

تحقیقی

بیان مارکر پرولیفراتیو سلولی Ki67 در سرطان پستان

دکتر رحیم گل محمدی*^۱، دکتر اکبر پوهان^۲

۱- استادیار علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار. ۲- استادیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از مهم‌ترین تومورهای بدخیم و دومین سرطان شایع در زنان است. مجموعه‌ای از عوامل محیطی و آسیب‌های ژنتیکی در ایجاد این سرطان نقش دارند. ژن Ki67 یک پروتئین کوژن است که در روند تکثیر سلولی فعال است. بررسی پروتئین Ki67 از نظر پاسخ به شیمی‌درمانی و پیش‌آگهی بیماری اهمیت دارد. این مطالعه به منظور بیان ژن Ki67 در بیماران مبتلا به سرطان پستان به روش ایمنو هیستوشیمی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی به روش ایمنو هیستوشیمی روی نمونه‌های سرطانی بافت پستان ۸۰ بیمار (۷۹ نفر زن و یک نفر مرد) مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر سبزوار در سال‌های ۸۸-۱۳۸۵ انجام شد. بعد از ثابت کردن نمونه‌ها در فرمالین، پاساژ بافتی بر روی نمونه‌ها انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین در صورت تشخیص بدخیمی توسط متخصصین آسیب‌شناس، بیان ژن Ki67 به روش ایمنو هیستوشیمی در نمونه‌ها تعیین شد و با توجه به در نظر گرفتن درصد و شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها، اسلایدها به درجات منفی، ضعیف، متوسط و شدید تقسیم‌بندی شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و آزمون کای اسکور و تست دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از تعداد ۸۰ نمونه سرطانی بافت پستان در ۳۷ نمونه (۴۶/۳ درصد) مارکر پرولیفراتیو Ki67 در بیش از ۱۰ درصد سلول‌ها مشاهده شد که میزان رنگ‌پذیری آنها در ۱۵ مورد یک مثبت (+)، در ۱۴ مورد ۲ مثبت (++) و در ۸ مورد سه مثبت (+++) بود. بین مرحله و نوع تومور با بیان ژن Ki67 ارتباط آماری معنی‌داری یافت شد ($P < 0/05$)؛ اما بین درجه تومور و بیان ژن Ki67 در سلول‌های سرطانی ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: بیان ژن Ki67 در بیماران مبتلا به سرطان پستان که در مرحله پیشرفته بیماری و متاستاتیک قرار داشتند؛ بیشتر مشاهده شد. لذا احتمال بیان ژن Ki67 در تومورهای مهاجم و پیشرفته بیشتر می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان، Ki67، ایمنو هیستوشیمی

* نویسنده مسؤول: دکتر رحیم گل محمدی، پست الکترونیکی rahingolmohammadi@yahoo.com

نشانی: سبزوار، جنب پلیس راه، دانشکده پزشکی سبزوار، تلفن ۴۴۴۶۰۷۰-۰۵۷۱، شماره ۴۴۴۵۶۴۸

وصول مقاله: ۸۹/۵/۹، اصلاح نهایی: ۸۹/۸/۳۰، پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۱۸

مقدمه

سرطان پستان یکی از مهم‌ترین تومورهای بدخیم و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در غرب است (۱). شیوع این سرطان در سال‌های اخیر در نواحی آسیا رو به افزایش است (۲). در حال حاضر سومین عامل اصلی مرگ در ایران سرطان می‌باشد و سرطان پستان رتبه پنجم را در میان زنان دارد (۳). در سرطان پستان مجموعه‌ای از عوامل محیطی و آسیب‌های ژنتیکی نقش دارند (۴). ژن‌هایی که در سرطان پستان فعال می‌شوند؛ در دو دسته قرار می‌گیرند. الف) دست اول ژن‌هایی هستند که tumor suppressor نامیده شده و مانع رشد تومور می‌شوند. ب) دسته دوم ژن‌هایی هستند که باعث پیشرفت و یا تسریع در رشد تومور نظیر Ki67 می‌شوند. ژن Ki67 بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۰ (10q25) انسانی قرار دارد (۵). محصول این ژن یک پروتئین غیرهستونی به‌نام (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) است که نیمه عمر آن حدود ۶۰ تا ۹۰ دقیقه است (۷و۶). این پروتئین را می‌توان در سلول‌های در حال تقسیم با روش ایمونوهیستوشیمی مشخص کرد. زیرا PCNA در تمام مراحل چرخه سلولی S، Gap1، S، Gap2 و میتوز فعال است. در حالی که در سلول‌های در حال استراحت (G0) غیرفعال است. عملکرد این مارکر در بخش‌هایی هنوز مشخص نیست (۸). میزان PCNA با پرولیفراسیون سلولی و سنتز DNA ارتباط مستقیم دارد و مقادیر زیاد آن در سلول‌های سرطانی با درجه بدخیمی تومور ارتباط دارد (۹). در آزمایشگاه‌های آسیب‌شناسی برای بررسی پاسخ به شیمی‌درمانی در سرطان پستان گیرنده‌های استروژنی و پروژسترونی را ارزیابی می‌کنند؛ ولی می‌توان از Ki67 هم به‌عنوان یک مارکر مهم در پیش‌آگهی (Prognosis) و پیش‌بینی (Predictive) سرطان استفاده کرد (۱۰-۱۲). بعضی از محققین اندازه‌گیری PCNA را به صورت روتین در بیماران سرطانی برای پیش‌بینی پاسخ به شیمی‌درمانی توصیه می‌کنند (۱۳و۱۴). هرچند در این مورد اختلاف نظر وجود دارد و بعضی آن را به‌عنوان یک مارکر مستقل پیش‌بینی کننده به حساب نمی‌آورند (۱۵). با وجود آن که Ki67 به عنوان یک عامل پیش‌آگهی ضعیف در سرطان قلمداد می‌شود؛ اما مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند در بیماران

که این پروتئین در آنها مثبت می‌باشد؛ استفاده از داروهای ضدهورمونی در درمان آنها مؤثر است و تعیین این مارکر قبل از شیمی‌درمانی به روش ایمونوهیستوشیمی توصیه می‌شود (۱۶و۱۷). لذا این مطالعه به منظور بیان ژن Ki67 در بیماران مبتلا به سرطان پستان به روش ایمونوهیستوشیمی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی به روش ایمونوهیستوشیمی روی نمونه‌های سرطانی بافت پستان ۸۰ بیمار (۷۹ نفر زن و یک نفر مرد) مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر سبزوار در سال‌های ۸۸-۱۳۸۵ انجام شد.

تشخیص بدخیمی نمونه‌ها توسط دو متخصص آسیب‌شناس به‌طور جداگانه انجام گرفت. پس از تشخیص بدخیمی، ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌ها انجام شد.

نمونه‌ها بلافاصله پس از عمل جراحی در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند و بعد از ۳ ساعت فرمالین تعویض شد. پس از ۲۴ ساعت پاساژ بافتی به وسیله دستگاه Tissue processing انجام شد. مقاطع ۴ میکرونی از تمام بلوک‌های پارافینی با میکروتوم چرخی (Litz آلمانی) تهیه شد. برای عمل ماسک‌زدایی پس از پارافین‌زدایی نمونه‌ها در داخل کوپلین ظرف بافر سیترات قرار داده شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ماکروویو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۸و۱۹). مهار پراکسیداز بافتی با آب اکسیژنه انجام گرفت.

از آنتی‌بادی مونوکلونال Ki67 سفارش شده توسط طب آسیا (Novocostra, RTU-Ki67-MMI) استفاده شد. زمان، دما و غلظت آنتی‌بادی طبق دستورالعمل کیت انجام شد. پس از شستشوی اسلایدها با بافر فسفات سالین، آنتی‌بادی ثانویه Biotinylated روی لام‌ها چکانده شد. سپس از استرپتوآویدین متصل به HRP که قادر است دی‌آمینوبنزیدین (DAB) را اکسید کند؛ استفاده شد. سلول‌هایی که با بیان Ki67 همراه هستند؛ رسوب غیرمحللول قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌کنند. پس از رنگ‌آمیزی زمینه بافت‌ها با همتاکسیلین لام‌ها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. اسلایدها توسط دونفر و به صورت Blind در ۱۰ میدان دید و در شرایط یکسان مطالعه شدند. برای شمارش تعداد سلول‌ها از میکروسکوپ نوری Motic و نرم‌افزار

NST، ۱۰ نمونه (۱۲/۵ درصد) از نوع کارسینوم لوبولی غیرمهاجم و ۵ نمونه کارسینوم لوبولی مهاجم ILC یا NLC (Invasive Lobular Carcinoma) بود.

۱۷ مورد (۲۱/۳ درصد) در مرحله صفر بیماری بودند. یعنی سلول‌های سرطانی محدود به یک لوبول و یک مجرا بود و بافت‌های چربی اطراف تومور گرفتار سلول‌های سرطانی نبودند. ۳۰ نمونه (۳۷/۵ درصد) در مرحله یک از نظر پیشرفت بیماری قرار داشتند و گره‌های لنفاوی با سلول‌های سرطانی آلوده نشده بود. در ۲۵ نمونه (۳۱/۳ درصد) از بیماران گره‌های لنفاوی و بافت‌های مجاور به سلول‌های سرطانی گرفتار شده بودند. یعنی در مرحله دو بیماری قرار داشتند. ۶ نمونه (۷/۵ درصد) در مرحله ۳ از نظر پیشرفت بیماری بودند. در مجموع ۳۱ مورد در دو مرحله ۲ و ۳ قرار داشتند. تعداد ۲ نمونه (۲/۵ درصد) در مرحله ۴ بیماری قرار داشتند که سلول‌های سرطانی در یک بیمار به ریه و در بیمار دیگر به پستان مجاور متاستاز داده بود.

از نظر بالینی ۵۹ نمونه سرطانی در درجه I، ۱۸ مورد در درجه II و ۳ مورد در درجه III بیماری قرار داشتند.

ب) بررسی مارکر Ki67

در ۳۷ نمونه (۴۶/۳ درصد) مارکر پرولیفراتیو Ki67 مشاهده شد. میزان رنگ‌پذیری در ۱۵ مورد یک مثبت (+)، در ۱۴ مورد ۲ مثبت (++) و در ۸ مورد سه مثبت (+++) بود (شکل‌های

Advanced motic plus2 با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر استفاده شد. براساس شدت و درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها، اسلایدها به درجات منفی، ضعیف، متوسط و شدید تقسیم‌بندی شدند. در صورتی که کمتر از ۱۰ درصد سلول‌ها در اسلایدها رنگ گرفتند؛ منفی (-) قلمداد شدند. اسلایدهایی که ۱۰ تا ۲۵ درصد سلول‌های سرطانی رنگ قهوه‌ای را گرفتند؛ یک مثبت (+) تلقی شدند. نمونه‌هایی که حدود ۲۶ تا ۵۰ درصد سلول‌ها رنگ مثبت گرفته بودند؛ متوسط (++) و اسلایدهایی که بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها رنگ قهوه‌ای گرفته بودند؛ سه مثبت (+++) نامیده شدند. همچنین شدت رنگ‌پذیری براساس وسعت میدان دید میکروسکوپی، رسوب مواد کروموزینیک در هسته و سیتوپلاسم سلول تعیین گردید (۲۰ و ۲۱).

داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS-15 و آزمون Chi-Square و تست دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری همه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) بررسی بافت‌شناسی نمونه‌ها

از ۸۰ فرد مبتلا به سرطان پستان، ۷۹ نفر زن و یک نفر مرد (۳۵ ساله) بودند. حداقل سن بیماران ۲۰ سال و حداکثر ۸۶ سال با میانگین سنی 48.78 ± 14.82 سال بود. از ۸۰ نمونه سرطانی ۶۵ نمونه (۸۵ درصد) از نوع کارسینوم مجرای مهاجم غیراختصاصی (Invasive Ductal Carcinoma no especial type)

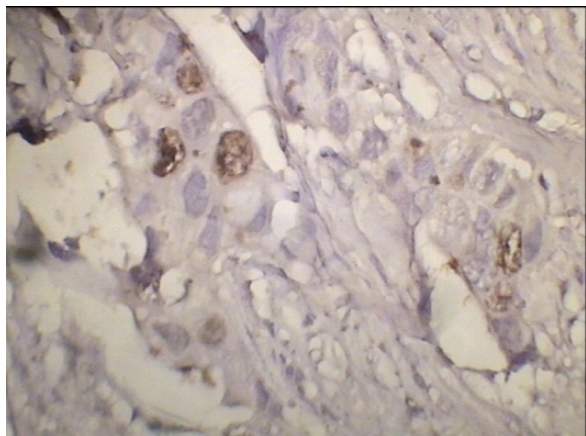
جدول ۱: توزیع فراوانی مرحله تومور با بیان ژن Ki67 در سلول‌های سرطانی بافت پستان

مرحله	بیان ژن Ki67 مثبت			بیان ژن Ki67 منفی			کل تعداد (درصد)
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		
صفر	۱ (۱/۳)	۱۶ (۲۰)	۱۷ (۲۱/۳)				
۱	۱۲ (۱۵)	۱۸ (۲۲/۵)	۳۰ (۳۷/۵)				
۲ و ۳	۲۲ (۲۷/۵)	۹ (۱۱/۳)	۳۱ (۳۸/۸)				
۴	۲ (۲/۵)	۰ (۰)	۲ (۲/۵)				
کل	۳۷ (۴۶/۳)	۴۳ (۵۳/۸)	۸۰ (۱۰۰)				

جدول ۲: توزیع فراوانی مرحله تومور با بیان ژن Ki67

در سلول‌های سرطانی بافت پستان

مرحله	بیان ژن Ki67		
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
گرید I	۲۷ (۳۳/۸)	۳۲ (۴۰)	۵۹ (۷۳/۸)
گرید II	۷ (۸/۸)	۱۱ (۱۳/۸)	۱۸ (۲۲/۵)
گرید III	۳ (۳/۸)	۰ (۰)	۳ (۳/۸)
کل	۳۷ (۴۶/۳)	۴۳ (۵۳/۸)	۸۰ (۱۰۰)



شکل ۳: مقطع عرضی ۴ میکرونی بافت سرطانی پستان پایداری پروتئین Ki67 یک مثبت (+) را نشان می‌دهد. یعنی ۱۰ تا ۲۵ درصد سلول‌های سرطانی با روش ایمنو‌هیستوشیمی رنگ قهوه‌ای را به خود گرفته‌اند. (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر).

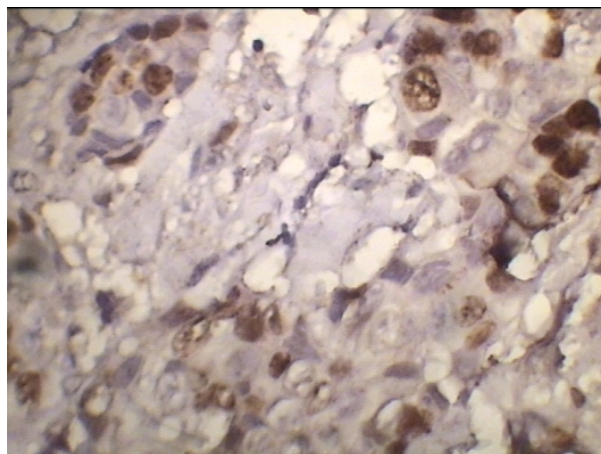
بحث

در مطالعه حاضر از تعداد ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان در ۳۷ نمونه (۴۶/۳ درصد) بیان ژن Ki67 مثبت بود. در حالی که در ۴۳ مورد (۵۳/۸ درصد) پایداری پروتئین Ki67 با روش ایمنو‌هیستوشیمی مشاهده نشد. بین نوع تومور و بیان ژن Ki67 ارتباط آماری معنی‌داری وجود داشت. همچنین بین مرحله تومور با بیان ژن Ki67 ارتباط آماری مشاهده شد. در حالی که بین درجه تومور با بیان ژن Ki67 ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در تومورهایی که در مراحل پیشرفته بیماری بودند؛ پایداری پروتئین Ki67 بیشتر بود.

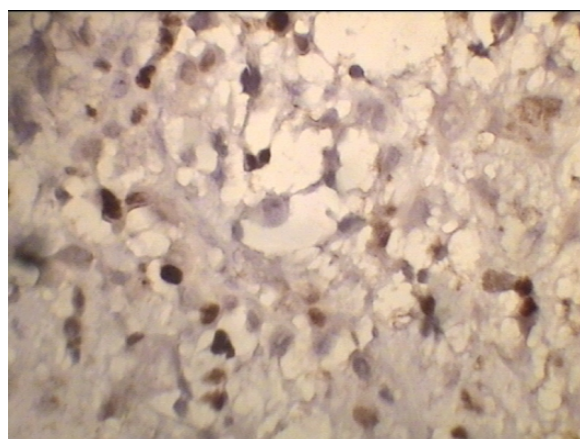
در مطالعه Ozer و همکاران در ترکیه روی ۱۸ بیمار مبتلا به سرطان دوطرفه پستان، در ۸ مورد (۴۴/۴ درصد) از بیماران پایداری پروتئین Ki67 مثبت گزارش شد (۲۲) که با مطالعه ما از نظر میزان درصد بیماری‌زایی که با بیان ژن Ki67 همراه هستند؛ تقریباً هم‌خوانی دارد. مطالعه Pinder و همکاران در بیمارستان Nottingham روی کارسینومای پستان، نشان داد که بین درجه بافتی و مارکر پرولیفراتیو Ki67 ارتباط آماری معنی‌داری وجود دارد (۲۳). در حالی که در مطالعه حاضر بین مرحله تومور با بیان ژن Ki67 ارتباط معنی‌داری مشاهده شد؛ ولی بین درجه بافتی و مارکر پرولیفراتیو Ki67 ارتباط معنی‌داری دیده نشد که با مطالعه حاضر تفاوت دارد. این تغییر احتمالاً می‌تواند مربوط به تعداد نمونه‌ها و درجه تومور باشد که در دو

۱ الی ۳). در ۴۳ نمونه (۵۳/۸ درصد) بیان ژن Ki67 منفی بود. بین مرحله تومور با مارکر پرولیفراتیو Ki67 ارتباط آماری معنی‌دار یافت شد ($P=0/001$) (جدول یک).

بین مرحله تومور و بیان ژن Ki67 در سلول‌های سرطانی بافت پستان ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۲). بین مارکر پرولیفراتیو Ki67 و نوع تومور ارتباط آماری معنی‌داری وجود داشت ($P<0/026$). به طوری که در ۳۵ نمونه (۴۳/۸ درصد) از تومورهای مهاجم مجرای بیان Ki67 مثبت بود. در حالی که در ۲ مورد (۲/۵ درصد) از تومورهای غیرمهاجم بیان Ki67 مثبت بود.



شکل ۱: مقطع عرضی ۴ میکرونی بافت سرطانی پستان پایداری پروتئین Ki67 سه مثبت (+++) را نشان می‌دهد. یعنی بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها با روش ایمنو‌هیستوشیمی رنگ قهوه‌ای را به خود گرفته‌اند. (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر).



شکل ۲: مقطع عرضی ۴ میکرونی بافت سرطانی پستان پایداری پروتئین Ki67 دو مثبت (++) را نشان می‌دهد. یعنی ۲۶-۵۰ درصد سلول‌های سرطانی با روش ایمنو‌هیستوشیمی رنگ قهوه‌ای را به خود گرفته‌اند. (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر).

عوامل بیولوژی ارتباط معنی داری مشاهده نشد (۲۵) که با مطالعه حاضر تفاوت داشت. به طوری که میانگین سن در مطالعه ما حدود ۱۰ سال کمتر از مطالعه Ringberg و همکاران (۲۵) می باشد که پیگیری و مطالعات بیشتری را می طلبد.

شیوع سرطان پستان در مردان کمتر از یک درصد است (۲۶). در مطالعه حاضر از ۸۰ نمونه متعلق به بافت سرطان پستان، یک نمونه بدخیم از جنس مذکر بود که در پیگیری به عمل آمده، وی در کمتر از یک سال بعد از تشخیص فوت نمود. علی رغم این که بیان ژن Ki67 در بیمار فوق منفی بود؛ بیماری در زمان تشخیص آسیب شناسی در مرحله ۳ از نظر پیشرفت بیماری بود.

نتیجه گیری

به نظر می رسد که بین مراحل بالای بیماری و شاخص های پاتولوژیک تومور با بیان ژن Ki67 ارتباط وجود دارد. به طوری که در مطالعه حاضر در تمام بیماران مبتلا به سرطان پستان که در مرحله پیشرفته بیماری و متاستاتیک به اعضای دیگر بودند؛ بیان ژن Ki67 مثبت بود. بنابراین می توان تصور کرد که بیان ژن Ki67 در تومورهای مهاجم و پیشرفته بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۳۸۵۰۱۰۱۱۸) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سبزوار بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم انجام گردید. بدین وسیله از متخصصین محترم آسیب شناسی جناب آقایان دکتر محمدرضا مهاجری و دکتر رامین ابراهیمی صمیمانه سپاسگزاری می گردد. همچنین از کارشناسان آزمایشگاه آقای محمد بروغنی، خانم ها مریم لندرانی و فرزانه محمودی سپاسگزاریم.

References

1. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, et al. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Oct; 8(10):843-54.
2. Lam WW, Fielding R, Ho EY. Predicting psychological morbidity in Chinese women after surgery for breast carcinoma. *Cancer.* 2005 Feb; 103(3):637-46.
3. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran.

مطالعه تفاوت دارد. در مطالعه Tan و همکاران افزایش بیان ژن Ki67 با درجه بالای درجه بافت شناسی و افزایش میتوز ارتباط داشت و مبنای واکنش ایمونولوژیک مثبت زمانی بود که بیش از ده درصد سلول های سرطانی با بیان ژن Ki67 همراه باشند؛ ولی اگر کمتر از ۱۰ درصد سلول ها با بیان ژن Ki67 همراه باشند؛ ایمونوراکتیو منفی قلمداد شدند (۲۰). در مطالعه حاضر هم مبنای مثبت و منفی بودن نمونه ها بر همین اساس تعیین شد. به طوری که در نمونه هایی با بیان ژن Ki67 کمتر از ۱۰ درصد سلول ها، منفی محسوب شدند و شاید یکی از دلایلی که بیش از نیمی از نمونه های مبتلا به سرطان پستان در مطالعه حاضر منفی بودند؛ همین باشد. ولی تمام نمونه هایی که در درجه III قرار داشتند؛ بیان ژن Ki67 در آنها مثبت بود که از نظر نتیجه با تحقیق Tan (۲۰) هم خوانی دارد. در تحقیقی جلالی ندوشن و همکاران روی ۶۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان پیشرفته؛ در اکثر بیماران بیان ژن Ki67 مثبت گزارش شد (۲۴) که با مطالعه حاضر از نظر میزان بیان ژنی Ki67 کاملاً تفاوت دارد. این تفاوت احتمالاً مربوط به نوع نمونه ها در دو مطالعه است. در مطالعه جلالی ندوشن و همکاران (۲۴) بیشتر نمونه های سرطانی در درجه III قرار داشتند. در حالی که در مطالعه حاضر بیشتر نمونه ها در درجه I بودند. در مطالعه Mylonas و همکاران در آلمان بین مارکر Ki67 با کارسینوم مجرای ارتباط معنی دار آماری گزارش شد (۲۱). در مطالعه حاضر بین بیان ژن Ki67 با تومورهای مهاجم مجرا ارتباط معنی دار آماری مشاهده شد که با مطالعه Mylonas و همکاران هم خوانی دارد (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط Ringberg و همکاران در سوئد روی ۱۷۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان با میانگین سنی ۵۸ سال انجام شد؛ در ۷۲ نمونه (۴۲ درصد) مارکر پرولیفراتیو Ki67 مثبت بود و بین سن و

Ann Oncol. 2009 Mar;20(3):556-63.

4. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000 Sep; 321(7261):624-8.

5. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter. *Genomics.* 1991 Oct;11(2):476-7.

6. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the

- 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996 Jul;29(7):413-25.
7. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992 Jan;25(1):31-40.
 8. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22.
 9. Onda H, Yasuda M, Serizawa A, Osamura RY, Kawamura N. Clinical outcome in localized renal cell carcinomas related to immunoexpression of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 antigen, and tumor size. *Oncol Rep.* 1999 Sep-Oct;6(5):1039-43.
 10. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):174-83.
 11. Bozhok AA, Semiglazov VF, Semiglazov VV, Arzumanov AS, Klettsel' AE. [Prognostic and predictive factors in breast cancer]. *Vopr Onkol.* 2005;51(4):434-43. [Article in Russian]
 12. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):174-83.
 13. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol.* 2005 Nov; 16(11):1723-39.
 14. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct; 23(28):7212-20.
 15. Klintman M, Bendahl PO, Grabau D, Lövgren K, Malmström P, Fernö M. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2010 Feb; 23(2):251-9.
 16. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol.* 2010 Apr; 4:15-34.
 17. Xu L, Liu YH, Ye JM, Zhao JX, Duan XN, Zhang LB, et al. [Relationship between Ki67 expression and tumor response to neoadjuvant chemotherapy with anthracyclines plus taxanes in breast cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2010 Mar 15;48(6): 450-3. [Article in Chinese]
 18. Beckstead JH. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem.* 1994 Aug;42(8):1127-34.
 19. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol.* 2005 Mar;18(3):374-81.
 20. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol.* 2005 Mar;18(3):374-81.
 21. Mylonas I, Makovitzky J, Jeschke U, Briese V, Friese K, Gerber B. Expression of Her2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma In Situ (DCIS) Versus invasive breast cancer alone. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun;25(3A):1719-23.
 22. Ozer E, Canda T, Kuyucuodlu F. p53 mutations in bilateral breast carcinoma. Correlation with Ki-67 expression and the mean nuclear volume. *Cancer Lett.* 1998 Jan 9;122(1-2):101-6.
 23. Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, Bell JA, Elston CW, Nicholson R, et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer.* 1995 Jan; 71(1):146-9.
 24. Jalali Nadoushan MR, Neisani E, Karbassi M. Correlation of Ki67-Positivity in Tumoral Cells' Percentage with Effective Factors on Prognosis in Primary Breast Cancer. *Journal of Biological Sciences.* 2007; 2(3): 326-8.
 25. Ringberg A, Anagnostaki L, Anderson H, Idvall I, Fernö M. Cell biological factors in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast-relationship to ipsilateral local recurrence and histopathological characteristics. *Eur J Cancer.* 2001 Aug; 37(12):1514-22.
 26. Hu SW, Chuang JH, Tsai KB. Immunohistochemical expression in male breast cancer: two case reports. *Kaohsiung J Med Sci.* 2006 May;22(5):235-42.

Original Paper

Gene expression of cell proliferative marker Ki67 in breast cancer

Golmohammadi R (PhD)*¹, Pejhan A (PhD)²

¹Assistant Professor, Department of Anatomy, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

²Assistant Professor, Department of Physiology, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is one of the most important malignant tumors world-wide and the second common cancer in the females. Breast cancer is associated with a number of environmental factors and genetic damages. Ki67 is a proto-oncogene which is activated in cell proliferation process. Ki67 is important in prognosis and response to chemotherapy. The aim of this study was to investigate the Ki67 gene expression in patients with breast cancer by immunohistochemistry method.

Materials and Methods: This descriptive laboratory study was conducted on 80 breast cancer specimens from patients admitted to the hospitals in Sabzevar, Iran during 2005-09. Samples were fixed in formalin, the tissue processing was done and sections were stained by Hematoxylin and Eosin method. The malignancy was diagnosed by two pathologists blindly. Over expression of ki67 was determined with the immunohistochemistry method. Slides were scored into negative, weak, average and strong based on percentage of cells which were stained. The Data were analyzed by SPSS-11.5, Chi-Square and Fisher's exact tests.

Results: Ki67 proliferative marker was observed in 37 (46.3%) specimens with breast cancer. Sensivity of staining was one positive (+) in 15 cases, two positive (++) in 14 cases and three positive (+++) in 8 cases. There was a significant relationship between Ki67 gene expression and tumor type and tumor staging ($P < 0.05$), but there was no significant relationship between Ki67 gene expression and tumor grade.

Conclusion: It is concluded that, ki67 is expressed mostly in invasive and developed breast cancer.

Keywords: Breast cancer, ki67 expression, Immunohistochemistry

* **Corresponding Author:** Golmohammadi R (PhD), E-mail: rahimgolmohammadi@yahoo.com

Received 31 July 2010

Revised 21 November 2010

Accepted 8 January 2011