

## بررسی بیان متالوپروتئیناز ۹ و CD34 از طریق رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در سرطان مهاجم داکتال پستان

شهریار دبیری<sup>۱\*</sup>، ناهید منصفی<sup>۲</sup>، غلامرضا نارویی<sup>۳</sup>، امین طالبی<sup>۴</sup>، منظومه شمسی میمندی<sup>۵</sup>، بهرام پورسیدی<sup>۶</sup>، حمید زینلی نژاد<sup>۷</sup>

### خلاصه

مقدمه: مطالعه حاضر به منظور بررسی روابط احتمالی بین سلول‌های استرومایی (فیبروبلاست یا میوفیبروبلاست) با تمرکز بر بیان متالوپروتئیناز ۹ (Matrix metalloproteinase-۹ یا MMP9) و آنتی‌ژن‌های آنژیوژنز CD31 و CD34 در طی روند تغییرات هیپرپلاستیک به پیش سرطان و سرطان مهاجم پستان انجام شد.

روش: در این مطالعه ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان مهاجم داکتال پستان که ماستکتومی و یا بیوپسی شده بودند با رنگ آمیزی IHC (Immunohistochemistry) برای بیان MMP9 و CD31 بررسی شدند. کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل گردید. سطح معنی‌داری در همه آزمون‌ها  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. در نهایت مقایسه‌ای با عوامل مؤثر موجود در «بانک اطلاعات سرطان پستان» به عمل آمد.

یافته‌ها: فراوانی بروز MMP9 در نواحی پیش سرطانی طبیعی و سرطان مهاجم معنی‌دار بود ( $P = 0/001$ ). شدت بروز MMP9 در نواحی سرطانی نسبت به پیش سرطانی قوی‌تر بیان شد. بین بیان MMP9 و CD31 در مرحله دوم در نواحی مهاجم رابطه معنی‌داری دیده شد. میانگین بیان CD31 در سیر پیشرفت بیماری از نواحی پیش سرطانی به طرف سرطانی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به عبارت دیگر، گسترش تومور با افزایش پرولیفراسیون عروق همراه بود ( $P < 0/001$ ).

نتیجه‌گیری: فراوانی و شدت بیان MMP9 با پیشرفت تومور پستان افزایش می‌یابد. بروز MMP9 بر اساس سن بیمار، تعداد گره‌های لنفی درگیر و یا اندازه توده در هیچ یک از مراحل پیشرفت بیماری تفاوتی نداشت. به عبارت دیگر، بین بروز MMP9 با تعداد لنف گره درگیر و اندازه تومور رابطه‌ای مشاهده نشد. در این مطالعه مشخص گردید که میانگین بیان CD31 در سیر تغییرات هیپرپلاستیک به (Ductal intraepithelial neoplasia) DIN، سرطان مجرای درجا (Ductal carcinoma in situ یا DCIS) و در نهایت سرطان مهاجم به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. گسترش تومور با افزایش پرولیفراسیون عروق همراه است، ولی بین CD34 مناطق DIN و DCIS با نواحی طبیعی کاهش شدیدی مشاهده شد؛ اگر چه در نواحی مهاجم افزایش کمی وجود داشت. به نظر می‌رسد مسیر تغییرات اپی‌تلیال هیپرپلازی به سوی DCIS و سرطان مهاجم پیچیده‌تر از آن باشد که یک روند خطی تصور شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان مهاجم پستان، MMP9، CD31، DIN، سرطان مجرای درجا

۱- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۳- دستیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۴- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۵- دانشیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۶- دانشیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

\* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: Dabiri12@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲۰

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۹/۳۰

پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۲

## مقدمه

به طور کلی سرطان پستان سومین عامل مرگ و میر زنان در ایران است (پس از بیماری‌های قلبی عروقی و سوانح و حوادث) و پس از سرطان ریه، شایع‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان محسوب می‌شود، اما سرطان پستان در زنان ایرانی شایع‌ترین سرطان و شایع‌ترین علت مرگ و میر می‌باشد که عامل ۱۹ درصد از مرگ و میرهای وابسته به آن را شامل می‌شود (۱). در حال حاضر سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی تشخیص داده شده در تمام طول عمر زنان و علت اصلی منتهی به مرگ در سنین ۷۹-۴۰ سالگی زنان می‌باشد (۲).

در چندین دهه قبل افزایش چشمگیری در بروز سرطان مهاجم پستان مشاهده شده است، اما در حال حاضر میزان بروز سرطان درجا، به خصوص انواع سرطان مجاری درجا (Ductal carcinoma in situ یا DCIS) بسیار افزایش یافته است که علت آن افزایش روزافزون روش‌های بیماریابی (ماموگرافی و آگاهی افراد جامعه نسبت به سرطان پستان) می‌باشد (۳،۴). متأسفانه زنان ایرانی در سنین پایین‌تر از زنان سایر کشورها به این بیماری مبتلا می‌شوند و حدود ۵۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان پستان در ایران، در وضعیت پیشرفته به متخصص مراجعه می‌کنند؛ در حالی که این رقم در دنیا حدود ۲۰ درصد است، اما خوشبختانه امروزه با استفاده از روش‌های غربالگری و تشخیص زودرس این بیماری و علاوه بر آن پیشرفت روش‌های درمانی، تحول بزرگی در این بیماری ایجاد شده است (۵).

در ژنوم انسان، کروموزوم ۱۱ حاوی دست‌هایی از ژن‌های ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinase یا MMP) می‌باشد. MMPs خانواده بزرگی از آنزیم‌های تخریبی هستند که در تجزیه ترکیبات مختلف ماتریکس خارج سلولی نقش دارند (۶). گفته می‌شود منشأ تولید متالوپروتئینازها در سرطان پستان، سلول‌های فیبروبلاست (و شاید میوفیبروبلاست) استرومایی و

سلول‌های توموری هستند (۷،۸). فعالیت بیشتر متالوپروتئینازها (Matrixins) در بافت و در حالت طبیعی بسیار کم و یا ناچیز است و با تغییر در بافت‌ها می‌تواند در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند تومورزایی، گسترش سرطان و متاستاز مؤثر باشند. همچنین آنها تحت تأثیر سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و ماتریکس خارج سلولی قرار می‌گیرند (۹،۱۰).

ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP9) به تازگی به عنوان یکی از مارکرهای مهم برای بسیاری از سرطان‌ها گزارش شده است و مطالعات قبلی ارتباط بین بروز MMP9 توسط سلول‌های استرومایی (فیبروبلاستی و یا میوفیبروبلاستی) و سلول‌های توموری را در پیشرفت و متاستاز سرطان مطرح کرده‌اند (۱۱،۱۲). نقش متالوپروتئینازها در بسیاری از سرطان‌ها به خصوص در تهاجم و متاستاز سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته است و همچنین در تعدادی از مطالعات انجام شده، میزان MMP9 پلاسمایی در بیماران بیشتر از افراد سالم بوده است و ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزان MMP9 پلاسمایی و متاستاز به غدد لنفاوی و تهاجم وریدی بیماران گزارش شده است (۱۳).

با توجه به این که در مطالعات همکاران دیگر به روش ایمونوهیستوشیمی، ارتباطی بین افزایش بیان متالوپروتئیناز ۹ و پیشرفت و متاستاز سرطان پستان و همچنین کاهش پاسخ به درمان گزارش شده است، نیاز است که بین بیان این مارکرها و مرحله‌بندی سرطان پستان بررسی‌های بیشتری به عمل آید (۱۴،۱۵). همچنین یکی از اهداف مهم متخصصین در سال‌های اخیر، استفاده از مهارکننده‌های متالوپروتئینازها برای درمان بسیاری از سرطان‌ها بوده است؛ اگرچه نتایج درمان‌های آزمایشی ضد و نقیض می‌باشد، ولی برای رسیدن به نتیجه قابل اعتماد به بررسی‌های بیشتری در این زمینه نیاز است (۱۶).

تومورها بدون تشکیل عروق قادر به رشد نیستند و آنژیوژنز جزء ملزومات بیولوژیک بدخیمی محسوب

رسیدن به نتایج قابل قبول مطالعات بیشتر و متفاوتی نیاز است (۲۶).

مطالعه حاضر به منظور بررسی بروز MMP9 و CD31 در بیماران مبتلا به سرطان مهاجم داکتال پستان صورت گرفت و رابطه بین این دو شاخص در بافت طبیعی و وضعیت هیستوپاتولوژیک (پیش سرطانی) مشخص گردید. با توجه به اطلاعات موجود در «بانک اطلاعات سرطان پستان»، گروه پاتولوژی به بررسی آماری عوامل پیش آگهی HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)، PR (Progesterone receptor) و ER (Estrogen receptor) در مرحله بندی و تحلیل آماری و مقایسه ای پرداخت.

#### روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت مقطعی و تحلیلی با گروه شاهد انجام گرفت. افراد مورد مطالعه ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان مهاجم داکتال پستان بودند که در سال‌های ۹۰-۱۳۸۰ با گزارش پاتولوژی موجود در بیمارستان‌های خصوصی و دولتی شهر کرمان، تشخیص آن‌ها قطعی شده بود. اندازه تومور و تعداد لنف گره‌های درگیر (Grading) از گزارش پاتولوژی جمع آوری شد. نمونه‌های موجود با رنگ آمیزی H&E (Eosin و Haematoxylin) و IHC (Immunohistochemistry) به روش استاندارد و برابر با دستورالعمل سازنده (Leika) در آزمایشگاه پاتولوژی انجام شد و توسط دو پاتولوژیست (مجری و همکار اصلی طرح) تأیید گردید. سپس از بلوک‌های پارافینی برش‌هایی به قطر ۳-۲ میکرون تهیه و به روش HIER (Heat induced antigen retrieval) و رنگ آمیزی IHC از نظر مارکرهای MMP9، CD31، CD34، ER، PR و HER2 مورد بررسی قرار گرفت.

می‌شود. همچنین بین میزان آژیوزنز و احتمال متاستاز بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان ارتباط مستقیمی وجود دارد و دانسیته عروقی شاخص مؤثر و مهمی محسوب می‌شود (۱۷، ۱۸). عوامل آژیوزنز ممکن است توسط سلول‌های توموری، سلول‌های التهابی و یا سلول‌های دیگر تولید شوند. عامل مهم رگ‌زایی، CD31/PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule) است (۱۹).

CD31/PECAM-1 پروتئینی انسانی است که به وسیله ژن PECAM-1 روی کروموزوم ۱۷ کد می‌شود و در سطح پلاکت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و بعضی از سلول‌های T وجود دارد و به عنوان رابط بین سلول‌های اندوتلیال و عناصر در گردش خون عمل می‌کند. CD31 مارکری است که برای واسکولاریزاسیون نئوپلاسم‌ها و بیشتر انواع نئوپلاسم عروقی مانند Hemangioma، Angiofibroma، Angiosarcoma مورد مطالعه قرار می‌گیرد (۲۰، ۲۱). عوامل رشد زیادی در امر متاستاز و رشد تومورها دخیل هستند که از آن جمله می‌توان به CD31 (که در برخی مطالعات نقش آن را در سرطان پستان مورد بررسی قرار داده‌اند و مشاهده شده است که این عامل در سرطان‌های داکتال درجا و یا تهاجمی بیشتر از بافت غیرنئوپلاستیک است)، اشاره کرد (۲۲).

در بیشتر مطالعات، سرطان پستان با CD31 مثبت دارای پیش آگهی بدتری در مقایسه با سرطان‌های CD31 منفی بوده‌اند (۲۳). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که آنتی‌بادی CD31 نقش مهمی در ترومبوز دارد و استفاده از مارکرهای عروقی مانند CD31 مورد تأیید قرار گرفته است و توقف افزایش رگ‌سازی هدف مهمی برای جلوگیری از رشد تومور محسوب می‌گردد (۲۴، ۲۵).

تحقیقات زیادی جهت تعیین بیان ژن‌های CD31 و MMP9 به روش‌های PCR (Polymerase chain reaction) و FISH (Fluorescence in situ hybridization) انجام شده است که همه این روش‌ها به نتایج ارزشمندی رسیده‌اند، ولی برای

## نسبت‌های رقیق‌سازی

نسبت ۱:۴۰ تا ۱:۸۰ برای MMP9، ER، PR، CD34 به صورت آماده برای استفاده (ready to use) و نسبت ۱:۱۰۰ برای CD31 و HER2 انجام شد.

## مراحل انجام رنگ‌آمیزی نمونه‌های پاتولوژی

بلوک‌های پارافینی از نمونه‌های پاتولوژی مربوط به سرطان داکتال مهاجم پستان انتخاب و از بایگانی آزمایشگاه پاتولوژی مربوطه بیرون آورده شدند و از بلوک‌های مربوط برش تهیه گردید.

لام‌های مخصوص Silanized تهیه شدند.

از هر بلوک برش‌های جداگانه تهیه شد؛ یکی جهت رنگ‌آمیزی با H&E و بقیه برای آنتی‌بادی‌های مورد بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا لام‌ها به صورت شبانه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

صبح روز بعد لام‌ها از انکوباتور بیرون آورده شدند و به مدت یک ساعت در فور ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

لام‌ها بدون اتلاف وقت پارافین‌زدایی شدند و آب آن‌ها گرفته شد.

لام‌ها بلافاصله به جار حاوی Retrieval buffer با pH = ۶ منتقل شدند.

لام‌ها همراه با Retrieval buffer درون دیگ زودپز (Pressure cooker) به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه گذاشته شدند و بعد به مدت ۱۰ دقیقه با آب خنک، سرد شدند.

بعد از ۱۰ دقیقه، اسلایدها به جار حاوی بافر شستشو (Wash buffer) منتقل شدند.

به مدت ۱۰ دقیقه محلول Methanol-soluble tissue peroxidase blocker ۵ درصد روی لام‌ها ریخته شدند.

سپس لام‌ها برای ۵ دقیقه در بافر شستشو (Rinse buffer) گذاشته شدند که این کار دو بار دیگر نیز بین مراحل اصلی انجام شد.

آنتی‌بادی اولیه تهیه شده از شرکت Leika با رقت‌های مطلوب مربوط به هر آنتی‌بادی اضافه شد.

لام‌ها به مدت ۶۰-۵۰ دقیقه در هوای مرطوب و تاریک قرار گرفتند.

سپس لام‌ها دو بار (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در بافر شستشو قرار داده شدند.

اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه به مدت ۳۰ دقیقه (اضافه کردن post primary و پلی‌مراز هر کدام به مدت نیم ساعت بین هر کدام از مراحل شستشو به مدت پنج دقیقه انجام شد).

Chromogen DAB به مدت ۱۵-۵ دقیقه روی لام‌ها ریخته شد.

لام‌ها به مدت یک دقیقه جهت شستشو در آب مقطر قرار داده شدند و سپس به مدت یک دقیقه با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند.

لام‌ها آب‌زدایی و تثبیت و خشک شدند.

برای هر آنتی‌بادی، شاهد‌های مثبت و منفی در نظر گرفته شد. شاهد مثبت برای ER و PR، سلول‌های اپی‌تلیال داکتال مجاور تومور و شاهد منفی سلول‌های استرومال بودند. شاهد مثبت برای C-erb-B2 یک مورد سرطان پستان با واکنش مثبت قوی (+۳) و شاهد منفی عضلات اسکلتی بودند. برای CD31 و CD34 شاهد مثبت اندوتلیوم جدار عروق و شاهد منفی سلول‌های اپی‌تلیال داکتال بود.

نمره مارکرها عبارت از شدت بیان MMP9 به صورت ۳ مثبت (شدید)، رنگ گرفتن سیتوپلاسم همراه با گرانول و ۲ مثبت (متوسط)، رنگ گرفتن سیتوپلاسم بدون گرانول و ۱ مثبت (خفیف)، رنگ گرفتن سیتوپلاسم به صورت ضعیف و صفر برای موارد منفی در نظر گرفته شد. برای CD31 و CD34 میانگین تعداد عروق کوچک (و نه عروق

درصد شمارش CD31 در مراحل مختلف نشان داد که در مرحله دوم کمترین درصد و در مرحله اول بیشترین درصد وجود داشت (شکل ۱). میانگین درصد شمارش CD34 در مراحل مختلف نیز حاکی از درصد زیاد در مرحله دوم بود و درصد CD34 در مرحله سوم به طور مشخصی کمتر از بقیه مراحل بود (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین درصد شمارش CD31 و CD34 بر اساس مراحل و در نواحی مهاجم و سرطان مجرای درجا

CD	مرحله	مهاجم*	
		انحراف معیار ±	میانگین
CD34	I	۴۲/۶ ± ۲	۲۴/۶ ± ۷
	II	۴۴/۱ ± ۲	۲۹/۲ ± ۶
	III*	۲۸/۳ ± ۵	۳۳/۰ ± ۸
CD31	I	۱۹/۰ ± ۵	۱۰/۰ ± ۲
	II	۱۸/۹ ± ۳	۱۱/۱ ± ۲
	III	۱۹/۰ ± ۵	۱۳/۵ ± ۴

\* معنی داری در سطح ۰/۰۵

توزیع فراوانی بروز ژن MMP9 در ناحیه مهاجم بر اساس مراحل مختلف و همچنین درصد شدت بروز MMP9 در این ناحیه در جدول ۲ آمده است.

ارتباط بین CD31 و CD34 با MMP9 بر اساس مراحل مختلف سرطان بررسی شد. بروز MMP9 با افزایش میانگین درصد شمارش CD31 در مرحله دوم ارتباط معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ).

#### یافته‌ها در ناحیه سرطان مجرای درجا

توزیع فراوانی بروز MMP9 در مرحله سرطان مجرای درجا برابر با ۸۲ درصد مثبت و ۱۸ درصد منفی بود. یافته‌های دیگر در این ناحیه عبارت از شدت بروز MMP9: ۵۶ درصد ضعیف، ۲۶ درصد متوسط و صفر درصد شدید

بزرگ) رنگ گرفت و شمارش در ۵ زمینه و در همه موارد با بزرگ‌نمایی ۴۰ انجام شد (۲۷،۲۸).

نمونه‌ها از نظر نواحی پیش سرطانی [طبیعی (تغییرات فیبروکیستیک ± داکتال داخل نئوپلازی)] و سرطانی (سرطان مجرای درجا و سرطان مهاجم پستان) به چهار ناحیه تقسیم شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

در نهایت همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون‌های آماری  $t$ ،  $\chi^2$  و Levenes در این مطالعه استفاده شد و سطح معنی داری در کلیه آزمون‌ها  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

#### نتایج

در مطالعه حاضر ۵۰ بیمار با تشخیص سرطان مهاجم داکتال پستان با میانگین سن ۴۷ سال (دامنه سنی ۲۵-۷۷ سال) و در مراحل مختلف بیماری (۳۵ درصد در مرحله ۱، ۴۲ درصد در مرحله ۲ و ۲۳ درصد در مرحله ۳) و متوسط اندازه تومور ۳/۶ سانتی‌متر مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌ها با توجه به مطالعه تغییرات بافتی از طبیعی به هیپرپلاستیک، به چهار ناحیه مهاجم، سرطان مجرای درجا، پیش سرطان و طبیعی تقسیم شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

#### یافته‌ها در ناحیه مهاجم

میانگین درصد شمارش CD31 در قسمت‌های طبیعی، پیش سرطانی، سرطان مجرای درجا و سرطان مهاجم بررسی شد و مقدار آن به طور معنی داری در ناحیه مهاجم (۱۹/۱ ± ۲/۵) بیشتر از سایر مناطق بود ( $P < 0/05$ ) و درصد شمارش به ترتیب در ناحیه سرطان مجرای درجا (۱۱/۴ ± ۱/۷)، پیش سرطانی (۱۱/۲ ± ۱/۲) و طبیعی (۳/۶ ± ۰/۴) از زیاد به کم مشاهده شد؛ بدین صورت هرچه سرطان به سوی مهاجم پیشرفت می‌کرد درصد شمارش CD31 به طور معنی داری افزایش یافت.

بود (جدول ۲) (شکل ۱). ضریب ارتباط بین CD31 و MMP9 در ناحیه سرطان مجرای درجا بررسی شد و رابطه معنی داری در مرحله دوم و سوم بین CD31 و MMP9 مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

**جدول ۲.** توزیع فراوانی بیان ژن MMP9 (Matrix metalloproteinase-9) بر اساس مرحله به تفکیک در نواحی مهاجم، سرطان مجرای درجا و پیش سرطان

مرحله	مهاجم*			سرطان مجرای درجا			پیش سرطان		
	منفی	ضعیف	متوسط	قوی	متوسط	ضعیف	منفی	ضعیف	متوسط
اول	۱	۵	۵	۲	۳	۹	۶	۸	۰
دوم	۰	۴	۱۲	۵	۶	۱۲	۱۶	۷	۰
سوم	۰	۳	۹	۲	۴	۷	۸	۵	۰

MMP: Matrix metalloproteinase

$\chi^2 = 114.7, DF = 3, P = 0.001$

یافته‌ها در ناحیه پیش سرطان فراوانی بیان MMP9 در ناحیه پیش سرطان در ۴۰ درصد موارد مثبت ضعیف (+۱) و در ۶۰ درصد منفی بود (جدول ۲).

یافته‌ها در ناحیه طبیعی فراوانی بیان مثبت MMP9 در مناطق طبیعی برابر با ۲ درصد و در ۹۸ درصد موارد منفی بود (شکل ۲).

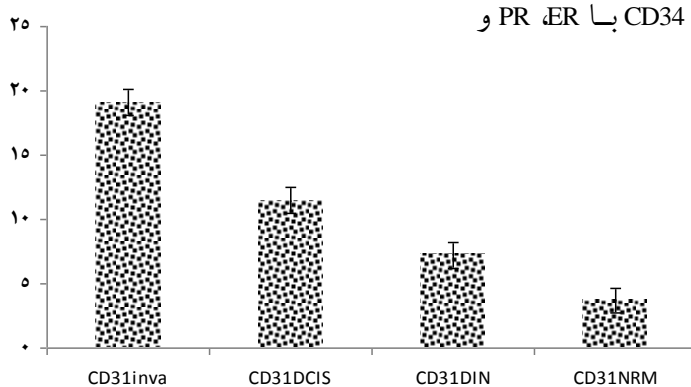
یافته‌های نهایی و مقایسه‌ای میانگین درصد شمارش CD31 با تغییرات پیش سرطانی (طبیعی، پیش سرطانی ± تغییرات فیروکیستیک به سرطان مهاجم، سرطان مجرای درجا) افزایش داشت (نمودار ۱)، اما میانگین درصد شمارش CD34 در ناحیه طبیعی بیشتر از سایر نواحی بود که در مرحله مهاجم مقادیر آن نسبت به مرحله پیش سرطان کمی افزایش نشان داد (جدول ۱).

CD34 و CD31 بر اساس تعداد لنف گره درگیر، سن بیمار و اندازه توده تومور تحلیل شدند. در این تحلیل میانگین درصد CD31 در نواحی مهاجم، پیش سرطانی و سرطان مجرای درجا به طور معنی داری در نمونه‌هایی که بیش از ۳ لنف گره درگیر داشتند، افزایش یافته بود ( $P < 0.05$ ). به عبارت دیگر در تمام نمونه‌های غیر طبیعی که بیش از ۳ لنف گره درگیر داشتند، میزان CD31 افزایش یافته بود، اما این تغییرات برای CD34 معنی دار نبود. میانگین درصد CD31 و CD34 در تحلیل بر حسب سن بیمار تفاوت معنی داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). بر اساس اندازه توده در نواحی مهاجم و پیش سرطان، میانگین درصد CD31 در توده‌های بزرگ‌تر از ۵ سانتی متر بیش از این میانگین در توده‌های کمتر از ۵ سانتی متر بود ( $P < 0.05$ ).

در مراحل مهاجم و سرطان مجرای درجا ارتباط بین مارکرهای عروقی (CD31 و CD34) بررسی شد و این ارتباط معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۳).

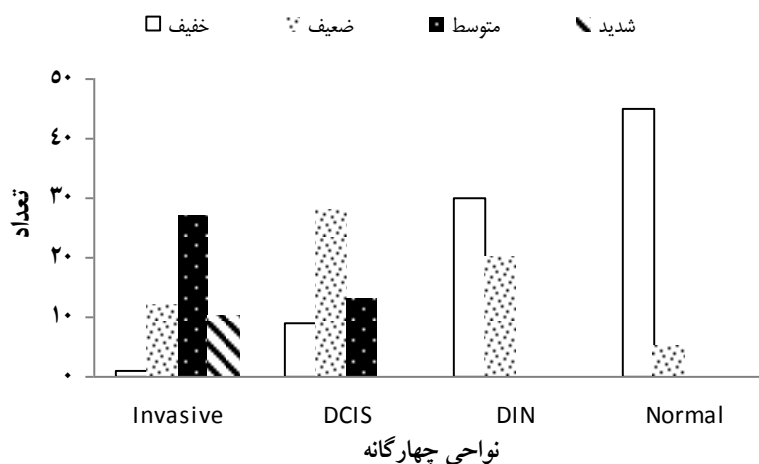
HER2 مورد بررسی قرار گرفتند و دیده شد که CD34 در مرحله مهاجم با HER2 و در مرحله سرطان مجرای درجا با ER، PR و HER2 ارتباط معنی داری داشت، ولی بین هیچ کدام از این عوامل با CD31 و MMP9 ارتباط معنی داری مشاهده نشد (جدول ۵).

شدت درصد بیان MMP9 (منفی، ضعیف، متوسط و شدید) بر اساس اندازه توده (بالای ۵ سانتی متر و کمتر از ۵ سانتی متر)، تعداد گره لنفاوی درگیر (بیشتر از ۳ عدد و کمتر از ۳ عدد) و سن بیمار (بالای ۵۰ سال و کمتر از ۵۰ سال) در مراحل پیش سرطانی و سرطانی تحلیل شد. در این تحلیل بر اساس اندازه توده، تعداد گره لنفاوی درگیر و سن بیمار رابطه معنی داری وجود نداشت.



نمودار ۱. میانگین CD31 در نواحی پیش سرطانی و سرطانی

DIN: Ductal intraepithelial neoplasia; DCIS: Ductal carcinoma in situ; NRM: Normal; Inva: Invasive



نمودار ۲. شدت بیان MMP9 (Matrix metalloproteinase-9) در مراحل چهارگانه

DIN: Ductal intraepithelial neoplasia; DCIS: Ductal carcinoma in situ



انجام شد و مشاهده گردید که HER2 در تومورهایی که درگیری بیشتر از ۳ عدد گره لنف داشتند، اختلاف معنی داری داشت ( $\chi^2 = 5/99$ ,  $P = 0/027$ ).

بررسی فراوانی بیان ER، PR و HER2 بر اساس اندازه توده (بالای ۵ سانتی متر و کمتر از ۵ سانتی متر)، تعداد گره لنفاوی درگیر (بیشتر از ۳ عدد و کمتر از ۳ عدد) و سن بیمار (بالای ۵۰ سال و کمتر از ۵۰ سال) در ناحیه مهاجم

جدول ۳. ضریب ارتباط بین CD31 و CD34 در نواحی مهاجم و سرطان مجرای درجا در بیماران مورد مطالعه

سرطان مجرای درجا		مهاجم		ناحیه
CD31	CD34	CD31	CD34	
-۰/۲۳۶	۰/۱۷۴	۰/۰۳۵		CD34
**۰/۶۹۰	۰/۰۴۲		۰/۰۳۵	CD31
-۰/۰۲۲		۰/۰۴۲	۰/۱۷۴	CD34
	-۰/۰۲۲	**۰/۶۹۰	-۰/۲۳۶	CD31

\*\* سطح معنی داری برابر با  $P < 0/01$

جدول ۴: فراوانی بیان MMP9 (Matrix metalloproteinase-9) در نواحی چهار گانه در بیماران مورد مطالعه

فراوانی (درصد)				MMP9
طبیعی	پیش سرطان	سرطان مجرای درجا	مهاجم	
۴۵ (۹۰)	۳۰ (۶۰)	۹ (۱۸)	۱ (۲)	منفی
۵ (۱۰)	۲۰ (۴۰)	۲۸ (۵۶)	۱۲ (۲۴)	ضعیف
۰ (۰)	۰ (۰)	۱۳ (۲۶)	۲۷ (۵۴)	متوسط
۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۰ (۲۰)	شدید

Matrix metalloproteinase:MMP

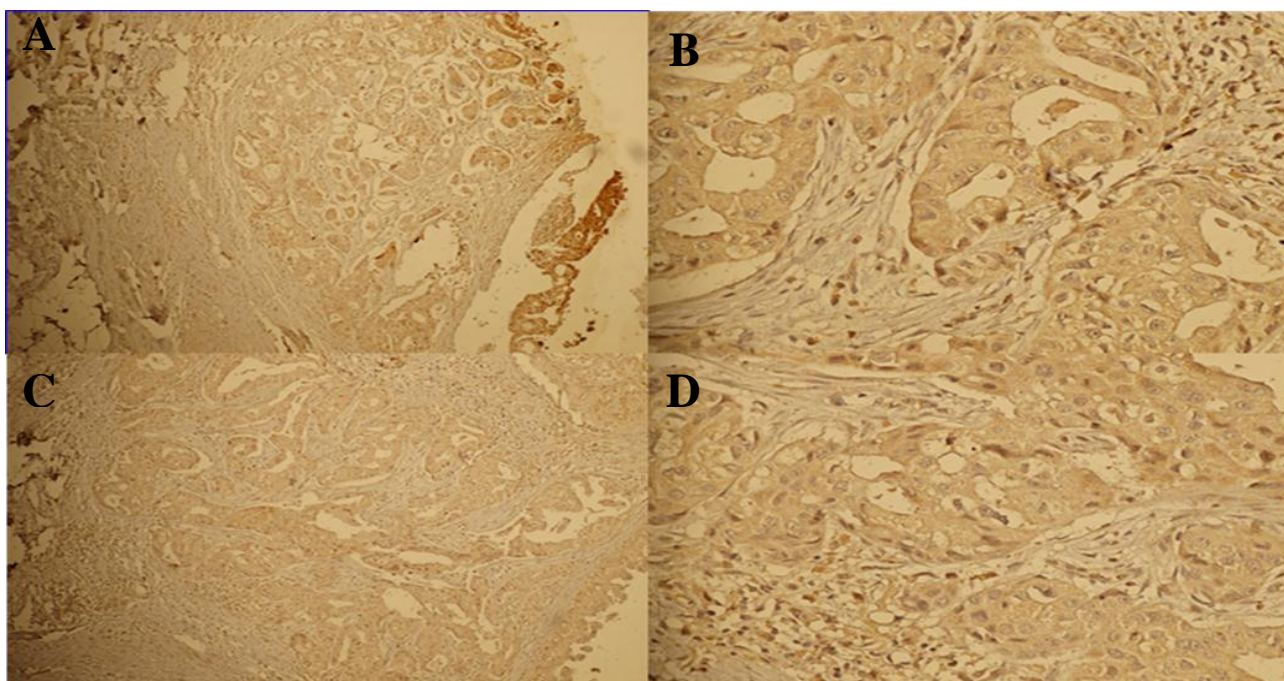
سطح معنی داری برابر با  $P < 0/05$

جدول ۵. ضریب ارتباط بین بیان عوامل ER، PR، HER2، CD34، CD31 و MMP9 در ناحیه مهاجم

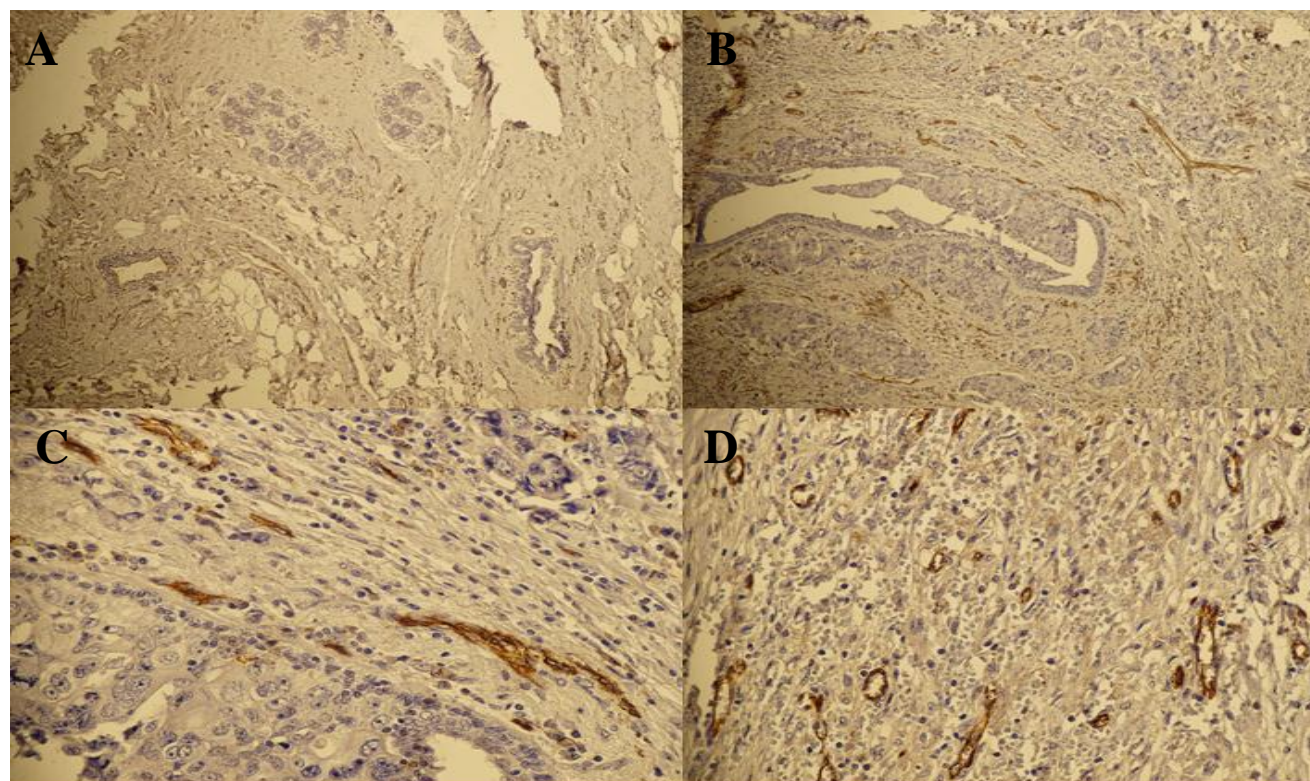
MMP9	CD31	CD34	HER2	PR	ER	عوامل
-۰/۰۷۷	-۰/۰۷۷	-۰/۰۲۶	*-۰/۲۸۷	**۰/۷۱۸		ER
-۰/۱۱۰	-۰/۰۴۲	-۰/۰۰۱	-۰/۲۲۴		**۰/۷۱۸	PR
-۰/۱۷۰	-۰/۱۱۲	** -۰/۴۸۵		-۰/۲۲۴	*-۰/۲۸۷	HER2
۰/۲۲۵	-۰/۰۹۶		** -۰/۴۸۵	-۰/۰۰۱	-۰/۰۲۶	CD34
**۰/۴۱۲		-۰/۰۹۶	-۰/۱۱۲	-۰/۰۴۲	-۰/۰۷۷	CD31
	** -۰/۴۱۲	-۰/۲۲۵	-۰/۱۷۰	-۰/۱۱۰	-۰/۰۷۷	MMP9

\*\* سطح معنی داری برابر با  $P < 0/05$       \* سطح معنی داری برابر با  $P < 0/01$

MMP: Matrix metalloproteinase, ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor



شکل ۱. رنگ‌آمیزی IHC (Immunohistochemistry). A بیان MMP9 (Matrix metalloproteinase) در نواحی طبیعی و پیش سرطان با بزرگ‌نمایی رنگ‌آمیزی ۱۰۰× و ۴۰۰× B بیان MMP9 در نواحی سرطان مجرای درجا با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× و C و D بیان MMP9 در نواحی مهاجم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و ۴۰۰×



شکل ۲. بیان CD31. A در نواحی طبیعی و پیش سرطان، B در نواحی سرطان مجرای درجا، C, D در نواحی مهاجم

## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، CD31 و MMP9 در نواحی پیش سرطان و سرطان پستان بررسی گردید. افزایش معنی داری در میانگین درصد شمارش CD31 در سیر پیشرفت سرطان دیده شد. به عبارت دیگر، گسترش تومور با افزایش پروليفراسیون عروق (CD31 مثبت) همراه است. درصد شدت و فراوانی بروز MMP9 با پیشرفت تومور از نواحی پیش سرطانی به سرطان مجرای درجا و ناحیه مهاجم افزایش داشت و این مارکر در مرحله مهاجم در ۹۸ درصد موارد مثبت بود. نظر به بروز ۲ درصد موارد در نواحی طبیعی می توان گفت MMP9 در بافت طبیعی پستان بیان نمی شود و این دستاورد با اکثر تحقیقات همخوانی دارد (۲۵-۱۸، ۱۴، ۲۰).

در مطالعه حاضر مشخص شد که میانگین بیان CD31 در سیر پیشرفت بیماری به طور معنی داری افزایش می یابد، ولی در مورد CD34 در مقایسه با مناطق پیش سرطانی و سرطانی مجرای درجا با نواحی طبیعی کاهش دیده شد؛ اگرچه در مرحله مهاجم افزایش کمی وجود داشت و در مرحله سوم رشد عروق CD34 مثبت و معنی دار بود. شاید یافته به دست آمده مؤید این مطلب باشد که عروق CD31 مثبت با عروق CD34 مثبت از جنبه تغییرات توموری و پیشرفت به سوی تهاجم نقش متفاوتی دارند. همچنین در مراحل بالا، CD31 و CD34 با MMP9 ارتباط معنی داری را نشان دادند. این یافته مشخص می کند که سرطان پستان در مرحله تهاجم تغییراتی از نظر بروز مارکهای آنژیوژنز بروز می دهد (با بیان CD31 و CD34) و بیان MMP9 با آنها همراه می باشد. رشد و متاستاز بسیاری از سرطان ها با آنژیوژنز ارتباط مستقیمی دارد. بسیاری از مطالعات مشاهده ای (۲۷، ۴۰) اعم از گذشته نگر و آینده نگر به این نتیجه رسیده اند که آنژیوژنز یک عامل پیش آگهی در سرطان های پستان است، اما در تعدادی از مطالعات دیگر نتایج ضد و نقیضی به دست آمده

است. علاوه بر این، برای درمان سرطان ها یکی از اهداف کنترل مویرگ ها و درمان ضد آنژیوژنز است.

دو مطالعه در بررسی ارتباط CD31 و سرطان پستان انجام گرفت. در مطالعه اول گزارش شد که بیان CD31 با رفتار تهاجمی سرطان مجرای درجا ارتباط دارد (۲۹). در مطالعه دوم نیز بیان گردید که بیان CD31 با گسترش سلول های تومور در سیستم مجرای مرتبط است، اما فنوتیپ تهاجمی نیاز به بیان CD31 و CD44 دارد (۳۰).

همان طور که پیش تر آنژیوژنز به عنوان یک عامل مؤثر شرح داده شد، افزایش سطح مارکر های مولکولی رگ زایی با پیش آگهی بدی همراه است. آنژیوژنز جزء ملزومات بیولوژیک بدخیم محسوب می شود. همچنین بین میزان آنژیوژنز و احتمال متاستاز بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان پستان ارتباط مستقیم وجود دارد و دانسیته عروقی شاخص مؤثر و مهمی محسوب می شود (۱۹، ۲۰).

عوامل رشد زیادی در امر متاستاز و رشد تومورها دخیل هستند؛ از جمله CD31 که در برخی مطالعات نقش آن را در سرطان پستان مورد بررسی قرار داده اند و مشاهده شده است که این عامل در سرطان های مجرای درجا و یا تهاجمی بیشتر از بافت غیرنئوپلاستیک است (۲۴). به عبارت دیگر در بیشتر این مطالعات سرطان پستان با CD31 مثبت دارای آنژیوژنز بیشتر و پیش آگهی بدتری در مقایسه با سرطان های CD31 منفی بوده اند (۳۱). همچنین مطالعات نشان می دهد که آنتی بادی CD31 نقش مهمی در ترومبوز دارد و استفاده از مارکرهای عروقی مانند CD31 مورد تأیید آنها قرار گرفته است. افزایش رگ سازی هدف مهمی برای درمان ضد توموری محسوب می گردد (۲۴، ۲۵).

مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی بروز MMP9 با پیشرفت تومور افزایش می یابد. مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است که نتایج به دست آمده در این مطالعه را تأیید می کنند (۳، ۱۱، ۱۳). در این بررسی MMP9 براساس سن بیمار، تعداد لنف گره درگیر و یا اندازه توده در هیچ

متولی باشی و همکاران مطالعه‌ای انجام دادند که در آن ۱۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از تحلیل داده‌ها مشاهده شد که بین آل T و سرطان پستان ارتباط معنی‌داری وجود دارد. همچنین ارتباط قوی و معنی‌داری بین آل T با تهاجم و پیشرفت تومور گزارش شد (۳).

تهاجم سرطان پستان نتیجه تعادل بین خاصیت چسبندگی و مهاجرتی سلول‌های تومور و انعطاف‌پذیری بافت اطراف تومور است. رفتار بدخیم یک تومور به رشد غیرقابل کنترل، تهاجم موضعی و توانایی متاستاز بستگی دارد. چسبندگی مولکول در هر یک از این ویژگی‌ها و نقش‌ها شرکت می‌کند. بیان شده است که کارسینوژنز تنها نتیجه موتاسیون در سلول‌های اپی‌تلیال یا استرومایی نیست و در هم شکستن اثر متقابل عناصر سلول‌های استرومایی - اپی‌تلیالی نیز تأثیر زیادی دارد (۳۷، ۳۸). این سلول‌ها مواد زیادی مانند کلاژن نوع ۱ و ۲، Fibronectin isoforms، Tenascin، Versican و همچنین پروتئازهایی که به وسیله میوفیبروبلاست‌ها بیان می‌شوند مانند MMPs، Urokinase، Plasminogen activator و FAP (fibroblast activating factor) را تولید می‌کنند. این پروتئازها تغییرات ماتریکس اکستراسلولار را القا می‌کنند که به دنبال آن رشد و مهاجرت سلول‌های سرطانی القا می‌گردد. به علاوه میوفیبروبلاست‌ها، عوامل رشد مانند CTGF (Connecting tissue growth factor) و TGF beta1 (Transforming growth factor beta-1) را ترشح می‌کنند که فعالیت‌های بالقوه آنژیوژنیک دارند (۳۹).

همچنین مطالعه‌ای به بررسی ارتباط بیان CD10 با پیش‌آگهی بد، ER منفی و مرحله بالا در سرطان مهاجم پستان اقدام کرد. در مطالعه مذکور نشان داده شد که بیان CD10 در سرطان مهاجم به‌طور معنی‌داری بیشتر از سرطان غیر مهاجم است. همچنین رابطه معنی‌داری بین بیان CD10 و مرحله بالاتر و منفی بودن ER مشاهده شد. در ضمن

یک از مراحل تغییرات تومورال تفاوتی نداشت؛ بدین معنی که بین MMP9 با سن بیمار، تعداد لنف گره درگیر و اندازه تومور رابطه‌ای وجود ندارد. مطالعه‌ای گزارش کرد که بیان MMPs با اندازه بزرگ تومور و مرحله بالاتر آن ارتباط دارد (۳۲).

یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که ممکن است استرومای تومور با تغییرات برگشت‌پذیر در فنوتیپ سلول‌های سرطانی، باعث متاستاز تومور شود (۳۳). به نظر می‌رسد سلول‌های اصلی که در گسترش واکنشی استروما (در اثر تومور) دخالت دارند، فیبروبلاست‌ها و میوفیبروبلاست‌ها باشند (۳۴، ۳۵). مشاهده شده است که سلول‌های سرطانی می‌توانند فیبروبلاست‌های طبیعی را به میوفیبروبلاست‌های فنوتیپیک واکنشی تبدیل کنند (۳۶). نقش MMPs در بسیاری از سرطان‌ها به خصوص در تهاجم و متاستاز سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته است و همچنین در تعدادی از مطالعات انجام شده، میزان MMP9 پلاسمایی در بیماران بیشتر از افراد سالم بوده است و ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزان MMP9 پلاسمایی و متاستاز به غدد لنفاوی و تهاجم وریدی بیماران مورد مطالعه گزارش شده است (۱۵). در آلمان مطالعه‌ای انجام گرفت که در آن ۵ فرد طبیعی، ۱۰ بیمار در مرحله دوم بیماری و ۱۰ بیمار در مرحله سوم بیماری از نظر بروز MMPs مورد بررسی قرار گرفتند. بروز MMPs با استفاده از RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) نیمه کمی، Western blot، Immunohistochemistry و Immunocytochemistry بر روی mRNA و سطح پروتئین اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که MMPs (انواع: ۱-۲-۸-۹-۱۰-۱۱-۱۲-۱۳-۱۵-۱۹-۲۳-۲۴-۲۷ و ۲۸) با گسترش و پیشرفت تومور پستان ارتباط دارند؛ بنابراین MMPs ذکر شده داوطلب مناسبی برای تحلیل‌های بعدی از جهت نقش آن در سرطان پستان است (۱۱).

از یافته‌های دیگر مطالعه حاضر، ارتباط بین شدت بروز MMP9 (در نواحی مهاجم) با استرومای بافتی است؛ بدین صورت در نمونه‌هایی که بروز MMP9 قوی بود، استروما فعالیت بیشتری نشان می‌داد. همچنین در تعداد کمی از نمونه‌ها بیان MMP9 با رنگ گرفتن شدید ماست سل‌ها همراه بود.

در مطالعه حاضر نیز توزیع فراوانی CD31 و CD34 بر حسب اندازه توده، تعداد لنف گره در گیر و سن بیماران بررسی شد. نتایج آن با بسیاری از مطالعات انجام شده دیگر هماهنگ بود (۲۹-۳۲) و نیز مؤید این موضوع می‌باشد که نقش CD31 اساسی‌تر از CD34 در مرحله تهاجم سرطان است. مطالعه‌ای در ایتالیا نشان داد که بیان CD34 با رفتار تهاجمی سرطان مجرای درجا ارتباط دارد (۲۹). در مطالعه دیگری نیز در ایتالیا گزارش شد که افزایش میانگین CD31 با گسترش سلول‌های تومور در سیستم مجرای ارتباط دارد، اما فوتوتیپ تهاجمی به افزایش میانگین CD31 و CD44 بستگی دارد (۳۰).

تحلیل دیگری که در مطالعات قبلی انجام نشده بود و در مطالعه حال حاضر انجام گرفت، ارتباط بین CD31 و CD34 در سرطان مهاجم داکتال پستان و سرطان مجرای درجا بود که این ارتباط معنی‌دار بود. شاید گفته شود اگرچه CD31 در همه مراحل تغییرات پیشرفت توموری مهم است، ولی در مرحله تبدیل سرطان مجرای درجا به سرطان مهاجم نقش مهم‌تری دارد. CD31 و CD34 بر اساس سن بیمار مورد بررسی قرار گرفت که ارتباط معنی‌داری نداشتند، اما بر اساس مرحله در CD34 فقط در مرحله مهاجم و دوم ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. در همه بیماران مورد مطالعه با هر درجه پیشرفت بیماری که بیش از ۳ لنف گره درگیر داشتند، میانگین مقادیر CD31 به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود. همچنین در سرطان پستان و افرادی که توده بزرگ‌تر از ۵ سانتی‌متر داشتند، میانگین رشد CD31 در نواحی مهاجم و پیش سرطان به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود که

گزارش گردید که بیان CD10 با کاهش بقای بیمار همراه است (۴۰).

متخصصین برای بهبود بخشیدن بقای بیماران مبتلا به سرطان پستان، علاوه بر عوامل پیش‌آگهی شناخته شده مانند وضعیت درگیری غدد لنفاوی زیر بغل، اندازه تومور و مرحله هسته، به دنبال عوامل مؤثر جدیدی هستند. از آنجایی که در بسیاری از بیماران هنگام تشخیص سرطان پستان در مراحل اولیه متاستازهای میکروسکوپی وجود دارد و ثابت شده است که درمان‌های کمکی (Adjuvant systemic therapy) در مراحل اولیه مؤثرتر است. نشانگرهای زیادی برای تعیین توانایی پیش‌بینی و پاسخ به درمان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، ولی هیچ‌کدام تاکنون رضایت‌بخش نبوده است. مارکرهای رایج پیش‌آگهی کننده مانند ER، PR، HER2 و CD10 به‌طور معمول با پیش‌آگهی بدی همراه هستند (۴۱).

در فرانسه مطالعه‌ای بر روی ۳۶۰ نمونه بافتی سرطان پستان انجام و گزارش شد که CD105 ممکن است برای ارزیابی نتوانیونز در بخش‌های پارافینی مناسب باشد، اما بافت‌های microarrays برای ارزیابی نتوانیونز به عنوان یک شاخص پیش‌آگهی مناسب نیستند (۴۱). مارکرهای مولکولی دیگری نیز با پیش‌آگهی در ارتباط هستند که شناخته‌ترین شده‌ترین آن‌ها ER، PR و HER2 می‌باشند. همچنین نشان داده شده است که CD10 میوفیبروبلاست نیز می‌تواند به صورت بالقوه یک عامل پیش‌آگهی منفی باشد (۴۱، ۴۲).

در مطالعه حاضر بیان ER در نمونه‌های با تعداد لنف گره درگیر بیش از ۳ عدد به‌طور معنی‌داری بیشتر است. مطالعات دیگر نیز این یافته را تأیید می‌کنند (۱۲، ۵۲). همچنین در تحلیل دیگری با HER2 مثبت و شدت بروز MMP9 قوی، این ارتباط معنی‌دار بود (۵۱، ۵۰). از آنجایی که HER2 با پیش‌آگهی بدی همراه است، احتمال دارد بروز قوی MMP9 نیز پیش‌آگهی بدی به دنبال داشته باشد.

استرومایی با پیش آگهی خوبی همراه است، ولی ماکروفاژها (CD68 مثبت) با پیش آگهی بد در بیماران با سرطان داکتال پستان وجود دارد (۴۲).

### سیاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به جهت تصویب طرح پژوهشی و حمایت‌های مالی و همچنین از همکاران محترم خانم‌ها زهرا شیخ شعاعی و صدیقه سالاری به دلیل همکاری در امور آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده پزشکی صمیمانه قدردانی می‌گردد.

نشان دهنده رابطه بین اندازه تومور و قدرت تهاجم و پیش آگهی بد می‌باشد. در یکی از مطالعات انجام شده، گزارش شد که آنژیوژنز به شدت با متاستاز در ارتباط است و اندازه و مرحله تومور با تعداد لنف گره‌های درگیر و همچنین واسکولاریزاسیون ارتباط دارد (۳۲)، اما مطالعه دیگری نشان داد که CD31 با تعداد لنف گره درگیر ارتباط معنی‌داری ندارد (۳۳).

دیبری و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی ارتباط بیان ماست سل‌های استرومایی و ماکروفاژها با سرطان مهاجم پستان پرداختند و دریافتند که افزایش ماست سل‌های

### References

1. Amani D, Mohammad Hassan Z, Ravangard F, Frazmand S, Karim Zadeh M. Flowcytometric Analysis of Tumor Associated Macrophages in Invasive Ductal Carcinoma of Breast. *Iran J Immunol* 2005; 2(2): 117-21.
2. Cooksley S, Hipkiss JB, Tickle SP, Holmes-levers E, Docherty AJ, Murphy G, et al. Immunoassays for the detection of human collagenase, stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) and enzyme-inhibitor complexes. *Matrix* 1990; 10(5): 285-91.
3. Sadeghi M, Motovali-Bashi M, Hojati Z. MMP-9 promoter polymorphism associated with tumor progression of breast cancer in Iranian population. *International Journal of Integrative Biology* 2009; 6(1): 33-7.
4. Carmeli EM, Moas M, hannon L, Scott KP. High intensity exercise increases expression of matrix metallo proteinases in fast skeletal muscle fibers. *Exp Physiol* 2005; 90(4): 613-9.
5. Newman PJ. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 714: 165-74.
6. Luukkaa M, Vihinen P, Kronqvist P, Vahlberg T, Pyrhonen S, Kahari VM, et al. Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognosis in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28(3): 225-34.
7. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, Bommert K, Wagener C, Kallinich B, et al. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer* 1995; 60(6): 854-9.
8. Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(4): H1540-H1547.
9. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(11): 845-56.
10. Talebi A. Evaluation of immunohistochemistry of stem (CD34) and myoepithelial (CK5/6, CK14, P63) cells in

- 100 cases of invasive ductal carcinoma of breast [PhD Thesis]. Kerman, Iran: School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences 2012. [In Persian].
11. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Diel J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 2009; 9: 188.
  12. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Jr., Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996; 49(1-3): 7-19.
  13. Porter GW, Khuri FR, Fu H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(3): 193-202.
  14. Danes CG, Wyszomierski SL, Lu J, Neal CL, Yang W, Yu D. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling. *Cancer Res* 2008; 68(6): 1760-7.
  15. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8): 563-72.
  16. Weiss L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19(3-4): I-383.
  17. Marx J. Cancer research. New insights into metastasis. *Science* 2001; 294(5541): 281-2.
  18. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 2008; 123(9): 1991-2006.
  19. Vandercappellen J, Van DJ, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008; 267(2): 226-44.
  20. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(40): 15735-40.
  21. Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal Cell Derived Factor-1: its Influence on Invasiveness and Migration of Breast Cancer Cells in Vitro, and its Association With Prognosis and Survival in Human Breast Cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(4): R402-R410.
  22. Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8229-34.
  23. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410(6824): 50-6.
  24. Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* 1995; 270(20): 11962-9.
  25. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271(3): 1544-50.
  26. Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JP, Lopez-Otin C. An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin Chim Acta* 2000; 291(2): 137-55.

27. Sadeghi M, Motevali Bashi M. Comparison of serum and plasma MMP-9 level in breast cancer patients. *Knowledge and Health Journal* 2011; 6(2): 13-7 [In Persian].
28. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 96(6): 903-11.
29. Righi L, Deaglio S, Pecchioni C, Gregorini A, Horenstein AL, Bussolati G, et al. Role of CD31/platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression in in vitro and in vivo growth and differentiation of human breast cancer cells. *Am J Pathol* 2003; 162(4): 1163-74.
30. Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S, et al. Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J Pathol* 2001; 194(2): 254-61.
31. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4(6): 327-32.
32. Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(1): 75-85.
33. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162): 557-63.
34. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(5): 349-63.
35. Bauer G. Elimination of transformed cells by normal cells: a novel concept for the control of carcinogenesis. *Histol Histopathol* 1996; 11(1): 237-55.
36. Pavlakis K, Messini I, Vrekoussis T, Yiannou P, Keramopoulos D, Louvrou N, et al. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer* 2008; 8: 88.
37. Sonnenschein C, Soto AM. Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog* 2000; 29(4): 205-11.
38. Cunha GR, Matrisian LM. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation* 2002; 70(9-10): 469-72.
39. Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 2002; 440(3): 298-303..
40. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 109-18.
41. Makretsov NA, Hayes M, Carter BA, Dabiri S, Gilks CB, Huntsman DG. Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Mod Pathol* 2007; 20(1): 84-9.
42. Dabiri S, Huntsman D, Makretsov N, Cheang M, Gilks B, Bajdik C, et al. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Mod Pathol* 2004; 17(6): 690-5.



## A Study of Matrix Metalloproteinase 9 and CD31 Expression through Immunohistochemistry in Invasive Breast Cancer

Shahriar Dabiri, M.D.<sup>1\*</sup>, Nahid Monsefi, M.D.<sup>2</sup>, Gholamreza Narouii, M.D.<sup>3</sup>, Amin Talebi, M.D.<sup>3</sup>,

Manzoumeh Shamsi-Meymandi, Ph.D.<sup>4</sup>, Bahram Pourseidi, M.D.<sup>5</sup>, Hamid Zainalinejad, M.D.<sup>6</sup>

1. Professor, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Assistant Professor, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Resident, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4. Assistant Professor, Department of Pharmacology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

5. Associate Professor, Department of Surgery, Afzalipour School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

6. Associate Professor, Department of Surgery, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

\* Corresponding author; e-mail: dabiri12@yahoo.com

(Received: 12 Oct. 2013 Accepted: 22 Jan. 2014)

### Abstract

**Background & Aims:** This study was performed to investigate possible relationships between the manifestation of stromal cells (fibroblasts and/or myofibroblasts) by focusing on expression of their matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and possible angiogenesis based on CD31 and CD34 antigen expression during the various steps of hyperplastic changes to precancerous state and invasive breast cancer.

**Methods:** Our study included 50 females with invasive ductal carcinoma. Samples were obtained by mastectomy or biopsy and were immunohistochemically stained for the MMP9, CD31, and CD34 antibody. microvessel count (MVC) was also carried out on samples. Statistical analysis of the data was performed using ANOVA and Student's t-test ( $P < 0.05$ ). Findings were compared with our "Breast Cancer Data Bank" for reevaluation of their clinical staging.

**Results:** Positive significant correlations were observed between expression of MMP9 and invasive ductal carcinoma in situ (DCIS) and fibrocystic disease  $\pm$  ductal intraepithelial neoplasia (FCD  $\pm$  DIN) areas ( $P=0.001$ ). MMP9 expression in invasive areas was more strongly positive than precancerous areas. Statistically significant correlations were observed between MMP9 expression and CD31 in grade II in invasive areas. MVC was evaluated by CD31 antibody. It was found to be inversely related to increased MVC from invasive areas, DCIS, DIN, and normal areas ( $P<0.001$ ). No significant difference was observed in MVC based on age, tumor size or steroid receptors in stroma of an invasive cancer, DCIS, and FCD  $\pm$  DIN.

**Conclusion:** MMP9 expression in invasive areas was more strongly positive than precancerous areas, and negative in normal areas. Angiogenesis can be observed before any significant changes in preinvasive breast lesions. The elevated content of microvessel count of the tumor may be an indicator for worse prognostic factor. The progression from epithelial hyperplasia toward DCIS, and then, invasive carcinoma seems too complex to be assumed a linear progression.

**Keywords:** Invasive breast carcinoma, Ductal carcinoma in situ (DCIS), Ductal intraepithelial neoplasia (DIN), Matrix metalloproteinase 9 (MMP9), CD31