

بیان ژن P53 با شاخص‌های بافتی و آسیب‌شناسی در سرطان پستان

رحیم گل محمدی^۱، اکبر پنهان^۲

^۱ استادیار علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

^۲ استادیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسئول: سبزوار، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دانشکده پزشکی، دکتر رحیم گل محمدی

E-mail: Rahimgolmohammadi@Yahoo.com

وصول: ۸۸/۱۲/۱، اصلاح: ۸۹/۱/۲۹، پذیرش: ۸۹/۳/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: یکی از ژن‌هایی که در سرطان پستان دچار جهش می‌شود، ژن p53 است. میزان بیان ژن p53 در سرطان پستان در نواحی مختلف، متفاوت گزارش شده است. از طرفی جهش این ژن در بیماران سرطانی با مقاومت به شیمی درمانی همراه است. هدف از این مطالعه، تعیین بیان ژن p53 با شاخص‌های بافتی و آسیب‌شناسی در سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی تحلیلی به روش نمونه‌گیری آسان بر روی ۸۰ نمونه سرطانی پستان انجام شد که در طول سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۸ به بیمارستان‌های شهر سبزوار مراجعه کرده بودند. بعد از ثابت کردن نمونه‌ها در فرمالین، پاساز بافتی بر روی نمونه‌ها انجام شد و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و انوزین در صورت تشخیص بدخیمی، پس از ماسک‌زدایی نمونه‌ها بیان ژن p53 با روش ایمونوهیستوشیمی تعیین شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS.11.5 با استفاده از آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از تعداد ۸۰ نمونه سرطانی پستان، در ۳۹ نمونه (۴۸/۸ درصد) بیان ژن p53 مشاهده شد که ترتیب بیان ژن P53 در ۲۱ نمونه یک مثبت (+)، در ۱۰ نمونه دو مثبت (++) و در ۸ نمونه سه مثبت (+++) بود. بین پایداری پروتئین p53 در سلول‌های سرطانی با مراحل تومور و همچنین بین گروه‌های سنی بالاتر از ۴۵ سال و کمتر از آن با مرحله تومور ارتباط معنادار آماری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، پایداری پروتئین p53 در حدود نیمی از نمونه‌ها مشاهده شد که می‌تواند نشانه‌ای از جهش زیاد ژن p53 در سرطان پستان در ناحیه سبزوار باشد. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۷/ شماره ۲ / صص ۱۲۸-۱۲۳).

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان؛ بیان ژن p53؛ مرحله تومور.

مقدمه

درصد سرطان‌های پستان را به خود اختصاص می‌دهند که شامل کارسینوم مهاجم مجرای و کارسینوم مهاجم لوبولی می‌باشند (۱،۲).

یکی از عواملی که در پیش‌آگهی سرطان پستان حائز اهمیت است، مرحله سرطان است که بر اساس اندازه تومور، درگیری لوبول‌ها، غدد لنفاوی، متاستاز به

کارسینوم پستان عمدتاً به دو شکل غیر مهاجم و مهاجم دیده می‌شود که انواع غیر مهاجم حدود ۱۵ تا ۳۰ درصد تمام سرطان‌های پستان را به خود اختصاص می‌دهند و شامل کارسینوم داخل مجرای و کارسینوم لوبولی است. کارسینوم‌های مهاجم پستان نیز حدود ۷۰ تا ۸۵

بین درجه تمایز و مرحله تومور با پایداری پروتئین p53 ارتباطی وجود دارد یا خیر؟ هدف از این مطالعه تعیین بیان ژن P53 با شاخص‌های بافتی و آسیب‌شناسی در سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی به روش ایمنووهیستوشیمی، تعداد ۸۰ نمونه سرطانی پستان که در طول سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۸ به بیمارستان‌های شهر سبزوار مراجعه کرده بودند، به روش نمونه‌گیری آسان وارد مطالعه شدند. حجم نمونه مورد نیاز با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، با خطای ۱ درصد و فروانی ۳۰ درصد جهش ژن p53 در سرطان پستان، هشتاد نمونه برآورد شد. پس از تشخیص بدخیمی توسط پاتولوژیست، ایمنووهیستوشیمی در نمونه‌های بافتی انجام شد. از بافت سالم پستان نیز به‌عنوان نمونه کنترل استفاده 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 به‌وسیله دستگاه Tissue processing (شرکت دیده سبز ارومیه) انجام شد. مقاطع ۴ میکرونی از تمام بلوک‌های پارافینی با میکروتوم چرخشی (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 درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند. این مرحله برای واکنش بهتر مراحل بعدی لازم بود چون در طی روند فیکساسیون بافتی ممکن است محل شاخص‌های آنتی ژنی که باید با آنتی‌بادی واکنش بدهد، دچار Mask شده باشند (۱۵، ۱۶). مهار پراکسیداز بافتی با آب اکسیژنه انجام گرفت. از آنتی‌بادی مونوکلونال مخصوص p53 (DAKO سفارش طب آسیا) که با پروتئین p53 باند می‌شود، در اتافک مرطوب با غلظت مناسب بر طبق دستور کیت انجام شد و

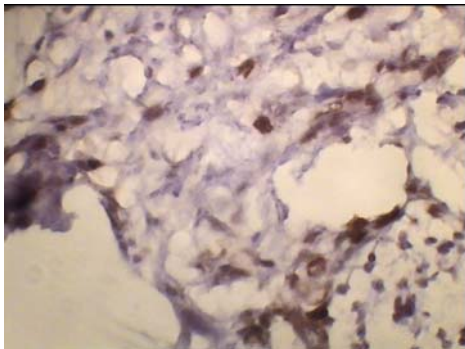
بافت‌های مجاور و دور دست از مرحله صفر تا IV تقسیم‌بندی می‌شود (۱،۳). مرحله‌های بالاتر سرطان نشان‌دهنده درگیری بافتی و گسترش بیشتر تومور است. عامل دیگری که در سرطان پستان مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، گرید تومور است که بر اساس ساختار بافتی و سلولی یعنی تکثیر سلول‌های سرطانی (میتوز) و وجود یا عدم وجود توبول، آن را به سه گرید I، II، و III تقسیم می‌کنند (۱،۳).

حدود ۵ تا ۱۰ درصد علت سرطان‌های پستان ناشی از عوامل ژنتیکی می‌باشد (۲). در سرطان پستان، تعدادی از ژن‌های سرکوب‌کننده تومور دچار جهش می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ژن P53 است. جهش‌های این ژن با تسریع رشد تومور، افزایش آنژیوژنز، اختلال در روند آپوپتوز و مقاومت درمانی همراه است (۴،۵). اعتقاد بر این است که پایداری پروتئین p53 در سلول‌های سرطانی نشانه‌ای از جهش ژن p53 است که در ایجاد تومور و گسترش آن ایفای نقش می‌کند (۶،۷). مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر نشان می‌دهد که بیان ژن P53 در سرطان پستان می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در پیش‌آگهی بیماری نیز مطرح باشد (۸،۹).

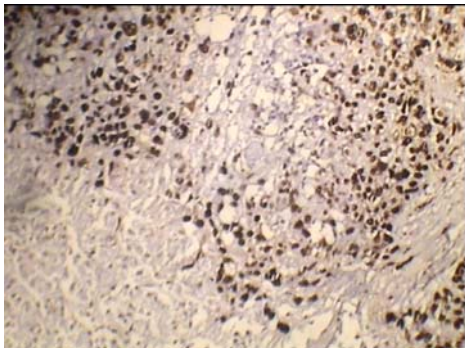
مشخص شدن شکل طبیعی ژن P53 و یا جهش-یافته آن از جنبه بالینی برای تعیین مقاومت به شیمی درمانی مهم است چون جهش‌های این ژن با مقاومت دارویی همراه است (۱۰). اکثر داروها شیمیایی از طریق تحریک آپوپتوز باعث حذف سلول‌های سرطانی می‌شوند و ژن p53 در این راستا یعنی آپوپتوز نقش اصلی را دارد (۱۱،۱۲). از طرف دیگر، میزان جهش ژن p53 در نواحی مختلف جهان، متفاوت بیان شده است؛ به‌طوری‌که در ایسلند ۱۶ درصد و در آمریکا ۴۶ درصد گزارش شده است (۱۳،۱۴). میزان بیان ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در ناحیه سبزوار نیز مشخص نیست. به عبارت دیگر، چند درصد از بیماران مبتلا به سرطان در ناحیه مورد مطالعه با بیان ژن p53 همراه می‌باشند و آیا

می‌شدند؛ در تعداد ۱۰ نمونه سرطانی، حدود ۲۶ تا ۵۰ درصد سلول‌ها رنگ گرفته بودند، یعنی دو مثبت (++) بودند؛ در ۸ نمونه، بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها سرطانی رنگ قهوه‌ای گرفته بودند، یعنی سه مثبت (+++) بودند. رنگ‌پذیری سلول‌های سرطانی پستان ناشی از پایداری پروتئین P53 در آن‌ها می‌باشد (تصاویر ۱ و ۲). در ۴۱ مورد (۵۱/۳ درصد) پایداری پروتئین P53 در سلول‌های سرطانی مشاهده نشد، یعنی سلول‌ها در روش ایمونوهیستوشیمی رنگ قهوه‌ای نگرفتند که به احتمال خیلی زیاد فاقد جهش ژن P53 هستند.

بین مراحل تومور با بیان ژن P53 در سلول‌های سرطانی بافت پستان نیز ارتباط معنادار آماری مشاهده نشد ($P=0/16$) (جدول ۱). همچنین بین گروه‌های سنی بالاتر از ۴۵ سال و کمتر از آن با مراحل تومور ارتباط معنادار آماری مشاهده نشد ($P=0/625$) (جدول ۲).



تصویر ۱: برش عرضی ۴ میکرونی بافت سرطانی پستان پایداری پروتئین P53 دو مثبت (++) را نشان می‌دهد که با روش ایمونوهیستوشیمی رنگ قهوه‌ای به خود گرفته‌اند (درشت‌نمایی ۴۰۰)



تصویر ۲: برش عرضی ۴ میکرونی بافت سرطانی پستان پایداری پروتئین P53 سه مثبت (+++) را نشان می‌دهد که با روش ایمونوهیستوشیمی رنگ قهوه‌ای به خود گرفته‌اند (درشت‌نمای ۴۰۰)

پس از شستشو با بفر فسفات سالین آنتی‌بادی ثانویه Biotinylated روی لام‌ها چکانده شد. از استرپتوآویدین متصل به HRP استفاده شد که قادر است دی آمینو بنزیدین (DAB) را اکسید کند. سلول‌هایی که با بیان ژن p53 همراه هستند، رسوب غیرمحلول قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌کنند. پس از رنگ‌آمیزی زمینه بافت با همتوکسیلین، لام‌ها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۱/۵) و آزمون مجذور کای جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

از تعداد ۸۰ نمونه سرطانی، در ۱۷ مورد (۲۱/۳ درصد) از بیماران سلول‌های سرطانی محدود به یک لوبول و یک مجرا بود، به طوری که بافت‌های چربی اطراف تومور گرفتار سلول‌های سرطانی نبود. در واقع، این نمونه‌ها در مرحله صفر (Carcinoma in situ) بیماری بودند. در ۳۰ مورد (۳۷/۵ درصد) از نمونه‌ها، اندازه تومور ۲ سانتی‌متر یا کمتر بود و گره‌های لنفاوی به سلول‌های سرطانی آلوده نشده بود؛ یعنی سرطان در مرحله یک از نظر پیشرفت بیماری قرار داشت. در تعداد ۲۵ نمونه (۳۱/۳ درصد) از بیماران، اندازه تومور حدود ۲ الی ۵ سانتی‌متر بود و گره‌های لنفاوی یا بافت‌های مجاور به سلول‌های سرطانی گرفتار شده بود، یعنی تومور در مرحله دو بیماری قرار داشت. در ۶ نمونه از موارد، تومور در مرحله ۳ از نظر پیشرفت بیماری بود که جمعاً ۳۱ مورد در این دو مرحله قرار داشتند. تعداد دو نمونه (۲/۵ درصد) در مرحله چهار بیماری قرار داشتند، یعنی سلول سرطانی بافت پستان به بافت‌های دور دست وارد شده بود.

همچنین از تعداد ۸۰ نمونه سرطانی مورد مطالعه، در ۳۹ نمونه (۴۸/۸ درصد) بیان ژن P53 مثبت بود. در ۲۱ نمونه، ۱۰ تا ۲۵ درصد سلول‌های سرطانی رنگ قهوه‌ای به خود گرفته بودند که اصطلاحاً یک مثبت (+) نامیده

جدول ۱: توزیع فراوانی مراحل تومور با بیان ژن P53 در سلول‌های سرطانی بافت پستان

مرحله	P53 مثبت		منفی		جمع
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
صفر	۵	۶/۳	۱۲	۱۵	۲۱/۳
یک	۱۵	۱۸/۸	۱۵	۱۸/۸	۳۷/۵
دو و سه	۱۷	۲۱/۳	۱۴	۱۷/۵	۳۸/۸
چهار	۲	۲/۵	۰	۰	۲/۵
جمع	۳۹	۴۸/۸	۴۱	۵۱/۳	۸۰

جدول ۲: توزیع فراوانی مراحل سرطان پستان با گروه‌های سنی کمتر از ۴۵ سال یا بیشتر

مرحله	گروه سنی کمتر از ۴۵ سال		گروه بیش‌تر از ۴۵ سال		جمع
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
صفر	۱۰	۱۲/۵	۷	۸/۸	۲۱/۳
یک	۱۲	۱۵	۱۸	۲۲/۵	۳۷/۵
دو و سه	۱۳	۱۶/۳	۱۸	۲۲/۵	۳۸/۸
چهار	۱	۱/۳	۱	۱/۳	۲/۵
جمع	۳۶	۴۵	۴۴	۵۵	۸۰

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان دهنده بیان بالای ژن P53 در نمونه‌های سرطانی پستان در شهرستان سبزوار است هر چند بین مرحله تومور و پایداری پروتئین P53 ارتباط معنادار آماری دیده نشد. پایداری پروتئین P53 عموماً زمانی اتفاق می‌افتد که در ژن P53 جهش ایجاد شده باشد (۷ و ۱۷). مشخص کردن پروتئین P53 در نمونه‌های سرطانی از جنبه بالینی برای تعیین مقاومت شیمی‌تراپی لازم می‌باشد. سرطان‌هایی که با جهش‌های ژن P53 همراه هستند، در مقایسه با سرطان‌های فاقد جهش، پاسخ متفاوتی به داروهای شیمیایی می‌دهند به‌طوری‌که سرطان‌هایی که جهش ژن P53 دارند، به‌خاطر اختلال در آپوپتوز در برابر شیمی‌درمانی، از خود مقاومت نشان می‌دهند (۱۲). در مطالعه‌ای که در ۱۰۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان در ایسلند انجام شد، در ۱۶ درصد از بیماران جهش ژن P53 گزارش شده است (۱۳) که با یافته‌های مطالعه حاضر از نظر میزان جهش ژن P53 تفاوت دارد.

عوامل مختلفی در میزان جهش ژن P53 تأثیر می‌گذارد که از آن جمله می‌توان به منطقه جغرافیایی، روش مطالعه، مرحله تومور و نوع تومور اشاره کرد. طبق گزارش کلابردمور، سرطان‌های پستان همراه با بیان بالای ژن P53، پیش‌آگهی بدی دارند (۱۸). در مطالعه یاماشیتا و همکارانش در ژاپن بر روی ۷۳ بیمار مبتلا به سرطان پستان، پایداری پروتئین P53 در ۲۱/۹ درصد نمونه‌ها مشاهده شد که به‌طور معناداری نسبت به اندوکترین‌تراپی از خود مقاومت نشان دادند (۱۹).

برای پاسخ مناسب به شیمی‌درمانی لازم است که سلول‌های سرطانی در چرخه آپوپتوز قرار گرفته و از این مسیر حذف شوند (۲۰ و ۱۰). در مطالعه‌ای در پاریس بر روی سرم ۱۵۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان، بیماران در مراحل ۳ و ۴ از نظر پیشرفت بیماری قرار داشتند، یعنی اندازه سرطان آن‌ها بزرگتر از ۵ سانتی‌متر بوده است. همچنین گره‌های لنفاوی، بافت‌های مجاور و حتی دوردست (مثل ریه) توسط سلول‌های سرطانی درگیر بوده است. در همان تحقیق در سرم خونی ۳۰ مورد (۱۹ درصد) از بیماران آنتی‌بادی P53 مثبت بود (۲۱) که با مطالعه حاضر از نظر میزان بیان ژن P53 در سرطان پستان تفاوت دارد. تفاوت مطالعه حاضر با این پژوهش مربوط به روش مطالعه می‌باشد زیرا در مطالعه فوق، آنتی‌بادی P53 سرم خون بیماران بررسی شده است در حالی که در پژوهش حاضر، آنتی‌بادی بافتی P53 در بافت سرطانی پستان مورد مطالعه قرار گرفته است. بنابراین تفاوت بودن میزان بیان ژن P53 که عمدتاً مربوط به جهش آن می‌باشد به عوامل مختلفی بستگی دارد و بیان زیاد ژن P53 عموماً در گرید بالای هیستولوژی و در تومورهای مهاجم ایجاد می‌شود (۲۲، ۲۳). در مطالعه حاضر، تومورهایی که در مراحل پیشرفته بیماری بودند، بیان ژن P53 در آن‌ها بیشتر بود.

به‌طور کلی، در این تحقیق پایداری پروتئین p53 با شاخص بافتی و آسیب‌شناسی ارتباط معنادار آماری

به خاطر تصویب طرح پژوهشی و تأمین هزینه‌های آن، از پاتولوژیست محترم جناب آقای دکتر مهاجری، مشاور محترم آمار آقای دکتر رخشانی و کارشناسان آزمایشگاه آقای بروغنی، خانم لندرانی و خانم محمودی سپاسگزاری به عمل می‌آید.

نداشت ولی در حدود نیمی از نمونه‌ها پایداری پروتئین p53 مشاهده شد که می‌تواند نشانه‌ای از جهش زیاد ژن p53 در سرطان پستان در ناحیه سبزوار باشد.

تشکر و قدردانی

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

References

1. Kumar V, Cortan R, Robbins S. Robbins Basic Pathology 8th Edition, Saunders Elsevier, 2007, page: 739-750.
2. Ellisen LW, Haber DA. Hereditary breast cancer. Annual Rev Med. 1998;49:425-36.
3. Vinay Kummar, Abbaa; s Fausto. Pathologic Basis of Disease. 7th edition, Saunders; 2005, pp: 862-867.
4. Liang Y, Besch-Williford C, Benakanakere I, Thorpe PE, Hyder SM. Targeting mutant p53 protein and the tumor vasculature: an effective combination therapy for advanced breast tumors. Breast Cancer Res Treat. 2010.
5. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. Trends Pharmacol Sci. 2004; 25(4):177-81.
6. Hofmockel G, Wittmann A, Dammrich J, Bassukas ID. Expression of p53 and bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: no for prognostic significance. Anticancer Res. 1996; 16(6B): 3807-11.
7. Zhu Z, Xing S, Cheng P, Li G, Yang Y, Zeng F, Lu G. The relationship of expression of bcl-2, p53, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) to cell proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2004; 24(4):354-7.
8. Francisco J Esteva, Gabriel N Hortobagyi. Prognostic molecular markers in early breast cancer. Breast Cancer Res 2004, 6:109-18.
9. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality. Int J Epidemiol. 2005; 34(2):405-12.
10. Varna M, Lehmann-Che J, Turpin E, Marangoni E, El-Bouchtaoui M, Jeanne M, Grigoriu C, Ratajczak P, Leboeuf C, Plassa LF, Ferreira I, Poupon MF, Janin A, de Thé H, Bertheau P. p53 dependent cell-cycle arrest triggered by chemotherapy in xenografted breast tumors. Int J Cancer. 2009 15;124(4):991-7.
11. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell. 2004 Jan 23;116(2):205-19.
12. Menendez JA, Lupu R. RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells. Int J Mol Med. 2005; 15(1):33-40.
13. Eyfjord JE, Thorlacius S. Genetic changes in breast carcinomas in an Icelandic population. Molecular and Cell Biology Laboratory, Icelandic Cancer Society, Reykjavik. Pharmacogenetics. 1992; 2(6):309-16.
14. Furberg H, Millikan RC, Geradts J, Gammon MD, Dressler LG, Ambrosone CB, Newman B. Reproductive factors in relation to breast cancer characterized by p53 protein expression (United States). Cancer Causes Control. 2003; 14(7):609-18.
15. Beckstead JH. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. J Histochem Cytochem. 1994 Aug;42(8):1127-34.
16. Available from: <http://www.ihcwold.com/Protocols/Antibody-Protocols/P53-Novocastra-cml.htm>.
17. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Campani D, Diella F, Cecchetti D, et al. p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. Cancer Res. 1993; 53(19):4665-9.

18. Klauber-Demore N. Tumor Biology of Breast Cancer in Young Women. *Breast disease*. 2005; 23: 9-15,
19. Yamashita H, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z et al. p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R48.
20. Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007; 26(15):2157-65.
21. Sangrajrang S, Arpornwirat W, Cheirsilpa A, Thisuphakorn P, Kalalak A, Sornprom A, Soussi T. Serum p53 antibodies in correlation to other biological parameters of breast cancer. *Cancer Detect Prev*. 2003;27(3):182-6.
22. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Campani D, Diella F, Cecchetti D, Callahan R, Bistocchi M. p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1993;53(19):4665-9.
23. Neoadjuvant FEC 100 for operable breast cancer: eight-year experience at Centre Jean Perrin Mouret-Reynier MA, Abrial CJ, Ferrière JP, Amat S, Curé HD, Kwiatkowski FG, Feillel VA, Lebouëdec G, Penault-Llorca FM, Chollet PJ. *Clin Breast Cancer*. 2004;5(4):303-7.