

## نقش پیش آگهی دهنده بیان EGFR، IGF-1R، VEGFR-2 و HIF-1 $\alpha$ در بیماران سرطان پستان تریپل نگاتیو ایرانی

رضا مهدی زاده: دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران

صفا نجفی: پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی

سید جلال زرگر: دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران

عیسی جهانزاد<sup>\*</sup>: انستیتو کانسرایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

آسیه الفت بخش: پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی

غلامرضا اسماعیلی جاوید: مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

حسین بختو: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

### چکیده

سرطان پستان تریپل نگاتیو<sup>۱</sup> (TNBC) با پیش آگهی بد، تا به امروز انتخاب های درمانی محدودی داشته است. هدف این مطالعه جستجوی میزان بیان گیرنده های تیروزین کینازی EGFR، IGF-1R، VEGFR-2 و فاکتور HIF-1 $\alpha$  در TNBC و نقش پیش آگهی دهنده آن ها می باشد. جمعیت مورد مطالعه، ۱۰۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان بودند که در ابتدا تریپل نگاتیو بودن آن ها تأیید شد و سپس بیان بیومارکرها در نمونه های پاتولوژی آن ها با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (IHC) مورد مطالعه قرار گرفت. روش IHC بر روی اسلایدهای ریزآرایه بافتی (TMA) بیماران و با آنتی بادی اختصاصی برای هر مارکر انجام شد. پانزده بیمار (۱۴٪) با مرحله (stage) پائین تومور (I) و مابقی با مراحل بالاتر (مرحله II با ۴۶/۶٪، مرحله III با ۳۰/۱٪ و متاستاتیک با ۵/۸٪) مراجعه داشته اند. فقط یک نفر با درجه هیستولوژیک I پذیرش شد و مابقی درجه های II و III (۴۹/۵٪ و ۴۹/۵٪) داشتند. میانگین پیگیری ۵۳ ماه، با دامنه ۱۵ تا ۸۰ ماه، بود. در مدت پیگیری ۲۳ نفر (۲۲/۱٪) فوت کردند و به این ترتیب میانگین بقای کلی ۴۸ ماه شد. از ۱۰۴ بیمار با کارسینوم مهاجم، بیان EGFR در ۱۵ (۱۴٪) نمونه، VEGFR-2 در ۶۳ (۶۱٪) نمونه، IGF-1R در ۸۱ (۷۸٪) نمونه و HIF-1 $\alpha$  در ۵۷ (۵۵٪) نمونه بیان شدند. اگرچه در تحلیل تک متغیری (P-Value=0.010, HR=3.247) و چند متغیری بقا، بیان EGFR به طور قابل توجهی با پیامدهای بدتر، در مقایسه با عدم بیان آن، در زمینه بقای کلی همراه بوده است، بیان هیچ کدام از دیگر مارکرها با بقای کلی ارتباطی نشان ندادند. این دسته بندی مولکولی بر اساس ایمونوهیستوشیمی پیامد بالینی متمایزی را نشان داده و تا کنون هیچ ارتباطی با پیش آگهی نشان داده نشده است.

واژه های کلیدی: سرطان پستان تریپل نگاتیو، EGFR، IGF-1R، VEGFR-2، HIF-1 $\alpha$ ، بقای کلی.

\* e-mail: jahanzad@sina.tums.ac.ir

<sup>۱</sup> Triple Negative Breast Cancer

## مقدمه

در سال ۲۰۱۰ میلادی، ۱/۶ میلیون زن با سرطان پستان تشخیص و ۴۲۵ هزار نفر- از این تعداد ۶۸ هزار نفر در محدوده‌ی ۱۵-۴۹ سال در کشورهای در حال توسعه- در اثر این سرطان جان خود را از دست دادند که اینسرطان را به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان مطرح می‌کند(۱). امروزه روشن شده است که سرطان پستان یک بیماری شامل زیرگروه‌های متعدد با نمای پاتوفیزیولوژیک، پیامد و پاسخ به درمان خاص خود می‌باشد. چندگانگی این بیماری از این منظر جلب توجه می‌کند که نیاز به درمان درخور برای بیمار خاص بسته به مشخصه‌های مولکولی بدخیمی خودش وجود دارد(۲،۳و۴). سرطان پستان تریپل نگاتیو(TNBC) با عدم بیان گیرنده‌های استروژنی و پروژسترونی<sup>۱</sup>(ER/PR) برای درمان هورمونی و عدم بیان گیرنده رشدی HER-2/neu برای درمان با تراستوزامب مشخص می‌شود و بنابراین این درمان‌های هدفمند، روش مؤثری برای درمان این گروه خاص از بیماران سرطان پستان نمی‌باشند(۵). رژیم درمانی استاندارد برای TNBC هنوز به ثبت نرسیده و اطلاعات پیرامون آن کافی نیست(۶).

آمار TNBCs در آسیا و کشورهای غربی بین ۱۰ تا ۲۰ درصد کل سرطان‌های پستان است و در آفریقایی‌تبارها با فراوانی بیشتری رخ می‌دهد(۷،۸و۹). کارسینوم‌های پستان تریپل‌نگاتیو، تومورهای بسیار مهاجم با پیش‌آگهی ضعیف هستند که با فراوانی بیشتر زنان جوانتر(سن کمتر از ۵۰ سال) را درگیر کرده و گرچه در ابتدا بسیار حساس به شیمی درمانی هستند، ولی به طور قابل توجهی مهاجم‌تر از تومورهای دیگر زیرگروه‌های مولکولی می‌باشند(۵). عدم وجود انتخاب درمانی مناسب، پژوهشگران را به سمت شناسایی مسیرهای مولکولی درگیر در تکثیر این تومورها هدایت کرده است. روشن شدن این مکانیسم‌های مولکولی، گسترش مواد هدفمند اختصاصی را موجب شده که به طور امیدوارانه‌ای پیامد بیماران را بهبود خواهد بخشید(۶).

گیرنده‌های تیروزین کینازی<sup>۲</sup>(RTKs) واسطه‌های اصلی شبکه پیام‌رسانی هستند که پیام‌های خارج سلولی را به درون سلول انتقال می‌دهند، ارتباط سلول-سلول را وساطت می‌کنند و به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی فرآیندهای حساس سلولی از جمله تکثیر و تمایز، بقای زیستی سلول و متابولیسم، مهاجرت سلولی و کنترل چرخه سلول نقش ایفا می‌کنند. پیشرفت اخیر و سریع در فهم ما از پیام‌رسانی سلولی به وسیله‌ی RTKs، در سلول‌های سالم و بدخیم، نوری بر توانایی RTKs به عنوان هدف‌های ضد سرطان انتخابی تابانده است(۱۱).

در سلول‌های سرطانی مکانیسم‌های مختلفی برای فعالیت گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی<sup>۳</sup>(EGFR) نشان داده شده است: افزایش بیان گیرنده‌ها و لیگاندها، افزایش تعداد کپی ژن EGFR و جهش‌های فعال‌کننده. EGFR در سرطان پستان تریپل‌نگاتیو بیان شده و چندین کارآزمایی بالینی در حال آزمایش نقش درمان مستقیم ضد EGFR هستند و اثرات ضدتوموری آن را از طریق مهار پیام‌رسانی سلولی در سلول‌های سرطانی نشان دادند، در پاره‌ای از این مطالعات بین بیان ژن EGFR و پیش‌آگهی سرطان پستان ارتباط معکوسی دیده شده است که به این ترتیب افزایش آن باعث کاهش بقا شده است(۱۲و۱۳).

<sup>۱</sup>Estrogen receptor- Progesterone receptor<sup>۲</sup>Receptor Tyrosine Kinases<sup>۳</sup>Epidermal Growth Factor Receptor

نشان داده شده است که مسیر گیرنده فاکتور رشد شبه‌انسولینی<sup>۱</sup> (IGF-1R) با تعدادی از دیگر مسیرهای انتقال پیام اثر متقابل دارد و به همین دلیل یک نقش احتمالی در مقاومت با واسطه به هدگیری درمانی مسیرهای دیگر برای IGF-1R پیشنهاد می‌شود (۱۵ و ۱۴). سطوح بالای بیان IGF-1R در طیف وسیعی از بدخیمی‌های انسانی گزارش شده است، اما ارتباط آن با مشخصه‌ها و پیامد تومور به میزان کمی مشخص شده است. اهمیت IGF-1R در جنبه‌های مختلفی از زیست‌شناسی سرطان، یک هدف جذاب برای مداخله درمانی از آن ساخته است. زیرا که بین بیان IGF-1R و بهبود بقا در مبتلایان به سرطان پستان دیده شده است (۱۶).

میانگین فشار اکسیژن در تومورها به طور قابل توجهی پایین‌تر از بافت‌های نرمال است. سلول‌های توموری با سازگاری با فشار کم اکسیژن و/ یا افزایش رگ‌زایی، باید بقای خود را حفظ کند. در شرایط کم‌اکسیژنی، فاکتور القاچی<sup>۲</sup> HIF-1 $\alpha$ ، به عنوان محرک رونویسی فاکتور رشد اندوتلیالی VEGF، نقش مهمی ایفا می‌کند. علاوه بر این شرایط دیگر محرک‌ها از قبیل IGF-1 و EGF نیز باعث پایداری HIF-1 $\alpha$  می‌شوند (۱۷). HIF فعالیت ژن‌های مرتبط با رگ‌زایی، متاستاز و تهاجم تومور را وساطت کرده و بنابراین به عنوان یک هدف جدید برای درمان سرطان مطرح می‌شود (۱۸). از طرف دیگر رگ‌زایی برای گسترش، تهاجم و متاستاز تومور حیاتی است. در این میان VEGF نقشی کلیدی دارد و با اتصال به گیرنده<sup>۳</sup> VEGFR-2 مسیر انتقال پیام را فعال کرده و VEGFR-2 را به عنوان تنظیم‌کننده اصلی رگ‌زایی نئوپلاستیک مطرح می‌کند و در بعضی مطالعات ارتباط معکوس بین بقا مبتلایان به سرطان پستان با افزایش بیان VEGFR-2 در سلول‌های توموری، دیده شده است (۱۹). هم‌چنین بیان این گیرنده از طریق تنظیم بعد از رونویسی به وسیله شرایط کم‌اکسیژنی، افزایش می‌یابد. به همین دلیل VEGFR-2 یک هدف خوب برای مداخله درمانی ارائه می‌کند (۲۰ و ۲۱).

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر میزان بیان گیرنده‌های تیروزین کینازی در بیماران سرطان پستان تریپل‌نگاتیو و ارتباط آن‌ها با بقای کلی بیماران برای دستیابی به عوامل پیش‌آگهی‌دهنده جدید و هم‌چنین اهداف درمانی بالقوه می‌باشد.

## بیماران و روش‌ها

در این مطالعه ۹۲۳ مورد کارسینوم مهاجم اولیه پستان از پژوهشکده سرطان پستان و انستیتو کانسر بین سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند. از میان این بیماران ۱۰۴ مورد سرطان تریپل‌نگاتیو با پیگیری دراز مدت انتخاب شدند. این بیماران با رژیم‌های مشابه درمان شده و قبلاً بیومارکرهای متعددی برای آن‌ها مطالعه شده بود. ارزیابی شرح حال بالینی و مشخصه‌های تومور، به روشی یکسان انجام شد.

بلوک‌های پارافینه‌ای تثبیت شده با فرمالین از تومورهای اولیه ۱۰۴ بیمار جمع‌آوری شد. سه بیوپسی، با ضخامت ۰/۶ میلیمتر، از هر بلوک دهنده با توجه به نواحی علامت‌گذاری شده مناسب از اسلاید تومور مهاجم به دست آمد. این نمونه‌ها توسط

<sup>۱</sup>Insulin-like Growth Factor Receptor

<sup>۲</sup>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha

<sup>۳</sup>Vascular- Endothelial Growth Factor Receptor 2

دستگاه ریزآرایه‌ی بافتی (Beecher Instruments, Alpheys, France) برداشته شده و به سه بلوک پذیرنده ریزآرایه بافتی<sup>۱</sup> (TMA) منتقل شد. مقاطع ۲-۳ میکرونی از بلوک‌های TMA با دستگاه میکروتوم بریده شد و بر روی اسلایدهای سیالینایز شده قرار داده شدند. در نهایت مراحل رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی منوکلونال برای هر یک از نشانگرها انجام شد. پیش از این هر کدام از اسلایدهای TMA برای دیدن ریخت شناسی و ارزیابی کیفیت نمونه‌های بیوپسی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند (جدول ۱).

جدول ۱: کلون، رقت و منبع آنتی‌بادی‌های به کار رفته			
منبع	کلون	رقت	آنتی‌بادی
Dako, Denmark	H11	۱:۱۰۰	EGFR
Abcam, UK	Polyclonal ab39256*	۱:۲۵۰	VEGFR-2
Abcam, UK	3C8B1, 3G5C1	۱:۵۰۰	IGF-1R
Abcam, UK	ESEE122	۱:۷۵۰	HIF-1 $\alpha$
* شماره محصول			

زمانی که بیش از ۱٪ سلول‌ها رنگ گرفتند، رنگ‌آمیزی غشایی EGFR مثبت تلقی شد. برای VEGFR-2 و IGF-1R، فقط سلول‌های مهاجم توموری در نظر گرفته شد و شدت رنگ‌آمیزی غشایی و سیتوپلاسمی با به کار بردن یک مقیاس نیمه-کمی (۰-۳) که قبلاً توصیف شده بود، نمره‌دهی شد. در تحلیل آماری، واکنش‌های ایمنی متوسط و قوی (۲ و ۳) با ضعیف و عدم رنگ-آمیزی (۰ و ۱) مقایسه شد. رنگ‌آمیزی HIF-1 $\alpha$  زمانی مثبت در نظر گرفته شد که ۱٪ و یا بیشتر سلول‌ها مثبت بودند (هسته‌ای و سیتوپلاسمی) (۴).

برای همه‌ی آزمایش‌ها، بیشترین نمره از سه نمونه مشابه از یک تومور برای تحلیل آماری استفاده شد و تنها سلول‌های مهاجم توموری در نظر گرفته شدند. آرایه‌ی توموری توسط دو محقق بدون آگاهی از اطلاعات بالینی آزمایش و در نتایج متفاوت دوباره آزموده و با تصمیم مشترک نهایی شد.

### تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 20 (SPSS Inc, Chicago) صورت گرفت. در این مطالعه ارتباط بین بقا و حضور متغیرهای بیولوژیک و دیگر متغیرهای کلینیکی پاتولوژیک و هم‌چنین اهمیت نشانگرهای مختلف پیش‌آگهی دهنده بوسیله آزمون chi-square، مورد سنجش قرار گرفت. همراهی با بقا را با تحلیل Cox regression برای نزدیک کردن به دیگر نشانه‌های پیش‌آگهی دهنده تحلیل شد. در این مطالعه عدد p کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

<sup>۱</sup>Tissue MicroArray

## نتایج

این مطالعه شامل ۱۰۴ بیمار با فنوتیپ تریپل نگاتیو (گیرنده استروژن منفی، گیرنده پروژسترون منفی و HER-2 منفی) بود. همه‌ی تومورها از نوع کارسینوم داکتال (duct/NST) بود. میانگین سنی بیماران ۵۰ سال (دامنه ۲۹-۸۷ سال) بود و همه بیماران شیمی درمانی آنتراساکلین و با پایه تاکسان (AC4-T4) دریافت کردند. میانگین مدت پیگیری ۵۳ ماه (دامنه ۸۰-۱۵ ماه) بود و در این مدت ۲۳ نفر از ۱۰۴ بیمار (۲۲/۱٪)، فوت کردند. هم‌چنین میانگین بقای کلی ۴۸ ماه بود. در زمان مراجعه، ۱۵ نفر (۱۴٪) به مرحله I<sup>۱</sup> تومور، ۵۷ نفر (۵۶٪) با مرحله II تومور، ۲۵ نفر (۲۴٪) با مرحله III تومور و ۷ نفر (۶٪) با مرحله IV تومور تشخیص داده شدند. اندازه تومور با ۲-۵ سانتیمتر (T2) در ۶۱ نفر (۵۸٪) و کمتر از آن (T1) در ۲۷ نفر بود و هم‌چنین ۵۸ نفر (۵۶٪) از بیماران متاستاز به غدد لنفاوی زیربغل در زمان تشخیص داشته‌اند (جدول ۲)

جدول ۲: مشخصه‌های بیماران و بیان مارکرهای بیولوژیک		
متغیرها	تعداد بیماران	درصد بیماری (%)
cm < ۲	۲۷	۲۶٪
cm ۲-۵	۶۱	۵۹٪
cm > ۵	۱۶	۱۵٪
وضعیت گره لنفی	تعداد بیماران	درصد بیماری (%)
۰	۴۶	۴۴٪
۱-۳	۲۵	۲۴٪
۴-۹	۲۱	۲۰٪
> ۹	۱۲	۱۲٪
درجه هیستولوژیک	تعداد بیماران	درصد بیماری (%)
I	۱	۱٪
II	۵۱	۴۹٪
III	۵۲	۵۰٪
سن		
< ۵۰	۵۴	۵۱/۹٪
> ۵۰	۵۰	۴۸/۱٪
تهاجم عصبی		
وجود	۴۶	۴۴٪
عدم وجود	۵۸	۵۶٪
تهاجم عروقی	تعداد بیماران	درصد بیماری (%)
وجود	۵۲	۵۰٪
عدم وجود	۵۲	۵۰٪
نوع جراحی	تعداد بیماران	درصد بیماری (%)
BCS*	۳۳	۳۲٪
MRM**	۷۱	۶۸٪
پرتودرمانی اذجوانت		

\*Stage

بله	۸۹	٪۸۶
خیر	۱۵	٪۱۴
شیمی‌درمانی ادرجات با رژیم تاکسان و آنتراساکلین (AC4-T4)	۱۰۴	٪۱۰۰
نوع هیستولوژیک تومور	تعداد بیماران	(%) درصد بیماری
IDC***	۱۰۴	٪۱۰۰
بیان VEGFR2		
منفی	۴۱	٪۳۹
مثبت	۶۳	٪۶۱
بیان EGFR	تعداد بیماران	(%) درصد بیماری
منفی	۸۹	٪۸۶
مثبت	۱۵	٪۱۴
بیان HIF-1 $\alpha$	تعداد بیماران	(%) درصد بیماری
منفی	۴۷	٪۴۵
مثبت	۵۷	٪۵۵
بیان IGF-1R	تعداد بیماران	(%) درصد بیماری
منفی	۲۳	٪۲۲
مثبت	۸۱	٪۷۸
*Breast Conserving Surgery **Modified radical mastectomy ***Invasive ductal carcinoma		

ما همراهی بین بقای کلی (OS) با متغیرهای کلینیکی و پاتولوژیکی و بیولوژیکی را تحلیل کردیم و نتایج تحلیل تک‌متغیری و چندمتغیری در جدول ۳ خلاصه شده است. در این تحلیل عدد ۱ را برای گروه رفرانس در نظر گرفته و T1-2 با T3-4، G I-II با G III، N 0-1 با N 2-3 و Stage I-II با III-IV مقایسه شد. اندازه تومور بیشتر از T2، درگیری غده لنفی بیشتر از N1، حضور انسداد عروقی، تهاجم پری‌نورال و درجه بدخیمی تومور<sup>۱</sup> بیشتر از G1 با بقای کلی کمتر، مرتبط بود. با این حال هیچ تفاوت معنی‌داری در بقای بیماران جوان (زیر ۵۰ سال) و مسن‌تر (بالای ۵۰ سال) وجود نداشت (جدول ۳).

جدول ۳: بررسی ارتباط متغیرهای پاتولوژیکی و ایمونوهیستولوژیکی با بقای کلی بیماران						
متغیر پیش-آگهی دهنده	تعداد بیماران	تعداد مرگ	تک‌متغیری		چندمتغیری	
			p-value	HR(%۹۵ CI)	p-value	HR(%۹۵ CI)
بیان EGFR	۱۵	۷	۰/۰۱۰	(-۷/۹۲۴) ۳/۲۴۷ (۱/۳۳۰)	۰/۰۲۱	(۱/۱۹۶-۸/۷۷۷) ۳/۲۴۰
بیان-2VEGFR	۶۳	۱۱	۰/۵۵۰	(۰/۳۲۴-۱/۷۷۰) ۰/۷۷۸	۰/۰۶۹	(۰/۱۴۸-۱/۰۷۵) ۰/۳۹۹
بیان-IGFR-1R	۸۱	۲۰	۰/۰۷۶	(-۱۰/۴۹۷) ۳/۰۵۶ (۰/۸۹۰)	۰/۰۸۷	(-۱۳/۳۴۴) ۳/۳۴۳ (-۰/۸۳۷)
بیان HIF-1 $\alpha$	۵۷	۱۳	۰/۲۹۱	(۰/۶۸۰-۲/۶۱۷) ۱/۵۶۹	۰/۴۴۶	(۰/۵۷۰-۳/۵۹۵) ۱/۴۳۱

<sup>۱</sup>Tumor Grade

-	-	< ۰/۰۰۱	-۳۵۵/۴۸۸ ۴۷/۸۲۴ (۶/۴۳۵)	۲۲	۲۲	مرحله تومور III-A-V
-	-	۰/۰۱۶	-۸/۰۴۴ ۳/۱۵۶ (۱/۲۳۸)	۱۷	۵۲	درجه بدخیمی III
-	-	< ۰/۰۰۱	-۴۷/۳۷۹ ۱۴/۰۴۰ (۴/۱۶۱)	۲۰	۳۳	N۲-۳
-	-	< ۰/۰۰۱	-۱۳/۴۱۵ ۵/۵۲۳ (۲/۲۷۴)	۹	۱۶	T۳-۴
۱/۶۱۶ ۰	-۳/۴۸۷) ۱/۲۹۰ (۰/۴۷۷)	۱/۰۵۹ ۰	-۵/۸۳۷) ۲/۳۷۷ (۰/۹۶۸)	۱۶	۵۲	تهاجم عروقی
-	-	۱/۳۷۱ ۰	-۳/۳۳۶) ۱/۴۵۸ (۰/۶۳۷)	۱۳	۴۶	تهاجم عصبی
-	-	۱/۵۹۹ ۰	(۰/۳۵۰-۱/۸۳۱) ۰/۸۰۱	۱۰	۵۴	سن کمتر از ۵۰ سال

بیان EGFR در ۱۵ نفر (۱۴٪) از ۱۰۴ بیمار تریپل‌نگاتیو دیده شد. در تحلیل تک‌متغیری بقا، بیان EGFR در قیاس با عدم بیان آن به طور قابل توجهی با پیامد بدتر در زمینه بقای کلی (P value=0.010, HR=3.247) همراه بود در عین حال ارتباط معنی‌داری با بقا در آنالیز چندمتغیری همراه با متغیرهای IGF-1R, VEGFR-2, HIF-1 و تهاجم عروقی مشاهده شده است (P value=0.021, OD=3.240) (جدول ۳). ما هیچ ارتباط معنی‌داری بین بیان EGFR و دیگر پارامترهای کلینیکوپاتولوژیکال دیده نشد. بیان هم‌زمان EGFR با دیگر نشانگرها ارزیابی شد و هیچ نتیجه معنی‌داری پیدا نشد. سطوح قابل ردیابی HIF-1 (بیان بیش از ۱٪ سلول‌ها) در ۵۷ نمونه (۵۵٪) پیدا شد. رنگ آمیزی HIF-1 معمولاً ناهمگن بود و مخصوصاً در سلول‌های زنده ماندنی اطراف نکروز دیده شد.

تحلیل بقای تک‌متغیری برای تمامی بیماران ارتباط معنی‌داری بین بیان HIF-1 و بقای کلی نشان نداد با این وجود بیان آن با کاهش بقا همراه بود (HR=1.569) (جدول ۳). سطوح بالای HIF-1 با بیان شدید VEGFR-2 مرتبط بود (P-value=0.043). بیان VEGFR-2 در ۶۳ نفر از بیماران (۶۱٪) دیده شد، اما این بیان با مشخصه‌های کلینیکوپاتولوژیکال بیماران در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری را نشان نداد. به علاوه بقای کلی ارتباط مستقیم ولی غیرمعنی‌داری با بیان VEGFR-2 داشت که انتظار آن بر اساس بیولوژی گیرنده و مطالعات گذشته نمی‌رفت (۴) (جدول ۳). در این‌جا هیچ ارتباط معنی‌داری بین بیان IGF-1R با پارامترهای کلینیکوپاتولوژیک در ۱۰۴ بیمار تریپل‌نگاتیو شناسایی نشد. علاوه بر این، بقای کلی ارتباط معنی‌داری با بیان IGF-1R نداشت، با این وجود این بیان خطر مرگ را حدود ۳ برابر افزایش داد (جدول ۳).

## بحث

در مطالعه حاضر ما شاخص‌های اصلی و ارزش پیش‌آگهی دهنده‌ی عوامل کلینیکوپاتولوژیک و بیولوژیک مختلف را در یک گروه از موارد سرطان پستان تریپل‌نگاتیو جستجو کردیم.

مشابه مطالعات قبل، معمول‌ترین نوع هیستولوژیک، کارسینوم داکتال بود و اکثر تومورها دارای درجه بدخیمی III بودند (جدول ۲) (۲۰۱۰ و ۲۲). در این‌جا ارتباط مثبتی با اندازه تومور بزرگتر (T3, T4)، درگیری لنفی بیشتر (N2, N3)، درجه بدخیمی بالاتر (GIII)، تهاجم عروقی، حضور بالای EGFR، مرحله تومور در زمان پذیرش و پیامد بدتر در زمینه بقای کلی (OS) در تحلیل تک متغیری وجود داشت (جدول ۳). بنابراین تحلیل متغیرهای کلینیکوپاتولوژیک در این مطالعه، اطلاعات قبلی را تأیید می‌کند (۲۰۱۰ و ۲۳).

شیوع TNBC ۱۰ تا ۱۷ درصد سرطان‌های پستان را شامل می‌شود، با این حال اطلاعات بالینی در زمینه سرطان پستان تریپل‌نگاتیو در جمعیت‌های خاورمیانه محدود است (۹ و ۸، ۷). از بین ۹۲۳ مورد سرطان پستان در این مطالعه، ما ۱۰۴ (۱۱/۲٪) بیمار با فنوتیپ تریپل‌نگاتیو شناسایی کردیم.

در حال حاضر مدیریت جاری بالینی سرطان پستان تریپل‌نگاتیو با تکیه بر عوامل پیش‌آگهی دهنده متداول شامل وضعیت غدد لنفی، درجه هیستولوژیک تومور و اندازه اولیه تومور می‌باشد (۲۴ و ۲۵). به طور تاریخی، ارزیابی بیومارکرها برای پیش‌بینی پاسخ به درمان با هدف این پروتئین‌ها بسیار ارزشمند است.

بعضی مطالعات ارتباط مثبتی بین تکثیر افزایش یافته، درجه هیستولوژیک بد و سطوح بالای بیان HIF-1 $\alpha$  را که با پیش‌آگهی بد همراه است، نشان می‌دهند (۲۶). در مغایرت با دیگر مطالعات، در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین شاخص‌های پیش‌آگهی دهنده‌ی بالا و بیان HIF-1 $\alpha$  پیدا نشد. در ضمن چنین ارتباطی بین این بیان و بقای کلی وجود نداشت. مطالعات دیگر نشان می‌دهند که سطوح HIF-1 و ER در طی پیشرفت مراحل سرطان پستان افزایش می‌یابد (۲۶)، در این مطالعات بیماران هم ER مثبت و هم منفی بودند ولی در مطالعه حاضر فقط بیماران ER منفی حضور داشتند. به دلیل تفاوت جمعیت دو مطالعه نتایج متفاوتی حاصل شده و در مطالعه حاضر چنین ارتباطی دیده نشد.

موارد سرطان پستان تریپل‌نگاتیو، به طور گسترده بیان افزایش یافته EGFR دارند و این مشخصه در بسیاری از مطالعات با پیش‌آگهی بد ارتباط داشته است و این به عنوان یک هدف بالقوه و امید بخش درمانی قابل ارائه می‌باشد (۴). با این حال این درمان‌ها در بسیاری از رژیم‌های درمانی هیچ سودی ندارند. در این مطالعه افزایش بیان EGFR در بیماران TNBC در تحلیل تک‌متغیری و چندمتغیریا کاهش بقا مرتبط است (جدول ۳)، و این امر نشان دهنده یک فاکتور پیش‌آگهی دهنده برای سرطان پستان تریپل‌نگاتیو می‌باشد که امید به درمان هدف‌دار را افزایش می‌دهد.

حضور یک مسیر انتقال پیام عملکردی IGF در سلول‌های پستان غیرپاسخگو به استروژن، بحث‌انگیز بوده و توجه کمی را به خود جلب کرده است. یک مطالعه گزارش داده است که سلول‌های غیرپاسخگو به استروژن به IGFs پاسخ تکثیری داده‌اند، اما جمع‌بندی بیشتر مطالعات بر این است که این سلول‌ها، پاسخ میتوزنیکی به IGFها نشان نمی‌دهند (۲۷ و ۲۸). بیان مرتبط بالای

گیرنده‌های IGF در سلول‌های سرطان پستان تریپل‌نگاتیو در دیگر مطالعات پیشنهاد می‌کند که مسیر انتقال پیام IGF ممکن است در کنترل تکثیر سلول و بقای سلول در این نوع از سرطان پستان مهم باشد (۱۶). در اکثر این مطالعات بیان ژن گیرنده به روش PCR مورد بررسی قرار گرفته است، اما در مطالعه حاضر بیان پروتئین در سطح سلول‌های تریپل‌نگاتیو بررسی شده و افزایش بیان IGF-1R با کاهش بقای کلی همراه بوده و لیارتباط معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳). بنابراین نتایج ما پیشنهاد می‌کند که این مطالعه با جمعیت بزرگتر و روش‌های دیگر تکرار شود.

در اینجا ارتباط معنی‌داری بین افزایش بیان VEGFR-2 و بقای کلی در گروه بیماران ما به صورتی که در جدول ۳ نشان داده شده است، وجود ندارد. برای ما مشخص نشد که چرا بیان این گیرنده با افزایش بقا همراه بود، با این وجود نیاز به ارزیابی این گیرنده در گروه تریپل‌نگاتیو با جمعیت بیشتر و روش‌های دیگر وجود دارد.

محدودیت‌های اصلی ما در تحلیل بالینی بلوک‌های پارافینی شامل فرآیند طبیعی زمان بر و سنگین و هم‌چنین حجم محدود نمونه بیمار بود.

### جمع‌بندی

در مجموع سرطان پستان تریپل‌نگاتیو، گروهی از بیماران با چالش درمان، بیماری با طبیعت مهاجم و پیش‌آگهی بد را ارائه می‌کند. چندانگی‌ای که در این زیرگروه از سرطان پستان نشان داده شده است، تدبیر درمانی واحد را غیر واقعی کرده است. شناسایی بیومارکرهای معتبر و در پی آن گسترش درمان‌های هدفمند باید از ریشه کارآزمایی‌های آینده در این جمعیت بیماران ناشی شود. VEGFR-2، HIF-1 $\alpha$ ، EGFR و IGF-1R هدف‌های درمانی هیجان‌انگیزی را ارائه می‌کنند که یک سری از کارآزمایی‌های بالینی بر روی منفعت بالقوه مهارکننده‌های آن‌ها در زنان مبتلا به TNBC در حال انجام است. مسیر متداول مدیریت سرطان پستان همیشه بر سر استفاده از درمان‌های هدفمند حتی قبل از شناسایی هدف‌ها درگیر بوده است. استفاده از درمان هورمونی در ابتدا بر اساس مشاهده بالینی، بسیار پیش از شناسایی گیرنده استروژن، وجود داشت. در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین بیان EGFR و بقای کلی بیماران دیده شد ولی برای سه بیومارکر دیگر یاد شده بالا چنین ارتباطی دیده نشد. در عین حال مهم‌ترین عامل در بقای کلی بیماران تریپل‌نگاتیو، مرحله بیماری در هنگام پذیرش است.

مطالعاتی مانند این مطالعه راهی منطقی به سمت شناسایی یک هدف خوب پیش از انجام یک کارآزمایی گران است. باید در ذهن داشت که:

- ۱- ظهور یک پروتئین بر سطح سلول می‌تواند از بیان ژن مربوط به آن پروتئین کاملاً مستقل باشد.
- ۲- مهار یک گیرنده سطح سلول با یک آنتی‌بادی منوکلونال به معنی مهار رونویسی ژن نمی‌باشد.

از آن‌جا که بررسی حضور پروتئین در سطح سلول فرآیندی است که عوامل مختلفی در آن تأثیر دارد، شاید بررسی ژن‌کد-کننده این پروتئین با روش‌های PCR، FISH و cDNA بتواند در مطالعات آینده رابطه‌ای بین آن و بقای کلی بیماران سرطان پستان تریپل‌نگاتیو نشان دهد.

## تقدیر و تشکر

این مطالعه با بودجه پژوهشی جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران به انجام رسید. از همکاری آقایان دکتر مسعود حبیبی، دکتر حسین بختو و هم‌چنین راهنمایی‌های خانم‌ها دکتر شهپر حقیقت، دکتر ماندانا ابراهیمی و ندا مهرداد از پژوهشکده سرطان پستان، کمال تشکر را داریم. همکاری کارکنان گروه پاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی انستیتو کانسر، کارکنان گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی تهران، خانم دکتر مجد از گروه ایمونوپاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران (ایران) و کارکنان بایگانی انستیتو کانسر را قابل تقدیر می‌دانیم.

## Reference

1. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 378:1461-84.
2. Sorlie T, Perou C, Tibshirani R. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguishes tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869–10874.
3. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5367–5374.
4. Ryde L, Jirstrom K, Haglund M, Stal O, Ferno M. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120:491–498.
5. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2329–2334.
6. Greenberg S, Rugo HS. Triple-Negative Breast Cancer: Role of Antiangiogenic Agents. *Cancer J* 2010; 16: 33–38.
7. Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, et al. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113:357-370.
8. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-Negative, progesterone receptor (PR)-negative and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer registry *Cancer* 2007; 109:1721-1728.
9. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African- American and Caucasian patients. *Cancer* 2007; 110:876-884.
10. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *CANCER* 2007; 109: 25-32.
11. Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, et al. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol* 2008; 26:1810–1816.

12. Pal SK, Mortimer J. Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions. *Maturitas* 2009; 63:269–274.
13. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK. TBCRC 001: EGFR inhibition with cetuximab added to carboplatin in metastatic triple-negative (basal-like) breast cancer. *J Clin Oncol* 26 (Suppl). (2008) (Abstr 1009)
14. Ryan PD, Goss PE. The emerging role of the insulinlike growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist* 2008; 13:16–24.
15. Jones HE, Goddard L, Gee JM, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *EndocrRelat Cancer* 2004; 11:793–814.
16. Heskamp S, Van Laarhoven HW, Molkenboer-Kuenen JD, et al. ImmunoSPECT and ImmunoPET of IGF-1R Expression with the Radiolabeled Antibody R1507 in a Triple-Negative Breast Cancer Model. *JurNurs Med* 2010; 51:1565-72.
17. Kallergi G, Markomanolaki M, Giannoukaraki V, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer Patients. *Breast Cancer Research* 2009; 11:R84.
18. Ban HS, Uno M, and Nakamura H. Suppression of hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  accumulation by VEGFR inhibitors: Different profiles of AAL993 versus SU5416 and KRN633. *Cancer Letters* 2010; 296: 17–26.
19. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J BiochemMolBiol* 2006; 39: 469–478.
20. Wilhelm S.M, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet J.M, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both RAF and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Threat* 2008; 7: 3129–3140.
21. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5407–5414.
22. Thike AA, Cheok PY, Jara Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Modern Pathology* 2010; 23, 123–133.
23. Rhee J, Han SW, Oh DY, et al. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer Published: *BMC Cancer* 2008; 8:307.
24. Torrisi R, Balduzzi A, Ghisini R, et al. Tailored preoperative treatment of locally advanced triple negative (hormone receptor negative and HER2 negative) breast cancer with epirubicin, cisplatin, and infusional fluorouracil followed by weekly paclitaxel. *Cancer ChemotherPharmacol* 2008; 62:667– 672.
25. Ellis GK, Green SJ, Russell CA. SWOG 0012, a randomized phase III comparison of standard doxorubicin (A) and cyclophosphamide (C) followed by weekly paclitaxel (T) versus weekly doxorubicin and daily oral cyclophosphamide plus G-CSF (G) followed by weekly paclitaxel as neoadjuvant therapy for inflammatory and locally advanced breast cancer. *J ClinOncol* 2006; 24:LBA537.
26. ReinhardBos, Paul J van Diest, Petra van der Groep. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related Published. *Breast Cancer Res* 2004, 6:450-459.

27. Hartog H, Wesseling J, Boezen HM, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future. *Eur J Cancer* 2007; 43:1895–1904.
28. Molloy CA, May FE, Westley BR. Insulin receptor substrate-1 expression is regulated by estrogen in the MCF-7 human breast cancer cell line. *J BiolChem* 2000; 275:12565–12571.