

## بررسی چگونگی تظاهر E-cadherin در کارسینوم مهاجم داکتال پستان همراه با متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل

ژیلا ترابی زاده فریاد نقش وار امید عمادیان محدثه خبازی

### چکیده

**سابقه و هدف:** کارسینوم پستان شایع ترین تومور بدخیم منجر به مرگ در زنان می باشد. ریسک متاستاز که مهمترین عامل مرگ و میر و از کار افتادگی این بیماران است، با فاکتورهای چون تعداد غدد لنفاوی درگیر، اندازه تومور، درجه میکروسکوپی و سن بیماران مرتبط می باشد. هدف این مطالعه تعیین چگونگی تظاهر E-cadherin در کارسینوم مهاجم داکتال پستان همراه با متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی لامها، پرونده ها و بلوک های ۱۰۰ نمونه کارسینوم مهاجم داکتال پستان که در طی سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۷ در بیمارستان های امام و شفای ساری رادیکال ماستکتومی شده بودند از بایگانی استخراج شد. لامها مورد بازبینی و درجه بندی مجدد قرار گرفت. اطلاعات مربوط به سن بیمار، اندازه تومور و تعداد غدد لنفاوی درگیر زیر بغل از پرونده استخراج گردید. بلوک های پارافینی مربوطه به منظور تظاهر نرمال یا غیر نرمال بودن E-cadherin به روش ایمونوهیستوشیمی، برش و بعد از تهیه لام رنگ آمیزی گردید. اطلاعات در چک لیست های مربوطه ثبت و با نرم افزار آماری SPSS مورد آنالیز توصیفی و با تست های Chi-square و Fisher's exact مورد آنالیز تحلیلی قرار گرفت.

**یافته ها:** فراوانی تظاهر غیر نرمال مارکر در نمونه ها ۳۹ درصد بوده است. رابطه معنی داری از نظر آماری بین تظاهر غیر نرمال با متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل و اندازه تومور وجود نداشت ( $p > 0/05$ ) ولی با درجه هیستولوژیک تومور و سن بیماران رابطه معنی دار ( $p < 0/05$ ) بوده است به طوری که در درجات هستولوژیک بالاتر و سن پائین تر از ۳۵ سال تظاهر غیر نرمال بیشتر بوده است.

**استنتاج:** عدم ارتباط بین تظاهر E-cadherin با متاستاز غدد لنفاوی در کارسینوم مهاجم داکتال پستان، لزوم بررسی عوامل دیگری مانند سایر مارکرها چسبندگی مثل dysadherin و یا فاکتورهای بالینی - پاتولوژیک دخیل در تهاجم این تومور را می رساند.

**واژه های کلیدی:** E-cadherin، سرطان مهاجم داکتال پستان، ایمونوهیستوشیمی

### مقدمه

کارسینوم پستان شایع ترین تومور بدخیم و کارسینوم منجر به مرگ در زنان می باشد در آمریکا سالانه ۱۰۰/۰۰۰ مورد جدید تشخیص داده می شود و تقریباً ۳۰/۰۰۰ بیمار از این بیماری فوت می کنند (۱). امروزه به علت استفاده وسیع از ماموگرافی میزان تشخیص کارسینوم پستان بالا رفته است. اکثر این موارد در سائز

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۶-۸۶ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: zhtorabi@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** ژیلایا ترابی زاده - ساری: بلوار امیرمازندرانی، مرکز آموزشی درمانی امام خمینی، گروه پاتولوژی

گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۸/۱۲/۳ تاریخ تصویب: ۸۹/۱۰/۹

پستان با فاکتورهای مختلف بالینی - پاتولوژیک از جمله سن بیمار، درجه میکروسکوپی، اندازه تومور و وجود یا عدم وجود متاستازهای غدد لنفاوی ناحیه زیر بغل و تعداد غدد درگیر در صورت وجود و همچنین متاستازهای دور دست، نتایج محدود و ضد و نقیضی به همراه داشته است در مطالعه Wang (۵)، Madhavan (۶) و Li (۷) ارتباط با متاستاز لنفاوی دیده شد ولی در سایر مطالعات ارتباط مشخصی یافت نشد (۵-۹).

با توجه به این مسأله که بین ریسک بیماری متاستاتیک که مستقیماً با پیش آگهی بیمار مرتبط می باشد و مجموع فاکتورهای بالینی - پاتولوژیک ذکر شده، به ویژه درگیری غدد لنفاوی رابطه مستقیم وجود دارد. از طرفی لنف نودهای زیر بغل شایع ترین راه انتشار متاستاتیک تومور می باشند (۱۰)، علاوه بر این در مطالعات مختلف بین سطح تظاهر E-Cadherin و حساسیت سلول های تومورال به داروهای شیمی درمانی هم ارتباط وجود داشته است (۱۱، ۱۲)، لذا تعیین ارتباط تظاهر غیر نرمال E-cadherin در تومور اولیه پستان از نوع مهاجم داکتال با هر کدام از پارامترهای مذکور به خصوص در مراحل اولیه بیماری به عنوان گامی اولیه در جهت افتراق بیماران با پیش آگهی بدتر از بیماران با پیش آگهی بهتر، می تواند در نحوه برخورد درمانی و پیگیری این بیماران تاثیر گذار باشد.

## مواد و روش ها

این مطالعه به صورت توصیفی - تحلیلی بر روی نمونه های موجود در بخش پاتولوژی بیمارستان های امام خمینی و شفای ساری انجام شد. با مراجعه به بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان های امام خمینی و شفای ساری، کلیه موارد سرطان مهاجم داکتال پستان که در طی سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۷ رادیکال ماستکتومی شده بودند، مشخص گردید. لام ها و بلوک های پارافینی مورد مطالعه استخراج و لام ها مورد بازبینی و درجه بندی

کمتر از ۲ cm و در مراحل اولیه تشخیص داده می شوند ولی با وجود این، مرگ و میر ناشی از سرطان پستان در دهه های اخیر تغییر کمی داشته است، در آمریکای شمالی، اروپای غربی و استرالیا کاهش یافته اما متأسفانه در کشورهای مثل ژاپن و سنگاپور افزایش یافته است (۱). دیده شده است که علت اولیه مرگ و میر و از کار افتادگی در کانسره های پستان، تهاجم تومور و متاستازهای دور دست می باشد (۲). از طرفی ریسک بیماری متاستاتیک با فاکتورهایی چون تعداد غدد لنفاوی درگیر، اندازه تومور، درجه میکروسکوپی و وضعیت رسیپتورهای هورمونی مرتبط است (۲). به ویژه در بین این عوامل تعداد غدد لنفاوی درگیر نقش بسیار مهمی در پیش آگهی این تومورهای مهاجم دارد (۱).  
 Cadherin ها گروهی از مولکول های چسبندگی سلولی از جنس گلیکوپروتئین هستند که در غشاء سلول قرار دارند و در ترکیب با مولکول های چسبندگی دیگر به نام Catenin ها قرار دارند که چندین فرآیند بیولوژیک مهم از جمله مهاجرت سلولی و تمایز و تکثیر و مرگ سلولی (آپوپتوز) را کنترل می کنند. دو نوع از Cadherin ها که بهتر مورد مطالعه قرار گرفته اند شامل E-cadherin (نوع اپی تلیال) و N-cadherin (نوع عصبی) می باشند (۱). نوع اپی تلیال یک مولکول چسبندگی سلولی وابسته به کلسیم می باشد (۳). اختلال در تظاهر آن با مراحل پیشرفته تر و تهاجمی تر خیلی از کانسرها مثل ریه، پروستات، معده و روده بزرگ همراهی داشته است (۳). این مارکر که به صورت ایمنونوهیستوشیمی قابل تشخیص می باشد، در بافت پستان به صورت طبیعی وجود دارد و تظاهر غیر نرمال آن به طور کلی در تومورهای نوع لوبولار پستان دیده شده است. اما ارزش بالینی - پاتولوژیک آن در تومورهای مهاجم غیر لوبولار پستان از جمله نوع مهاجم داکتال که نوع شایع تر کارسینوم پستان از جمله در منطقه ما می باشد، نامشخص می باشد (۴). در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، رابطه بین تظاهر غیر نرمال E-cadherin به ویژه در کارسینوم مهاجم داکتال

جهت بررسی رابطه تظاهر غیر نرمال مارکر E-cadherin با فاکتورهای چون سن بیمار، اندازه تومور، درجه میکروسکوپی، وجود یا عدم وجود متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل و تعداد غدد درگیر براساس منابع موجود فاکتورها به صورت زیر تقسیم بندی شده‌اند:

۱. اندازه تومور: به علت تأثیر اندازه تومور در مرحله بیماری براساس سیستم دسته‌بندی TMN به صورت کم‌تر یا مساوی ۲ cm (منطبق بر T<sub>1</sub>) - ۵ cm (منطبق بر T<sub>2</sub>) و بالاتر از ۵ cm (منطبق بر T<sub>3</sub>) تقسیم‌بندی صورت گرفت (۱).

۲. سن بیمار: به صورت سن کم‌تر و مساوی ۳۵ سال و بیشتر از ۳۵ سال تقسیم بندی شد (۱، ۱۰).

۳. متاستاز: به صورت وجود یا عدم وجود تقسیم بندی شد (۱، ۱۰).

۴. تعداد متاستاز: به صورت بیشتر یا مساوی ۴ عدد و کم‌تر از ۴ عدد تقسیم‌بندی شد (۱، ۱۰).

۵. درجه میکروسکوپی: براساس سیستم درجه بندی Bloom-Richardson به صورت درجه I، درجه II و درجه III تقسیم‌بندی شد (۱).

اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های Chi-Square و Fisher's exact مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقادیر p زیر ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

محدوده سنی نمونه‌های ما بین ۲۷ تا ۷۱ سال با میانگین  $48/13 \pm 10/63$  سال بوده است. محدوده سبب تومور ۲ تا ۹ سانتی‌متر با میانگین  $4/83 \pm 1/94$  سانتی‌متر بوده است. ۳۱ مورد از ۱۰۰ نمونه تظاهر غیرنرمال مارکر E-cadherin داشته‌اند. تصاویر ۱ و ۲ به ترتیب نحوه تظاهر مارکر E-cadherin را در شاهد ما که بافت نرمال پستان است و همچنین یک مورد تظاهر نرمال و غیرنرمال (در این جا عدم تظاهر) از نمونه‌های ما را نشان می‌دهد.

مجدد توسط دو متخصص پاتولوژی قرار گرفت، سپس بلوک‌های پارافینی پس از برش‌های مناسب، به روش ایمونوهیستوشیمی از نظر مارکر E-cadherin به روشی که در ذیل می‌آید مورد رنگ آمیزی قرار گرفت. سپس اطلاعات مورد نظر شامل سن، درجه هستولوژیک و سبب تومور از پرونده‌های موجود استخراج گردید و در فرم‌های اطلاعاتی ضمیمه ثبت گردید.

لازم به ذکر است که ارزیابی لام‌های رنگ آمیزی شده به صورت تظاهر غیر نرمال و تظاهر نرمال براساس H-score (که بر پایه شدت رنگ‌پذیری غشاء سلول‌های توموری به علاوه درصد سلول‌های رنگ گرفته ارزیابی شده) ۰ تا ۳۰۰ نمره بندی شد. عدم رنگ‌پذیری و نمره کم‌تر یا مساوی ۱۰۰ به عنوان نتیجه غیر نرمال و نمره بالاتر از ۱۰۰ به عنوان نتیجه نرمال در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که از بافت نرمال پستان به عنوان شاهد مثبت و از عضله صاف رحم به عنوان شاهد منفی برای نمونه‌ها استفاده شد.

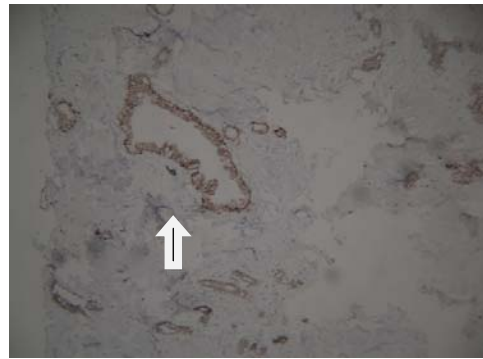
## تکنیک رنگ آمیزی:

۱. برش بافتی (از بلوک پارافینی) به ضخامت ۴ تا ۵ میکرون
۲. قرار دادن برش روی لام یا اسلاید
۳. دپارافینه شدن با گزبلل به مدت ۱۵ دقیقه
۴. آبگیری مجدد با الکل به مدت ۱۵ دقیقه
۵. قرارگیری اسلایدها در بافر ۳ درصد متانول/آب اکسیژنه به مدت ۳۰ دقیقه
۶. قرارگیری در بافر سدیم سترات به مدت ۲۰ دقیقه
۷. انکوبه کردن در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت
۸. قرار دادن آنتی‌بادی‌های E-cadherin به مدت ۳۰ دقیقه
۹. شستشو با بافر تریس به مدت ۵ دقیقه
۱۰. تماس با کمپلکس آویدین-بیوتین به مدت ۴۵ دقیقه
۱۱. رنگ آمیزی با همتو کسپیلین

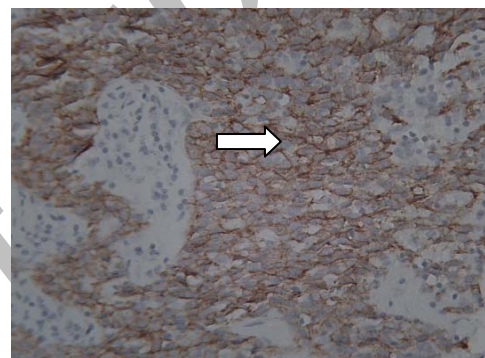
به تفکیک مشخص کرده است و ضمناً سطح معنی داری مربوط به ارتباط این متغیرها با نحوه تظاهر مارکر E-cadherin را نشان می‌دهد. با افزایش درجه تظاهر غیر نرمال بیشتر و در سنین بالای ۳۵ سال نیز تظاهر مارکر کمتر بوده است.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی و ارتباط تظاهر E-cadherin با فاکتورهای بالینی - پاتولوژیک

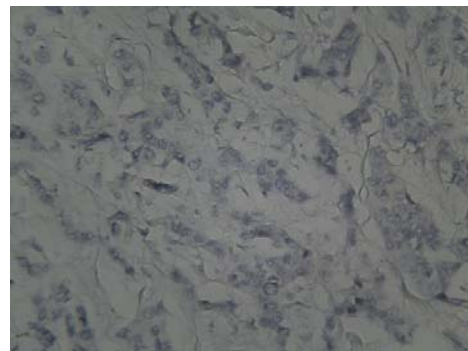
متغیر	E-cadherin طبیعی (نمره بیشتر از ۱۰۰)	E-cadherin غیر طبیعی (نمره مساوی یا کمتر از ۱۰۰)	سطح معنی داری
اندازه			
$\leq 2$ cm	۶ (۹/۸)	۶ (۱۵/۴)	
۵ تا ۲ cm	۳۲ (۳۷/۷)	۱۳ (۳۳/۳)	۰/۱۶۸
$> 5$ cm	۳۲ (۳۷/۷)	۲۰ (۵۱/۳)	
درجه			
I	۳۳ (۵۴/۱)	۶ (۱۵/۴)	
II	۲۸ (۴۵/۹)	۱۵ (۳۸/۴)	۰/۰۰۰
III	۰	۱۸ (۴۶/۲)	
غدد لنفاوی درگیر			
$< 4$	۲۸ (۴۵/۹)	۱۸ (۴۶/۱)	۰/۵۷۱
$\geq 4$	۳۳ (۵۴/۱)	۲۱ (۵۳/۹)	
سن			
سال $\leq 35$	۵۹ (۹۶/۷)	۲۹ (۷۴/۴)	۰/۰۰۱
سال $> 35$	۲ (۳/۳)	۱۰ (۲۵/۹)	



تصویر شماره ۱: تظاهر نرمال E-cadherin در نمونه شاهد



تصویر شماره ۲: یک نمونه از تظاهر نرمال E-cadherin. رنگ قهوه‌ای نشانگر تظاهر نرمال است.



تصویر شماره ۳: یک نمونه از عدم تظاهر E-cadherin

در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته، رابطه عدم تظاهر یا کاهش تظاهر E-cadherin با فاکتورهای مختلف بالینی - پاتولوژیک از جمله سن بیمار، درجه میکروسکوپی، اندازه تومور و وجود یا عدم وجود متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل و تعداد غدد درگیر نتایج متفاوتی به همراه داشته است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که تظاهر غیر نرمال این مارکر در کارسینوم مهاجم داکتال پستان ۳۹ درصد بوده است. ارتباط معنی داری با وجود یا عدم وجود متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل و تعداد غدد درگیر وجود نداشته ولی با درجه بافت‌شناسی تومور به طور بسیار چشم‌گیری ( $p=0/000$ ) مرتبط بوده است. یعنی تظاهر غیر نرمال این مارکر با درجات هستیولوژیک بالاتری همراه بوده است. همچنین با سن بیماران ارتباط معنی داری با ( $p=0/001$ ) داشته است. به طوری که عدم تظاهر در سنین مساوی یا

همانطور که در شکل دوم مشاهده می‌شود تظاهر نرمال مارکر به صورت رنگ پذیری غشاء سیتوپلاسمی در یک شدت مطلوب در نظر گرفته شده است.

جدول شماره ۱ توزیع فراوانی تظاهر نرمال و کاهش یافته E-cadherin را برحسب هر کدام از متغیرها

معنی دار وجود نداشته است.

طبق مطالعه Li و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۷) بین تظاهر غیرنرمال E-cadherin بر خلاف مطالعه حاضر با متاستاز غدد لنفاوی ارتباط معنی داری وجود داشته به طوری که تظاهر غیر نرمال همراه با افزایش متاستاز غدد لنفاوی بوده است.

با توجه به مطالعه حاضر که تظاهر غیر نرمال E-cadherin بیشتر در ارتباط با سن بیمار و درجه میکروسکوپی تومور بوده و ارتباطی با متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل نداشت این طور می توان نتیجه گیری کرد که بر خلاف سرطان مهاجم لوبولار که کاهش یا عدم بروز مارکر E-cadherin نشانه مهاجم تر بودن تومور و ریسک بالاتر متاستاز لنفاوی و دور دست می باشد، در سرطان مهاجم داکتال پستان عوامل دیگری مثل عدم بروز سایر مارکرهای چسبندگی مانند dysadherin و یا فاکتورهای بالینی - پاتولوژیک مثل وزن و سایز تومور، و درجه میکروسکوپی در بروز متاستاز لنفاوی و تهاجم موضعی تومور دخیل هستند که باید بررسی بیشتری در این زمینه در مطالعات بعدی صورت گیرد.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دوره دستیاری دکتر محدثه خبازی می باشد.

### References

1. Rosai R, Ackerman A. Surgical pathology. 9<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill, Elsevier Inc; 2004.
2. Harriet M, Kluger E. Is E-cadherin expression correlated with metastases?. American Association for Cancer Research 2005; 25(3): 452-457.
3. Kowalski P.J, Rubin M.A. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. Breast Cancer Res 2003; 5: R217-R222.
4. Harigopal M, Berger A.J. Automated Quantitative analysis of E-cadherin expression in lymph node metastases is predictive of survival in invasive Ductal breast cancer. Clin Cancer Res Vol 2005; 11: 4083-4089.
5. Wang LH, Liu DY, chen YJ. Relation ship

کمتراز ۳۵ سال به طور معنی داری بیشتر بوده است. تظاهر E-cadherin با اندازه تومور هم ارتباط معنی داری نداشت. در مطالعه ای که توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد، بین تظاهر E-cadherin با متاستاز غدد لنفاوی زیر بغل ارتباط عکس وجود داشته، یعنی هر چه تظاهر مارکر کم تر بوده، متاستاز غدد لنفاوی بیشتر بوده است (۵) که این برخلاف مطالعه حاضر بوده است. در مطالعه ای که توسط Madhavan و همکاران که در سال ۲۰۰۱ انجام شد (۶) نتیجه مشابه مطالعه Wang (۵) و برخلاف مطالعه حاضر به دست آمد ولی در مطالعه Rakha و همکارانش در سال ۲۰۰۵ (۸) مانند مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین کاهش یا عدم تظاهر E-cadherin با متاستاز غدد لنفاوی پیدا نشد همچنین با درجه میکروسکوپی تومور رابطه معنی داری مشابه مطالعه ما به دست آمد. اما با سن بیمار ارتباط وجود نداشت و برعکس با اندازه تومور (اندازه بزرگ تر با تظاهر کم تر E-cadherin) ارتباط معنی داری وجود داشته که این دو یافته اخیر برخلاف مطالعه حاضر بوده است.

در مطالعه Cobanoglu و همکارانش در سال ۲۰۰۴ همانند (۹) مطالعه حاضر اختلاف چشمگیری بین عدم تظاهر مارکر با درجه میکروسکوپی تومور وجود داشته ولی با توانایی متاستاز غدد لنفاوی و سایز تومور، مشابه مطالعه حاضر و سن بیمار، مغایر مطالعه حاضر ارتباط

- between lymph node metastasis an expressions of E-cadherin. N-cadherin and matrix metalloproteinase in breast carcinoma. *Ai Zheng* 2002; 21(9): 965-969.
6. Mandhavan M, Srinivas P, Abraham E. cadherin as predictive markers of nodal metastasis in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2001; 14(5): 423-427.
  7. Li Q, WU MF, Song AP. Expression of Ezrin and E-cadherin in invasive uctal breast cancer and their correlation to lymphatic metastasis. *Ai Zheng* 2006; 25(3): 363-366.
  8. Rakha EA, Abd EI Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology* 2005; 46(6):685-693.
  9. Cobanoglu U, Ersoz S, Turgutalp H. Correlation of E-cadherin expression with clinicopathological parametes in breast carcinoma. *Saudi Med J* 2004; 25(8): 1024-1027.
  10. Canavese G, Bernardi A, Candelaresi G, Lovadina P, Amerio S, Rossetti V, et al. Expression of the E-cadherin-catenins complex in sentinel node is related to tumor morphology but not to spread to nonsentinel nodes. *Pathol Res Pract* 2007; 203(7): 523-527.
  11. Wang L, Li Z, Wang C, Yang Y, Sun L, Yao W, et al. E-cadherin decreased human brecest cancer cells sensitivity to staurisporine by up- regulating Bcl-2 exprexsion. *Arch Biochem Biophys* 2009; 481(1):116-122.
  12. Berezhnaya N.M, Belova O.B, Vinnichuk Yu.D, Tarutinov V.I. Expression of E-cadherin in drug resistant human bereast cancer cells and their sensitivity to lymphokine-activated lymphocytes action. *Expermental Oncology* 2009; 31: 242-245.