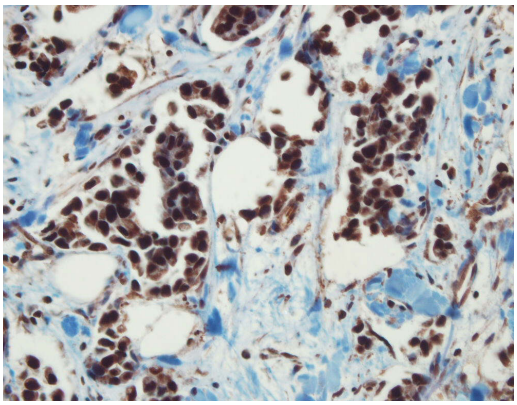
از میان ۱۰۳ تومور حاوی اطلاعات مربوط به تهاجم عروقی۶۲ تومور (۶۰٪) تهاجم عروقی نداشتند و ۴۱ تومور (۴۰٪) تهاجم عروقی داشتند. اندازه تومورهای مورد بررسی نیز از ۰.۸ تا ۱۹ سانتی‌متر متغیر بود. از نظر اندازه تومور بیماران در ۲ گروه طبقه بندی شدند: اندازه تومور۹۳ مورد(۶۴٪) کمتر از ۳ سانتی‌متر و ۵۲ تومور (۳۶٪) سایز بیشتر از ۳ سانتی‌متر داشتند.

در مورد انواع پاتولوژیک تومورها: ۸۹٪ (۱۲۰)تومورها کارسینوم مهاجم مجرایی(Invasive ductal carcinoma)بوده و ۱۱٪ (۱۵) سایر تومورها شامل کارسینوم در جا، کارسینوم مدولاری و کارسینوم لوبولار مهاجم بودند.کلیه اطلاعات مربوط به این قسمت در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

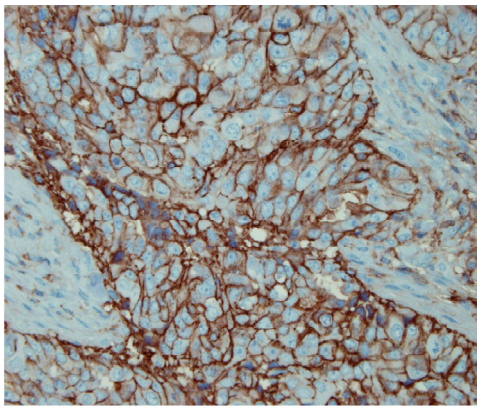
شدت رنگ آمیزی BRCA1 در تومورهای پستان سلول‌های بافت نرمال پستان در حاشیه نواحی تومورال بیانگر شدت زیاد رنگ امیزی BRCA1 درهسته سلول‌ها بود، اما در نواحی تومورال رنگ آمیزی BRCA1 بسیار هتروژن بوده. گاهی در هسته و در برخی سلول‌ها در سیتوپلاسم مشاهده شد و به طور کلی رنگ آمیزی نواحی تومورال پستان ضعیف تر از سلول های نرمال بود.

از نظر شدت رنگ آمیزی BRCA1 نیز ۱۵۶ بیمار

www.SID.ir



شکل شماره ۱) رنگ آمیزی BRCA1 با شدت قوی در هسته سلول‌های تومورال پستان



شکل شماره ۲) رنگ امیزی CD44 با شدت قوی در غشائ سلول‌های تومورال پستان

در ۳ گروه تقسیم بندی شدند: ۵۴ بیمار (۳۴/۵٪) در گروه اول(شدت رنگ آمیزی ضعیف)، ۶۶ بیمار (۴۲/۵٪) در گروه دوم (شدت رنگ آمیزی متوسط) و ۳۶ نفر (۲۳٪) در گروه سوم (شدت رنگ آمیزی قوی) قرار گرفتند (شکل شماره ۱).

از نظر رنگ پذیری هسته سلول نیز از میان ۱۵۶ نمونه، در ۴۴ نمونه (۲۸٪) هسته رنگ نگرفته و در ۱۱۲ مورد دیگر (۷۲٪) هسته رنگ گرفته بود. از نظر رنگ پذیری سیتوپلاسم از میان ۱۵۶ نمونه، ۲۳ نمونه (۱۴/۷٪) رنگ نگرفته و ۱۳۳ نمونه باقی مانده (۸۵/۳٪) از نظر رنگ پذیری سیتوپلاسم مثبت بودند.

از نظر رنگ پذیری غشای سلولی نیز ۱۴۰ نمونه (۸۹٪) رنگ نگرفته و ۱۶ نمونه دیگر (۱۱٪) رنگ گرفته بودند. جهت تکمیل این مطالعات H score بیماران نیز بررسی شد: H score حداقل ۳۰ و حداکثر ۲۷۰ بود. نتایج H score در سه گروه مختلف بررسی شد: H score ۳۶تومور (۲۳٪) کمتر از ۱۰۰، ۸۴ تومور (۵۴٪) بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ و ۳۶ تومور دیگر(۲۳٪) بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ داشتند.

مقایسه میزان بیان BRCA۱ با سن بیماران و خصوصیات پاتولوژیک تومور

جهت مقایسه میزان بیانBRCA۱ در گروه های سنی متفاوت، بیماران در ۲ گروه بیماران کمتر از ۴۰ سال و بالاتر از ۴۰ سال بررسی شدند. میزان رنگ پذیری هسته (به عنوان معیاری از جهش‌های BRCA در هسته) با سن بیماران از طریق تست مجذور کای مقایسه شد و ارتباط مثبت معنی‌داری بین این دو متغیر به دست آمد (p-value=0.047) به این صورت که درتومورهای گروه سنی زیر ۴۰ سال شدت رنگ آمیزی BRCA ۱ کاهش یافته بود (جدول شماره ۲).

ارتباط معکوس معنی‌داری میان گرید تومور و رنگ پذیری هسته‌ای نیز با تست مجذور کای دو دیده شد (p=۰/۰۰۶)؛ به این معنی که در تومورهای با گرید ۳ (تومورهای دارای تمایز کمتر)، شدت رنگ‌آمیزیBRCA۱ کاهش یافته بود (جدول شماره ۳).

به همین ترتیب ارتباط میان متاستاز لنفاوی و شدت رنگ پذیری هسته‌ای نیز با تست مجذور کای مجدداً بررسی شد. از نظر آماری ارتباط معنی‌داری میان این دو متغیر دیده نشد (p=۰/۲۷) (جدول شماره ۳).

ارتباط میان اندازه تومور و رنگ پذیری هسته‌ای نیز در میان نمونه‌های فوق با تست کای دو انجام گرفت. نمونه‌ها در دو گروه با سایز تومور کمتر از ۳ سانتی‌متر و بیشتر از ۳ سانتی متر قرار گرفتند. ارتباط آماری معنی‌داری میان این دو متغیر یافت نشد(p=۰/۶۲). بیماران از نظر نوع تومور در ۲ گروه عمده (گروه ۱ کارسینوم مجرایی مهاجم و گروه دوم سایر تومورها) قرار گرفتند. به کمک آنالیز نان پارامتریک ارتباط آماری معنی داری میان نوع تومور و رنگ آمیزی هسته ای با تست کای دو دیده شد. (p=۰/۰۵)؛ به این معنی که در تومورهای از نوع کارسینوم مجرایی مهاجم شدت رنگ‌آمیزیBRCA۱ کاهش یافته بود. کلیه اطلاعات مربوط به این قسمت در جدول شماره ۳ خلاصه شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

ارتباط میان بیان مارکر سلولهای بنیادی سرطان پستان (CD44) وBRCA1

میزان بیانCD44 (مارکر سلول‌های بنیادی سرطان پستان) در مطالعه دیگری روی همین گروه از تومورهای پستان انجام گرفته بود[۲۳] و نتایج حاصل از آن مطالعه جهت بررسی در این مطالعه حاضرمورد استفاده قرار گرفت.

در مطالعه مذکور بیماران از نظر میزان رنگ پذیری(Intensity) برای مارکرCD44 در چهار گروه مختلف قرار گرفتند: در گروه اول که اصلاً نمونه رنگ نگرفته بود، در گروه دوم نمونه ها رنگ پذیری ضعیفی داشته، در گروه سوم رنگ پذیری متوسط و در گروه چهارم رنگ پذیری قوی دیده شد (شکل شماره ۲). ارتباط میان شدت رنگ پذیری(CD44 intensity) و رنگ پذیری هسته‌ای BRCA1 (Nuclear BRCA1 intensity) با تست کای دو بررسی شد که ارتباط آماری معنی‌داری میان این دو دیده شد (p=۰/۰۴)

درصد رنگ پذیری سلول‌ها از نظر مارکرCD44 و درصد سلول‌های BRCA1 مثبت هسته با تست مجذور کای مقایسه شدند. ارتباط آماری معنی‌داری میان این دو متغیر دیده شد (p=۰/۰۰۰۱). H score (IntensityX% positive cells)طبق تقسیم‌بندی معمول عنوان شده در ۳ گروه انجام شد. میزان رنگ پذیری BRCA1 و رنگ پذیری نمونه‌ها از نظر مارکرCD44 با معیارH score نیز با تست مجذور کای مقایسه شد که ارتباط آماری معنی‌داری دیده شد(p=۰/۰۴).

با همین تست ارتباط میان شدت رنگ پذیری نمونه‌ها از نظر مارکرCD44 و رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری سیتوپلاسم آن‌ها از نظر جهش BRCA1 سنجیده شد که ارتباط آماری معنی‌داری میان آن‌ها یافت نشد. همچنین ارتباط میان درصد سلول‌ها از نظر رنگ پذیری مارکرCD44 و رنگ‌پذیری یا عدم رنگ پذیری سیتوپلاسم از نظر مارکر BRCA1 نیز با تست فوق سنجیده شد که ارتباط آماری معنی‌داری میان این دو دیده نشد.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه میزان بیان پروتئین BRCA1 و نیز محل قرار گیری (Localization) این پروتئین در ۱۵۶ تومور پستان مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات ما نشان داد سلول‌های بافت نرمال پستان (در حاشیه نواحی تومورال) پروتئین BRCA1 را با شدت زیاد درهسته سلول‌های خود بیان می‌نمایند. اما در نواحی تومورال رنگ آمیزی BRCA1 بسیار هتروژن بوده (گاهی در هسته و در برخی در سیتوپلاسم مشاهده شد) و به طور کلی رنگ آمیزی نواحی تومورال پستان ضعیف تر از سلول های نرمال بود. این مشاهدات با آنچه Rakha و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند هماهنگی داشت.

Rakha وهمکارانش در مطالعه‌ای بر روی ۱۹۴۰ تومور مهاجم پستان (با استفاده از ریز ارایه بافتی) نشان دادند که در بافت نرمال پستان، رنگ آمیزی BRCA1 با شدت زیاد مختص هسته سلول‌ها بوده و سیتوپلاسم و غشائ سلول رنگ پذیر نیستند؛ در صورتی که در بافت‌های تومورال بر خلاف بافت نرمال، پروتئین BRCA1 با شدت های متفاوت در هر دو محل اعم ازهسته و یا سیتوپلاسم سلول‌ها مشاهده می‌شود.[۲۴] در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری میان سن بیماران و بروز جهش‌های هسته‌ای BRCA1 دیده شد. به عبارتی می‌توان گفت که طبق نتایج به دست آمده از این بررسی، زودرس یا دیررس بودن سرطان پستان ارتباطی با جهش ها BRCA1 دارد. به نظر می‌رسد این یافته توسط سایر مطالعات نیز نشان داده شده بود.[۵]

در مطالعه حاضر ارتباط آماری معنی‌داری میان درجه پاتولوژی(Grade) تایید شده و میزان جهش‌های BRCA1 به ویژه از نظر نوع پروتئین‌های هسته‌ای به دست آمد. این یافته توسط بسیاری از مطالعات دیگر نیز تایید شد. آن‌ها نشان دادند که میزان جهش‌های BRCA1 از نظر پروتئین‌های هسته‌ای در تومورهای با گرید بالاتر وبا تمایز کمتر شایع تر می باشد.[۱۶و۲۶-۲۴]

مطالعه حاضر نشان داد که BRCA1 Intensity با نوع تومور درگیر کننده ارتباط دارد؛ به این صورت که در تومورهای از نوع کارسینوم مجرایی مهاجم، شدت رنگ آمیزی BRCA1 کاهش یافته بود. این نتایج در برخی مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است.[۱۶و۲۴] اما در مطالعه حاضر ارتباط آماری معنی داری میان متاستاز لنفاوی، اندازه تومور و یا میزان تهاجم تومور به عروق

Archive of SID
www.SID.ir

خونی با میزان جهش‌های BRCA1 به خصوص از نوع پروتیین‌های هسته‌ای دیده نشد.

بر خلاف این نتایج، Rakha و همکاران با مطالعه روی ۱۹۴۰ نمونه نشان دادند که جهش‌های هسته‌ای BRCA1 با متاستاز پیشرفته به غدد لنفاوی، تهاجم عروقی و افزایش اندازه تومورها به طور معنی‌داری ارتباط دارد.[۲۴] در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین بیان سیتوپلاسمی BRCA1 و هیچ یک از خصوصیات تومور یافت نشد. در صورتی که Rakha و همکارانش به طور خاص جهش پروتئین های BRCA1 سیتوپلاسمی را با نوع پاتولوژی تومور ها مرتبط می‌دانند.[۲۴] به نظر می رسد با افزایش تعداد تومورهای مورد مطالعه و قرار دادن آن‌ها در ریزارایه‌های بافتی بتوان متغیرهای بیشتری را بررسی نموده و نتایج مشابهی با مطالعات قبلی به دست آورد.

میزان بیان مارکر سلول های بنیادی سرطان پستانCD44در روی همین گروه از تومورهای پستان طی مطالعه دیگری بررسی شده بودکه نتایج حاصل از آن در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت.[۲۳] بنابر این در مطالعه حاضر ارتباط بین جهش‌های BRCA1 در تومور پستان با میزان بیان مارکر سلول‌های بنیادی (CD_{44}) نیزبه کمک تست کای دو با هم سنجیده شده‌اند؛ به عبارتی میزان بیان BRCA1 را با تومورهایی که از نظر فنوتیپCD44 مثبت هستند مقایسه شدند. ارتباط معنی‌داری میان شدت رنگ‌پذیری(CD_{44}) و رنگ‌پذیری هسته‌ای BRCA1 (Nuclear BRCA1 intensity)، درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها از نظر مارکرCD44 و درصد سلول‌های BRCA1 مثبت هسته وجود داشت. علی رغم یافتن ارتباط بین بیانCD44 و BRCA1 هسته‌ای، هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری میان شدت رنگ پذیری نمونه‌ها و یا درصد سلول‌ها از نظر رنگ پذیری مارکرCD44 و رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری سیتوپلاسم آن‌ها از نظز جهش BRCA1 یافت نشد. این یافته می‌تواند بیانگر ارتباط میان جهش‌های هسته‌ای BRCA1 و سلول‌های بنیادی سرطان پستان باشد. این یافته تایید کننده مطالعاتی می‌باشد که بیان کننده نقش مهم BRCA1 به عنوان رگولاتور و تنظیم کننده سلول‌های بنیادی پستان می‌باشند.[۲۷و۲۸]

این مطالعه ضمن بررسی میزان بیان پروتئین BRCA1 در یک گروه غیر انتخابی از تومورهای پستان (فامیلی یا اسپورادیک) نشان داد که محل قرارگیری(Localization) این پروتئین در تومورهای پستان مختص هسته سلول‌ها نبوده و در تومورهای متفاوت ممکن است در هسته، سیتوپلاسم و یا هم در هسته و هم در سیتوپلاسم مشاهده شود و این محل بیان ممکن است به نوعی با فامیلی و یا اسپورادیک بودن تومور پستان مرتبط باشد. علاوه بر این، مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی ارتباط بین میزان بیان پروتئین BRCA1 و مارکر سلول‌های بنیادی سرطان پستان (CD_{44}) در بافت‌های تومورال انسانی پرداخت.

به طور کلی از یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که جهش‌های هسته‌ای BRCA1 نشانگر بدخیمی و میزان تهاجم تومورهای پستان می‌باشند. شاید در یک نگاه کلی بتوان میان جهش پروتئین‌های هسته‌ای BRCA1، نقش آن در تومور زایی و درگیری سلول‌های بنیادی تومور ارتباط برقرار کرد.

جهت تکمیل این مطالعه لازم است تعداد نمونه‌های تومورال را به میزان قابل توجهی افزایش داده و با استفاده از روش Tissue Microarray نمونه‌ها را مورد مطالعه قرار داد. برای شناسایی بهتر سلول‌های بنیادی سرطان پستان می‌توان به طور همزمان مارکرهای متفاوت CD24/CD44 را با کمک روش Double staining رنگ آمیزی نمود و یا از سایر مارکرهای جدید استفاده نمود. در این مطالعه هیچگونه تضاد منافعی وجود نداشته است.

تقدیر و تشکر

از زحمات سرکار خانم شرزوی کارشناس بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) که کمال همکاری را در برش زدن، رنگ آمیزی و سپس ارسال نمونه‌های بافتی داشته‌اند کمال تشکر را داریم. این مطالعه در مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان و تحت حمایت مالی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

فهرست منابع

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden:

Archive of SID
www.SID.ir

Globocan 2000. Int J Cancer; 2001. 94(2): 153-56.

2. Rosen P. Rosen's Breast Pathology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott williams; 2009.p. 264-268.

3. Bennett IC, Gattas M, Teh BT. The genetic basis of breast cancer and its clinical implications. Aust N Z J Surg; 1999. 69(2): 95-105.

4. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science; 1994. 266(5182): 66-71.

5. Ellisen LW, Haber DA. Hereditary breast cancer. Annu Rev Med; 1998. 49: 425-36.

6. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. Blood; 2004. 103(6): 2332-36.

7. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res; 2005. 65(23): 10946-51.

8. Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. Stem Cells; 2007. 25(3): 707-11.

9. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell; 2007. 131(6): 1109-23.

10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A; 2003. 100(7): 3983-88.

11. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelogou M, Brauch H. Prevalence ofCD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. Clin Cancer Res; 2005. 11(3): 1154-59.

12. Deng Y, Ma W, Fang X, Zheng S. [The relationship of expression ofCD44v6 with metastasis and prognosis in breast cancer]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi; 2000. 38(6): 451-52.

13. Ma W, Deng Y, Zhou L. The prognostic value of adhesion moleculeCD44v6 in women with primary breast carcinoma: a clinicopathologic study. Clin Oncol (R Coll Radiol); 2005. 17(4): 258-63.

14. Russo J, Lynch H, Russo IH. Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. Breast J; 2001. 7(5): 278-91.

15. Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. Nucleic Acids Res; 2006. 34(5): 1416-26.

16. Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. J Med Genet; 2004. 41(1): 1-5.

17. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. Proc Natl Acad Sci U S A; 2008. 105(5): 1680-85.

18. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell; 2007. 1(5): 555-67.

19. Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, Suga K, et al. Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated

Archive of SID

www.SID.ir

cases. Clin Cancer Res; 1999. 5(6): 1249-61.

20. Fraser JA, Reeves JR, Stanton PD, Black DM, Going JJ, Cooke TG, et al. A role for BRCA1 in sporadic breast cancer. Br J Cancer; 2003. 88(8): 1263-70.

21. Lambie H, Miremadi A, Pinder SE, Bell JA, Wencyk P, Paish EC, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in sporadic breast carcinomas. J Pathol; 2003. 200(2): 207-13.

22. Madjd Z, Spendlove I, Moss R, Bevin S, Pinder SE, Watson NF, et al. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. Cancer Immun; 2007. 7: 17.

23. Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, Molanaei S, Shahzadi SZ, Asadi-Lari M.CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. Cancer Immun; 2009. 9: 4.

24. Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, El-Sayed ME, Green AR, Ellis IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. Hum Pathol; 2008. 39(6): 857-65.

25. Taylor J, Lymboura M, Pace PE, A'Hern R P, Desai AJ, Shousha S, et al. An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. Int J Cancer; 1998. 79(4): 334-42.

26. Foulkes WD, Metcalfe K, Hanna W, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, et al. Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in BRCA1-related breast carcinoma. Cancer; 2003. 98(8): 1569-77.

27. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, et al. TheCD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. Breast Cancer Res; 2008. 10(3): R53.

28. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. Clin Cancer Res; 2006. 12(19): 5615-21.

Archive of SID

www.SID.ir

Expression of BRCA1 protein in invasive and *in situ* carcinomas and its relation with marker of breast cancer stem cells (CD44) and prognostic factors in breast cancer patients*

A. Karimi Kivi: **MD**. Resident of Pathology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.
***Z. Madjd**: **MD, PhD**. Assistant Professor of Immunopathology, Oncopathology Research Center, School of Medicine, Crossing of Shaheed Chamran and Hemmat Expressways, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (*Corresponding author).
F. Hashemi: **MD.** Associate Professor of Pathology, Oncopathology Research Center, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.
S. Molanae: **MD.** Pathologit, Milad Hospital, Tehran, Iran.

*This article is a Summary of the thesis by A. Karimi Kivi for the degree of speciality in Pathology under supervision of Z. Madjd, MD and consultation with F. Hashemi, MD (2010).

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common cancer and the second cause of cancer death among women. Despite recent developments in therapeutic tools about 25% of all the involved cases die annually. The clinical, molecular, and pathologic features of breast cancer in *BRCA1* mutation carriers suggest that BRCA1 may function as a stem-cell regulator. The purpose of the current study was to investigate the correlation between BRCA1 protein expression and clinicopathological characteristics, and putative cancer stem cell marker (CD44) in breast carcinomas.

Methods: In this experimental study, immunohistochemistry was performed on 156 primary operable breast tumors employing a monoclonal anti-BRCA1 primary antibody. The relation between BRCA1 expression and variations such as age and pathologic features andCD44 was studied by Chi square test. SPSS V.16 was also used for data analysis.

Results: Altered BRCA1 expression was significantly associated with high grade and poor prognosis breast tumors (p=0.006). Mutated BRCA1 was also more often seen in early onset breast cancer patients (≤ 40 years) rather than patients over age of 40 (p=0.04). There was also a significant correlation between the BRCA1 andCD44 expression (p= 0.02).

Conclusion: Our results indicated that mutated BRCA1 expression is a marker of tumor aggressiveness, and its expression related to breast cancer stem markerCD44 in primary breast tumors. These finding support the idea that loss of BRCA1 expression may result in an accumulation of genetically unstable breast stem cells, providing targets for further carcinogenic events.

Keywords: Breast cancer, Cancer stem cell, Prognostic factors, CD44, BRCA1

www.SID.ir