مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ١٤، شماره ٣: از ١-١٣
پاییز ١٣٩٠

بررسی ارتباط بین بیان ژن گیرنده استروژن آلفا در سطح RNA با پروتئین در بافت تومورهای بدخیم اولیه پستان

پانته‌آ ایزدی[1]، مهرداد نوروزی‌نیا[2*]، مرتضی کریمی‌پور[3]، محمدحمید کرباسیان[4]، محمدتقی اکبری[2]، فروزنده فریدونی[5]، زهرا مستخدمین‌حسینی[5]، فاطمه کمالی[6]، عیسی جهانزاد[5]

١- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٢- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٣- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۴- فوق تخصص جراحی پستان، بیمارستان دی، تهران، ایران
۵- متخصص پاتولوژی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶- پزشک عمومی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۹۰/۰۲/۰۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۰۷/۰۵

چکیده

هدف: پروتئین گیرنده استروژن آلفا در حال حاضر با روش ایمینوهیستوشیمی در تمام تومورهای بدخیم پستان اندازه‌گیری می‌شود. این روش دارای محدودیت‌هایی است. روش‌های مبتنی بر سنجش RNA مکمل بالقوه‌ای برای این روش هستند چرا که خاموش شدن یک ژن می‌تواند در مراحل مختلف بیان ژن از RNA تا پروتئین رخ داده باشد. هدف از این مطالعه مقایسه نتایج حاصل از این دو روش به‌منظور شناسایی ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک و بالینی زیرگروهی از تومورهای بدخیم است که در آن‌ها با وجود بیان ژن در سطح RNA، پروتئین مربوط وجود نداشته باشد.

مواد و روش‌ها: ۹۲ تومور بدخیم اولیه پستان پیش از شروع درمان همراه با اطلاعات بالینی، هیستوپاتولوژیک و نتایج ایمینوهیستوشیمی آن‌ها گردآوری شد. بررسی بیان ژن گیرنده استروژن روی RNA استخراج شده از این تومور بدخیم‌ها با روش RT-PCR انجام شد. ژن مرجع در این روش گلیسر آلدئید فسفات دهیدروژناز بود.

نتایج: ٣٦/٧ درصد از تومورهای فاقد پروتئین گیرنده استروژن، دارای بیان ژن در سطح RNA بود. در این زیرگروه، اکثر بیماران بالای ۵۰ سال و در مرحله ٣ و ٤ بیماری و دارای شاخص پیش‌آگهی دهنده ناتینگهام ضعیف بودند. بیشترین میزان تهاجم تومور بدخیم به غلاف عصب در این زیرگروه دیده شد.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد روش RT-PCR ما را قادر به شناسایی زیرگروهی از تومورهای بدخیم پستان دارای بیان ژن در سطح RNA و فاقد پروتئین مربوطه می‌نماید که پیش‌آگهی آن‌ها ضعیف‌تر از سایر تومورهاست.

کلیدواژگان: گیرنده استروژن آلفا، ایمینوهیستوشیمی، سرطان پستان

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، کدپستی: ١٤١١٧١٣١١٦
Email: noruzinia@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

۱- مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان سراسر دنیاست، به‌طوری که سالیانه حدود یک میلیون مورد جدید از این بیماری در دنیا تشخیص داده می‌شود [۱]. در ایران نیز این سرطان، شایع‌ترین بدخیمی زنان محسوب می‌شود و ۲٤/٤ درصد بدخیمی‌های شناسایی شده در زنان را تشکیل می‌دهد [۲]. میزان شیوع سرطان پستان در زنان ایرانی بالای ۳۰ سال، ۲۲ در ۱۰۰۰۰۰ است [۳]. میانگین سنی مبتلایان به این سرطان در ایران ٤۸/۸ سال است و حداکثر فراوانی آن در گروه سنی ٤۹-٤۰ سال مشاهده می‌شود؛ بنابراین سرطان پستان در بیماران ایرانی یک دهه زودتر از همتایان مبتلای آن‌ها در جوامع غربی بروز می‌کند که اشاره به تفاوت‌هایی در روند ایجاد یا پیشرفت آن در بیماران ایرانی نسبت به سایر جوامع دارد [٤].

تومورهای بدخیم پستان براساس ویژگی‌های مختلفی قابل دسته‌بندی هستند که از آن جمله می‌توان به مشخصات بافت‌شناسی تومور بدخیم و نیز شاخص‌های قابل اندازه‌گیری با روش ایمینوهیستوشیمی (Immunohistochemistry)، (از قبیل گیرنده استروژن و گیرنده پروژسترون و...) اشاره نمود.

با توجه به این‌که بافت پستان یکی از بافت‌های پاسخ دهنده به هورمون استروژن است، این هورمون و گیرنده آن نقش چشمگیری در سرطان پستان دارد، به‌طوری که سنجش این گیرنده در تمام تومورهای بدخیم اولیه پستان انجام شده و معمولاً در ٦۰-۷۰ درصد تومورهای مذکور گیرنده استروژن حضور دارد [٥]. هدف‌گیری گیرنده استروژن از طریق داروهایی مانند تاموکسی‌فن (Tamoxifen) یکی از رویکردهای درمانی در تومورهای بدخیم دارای گیرنده استروژن است [٥، ٦]. گیرنده استروژن به‌عنوان یک عامل رونویسی (Transcription Factor) قادر است بیان ژن‌های دخیل در رشد، تمایز، تهاجم و رگ‌زایی تومور بدخیم را تنظیم نماید [۷]. با توجه به نقش استروژن در تحریک سلول‌ها به رشد، رویکرد هورمون‌درمانی در سرطان پستان مبتنی بر متوقف نمودن اثر تحریکی این هورمون بر سلول‌های توموری از طریق مهار تولید هورمون یا ممانعت از اتصال آن به گیرنده‌اش بوده است [۸]. هورمون‌درمانی در بیماران مبتلا به تومورهای بدخیم ER^+ (دارای پروتئین گیرنده استروژن)، سبب کاهش چشمگیری در مرگ و میر ناشی از سرطان پستان طی دو دهه گذشته شده است [۹].

در گذشته روش کمی «سنجش اتصال با لیگاند» (Ligand Binding Assay)، روش مرجع برای اندازه‌گیری گیرنده استروژن در بافت تومورهای بدخیم پستان بوده است. در دهه ۹۰ این روش با روش ایمینوهیستوشیمی جایگزین شد و امروزه روش مرجع برای اندازه‌گیری گیرنده استروژن در بافت، ایمینوهیستوشیمی است [۱۰].

اگر چه در حال حاضر روش ایمینوهیستوشیمی به‌عنوان روش مرجع شناخته می‌شود، اما هنوز با چالش‌هایی در مراحل پیش از سنجش و سنجش (Pre Analytical & Analytical) مواجه است. عوامل مؤثر در نتیجه ایمینوهیستوشیمی در مرحله پیش‌سنجش شامل تأخیر در تثبیت بافت، نوع تثبیت کننده و طول مدت تثبیت شدن نمونه است [۱۱]. در مرحله سنجش نیز به علت تفاوت‌های ناشی از حد تفکیک به‌کار رفته (برحسب درصد سلول‌های مثبت و شدت رنگ‌پذیری آن‌ها) و اختلاف نظر بین مشاهدات مختلف یک فرد از یک نمونه و نیز تفاوت در نتایج مشاهده کننده‌های مختلف چالش‌هایی وجود دارد [۱۱]. به همین دلیل تلاش‌هایی برای کمک گرفتن از روش‌های بیوشیمیایی مبتنی بر سنجش پروتئین با روش‌های مبتنی بر سنجش RNA صورت گرفته است [۱۲-۱٥].

به‌هر حال باید توجه داشت که کنترل بیان ژن یک فرایند پیچیده است که امکان دارد در سطح خود ژن اعمال شده و مانع بیان ژن در سطح RNA شود یا با وجود بیان ژن در سطح RNA فرایندهای تنظیمی می‌توانند در مراحل بعد به‌صورت عدم ترجمه RNA و تشکیل پروتئین مربوط یا تجزیه پروتئین حاصل ایفای نقش نماید. با به‌کارگیری روش‌های مبتنی بر سنجش پروتئین (مانند ایمینوهیستوشیمی)، می‌توان تومورهای

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

پستان را در دو گروه ER^+ (بالقوه قابل درمان با هورمون‌درمانی) و ER^- (دارای پیش‌آگهی بدتر و غیر قابل درمان با هورمون‌درمانی) دسته‌بندی نمود اما اطلاعی از سطح کنترل بیان ژن ER به‌دست نمی‌آید. روش‌های مبتنی بر سنجش RNA قادرند در سطحی پیش از تشکیل پروتئین نهایی (یعنی RNA)، بیان یا عدم بیان ژن را ردیابی نمایند و به‌طور بالقوه می‌توانند ما را قادر به شناسایی زیرگروه‌های جدیدتری از تومورهای پستان با ویژگی‌های متمایز نمایند. احتمال دارد افزوده شدن این اطلاعات مولکولی به مشخصات تومورهای بدخیم پستان، به شناسایی زیرگروه‌هایی با اختصاصات و پیش‌آگهی متفاوت منجر شود که در مدیریت درمانی بیماران سودمند واقع شود. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی مقدماتی ارتباط بین بیان ژن گیرنده استروژن آلفا در دو سطح پروتئین و RNA در ۹۲ تومور بدخیم پستان اولیه به‌منظور جستجوی زیرگروه‌های جدید مولکولی در بیماران مبتلا به سرطان پستان است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌های بافت سرطان پستان

در این مطالعه ۹۲ نمونه تومور بدخیم از زنان مبتلا به سرطان پستان اولیه جمع‌آوری شد. هیچ‌یک از بیماران پیش از ورود به مرحله جراحی و دریافت تومور تحت شیمی درمانی، هورمون‌درمانی یا پرتودرمانی قرار نگرفته بودند. بیماران مراجعه کننده به انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی پیش از جراحی با تکمیل و امضای فرم رضایت آگاهانه وارد مطالعه شده و بافت جدا شده از بدن بیمار فوراً از اتاق عمل به بخش پاتولوژی منتقل شد. جداسازی سریع بافت‌های توموری از بافت‌های طبیعی مجاور توسط پاتولوژیست مجرب با سرعت انجام شده و نمونه فوراً در محفظه ازت در بانک بافت‌های توموری قرار داده شد. این تومورهای بدخیم تا زمان بررسی در ازت مایع و شرایط عاری از ریبونوکلئاز نگهداری شد.

۲-۲- جمع‌آوری اطلاعات هیستوپاتولوژیک، بالینی و ایمینوهیستوشیمی بیماران

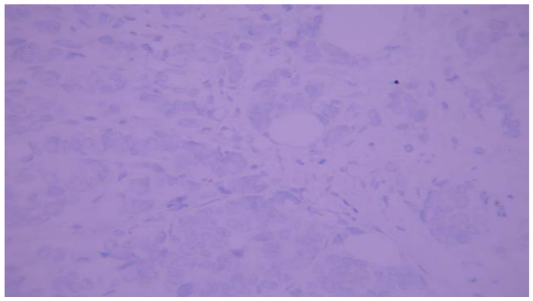
با توجه به این‌که مقایسه زیرگروه‌های تومورهای بدخیم مورد مطالعه، نیازمند اطلاعات بالینی و هیستوپاتولوژیک و نیز نتایج ایمینوهیستوشیمی تومورها است، این داده‌ها از پرونده بیمارستانی بیماران و براساس مجموعه نتایج آزمون‌های جاری بیماران مذکور استخراج و گردآوری شد. اطلاعات گردآوری شده شامل موارد کلی (سن، وضعیت یائسگی بیماران)، نتایج حاصل از بافت‌شناسی تومور [شامل اندازه تومور، نوع بافت‌شناسی تومور، درجه یا Grade تومور، وجود تهاجم تومور به غلاف عصب (Perineural Invasion)]، نتایج مجموعه آزمون‌های ایمینوهیستوشیمی تومور [شامل سنجش گیرنده استروژن، گیرنده پروژسترون و HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2)] بود. ضمناً برای هر بیمار با توجه به شرایط بالینی، مرحله بیماری (Staging) مشخص و داده‌های مربوط به آن نیز استخراج و ثبت شد.

۲-۳- سنجش گیرنده استروژن با روش ایمینوهیستوشیمی در تومورهای بدخیم

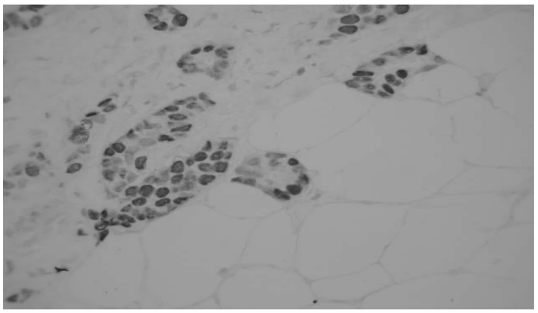
برای دسته‌بندی تومورهای بدخیم در دو گروه ER^+ و ER^- از روش ایمینوهیستوشیمی استفاده شد. این روش مبتنی بر واکنش یک آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal Antibody) با گیرنده استروژن در بافت تثبیت شده روی لام است. اتصال آنتی‌بادی با گیرنده استروژن موجود در سلول‌ها منجر به ایجاد واکنش رنگی می‌شود (شکل ۱ و ۲). بررسی سلول‌های رنگ شده با این روش در زیر میکروسکوپ مشخص می‌کند که تومور ER^- (فاقد پروتئین مذکور) یا ER^+ (دارای پروتئین مذکور) است. با توجه به این‌که این آزمون یک روش معمول بوده و برای تمام تومورهای بدخیم پستان انجام می‌شود، نتایج ثبت شده آن از پرونده بیماران شرکت کننده در پژوهش استخراج و برای مقایسه با روش RT-PCR

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) به‌کار گرفته شد.



شکل ۱ نتیجه ایمینوهیستوشیمی روی لام مربوط به بافت تومور بدخیم پستان از نوع فاقد پروتئین گیرنده استروژن آلفا (ER^-)؛ عدم رنگ شدن هسته‌های سلولی به رنگ قهوه‌ای نشان دهنده عدم حضور ER در بافت تومور است.



شکل ۲ نتیجه ایمینوهیستوشیمی روی لام مربوط به بافت تومور بدخیم پستان از نوع دارای پروتئین گیرنده استروژن آلفا (ER^+)؛ در این تومورها هسته سلول‌های بدخیمی که درون مجاری (Duct) قرار دارند در اثر واکنش با آنتی‌بادی مربوط به رنگ قهوه‌ای در آمده است.

۲-٤- استخراج RNA از تومورها

استخراج RNA کل از تومورها با استفاده از RNA easy plus mini kit (Qiagen) انجام شد. برای این منظور در شرایط استریل و روی یخ، قطعه کوچکی (در حدود ۳ میلی‌متر) از تومور بدخیم سریعاً بریده شد و فوراً در داخل بافر لیز کننده موجود در کیت با خرد کن دستی همگن شد. از آن‌جایی که تومورهای بدخیم پستان جزو گروه تومورهای جامد بوده و معمولاً متراکم و سخت هستند، با عبور دادن نمونه‌های همگن شده از ستون‌های Qia shredder (Qiagen) قطعات خرد شده بافتی راحت‌تر از یکدیگر جدا شده و مقدار محصول بهتری در استخراج RNA به‌دست می‌آید. RNA تخلیص شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و کیفیت محصول استخراج شده با الکتروفورز آن روی ژل آگارز ۲ درصد سنجش شد. این ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) در زیر نور ماورای بنفش از نظر حضور دو باند مربوط به 28S RNA و 18S بررسی شد.

۲-۵ سنتز cDNA

رونویسی معکوس از روی RNA با استفاده از QuantiTect Reverse Transcriptiokit (Qiagen) انجام شد. حجم کل واکنش ۲۰ میکرولیتر بوده و پس از انجام مرحله حذف DNA ژنومیک با استفاده از مخلوط آغازگری حاوی راندوم هگزامر (Random Hexamer) و Oligo dT سنتز cDNA در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت با قرار دادن مخلوط واکنشی برای ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد واکنش متوقف و این cDNA ها در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

۲-٦- بررسی بیان ژن گیرنده استروژن آلفا با روش RT-PCR

به‌منظور بررسی کیفی بیان ژن در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. تمام نمونه‌های cDNA حاصل از تومورهای بدخیم ابتدا از نظر بیان ژن مرجع (House Keeping) ارزیابی شدند. ژن مرجع انتخاب شده در این پژوهش، گلیسر آلدئید فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) بود. توالی آغازگرهای به‌کار رفته برای RT-PCR این ژن عبارت است از:

آغازگر جلویی (Forward primer):

ACA TCG CTC AGA CAC CAT GG

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

آغازگر برگشتی (Reverse primer):

GTA GTT GAG GTC AAT GAA GGG

اندازه قطعه حاصل از تکثیر ۱۵۰ جفت‌باز بود. توالی آغازگرهای به‌کار رفته برای ژن گیرنده استروژن آلفا عبارت بود از:

آغازگر جلویی:

GGT ACT GGC CAA TCT TTC TC

آغازگر برگشتی:

AACGCG CAG GTC TAC GGT CA

اندازه قطعه حاصل از تکثیر ۳۰۰ جفت‌باز بود. در هر واکنش که در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد، بافر PCR ۱X (شرکت سیناژن، ایران)، ۱/۵ میلی‌مولار منیزیوم کلراید، ۱ میلی‌مولار dNTP، ۰/۲ پیکومول از هر آغازگر و ۲ واحد آنزیم *Taq* (سیناژن، ایران) استفاده شد. در هر سری RT-PCR از cDNA تهیه شده از رده سلولی MCF-7 (دارای بیان ژن ER) به‌عنوان کنترل مثبت و از cDNA به‌دست آمده از رده سلولی MDA-MB-231 (فاقد بیان ژن ER) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برنامه دمایی تکثیر عبارت بود از: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و در انتها ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصول هر واکنش RT-PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. این مرحله با ولتاژ ثابت ۸۵ ولت و مدت ۱ ساعت انجام شد و در نهایت پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید و براساس تعیین اندازه باندهای مشاهده شده تفسیر صورت گرفت.

هر نمونه تومور بدخیم حداقل دو بار برای هریک از ژن‌های GAPDH و ER با روش RT-PCR بررسی شد.

۲-۷- محاسبه شاخص پیش‌آگهی دهنده ناتینگهام (Nottingham prognostic index: NPI) بیماران

برای به‌دست آوردن یک برآورد از پیش‌آگهی بیماران که مبتنی بر چند ویژگی عمده باشد، از شاخص ناتینگهام استفاده شد. محاسبه این شاخص با توجه به فرمول زیر، ارایه شده توسط گالئا (Galea) و همکاران [۱۶] انجام شد.

NPI= مرحله غده لنفاوی (۳-۱) + درجهٔ بافتی (۳-۱) + اندازه تومور (سانتی متر)×۰/۲

مبنای تعیین مرحله درگیری عقده‌های لنفاوی عبارت بود از:

مرحله ۱: عدم درگیری عقده‌های لنفاوی

مرحله ۲: درگیری ۱ تا ۳ عقده لنفاوی

مرحله ۳: درگیری ٤ عقده لنفاوی یا بیشتر

این اطلاعات از پرونده بیماران استخراج شد.

مبنای تعیین درجه بافتی (Histological Grade) عبارت بود از:

درجه ۱ شامل تومورهایی با تمایز بافتی خوب

درجه ۲ شامل تومورهایی با تمایز بافتی متوسط

درجه ۳ شامل تومورهای با تمایز بافتی ضعیف

این اطلاعات از نتایج بافت‌شناسی تومورهای بدخیم (موجود در پرونده بیماران) استخراج شد.

بر این اساس NPI بیماران می‌تواند کمتر از ۳/٤ (پیش‌آگهی خوب)، در محدوده ۵/٤-۳/٤ (پیش‌آگهی متوسط) یا بزرگ‌تر از ۵/٤ (پیش‌آگهی ضعیف) به‌دست بیاید. از این معیار برای مقایسه سه زیر گروه تفکیک شده با روش RT-PCR استفاده شد.

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

ارتباط بین ویژگی‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک بیماران با بیان ژن ER در سطح RNA با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۳ تحلیل شد. برای این منظور از آزمون‌های آماری فیشر (Fisher Exact Test) و آزمون مجذور کای پیرسون (Pearson Chi Square Test) استفاده شد. P value کمتر از ۰/۰۵ و فاصله اطمینان (Confidence Interval: CI) ۹۵ درصد به‌عنوان حد معنی‌داری پذیرفته شد. برای مقایسه نتایج به‌دست آمده با دو روش ایمینوهیستوشیمی و RT-PCR تطابق نتایج مثبت و نتایج منفی محاسبه شد. برای محاسبه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

تطابق دو روش از نظر نتایج مثبت، تعداد نمونه‌های مثبت مشترک در هر دو روش تقسیم بر تعداد نمونه‌های مثبت با روش ایمینوهیستوشیمی شد و عدد حاصل به شکل درصد بیان شد. برای درصد تطابق نتایج منفی نیز به همین صورت محاسبه انجام گرفت.

۳-نتایج

۳-۱- ویژگی بیماران

در مجموع ۹۲ تومور بدخیم اولیه پستان بررسی شد. ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیک بیماران در جدول ۱ خلاصه شده است.

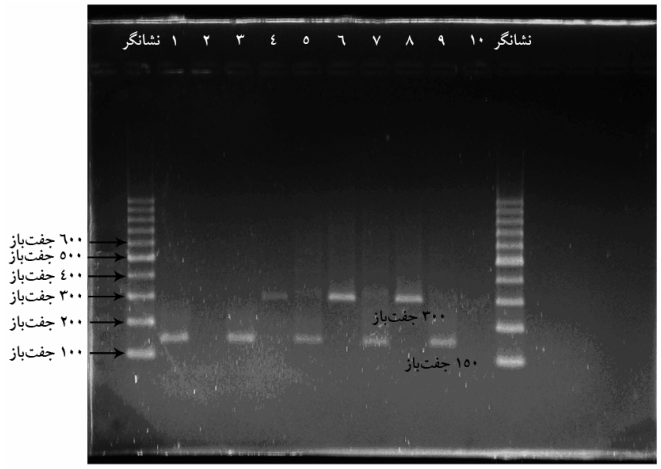
جدول ۱ ویژگی‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک بیماران

ویژگی	تعداد (درصد)
سن در زمان تشخیص بیماری	
کمتر یا مساوی ۵۰ سال	۵۰ (۵٤/۳)
بیشتر از ۵۰ سال	٤۲ (٤۵/۷)
وضعیت یائسگی	
پیش یائسگی	٤٤ (٤۷/۸)
پس یائسگی	٤۸ (۵۲/۲)
اندازه تومور بدخیم	
کمتر یا مساوی ۲ سانتی‌متر	۱۵ (۱٦/۳)
٤/۹-۲ سانتی‌متر	۵۲ (۵٦/۵)
مساوی یا بزرگ‌تر از ۵ سانتی‌متر	۲۵ (۲۷/۲)
تعداد غدد لنفاوی درگیر	
هیچ غده	۳۲ (۳٤/۸)
۳-۱ غده	۲۲ (۲۳/۹)
۹-٤ غده	۱۸ (۱۹/٦)
مساوی یا بیشتر از ۱۰ غده	۱۱ (۱۲)
نامشخص	۱ (۱/۱)
مرحله بیماری	
۱	۱۰ (۱۰/۹)
۲	٤۳ (٤٦/۷)
۳	۳٦ (۳۹/۱)
٤	۳ (۳/۳)
بافت‌شناسی تومور بدخیم	
مجرایی (Ductal)	۸۸ (۹۵/۷)
غیرمجرایی (Non Ductal)	٤ (٤/۳)
درجه تومور بدخیم	
(درجه پایین)	٦۲ (٦۷/٤)
(درجه بالا)	۳۰ (۳۲/٦)
وضعیت گیرنده استروژن آلفا براساس روش ایمینوهیستوشیمی	
مثبت	٤۳ (٤٦/۷)
منفی	٤۹ (۵۳/۳)
وضعیت گیرنده پروژسترون براساس روش ایمینوهیستوشیمی	
مثبت	۲۸ (۳۰/٤)
منفی	٦٤ (٦۹/٦)
وضعیت Her2 براساس روش ایمینوهیستوشیمی	
مثبت	۳۷ (٤۰/۲)
منفی	۵۵ (۵۹/۸)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

۳-۲- مطالعه بیان ژن گیرنده استروژن آلفا

شکل ۳ نتایج RT-PCR را برای سه نمونه از تومورهای مورد مطالعه نشان می‌دهد. نتایج بررسی بیان ژن گیرنده استروژن آلفا با روش RT-PCR نشان داد که ژن مرجع (GAPDH) در تمام تومورهای بدخیم فعال بوده و بیان شده است. ژن هدف (ERα) در تمام تومورهای بدخیم ER^+ (دارای گیرنده استروژن براساس نتایج ایمینوهیستوشیمی) بیان شده در حالی که تومورهای بدخیم ER^- (فاقد گیرنده استروژن براساس نتایج ایمینوهیستوشیمی) از نظر بیان ژن گیرنده استروژن، در دو گروه جای گرفتند: ۳٤ تومور بدخیم فاقد بیان ژن در سطح RNA مذکور بوده و ۱۵ تومور دارای بیان ضعیف ژن (وجود باند ضعیف در RT-PCR) بودند. (براساس اطلاعات ثبت شده از نتایج ایمینوهیستوشیمی در پرونده بیماران، ٤۳ تومور بدخیم از نظر پروتئین ER مثبت و ٤۹ تومور بدخیم فاقد پروتئین ER یعنی ER^- بود). به‌عبارت دیگر ۳٦/۷ درصد از تومورهای فاقد پروتئین گیرنده استروژن، در سطح RNA بیان ژن مذکور را نشان دادند.



شکل۳ الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل آگارز؛ نشانگر اندازه (Size Marker) به‌کار رفته GeneRuler 100 bp plus #SM0321 از شرکت Fermentas است. **چاهک ۱)** محصول تکثیر ژن GAPDH (با اندازه ۱٥۰ جفت‌باز) در تومور شماره یک (ER منفی)، **چاهک ۲)** عدم تکثیر ژن ER در تومور شماره یک (ER منفی)، **چاهک ۳)** محصول تکثیر ژن GAPDH (با اندازه ۱٥۰ جفت‌باز) در تومور شماره دو (ER منفی)، **چاهک ٤)** محصول تکثیر ژن ER (با اندازه ۳۰۰ جفت‌باز) به‌صورت یک باند ضعیف در تومور شماره دو (ER منفی)، **چاهک ٥)** محصول تکثیر ژن GAPDH (با اندازه ۱٥۰ جفت‌باز) در تومور شماره سه (ER مثبت)، **چاهک ٦)** محصول تکثیر ژن ER (با اندازه ۳۰۰ جفت‌باز) در تومور شماره سه (ER مثبت)، **چاهک ۷، ۸)** محصولات تکثیر ژن GAPDH و ER در کنترل مثبت (رده سلولی ER مثبت به‌نام MCF-7). **چاهک ۹، ۱۰)** محصول تکثیر ژن GAPDH و ER در کنترل منفی (رده سلولی ER منفی به‌نام MDA-MB-231)

۳-۳- بررسی ارتباط بیان ژن گیرنده استروژن آلفا با ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی تومورهای بدخیم

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین ER^+ بودن تومور بدخیم (براساس روش ایمینوهیستوشیمی) و بیان ژن مذکور در سطح mRNA (براساس RT-PCR) مشاهده شد ($P<۰/۰۰۰۱$). همچنین رابطه معنی‌داری بین بیان ژن گیرنده استروژن آلفا در سطح mRNA و حضور پروتئین گیرنده پروژسترون در بافت تومور بدخیم (براساس روش ایمینوهیستوشیمی) به‌دست آمد ($P<۰/۰۰۰۱$).

در بررسی ارتباط بین بیان ژن گیرنده استروژن آلفا در سطح mRNA در تومورهای بدخیم و حضور HER2 (براساس ایمینوهیستوشیمی)، اگرچه رابطه به سطح تعیین شده برای معنی‌داری نرسید ($P=۰/۰۷$)، اما ۳۱ تومور بدخیم از ٤۳ تومور ER^+ فاقد HER2 بوده و به‌نظر می‌رسد رابطه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

معکوسی بین این دو ویژگی در تومورهای بدخیم دارای بیان فعال ژن گیرنده استروژن آلفا بر قرار باشد. ارتباط ER^+ بودن تومور بدخیم با عدم حضور HER2 کاملاً معنی‌دار بوده و تومورهای بدخیم ER^+ بیشتر از نوع $HER2^-$ بود (P=۰/۰۲).

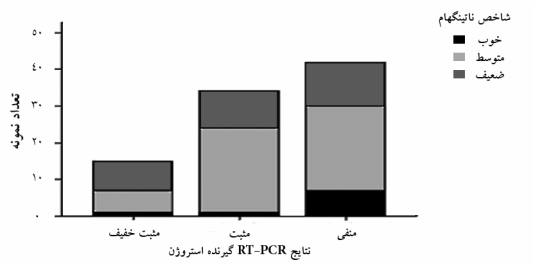
منفی بودن تومور بدخیم از نظر سه شاخص اصلی ($ER^-/PR^-/HER2^-$) با عدم بیان ژن گیرنده استروژن آلفا در سطح mRNA رابطه معنی‌دار داشت (P<۰/۰۰۰۱). رابطه معنی‌داری بین بیان ژن گیرنده استروژن آلفا در سطح mRNA با سن بیمار در زمان تشخیص، یائسگی، اندازه تومور بدخیم، تعداد غدد لنفاوی درگیر و مرحله بیماری دیده نشد. رابطه درجه تومور بدخیم (Grade) با بیان ژن مذکور در سطح پروتئین معنی‌دار (P=۰/۰۵) و با بیان ژن در سطح mRNA نزدیک به معنی‌دار (P=۰/۱) بود؛ به‌طوری که بیشتر تومورهای بدخیم با درجه پایین دارای بیان فعال ژن مذکور بود .

۳-٤- بررسی ویژگی تومورهای بدخیم فاقد بیان ژن ER در سطح پروتئین که دارای بیان ضعیف ژن در سطح mRNA هستند

بررسی ویژگی‌های این زیرگروه نشان داد که برخلاف سایر تومورهای بدخیم ER^-، تعداد بیماران بالای ۵۰ سال و یائسه در این زیرگروه دو برابر بیماران زیر ۵۰ سال است. از نظر مرحله بیماری این گروه متفاوت از تومورهای بدخیم فاقد بیان ژن در سطح پروتئین و RNA و تومورهای بدخیم دارای بیان ژن در سطح پروتئین و RNA است، به‌طوری که ٦۰ درصد بیماران این زیر گروه در مرحله ۳ و ٤ بیماری خود هستند و در مقابل ۳۲ درصد بیماران با تومورهای بدخیم ER و ۳۷ درصد بیماران با تومورهای بدخیم ER^+ در این مراحل قرار دارند. از نظر بافت‌شناسی در این زیرگروه بیشترین تهاجم سلول‌های بدخیم به غلاف اطراف عصب‌ها دیده می‌شود (٤۰ درصد در مقابل ۲۳ درصد در گروه ER^- و ۳۰ درصد در گروه ER^+).

۳-۵- مقایسه NPI در بیماران

نمودار ۱ مقایسه NPI را در سه زیر گروه مشخص شده با RT-PCR نشان می‌دهد. ۵۳ درصد زیرگروه دارای بیان ژن ER در سطح RNA و فاقد پروتئین مربوط، دارای شاخص ناتینگهام ضعیف (Poor NPI) بود؛ در حالی که این ویژگی در ۲٦ درصد تومورهای فاقد و نیز ۲۸ درصد تومورهای واجد بیان ژن فوق مشاهده شد. این تفاوت نزدیک به حد معنی‌دار بود (P=۰/۱).



نمودار ۱ مقایسه NPI در سه گروه تومور تفکیک شده براساس بیان ژن گیرنده استروژن در سطح RNA در روش RT PCR؛ مثبت خفیف: معرف گروه دارای بیان ژنی ضعیف، مثبت: معرف گروه دارای بیان ژنی قوی، منفی: معرف گروه فاقد بیان ژن مذکور، شاخص ناتینگهام در سه مقیاس خوب، متوسط و ضعیف (Poor) طبقه‌بندی شده است [۱۷].

٤-بحث

در این تحقیق با استفاده از مقایسه یافته‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک ۹۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان از نوع تک‌گیر و یافته‌های مولکولی مشخص شد که می‌توان به روشی دقیق‌تر به دسته‌بندی بیماران از نظر پیش‌آگهی پرداخت.

امروزه براساس معیارهای موجود، سنجش دقیق گیرنده‌های هورمونی (مانند گیرنده استروژن آلفا و گیرنده پروژسترون) در بافت تومورهای بدخیم پستان از اهمیت فوق‌العاده‌ای در انتخاب مسیر درمانی و پیش‌آگهی بیماران برخوردار است. به‌عنوان مثال، بیماران دارای تومورهای بدخیم ER^+ که با تاموکسی‌فن تحت درمان هورمونی بوده‌اند،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

بقای ۱۵ ساله بهتری داشته و این درمان می‌تواند در ۵۰ درصد این بیماران مانع عود بیماری شود [۹]. به همین علت، در حال حاضر در دستورالعمل‌های انجمن آمریکایی سرطان‌شناسی بالینی (American Society of Clinical Oncology: ASCO) روش مرجع برای سنجش گیرنده‌های هورمونی، ایمینوهیستوشیمی است [۱۷]. البته باید توجه داشت که جدای از تفاوت‌های تکنیکی روش‌های سنجش پروتئین (مانند ایمینوهیستوشیمی) با روش‌های مبتنی بر RNA (مانند RT-PCR) که باعث بروز تفاوت‌هایی در نتایج آن‌ها (به‌ویژه نتایج منفی) می‌شود، بیان ژن در سطح RNA لزوماً معادل بیان آن در سطح پروتئین نبوده و در بهترین شرایط از لحاظ روش سنجش، احتمالاً نمونه‌هایی (هرچند محدود) وجود خواهند داشت که در آن‌ها بیان ژن در مرحله ترجمه RNA به پروتئین متوقف شده و با وجود حضور RNA، محصول ژن مربوط و تأثیرات متعاقب حضور آن، پروتئین در بافت دیده نمی‌شود. بنابراین در این مطالعه هدف محققان حاضر جستجوی زیرگروهی از تومورهای فاقد پروتئین ER بود که با وجود عدم حضور پروتئین ER، دارای RNA مربوطه است.

با توجه به هدف مطالعه حاضر، نتایج حاصل از ایمینوهیستوشیمی تومورها با نتایج حاصل از RT-PCR آن‌ها به‌منظور شناسایی زیرگروه مورد نظر انجام شد. نتایج ایمینوهیستوشیمی در تومورهای بدخیم بررسی شده در این مطالعه با استانداردهای کیفی دقیق و در آزمایشگاه مرجع دانشگاهی (بخش پاتولوژی انستیتو کانسر) به‌دست آمده است و معیار تعیین ER^+ بودن یک تومور بدخیم حضور پروتئین مذکور در حداقل ۱ درصد سلول‌های توموری بوده است. مقایسه‌ها نشان داد که وجود پروتئین و RNA گیرنده استروژن به‌طور همزمان (همخوانی مثبت نتایج ER) در تومورهای ER^+ بررسی شده در این مطالعه ۱۰۰ درصد بوده در حالی که این معیار برای نتایج منفی ER (Negative Agreement)، ۷۰ درصد به‌دست آمده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که انطباق دقیقی بین نتایج ایمیونوهیستوشیمی و روش مولکولی RT-PCR در گروه تومورهای ER^+ وجود دارد.

در مطالعه صورت گرفته توسط بادوه (Badve) و همکاران [۱۲]، همخوانی نتایج مثبت بسیار نزدیک به مطالعه حاضر بوده (۹۹ درصد در مقابل ۱۰۰ درصد) در حالی که میزان همخوانی نتایج منفی متفاوت بوده است (۸۷ درصد در مقابل ۶۹/۳ درصد در مطالعه حاضر). البته تفاوت ۱۷/۷ درصدی مشاهده شده بین این دو مطالعه می‌تواند ناشی از اختلاف روش تحقیق و نمونه‌های به‌کار رفته باشد. از یک طرف در مطالعه مذکور برای بررسی RNA از تومورهای بدخیم تثبیت شده و برش‌های بافتی پارافینه آن‌ها استفاده شده بود در حالی‌که در مطالعه حاضر RT-PCR با استفاده از نمونه‌های توموری بدخیم تازه و نگهداری شده به‌صورت منجمد در محفظه ازت مایع انجام شده است. به علت ماهیت آسیب‌پذیر RNA به‌نظر می‌رسد احتمال حفظ شدن و قابل اندازه‌گیری بودن مقادیر اندک آن در شرایط انجماد سریع بافت بیشتر از بافت‌های تثبیت شده و پارافینه باشد. تعداد کمتر نمونه‌های مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه بادوه و همکاران و تفاوت در روش سنجش بیان ژن که در مطالعه مذکور به‌صورت کمی و در مطالعه حاضر کیفی بوده است، می‌تواند از دیگر علل عدم تطابق کامل یافته‌های این دو مطالعه در نمونه‌های ER^- باشد.

به‌طورکلی نکته‌ای که توسط سایر محققین نیز مشاهده شده است، تفاوت نتایج حاصل از روش ایمینوهیستوشیمی و RT-PCR در محدوده نتایج منفی است [۱۲، ۱۸].

مقایسه ارتباطات مختلف بین حضور گیرنده استروژن در بافت تومور بدخیم (در سطح پروتئین و در سطح RNA) با ویژگی‌های مختلف بالینی و آسیب‌شناسی تومورها نشان داد که در اغلب موارد روابط معنی‌دار در هر دو روش به موازات یکدیگر برقرار است.

تاکنون مطالعات متعددی در تومورهای پستان روی مقایسه بیان ژن گیرنده استروژن در سطح RNA با پروتئین صورت گرفته است [۱۳-۱۵، ۱۸-۲۰]. با وجود تفاوت‌هایی در روش سنجش به‌کار رفته در سایر مطالعات در مقایسه با مطالعه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

حاضر (از نظر کمی بودن سنجش RNA در مقابل روش کیفی به‌کار رفته در این تحقیق)، نکته مشترک نتایج این مطالعات، حضور زیرگروهی از تومورهای بدخیم فاقد پروتئین و در عین حال دارای RNA برای گیرنده استروژن بوده است.

مطالعات بیان ژن در سطح RNA به دو صورت کمی و کیفی انجام می‌شود. در بیشتر مطالعات روش سنجش RNA از نوع کمی (Real Time PCR) بوده است و نشان داده‌اند که میزان بیان این ژن در تومورهای بدخیم دامنه وسیعی دارد. با توجه به این که سؤال اساسی در برخورد با بیماران مبتلا به سرطان پستان این است که «آیا این بیمار را می‌توان هورمون درمانی کرد؟»، در صورت استفاده از روش‌های کمی، همچنان باید نتایج را به صورت کیفی گزارش کرد؛ هر چند که دو حالتی کردن (Dichotomization) یک متغیر دامنه وسیع مانند بیان ER شاید منجر به از دست رفتن اطلاعات بسیاری در مورد تفاوت‌های فردی تومورها شود [۲۱]. به همین دلیل تمام محققینی که از روش‌های کمی سنجش RNA استفاده کرده‌اند نیز سعی در تعریف حد تفکیک (Cut off) برای نتایج خود و تبدیل مقادیر کمی به نتایج کیفی داشته‌اند. مشکل اساس این است که در صورت استفاده از روش‌های کمی، حد تفکیک مشخصی برای تفسیر نتایج کمی بیان این ژن در سطح RNA در تومورهای بدخیم پستان به تأیید نهایی نرسیده است و مقایسه نتایج حاصل از مطالعات گوناگون (که دارای تفاوت‌هایی در روش کمی به‌کار رفته و حد تفکیک انتخابی هستند)، با دشواری‌هایی همراه است.

مقایسه خصوصیات بالینی و آسیب‌شناختی زیرگروه دارای RNA و فاقد پروتئین ER با سایر تومورهای بدخیم مورد بررسی نشانگر ویژگی‌های متمایزی در این گروه نسبت به دو گروه دیگر (ER^+ و ER^- براساس ایمینوهیستوشیمی و RT-PCR) بوده است. تعداد بیماران یائسه و بالای ۵۰ سال در این زیرگروه دو برابر بیماران ER^- دیگر بود. مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که بیان ژن گیرنده استروژن در سطح RNA با افزایش سن و پس از یائسگی بالا می‌رود [۱۳، ۱۵].

از دیگر موارد ویژگی این زیر گروه از بیماران وجود تهاجم تومور به غلاف عصب است. این ویژگی در ٤٠ درصد تومورهای بدخیم دارای RNA برای ER و فاقد پروتئین مربوط دیده شد که بیشتر از دو گروه دیگر تومورهای بدخیم بود که ممکن است نشان‌دهنده ویژگی خاص این زیرگروه از لحاظ توان تهاجمی باشد. تهاجم تومور به غلاف عصب بسیاری از مواقع مستقل از تهاجم عروقی و لنفاوی در بافت تومور بدخیم دیده می‌شود و ناشی از گرایش سلول‌های بدخیم به تجمع در اطراف سلول‌های عصبی است [۲۲]. از آن‌جایی که غلاف عصب از چندین لایه کلاژن و غشای پایه به‌وجود آمده است، یک مسیر کم مقاومت برای مهاجرت سلول‌های بدخیم نبوده و حضور سلول‌های توموری در این نواحی ممکن است انعکاسی از توان تهاجمی تومور بدخیم به بافت‌های دور دست باشد [۲۳]. شیوع تهاجم تومور بدخیم به غلاف عصب در تومورهای پستان ۱ تا ۳۸ درصد گزارش شده است [۲٤-۲۷].

یکی از موضوعات مهم در سرطان پستان تعیین پیش‌آگهی بوده است و با وجود پارامترهای گوناگونی که برای این منظور به‌کار می‌رود، هیچ عامل پیش‌آگهی دهنده منفردی به تنهایی کاربرد ندارد و آن‌چه مفیدتر است برآیندی از مجموعه ویژگی‌های اصلی تومور بدخیم است. تاکنون تلاش‌های متعددی در این راستا و به‌منظور جمع‌بندی ویژگی‌های تومورهای بدخیم صورت گرفته است. یکی از این برآوردها، محاسبه NPI است که در برگیرنده سه مشخصه مهم هر تومور بدخیم (یعنی تعداد غدد لنفاوی درگیر، درجه و اندازه تومور) است [۱٦]. کارآیی این شاخص در تعیین پیش‌آگهی قبلاً به اثبات رسیده است [۲۸، ۲۹]. از این شاخص به‌عنوان معیاری برای مقایسه گروه های توموری بدخیم به‌دست آمده با روش RT-PCR در این مطالعه استفاده شد. بر این اساس بیش از نیمی از بیماران مربوط به زیرگروه دارای ER RNA و فاقد پروتئین مذکور، جزو گروه دارای پیش‌آگهی ضعیف محسوب شدند که در مقایسه با دو گروه دیگر قابل‌توجه بود.

در مجموع با وجود تعداد محدود تومورهای بدخیم زیرگروه مورد بحث، در این تحقیق مشخص شد که در زیر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

گروه بیماران مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر دارای بیان ژن گیرنده استروژن در سطح RNA و فاقد پروتئین مربوط، دارای پیش‌آگهی ضعیف‌تر و تمایل تهاجمی بیشتر تومور بدخیم به غلاف عصب است. این یافته می‌تواند کمک شایانی در شناسایی زیرگروه‌های جدید در سرطان پستان داشته باشد. با توجه به این‌که روش ایمینوهیستوشیمی تنها قادر به دسته‌بندی کردن تومورهای بدخیم به دو گروه ER^+ و ER^- است، بنابراین به‌نظر می‌رسد بررسی RNA با استفاده از روش RT-PCR به‌عنوان روش تکمیلی بررسی‌های ایمینوهیستوشیمی به شناسایی زیرگروه جدیدی از تومورهای ER^- منجر شود که پیش‌آگهی ضعیف‌تر و قابلیت تهاجمی بیشتری دارد. از آن‌جایی که شواهد اولیه به‌دست آمده در این پژوهش، با مطالعه تعداد محدودی از بیماران (۹۲ نفر) به‌دست آمده، تفسیر داده‌ها با احتیاط صورت گرفته و نیاز به بررسی پدیده‌های مشاهده شده در تعداد بالاتری از تومورهای بدخیم پستان است.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مصوب دکتری رشته ژنتیک پزشکی است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است. کلیه تومورهای بدخیم به‌کار رفته در این پژوهش توسط بانک بافت‌های تومورال ایران (انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران) تأمین شد. نگارندگان بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از جناب آقای دکتر ناطقی (مشاور آماری) ابراز می‌دارند.

٦- منابع

[1] Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res 2004; 6(6): 229-39.

[2] Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. Arch Iran Med 2010; 13(2) :143-6.

[3] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J 2007; 13 (4): 383-91.

[4] Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5 (1): 24-7.

[5] Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, Jordan VC. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. Curr Top Med Chem 2006; 6 (3): 181-202.

[6] Yamashita H .Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. Int J Clin Oncol 2008; 13(5):380-3.

[7] Hayashi S, Niwa T, Yamaguchi Y. Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. Cancer Sci 2009; 100(10): 1773-8.

[8] Lopez-Tarruella S, Schiff R. The dynamics of estrogen receptor status in breast cancer: re-shaping the paradigm. Clin Cancer Res 2007; 13 (23): 6921-5.

[9] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005; 365(9472): 1687-717.

[10] Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immune-histochemistry is superior to the ligand-binding

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

Sulkowski S, Kottler ML, Wolczynski S. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of oestrogen receptors alpha and beta in human primary breast cancer: correlation with proliferation marker Ki-67 and clinicopathological factors. Eur J Cancer 2005; 41(18): 2924-34.

[16] Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1992; 22(3): 207-19.

[17] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommend-dations for immune-histochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). Arch Pathol Lab Med 2010; 134(7): e48-72.

[18] Oda M, Arihiro K, Kataoka T, Osaki A, Asahara T, Ohdan H. Comparison of immune-histochemistry assays and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for analyzing hormone receptor status in human breast carcinoma. Pathol Int 2010; 60(4): 305-15.

[19] Allred DC. Problems and solutions in the evaluation of hormone receptors in breast assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol 1999; 17(5): 1474-81.

[11] Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Miller KD. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. J Clin Pathol 2000; 53(4): 292-301.

[12] Badve SS, Baehner FL, Gray RP, Childs BH, Maddala T, Liu ML, Rowley SC, Shak S, Perez EA, Shulman LJ, Martino S, Davidson NE, Sledge GW, Goldstein LJ, Sparano JA. Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immune-histochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription poly-merase chain reaction by central laboratory. J Clin Oncol 2008; 26(15): 2473-81.

[13] Bièche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. Oncogene 2001; 20(56): 8109-15.

[14] de Cremoux P, Tran-Perennou C, Elie C, Boudou E, Barbaroux C, Poupon MF, De Rycke Y, Asselain B, Magdelénat H. Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse trans-cription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. Biochem pharmacol 2002; 64(3): 507-15.

[15] Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, Mittre H,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]

black and white women. Cancer 1998; 83(12): 2509-15.

[26] Cowan WK, Kelly P, Sawan A, Cunliffe WJ, Henry L, Higgs MJ, Lunt LG, Young JR, Horne CH, Angus B. The pathological and biological nature of screen-detected breast carcinomas: a morphological and immunohistochemical study. J Pathol 1997; 182(1): 29-35.

[27] Karak SG, Quatrano N, Buckley J, Ricci A Jr. Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. Conn Med 2010; 74(1): 17-21.

[28] Lee AH, Ellis IO. The Nottingham prognostic index for invasive carcinoma of the breast. Pathol Oncol Res 2008; 14(2): 113-5.

[29] Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, Lee AH, Macmillan RD, Morgan DA, Robertson JF, Mitchell MJ, Ball GR, Haybittle JL, Elston CW. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. Eur J Cancer 2007; 43(10): 1548-55.

cancer. J Clin Oncol 2008; 26(15): 2433-5.

[20] Potemski P, Pluciennik E, Bednarek AK, Kusinska R, Kubiak R, Kordek R. Evaluation of oestrogen receptor expression in breast cancer by quantification of mRNA. Histopathology 2007; 51(6): 829-36.

[21] Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. Mod Pathol 2008; 21(Suppl 2): S8-S15.

[22] Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. Cancer 2009; 115(15): 3379-91.

[23] Batsakis JG. Nerves and neurotropic carcinomas. Ann Otol Rhinol Laryngol 1985; 94(4 Pt 1): 426-7.

[24] Ho CM, Mak CK, Lau Y, Cheung WY, Chan MC, Hung WK. Skin involvement in invasive breast carcinoma: safety of skin-sparing mastectomy. Ann Surg Oncol 2003; 10(2): s102-7.

[25] Elmore JG, Moceri VM, Carter D, Larson EB. Breast carcinoma tumor characteristics in

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-05]