

ارتباط بین c-erb B-2 و درگیری گره های لنفاوی در سرطان پستان

دکتر اشرف فخرجو: دانشیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط

E-mail : a_fakhr_ir@yahoo.com

دکتر محمود طاهری: دستیار پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
احمد آقازاده: مربی آمار کاربردی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۳/۷/۶، بازنگری نهایی: ۸۳/۱۱/۹، پذیرش: ۸۳/۱۲/۵

چکیده

زمینه و اهداف: درگیری گره های لنفاوی مهم ترین عامل پروگنوستیک در سرطان پستان می باشد و در انتخاب نوع درمان سیستمیک مهم است. آگاهی از درگیری یا عدم درگیری گره های لنفاوی مستلزم تشریح گره های لنفاوی زیر بغل است. c-erb B-2 یک آنکو پروتئین غشایی است که HER2/neu نامیده میشود و اساساً در سرطان پستان بروز می کند ولی الزاماً در همه ی موارد سرطان پستان دیده نمیشود.

می خواهیم ببینیم بین درگیری گره های لنفاوی زیر بغل و مثبت شدن c-erb B-2 ارتباطی وجود دارد؟ اگر ارتباطی وجود دارد؛ می توان از آن بعنوان یک مارکر بیولوژیک برای پی بردن به وضعیت گره های لنفاوی و تعیین پروگنوز استفاده کرد، قبل از آنکه احتیاج به تشریح گره های لنفاوی زیر بغل باشد.

روش بررسی: در این تحقیق روی ۹۰ مورد سرطان پستان بلوکهای پارافینی تهیه و رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی برای آنکو پروتئین B-2 c-erb با روش Biotin-Avidin Peroxidase Complex صورت گرفت و نتایج با و استفاده از آزمون مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: از ۹۰ مورد، ۸۵ مورد (۹۴/۴٪) سرطان داکتال مهاجم، ۲ مورد (۲/۲٪) سرطان لوبولر مهاجم، ۲ مورد (۲/۲٪) سرطان موسینی و ۱ مورد (۱/۱٪) سرطان نوع مدولری بودند. از میان ۹۰ مورد، در ۵۴ مورد ماستکتومی همراه با تشریح گره لنفاوی زیر بغل وجود داشت که ۳۹ مورد درگیری گره لنفاوی داشتند و ۱۵ مورد نداشتند. کلاً ۴۰٪ موارد برای B-2 c-erb مثبت بودند. بین بالا بودن درجه بدخیمی و مثبت شدن B-2 c-erb ارتباط مستقیم وجود داشت (P=۰/۰۴۱). بین درگیری غدد لنفاوی و یا تعداد گره های لنفاوی درگیر و B-2 c-erb ارتباط معنی داری وجود نداشت (P=۰/۹۸).

نتیجه گیری: ارتباطی بین درگیری گره های لنفاوی و مثبت شدن B-2 c-erb وجود ندارد و نمی توان از آن به عنوان یک مارکر بیولوژیک برای تعیین درگیری گره های لنفاوی استفاده کرد. لذا در تعیین پروگنوز و تصمیم گیری برای شروع یا عدم شروع درمان سیستمیک جایگزین تشریح گره های لنفاوی زیر بغل نمی باشد. مثبت بودن پروتئین B-2 c-erb صرفاً یک عامل پروگنوستیکی و انتخاب پروتکل درمانی خاصی را شامل نمیشود.

کلید واژه ها: سرطان پستان، B-2 c-erb، درگیری گره لنفاوی، ایمونو هیستوشیمی

مقدمه

می باشد (۱ و ۲). مثبت شدن B-2 c-erb روی بقاء و انتخاب نوع درمان سیستمیک مؤثر است و تعداد گره های لنفاوی دیگر نیز در پروگنوز و انتخاب روش درمان مؤثر می باشد. یکی از روشهای درمانی گره های لنفاوی درگیر، دادن اشعه است (۱).

مواد و روش ها

مطالعه ما یک مطالعه مقطعی - تحلیلی می باشد که روی ۹۰ مورد سرطان پستان (بیوسی و ماستکتومی) که از مهرماه ۸۱ لغایت آبان ۸۲ به بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی تبریز مراجعه کرده بودند، صورت گرفت.

از آنها بلوکهای پارافینی تهیه شد و نوع هیستولوژیک، درجه و وضعیت گره های لنفاوی آنها بررسی شد (از نظر تعداد گره های لنفاوی و اینکه درگیری دارد و یا خیر). سپس از بلوکهای پارافینی

سرطان پستان شایع ترین سرطان در خانمها است و مشکلات فراوان و مرگ و میر زیادی را بدنبال دارد (۱). دانشمندان سعی کرده اند عواملی را که در پروگنوز و درمان این سرطان نقش دارد شناسایی کنند. از عوامل مهم در پروگنوز این بیماران درجه میکروسکوپی و درگیری گره های لنفاوی می باشد.

B-2 c-erb یا HER2/neu یک آنکو پروتئین غشایی ۱۸۵ کیلو دالتونی را کد می کند که مرتبط با خانواده تیروزین کیناز بوده و اساساً در سرطان پستان بروز می کند، ولی در سایر تومورها مثل تخمدان نیز دیده می شود. ژن آن روی کروموزوم ۱۷q قرار دارد. در مورد نقش این آنکوژن بعنوان یک عامل پروگنوستیک اختلاف نظر وجود دارد. ولی به نظر می رسد در آنهایی که این آنکو پروتئین با درجه تومور ارتباط نزدیکی دارد (۲ و ۳)، و در سرطانهایی که B-2 c-erb مثبت دارند، درگیری گره های لنفاوی بعنوان مهم ترین فاکتور پروگنوستیک

مورد (۱/۱) کارسینوم مدولری بودند. میانگین سنی بیماران ۱۳/۸ ± ۴۷ سال بود. کلا ۴۰٪ موارد c-erb B-2 مثبت داشتیم. از ۸۵ مورد سرطان مهاجم داکتال، ۳۹ مورد (۴۵/۹٪) درجه I؛ ۴۵ مورد (۵۲/۹٪) درجه II و یک مورد (۱/۲٪) درجه III بود و چون تعداد درجه III فقط یک مورد بود کلاً درجه ها را به دو دسته I (۳۹ مورد) و درجه بالاتر (II و III) تقسیم کردیم (۴۶ مورد). وضعیت c-erb B-2 در آنها بررسی شد و نتایج به صورت جداول زیر درآمد همان طوریکه در جدول ۱ مشاهده می شود.

اختلاف معنی داری بین مثبت شدن c-erb B-2 و بالا بودن درجه تومور وجود دارد (p=۰/۰۴۱).

از بین این ۸۵ مورد که بیوپسی و ماستکتومی شده بودند در ۵۴ مورد ماستکتومی و تشریح گره های لنفاوی آگزیلاری صورت گرفته بود که ۳۹ مورد درگیری گره های لنفاوی داشتند و ۱۵ مورد نداشتند. برای اینکه ببینیم ارتباطی بین درگیری گره های لنفاوی با مثبت شدن c-erb B-2 وجود دارد یا خیر، نتایج I.H.C (ایمونو هیستوشیمی) را بین این دو گروه (گروه دارای درگیری گره های لنفاوی و گروه بدون درگیری) بررسی کردیم.

مواردی که درگیری گره های لنفاوی داشتند (۳۹ مورد) به دو دسته تقسیم کردیم؛ دسته اول آنهایی که ۱ الی ۴ گره های لنفاوی درگیر داشتند و دسته دوم آنهایی که ۴ یا بیشتر گره لنفاوی درگیر داشتند. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود.

اختلاف معنی داری بین تعداد غدد لنفاوی درگیر و مثبت شدن c-erb B-2 وجود ندارد.

برشهای ۵ میکرونی جهت ایمونو هیستوشیمی (IHC) برای c-erb B-2 به روش Avidin-biotin peroxidase تهیه شد. برشها را روی لام قرار داده و به مدت یک شبانه روز در داخل فور قرار دادیم تا پارافین زدایی شوند در مرحله بعد جهت آگیری و شفاف سازی، لامها را در گزلیل و درجات مختلف الکل سفید و الکل مطلق قرار دادیم، تا آنتی ژنهای سطحی موجود در تومور ظاهر و فعال شوند.

سپس لامها را از داخل بافر سیترات درآورده و داخل بافر فسفات BPS با pH=۷/۲ قرار دادیم و بطور سلسله وار مراحل IHC را انجام دادیم که شامل استفاده از آب اکسیژنه ۳٪ به مدت ۵ دقیقه جهت مهار پراکسیداز اندوزن - ورود به بافر BPS، آنتی بادی منوکلونال علیه c-erb B-2 به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه.

محلول بیوتین (biotinylated antibody) ۱۰ دقیقه - BPS، محلول استریتوآویدین ۱۰ دقیقه.

BPS- محلول کروموزن ۵ دقیقه - و در نهایت لامها را با هماتوکسیلین رنگ آمیزی متقابل کرده و با میکروسکوپ نوری نگاه کردیم. رنگ آمیزی غشایی که به صورت پیوسته بوده و بالاتر از ۱۰٪ سلولها را رنگ کرده باشد مثبت در نظر گرفتیم (۵).

نتایج با نرم افزار آماری SPSS 11 با استفاده از آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

از ۹۰ مورد سرطان پستان که بررسی شدند، از نظر انواع هیستولوژیک، ۸۵ مورد (۹۴/۴٪) سرطان مهاجم داکتال، ۲ مورد (۲/۲٪) سرطان لبولر مهاجم، ۲ مورد (۲/۲٪) سرطان موسینوس و ۱

جدول ۱: وضعیت c-erb B-2 و درجه تومور

درجه بندی تومور	I		II		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
ایمونو هیستوشیمیایی منفی	۲۸	۳۳٪	۲۳	۲۷٪	۵۱
ایمونو هیستوشیمیایی مثبت	۱۱	۱۳٪	۲۳	۲۷٪	۳۴
جمع	۳۹	۴۶٪	۴۶	۵۴٪	۸۵

p=۰/۰۴۱

جدول ۲: وضعیت c-erb B-2 و درگیری یا عدم درگیری گره های لنفاوی

درگیری گره های لنفاوی	بدون درگیری گره های لنفاوی		با درگیری ۱-۴ گره های لنفاوی		با درگیری بیش از ۴ گره های لنفاوی		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
ایمونو هیستوشیمیایی منفی	۸	۱۴/۸٪	۱۱	۲۰/۴٪	۹	۱۶/۶۵٪	۲۸
ایمونو هیستوشیمیایی مثبت	۷	۱۳٪	۱۰	۱۸/۵٪	۹	۱۶/۶۵٪	۲۶
جمع	۱۵	۲۷/۸٪	۲۱	۳۸/۹٪	۱۸	۳۳/۳٪	۵۶

p=۰/۹۸

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده ارتباط معنی داری بین درگیری گره های لنفوی و مثبت شدن c-erb B-2 وجود نداشت ($p=0/98$). ولی با درجه تومور ارتباط داشت ($p=0/041$). در اکثر مطالعات دیگر نیز چنین نتیجه ای بدست آمده است.

Hartmann و همکاران با مطالعه روی ۳۵۴ بیمار با درگیری گره های لنفوی به این نتیجه رسیدند که ارتباطی بین درجات درگیری گره های لنفوی و مثبت شدن c-erb B-2 وجود ندارد ($P=0.001$) ولی شدت رنگ آمیزی، با درجه هسته ای و منفی بودن گیرنده ی استروژنی یک ارتباط معنی دار دارد (۶).

Rosen و همکاران با مطالعه ۴۴۰ بیمار با سرطان پستان و بدون درگیری گره های لنفوی به این نتیجه رسیدند که c-erb B-2 ارزش پروگنوستیک ندارد (۷).

Hayes و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که c-erb B-2 یک مارکر بالینی مفید برای انتخاب روش درمان می باشد و به نظر می رسد که c-erb B-2 یک فاکتور پروگنوستیک ضعیف می باشد. هنگامی که شیمی درمانی Adjuvant مطرح است. افرادی که c-erb B-2 مثبت دارند از داروهای anthracycline بیشتر سود می برند و در آنهایی که متاستاز داده آند و c-erb B-2 مثبت است، استفاده از آنتی بادی anti c-erb B-2 یعنی trastuzamb حیاتی است (۸).

Hendriks و همکاران روی ۲۱۱ مورد سرطان پستان که حدود ۱۶ سال دنبال و پیگیری شدند ملاحظه کردند که در مطالعه Univariant در افرادی که گره های لنفوی درگیر است، مثبت شدن c-erb B-2 ارزش پروگنوستیک دارد و آنهایی که گره های لنفوی گرفتار ندارند، ارزش پروگنوستیک ندارند. ولی در مطالعه مولتی واریانت این مسئله مشاهده نشد و این ارتباط قوی نبود (۹).

Rilke و همکاران هم در مطالعه ای روی ۱۲۱۰ مورد سرطان پستان که ۱۹ سال آنها را پیگیری کردند چند پارامتر را بررسی نمودند مانند اندازه تومور و درگیری گره های لنفوی، درجه تومور و انفیتراسیون لنفوسیتی. آنها به این نتیجه رسیدند که c-erb B-2 روی پروگنوز آنها که درگیری گره های لنفوی دارند، مؤثر بوده و پروگنوز آنها بدتر می باشد ولی در آنها که گره های لنفوی درگیر نبود چنین ارتباطی وجود نداشت. ضمناً مثبت شدن c-erb B-2 بستگی به اندازه تومور - درجه آن و میزان التهاب داشت ولی ارتباطی با گره های لنفوی نداشت (۱۰).

در یک مطالعه توسط Jeffrey و همکاران، بصورت مرور مقالات، ۵۲ مقاله که روی هم ۱۶۰۰۰ بیمار می شد، بررسی شد. آنها به این نتیجه رسیدند که ارزش پروگنوستیک c-erb B-2 مورد بحث است ولی در پاسخ به درمان مناسب است و آنها که مثبت می شوند به درمان مقاوم تر هستند. ضمناً مثبت شدن c-erb B-2 بطور مستقل ارتباطی با درگیری گره های لنفوی نداشت ولی بصورت مولتی واریانت مرتبط بود (۱۱).

در مطالعه Tsuda و همکاران روی ۱۷۶ مورد سرطان پستان، نتیجه گرفتند که درگیری گره های لنفوی و درجه روی پروگنوز مؤثر

است و مثبت شدن c-erb B-2 با درجه ارتباط قوی دارد و مثبت شدن آن در داخل پارامتر درجه نهفته است (۱۲).

Christopher و همکاران با مطالعه ۱۸۵ مورد سرطان پستان و انجام IHC برای c-erb B-2 و پیگیری ۶۰ ماهه آنها نشان دادند، درگیری گره های لنفوی مهمترین عامل پروگنوستیک است و مثبت شدن c-erb B-2 با منفی بودن رسیپتور ER و درجه ارتباط دارد ولی با گره های لنفوی ارتباط ندارد. در ضمن آنها نتیجه گرفتند که c-erb B-2 یک عامل پروگنوستیک مستقل در پروگنوز سرطان پستان است. (۱۳)

در مطالعه ای که Silverstein و همکاران روی ۲۲۸۲ بیمار با سرطان پستان و تشریح گره های زیر بغل انجام دادند یازده پارامتر بالینی و پاتولوژیکی بررسی شد. مانند قابل لمس بودن تومور، تهاجم عروق خونی و لنفاتیک، درجه تومور، رسیپتور استروژنی و پروژستونی، سن، HER2/neu، نوع هستولوژی، پلئیدی و TNM staging.

از بین اینها، چهارتای آنها شامل:

۱- درگیری عروق خونی و لنفاتیک

۲- اندازه تومور (بالتر یا کوچکتر از ۱۵ میلی متر)

۳- Nuclear grade (درجه هسته ای)

۴- قابل لمس بودن تومور

بعنوان فاکتورهای مستقل برای درگیری گره های لنفوی تشخیص داده شد و HER2/neu یا همان c-erb B-2 جزو آنها نبود. از این چهار پارامتر می توان برای یافتن ریسک درگیری گره های لنفوی و در نتیجه انتخاب روش درمان مناسب استفاده کرد. در تومورهایی که قابل لمس نیستند اگر بقیه سه عامل منفی باشد شانس متاستاز به عقده های لنفوی ۰/۰۳ و اگر هر یک از سه تای دیگر به تنهایی باشد شانس متاستاز ۶٪ است (۴).

Hartmann و همکاران بین میزان درگیری گره های لنفوی و میزان مثبت شدن c-erb B-2 ارتباطی پیدا کرده اند. (۵) ولی دیگر محققان نتوانسته اند چنین ارتباطی را پیدا کنند (۶، ۷ و ۸) و در بعضی از مطالعات یک ارتباط معکوس بین مثبت شدن c-erb B-2 و مثبت شدن رسیپتور استروژن پیدا کرده اند. (۹) و چندین روش برای تعیین بروز c-erb B-2 در سرطان وجود دارد که شامل ۴ موارد زیر است: RNA (Northern) blotting، DNA (Southern) hybridization، Immunoblotting (Western)، روش دیگر رنگ آمیزی ایمونوهیستو شیمیایی می باشد که می تواند آشکار شدن مستقیم آنکو پروتئین و محل آن را نشان می دهد و ارتباط نزدیک و خوبی بین این روشها وجود دارد (۵).

نتیجه گیری

در این تحقیق با توجه به اینکه ارتباطی بین درگیری گره های لنفوی و مثبت شدن c-erb B-2 وجود ندارد و نمی توان از آن بعنوان یک مارکر بیولوژیکی برای تعیین درگیری گره های لنفوی استفاده کرد، بنابراین از درخواست آزمایش c-erb B-2 که آزمایش نسبتاً

را بررسی کرده و بتواند برای شروع یا عدم شروع درمان سیستمیک تصمیم بگیرد. ولی لازم به ذکر است که چنانچه تصمیم به شروع درمان سیستمیک گرفته شد از c-erb B-2 می توان برای انتخاب روش درمان Adjuvant مانند Anthracycline و Transtuzamb استفاده مفید کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدر دانی خود را از جناب آقای دکتر ابراهیم نژاد، آقای اکبری و آقای اسفنجانی به خاطر همکاری در کارهای تکنیکی (برش بلسوکهای پارافینی و رنگ آمیزی) ابراز می دارند.

گرانی می باشد برای بررسی پروگنوز و پیشگویی درگیری گره های لنفاوی باید خودداری شود و بیشتر برای انتخاب نوع درمان سیستمیک این آزمایش درخواست گردد. در ضمن می توان روی مارکرهای دیگری مطالعه کرد تا شاید بتوان در آینده با توسل به آن درگیری گره های لنفاوی را تعیین کند که گامی بزرگ در کاهش آلام بیماران با جلوگیری از تشریح گره های لنفاوی زیر بغل می باشد.

پیشنهاد

با توجه به عدم ارتباط بین c-erb B-2 و درگیری گره لنفاوی، نمی توان از c-erb B-2 بعنوان یک مارکر بیولوژیکی برای پروگنوز و تعیین درگیری یا عدم درگیری گره لنفاوی استفاده کرد و همچنان جراح باید متوسل به تشریح گره لنفاوی زیر بغل شود تا بتواند پروگنوز

References

1. Cotran R, Kumar V, Collins T: *Robbins Pathologic Basis of Diseases*, sixth Edition. Saunders, Philadelphia. 1999; P: 1114-1115.
2. Rosai J. *Ackerman's surgical pathology*, volume 2, Ninth Edition. Mosby, St, Louis, Missouri. 2004: PP: 1819-1823.
3. Elise R, Raymond R, Jonathan L, Myles and Gary W: HER 2/neu Amplification in Breast cancer. *Am J clin pathol*. 2002; **117**: 916-921.
4. Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patient with breast carcinoma. *World J.surg*. 2001; **25**(6): 767-72.
5. Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry*, Churchill Livingstone, USA. 2002; 551.
6. Hartmann L, Ingle J, Wold L, Farr G, Grill J. Prognostic value of c-erbB-2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. *CANCER*. 1994; **74** (11): 2956-2963.
7. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Milicent C, Patrick B, et al. A study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *CANCER*. 1995; **75**(6): 1320-1326.
8. Hayes DF, Thor AD. c-erb B-2 in breast cancer. Development of a clinically useful marker. *oncol*. 2002; **29**(3):231-45.
9. Hendriks S, Eriksson ET, Falkmer UG, Lars -Erik R, Hemming J, Anders F, Auer GU. Prognostic significance of I.H.C c-erb B-2 proto-oncogen expression and nuclear DNA content In human breast cancer. *Europ. J. Surg.oncol*. 1992; **18**: 530-537.
10. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. cancer*. 1991; **49**: 44-49.
11. Jeffrey S, Fletcher JA: HER-2/neu (c-erb B-2) gene and protein in breast cancer. *Am clin pathol*. 1999; **112**(suppl.1): 53-67.
12. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erb B-2 gene in breast carcinoma. *CANCER*. 1990; **65**: 1797-1800.
13. Christopher W, Brian A, Stewart NJ, Sainsbury RC, John C, William J, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: A prognostic indicator in Human Breast cancer. *CANCER. reserch*. 1989; **49**: 2087-2090.