

# بررسی دانسیته عروق ریز و فاکتور رشد اندوتلیال رگی در کارسینوم‌های مهاجم پستان

## با روش مارکر ایمنو هیستوشیمی و مقایسه آن با پارامترهای کلینیکوپاتولوژیک

### چکیده

زمینه و هدف: آنژیوژنز نقش مهمی در رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی و متاستاز سرطان پستان داشته و یک وسیله پیش بینی کننده بقا فرد مبتلا می‌باشد. این پروسه توسط فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) کنترل می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی پروسه آنژیوژنز از طریق تعیین مارکر VEGF و میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) بر اساس ایمنو هیستوشیمی در بیماران مبتلا به سرطان پستان مهاجم و مقایسه بروز VEGF با دانسیته عروقی ریز (MVD) و دو فاکتور ذکر شده با گرید (staging, grading)، سن بیماران، درگیری غدد لنفاوی و مارکرهای ایمنو هیستوشیمی گیرنده استروژنی ER، گیرنده پروژسترونی PR، Ki-67، Her-2 و P53 است.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی تحلیلی پس از بررسی فایل آزمایشگاه بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) و آتیه طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶، ۷۴ تومور پستان مهاجم وارد مطالعه شدند. پس از تهیه لام، رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی از نظر مارکر VEGF و CD31 انجام گرفت و پس از ارزیابی نتایج آن از نظر رنگ پذیری و نحوه آن، داده‌های دموگرافیک نیز جمع آوری شد، داده‌ها وارد رایانه گردید و مورد آنالیز آماری قرار گرفت. یافته‌ها: متوسط سنی بیماران  $59/4 \pm 11/94$  سال بود. در مورد دانسیته عروقی (MVD) بیومارکر CD31 بررسی شد که بین  $5/6$  و  $10/6$  متغیر بود ( $Mean \pm SD$   $37/39 \pm 17/90$ ) و میانه آن نیز  $34/3$  بود که این عدد به عنوان cut off در نظر گرفته شد. مواردی که متوسط CD31 آن‌ها زیر این میزان بود بعنوان میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) کم و مواردی که CD31 آن‌ها بالای این میزان بود میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) بالا در نظر گرفته شدند که بر این اساس ۳۷ مورد (۵۲/۱٪) میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) پایین و ۳۴ مورد (۴۷/۹٪) نیز میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) بالا بودند.

در مورد VEGF نیز ۵۷ مورد (۷۷٪) مثبت و ۱۷ مورد (۲۳٪) منفی بودند. بین متوسط میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) و VEGF ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $Spearman r=0.24$  and  $P=0.041$ ). در آنالیز تحلیلی ارتباط VEGF و میزان دانسیته عروقی ریز (MVD) با فاکتورهای زمینه‌ای سن، گرید هیستولوژیک و گرید هسته، درگیری لنفاوی، سایز تومور، stage، رسپتور استروژن، رسپتور پروژسترون، HER2/Neu، Ki-67، P53 مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصله نشان داد ارتباط معنی‌داری بین متغیرهای یاد شده وجود ندارد. نتیجه‌گیری: طبق نتایج مطالعه حاضر VEGF در تحریک آنژیوژنز در تومورهای مهاجمی پستان نقش دارد. همچنین با توجه به نتایج این مطالعه ارتباطی بین VEGF و دانسیته عروقی ریز (MVD) با فاکتورهای پروگنوزی هیستوپاتولوژیک و سن و نیز بیومارکرهای ER، PR، HER2/Neu، Ki-67، P53 بدست نیامد. از آنجا که هیچ رابطه معنی‌داری بین P53 و HER2/Neu با VEGF بدست نیامد لذا به نظر می‌آید فاکتورهای دیگری در تنظیم بیان VEGF نقش داشته باشند.

کلیدواژه‌ها: ۱- سرطان پستان مهاجم ۲- CD31 ۳- فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) ۴- دانسیته عروقی ریز (MVD)

\*دکتر مریم کدیور I

دکتر علی اسماعیلی II

دکتر آزاده جولایی III

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۹

### مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان در زنان می‌باشد که بعد از سرطان ریه مقام دوم را از نظر مورتالیته و مورییدیته دارا می‌باشد. در آمریکا سالانه ۱۰۰۰۰۰ مورد جدید بیماری تشخیص داده می‌شود و حدود

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای دکتر علی اسماعیلی جهت دریافت درجه دکترای تخصصی پزشکی به راهنمایی دکتر مریم کدیور و مشاوره دکتر آزاده جولایی، سال ۱۳۸۷.

(I) دانشیار پاتولوژی، بخش پاتولوژی بیمارستان رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (\* مؤلف مسؤول)

(II) دستیار پاتولوژی، بخش پاتولوژی بیمارستان رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

(III) استادیار جراحی، بیمارستان مهدیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳۰۰۰۰ بیمار در اثر این سرطان فوت می کنند. امروزه بعلت استفاده گسترده از ماموگرافی میزان تشخیص سرطان پستان بالا رفته که بیشتر آن‌ها در stage های پایین تشخیص داده می شوند، ولی با اینحال هیچگونه کاهش مشخص در مرگ و میر ناشی از سرطان پستان مشاهده نشده است.<sup>(۱)</sup>

فاکتورهای مختلفی در پیش آگهی و میزان بقای فرد مبتلا به سرطان پستان دخیل است که از جمله آن‌ها می‌توان grading و staging را نام برد. Grading که شامل میزان تمایز سلولی و میتوز سلولی است دارای اهمیت کمتری نسبت به staging است که دربرگیرنده اندازه تومور، متاستاز به غدد لنفاوی و متاستاز دوردست می‌باشد. علاوه بر فاکتورهای فوق، نقش سن، وضعیت گیرنده‌های استروژنی و پروژسترونی، Erb2 و DNA پلوییدی هم بعنوان فاکتورهای مشخص کننده پیش آگهی کاملاً مشخص شده است.<sup>(۱)</sup>

امروزه مطالعات مختلفی بر روی اندازه‌گیری VEGF و نقش آن در ایجاد آنژیوژنز که توسط microvessel density (MVD) نشان داده می شود و اثر آن در پیش آگهی سرطان پستان در افراد و سنین مختلف و در حضور یا عدم حضور متاستاز غدد لنفاوی صورت گرفته است. اگرچه برخی مطالعات بیانگر ارتباط مستقیم بین VEGF با دانسیته عروقی ریز MVD و میزان بقای فرد مبتلا و درگیری غدد لنفاوی بوده است، لیکن سایر مطالعات هیچگونه ارتباطی بین این دو فاکتور و وضعیت درگیری غدد لنفاوی، grading و یا اندازه تومور نشان نداده‌اند.<sup>(۲، ۳، ۴)</sup>

VEGF یکی از فاکتورهای بسیار قوی و مؤثر در آنژیوژنز در سرطان پستان می باشد و بسیاری از مطالعات بیانگر آن است که تظاهر بیش از حد VEGF همراه با افزایش بیش از حد رگ‌زایی در سرطان‌هاست.<sup>(۸، ۹، ۱۰-۱۱)</sup> از آنجا که آنژیوژنز نقش مهمی در رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی و متاستاز

سرطان بر عهده دارد و غالب مطالعات بیانگر آن است که آنژیوژنز در سرطان پستان یک وسیله پیش بینی کننده بقا فرد مبتلا می‌باشد لذا در این مطالعه بر آن شدید که میزان بیان VEGF در سرطان مهاجم پستان و ارتباط آن با آنژیوژنز (MVD) را بررسی کنیم. بعضی از مطالعات نشان می دهد که آنکوژنها در تنظیم بیان فاکتورهای دخیل در آنژیوژنز نقش دارند. به عنوان مثال دیده شده است که موتاسیون در P53 ممکن است نقش بزرگی در تنظیم و افزایش VEGF داشته باشد.<sup>(۳)</sup> علاوه بر آن بعضی از مطالعات همین نقش را برای آمپلیفیکاسیون Her-2/neu قائلند.<sup>(۱۱)</sup> این مطالعه در نظر دارد با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی IHC، به بررسی میزان بیان VEGF و ارتباط آن با MVD و سایر پارامترهای staging، grading، سن بیمار، درگیری غدد لنفاوی و مارکرها ایمونوهیستوشیمی ER، PR، Ki-67، Her-2 و P53 بپردازد.

### روش بررسی

در این مطالعه مقطعی تحلیلی بیماران مبتلا به سرطان مهاجم پستان که تحت جراحی ماستکتومی قرار گرفته‌اند جامعه پژوهش این مطالعه را تشکیل می‌دادند. نمونه پژوهش نیز شامل کلیه موارد یاد شده در فاصله سال‌های ۸۲ تا ۸۶ می‌شد که پرونده بالینی کامل یا نسبتاً کامل داشته و دارای بلاک بافتی در بخش پاتولوژی بودند.

پس از هماهنگی بلاک‌های پارافینه نمونه ماستکتومی موارد مبتلا به سرطان مهاجم پستان موجود در بخش پاتولوژی مشخص و طبق مشخصات، پرونده بالینی آنها نیز استخراج گردید و اطلاعات مورد نظر شامل staging، grading، سن و نتایج هیستوپاتولوژی و اطلاعات مربوط به مارکرها ایمونوهیستوشیمی ER، PR، Ki-67، Her-2 و P53 از پرونده بالینی استخراج و ثبت گردید. از بلوک‌های پارافینه یاد شده برش‌های به ضخامت ۴ میکرون تهیه و سپس طبق روش IHC استرپتاویدین-

MVD بر اساس تعداد عروق ریز در میلیمتر مربع ( $\text{mm}^2$ ) از طریق رنگ پذیری سلول های اندوتلیال برای مارکر CD31 مشخص می گردد. هر سلول رنگ شده قهوه ای اندوتلیال جدا از سلول های اندوتلیال رنگ شده دیگر و سایر سلول های استرومایی به عنوان یک عروق ریز شناخته می شود (شکل شماره ۲). عروق بزرگ با دیواره ضخیم در ارزیابی شمارش نمی گردد و وجود لومن برای ارزیابی MVD ضروری نیست.

در هر مورد میزان بروز، CD31 در ۳ منطقه با بیشترین شدت رنگ پذیری (با بزرگنمایی 100x) در نظر گرفته می شد (hot spot) و در هر منطقه، تمام عروق کوچک رنگ گرفته شده با مارکر CD31، با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 200x شمارش می شد. اعداد بدست آمده در هر ۳ منطقه ثبت می گردید و میانگین گرفته می شد.

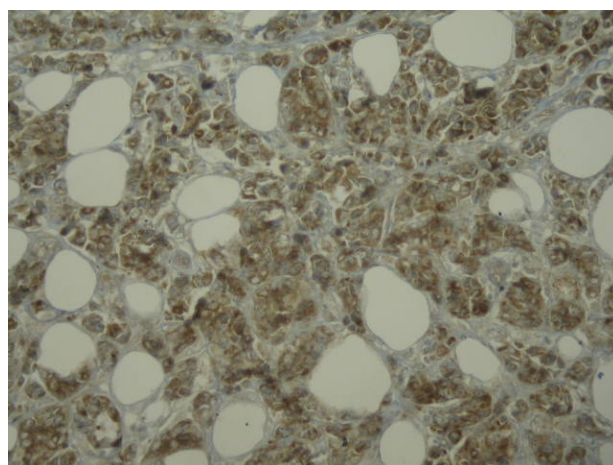
با استفاده از نرم افزار SPSS v.12، بخش توصیفی داده ها مورد آنالیز توصیفی قرار گرفت. در آنالیز تحلیلی از تست های T student و Chi2 استفاده شد و مقادیر P زیر ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

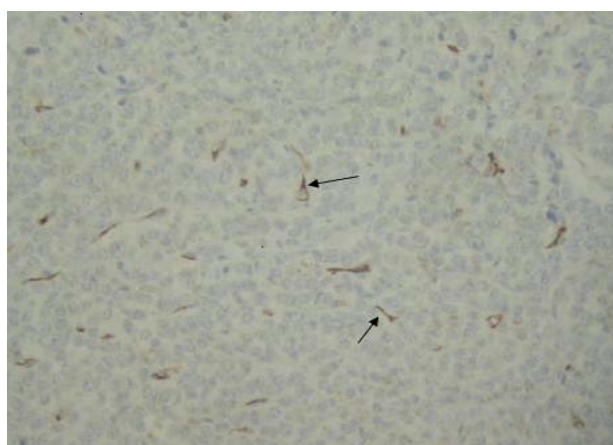
در این مطالعه مقطعی تحلیلی که به منظور بررسی ارتباط VEGF و CD31 با سن، گرید، stage و بیومارکرهای دیگری چون ER، PR، Her2/neu و P53 در بیماران مبتلا به سرطان پستان مهاجم انجام شد، ابتدا ۱۰۰ مورد وارد مطالعه شدند که بعلت مسائلی چون کیفیت پایین اسلایدها، نبودن اطلاعات کامل در برخی پرونده ها و نبودن جزء مهاجم سرطان در برخی اسلایدها، تعداد ۲۶ مورد از مطالعه حذف شدند و در نهایت ۷۴ مورد بررسی شدند.

متوسط سنی بیماران  $51.94 \pm 9.4$  سال بود (نمودار شماره ۱). ۱۳ مورد (۱۷/۶٪) زیر ۴۰ سال، ۳۱ مورد (۴۱/۹٪) بین ۴۰ و ۵۰ سال و ۳۰ مورد (۴۰/۵٪) بالای ۵۰ سال سن داشتند.

بیوتین لام ها برای CD31 و VEGF بطور جداگانه رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، توسط یک پاتولوژیست باتجربه جهت ارزیابی VEGF سلول های تومورال رنگ گرفته توسط مارکر VEGF بر اساس شدت رنگ پذیری (intensity) و تعداد سلول های رنگ گرفته از کل تومور (درصد) ارزیابی می گردید و هر یک از این دو عامل به ۳ درجه [I(0-25%), II(25-50%), III(>50%)] یا (خفیف، متوسط و شدید) تقسیم می گردید. سپس مجموع درجات داده شده که عددی بین صفر تا ۶ بود، اساس معیار مثبت یا منفی بودن این مارکر می شد. به نحوی که اگر مجموع درجات بین عدد ۱ تا ۳ بود، نمونه منفی و در صورتی که بین ۴ تا ۶ بود، مارکر VEGF در تومور مثبت می شد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- VEGF مثبت رنگ آمیزی شده



شکل شماره ۲- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی با آنتی بادی ضد CD31. فلش ها نمایانگر تشکیل عروق ریز در بافت سرطانی هستند.

جدول شماره ۱- بررسی ارتباط VEGF و MVD با متغیرهای زمینه‌ای

P	MVD high		MVD low		P	VEGF-		VEGF+		
	درصد	تعداد	درصد	تعداد		درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۰/۲۵	۹/۹	۷	۸/۵	۶	۰/۳۴	۱۰/۸	۸	۶/۸	۵	زیر ۴۰ سال ۴۰ تا ۴۹ سال ۵۰ سال و بالاتر
	۲۳/۹	۱۷	۱۸/۳	۱۳		۳۳/۸	۲۵	۸/۱	۶	
	۱۴/۱	۱۰	۲۵/۴	۱۸		۳۲/۴	۲۴	۸/۱	۶	
۰/۴۲	۳/۱	۲	۶/۳	۴	۰/۵۵	۷/۵	۵	۱/۵	۱	I II III unknown
	۳۲/۸	۲۱	۳۹/۱	۲۵		۵۶/۷	۳۸	۱۳/۴	۹	
	۷/۸	۵	۷/۸	۵		۱۱/۹	۸	۶	۴	
	۳/۱	۲	.	.		۱/۵	۱	۱/۵	۱	
۰/۴۸	۴/۷	۳	۴/۷	۳	۰/۶۹	۷/۵	۵	۱/۵	۱	I II III unknown
	۱۸/۸	۱۲	۹۲/۱	۱۴		۲۹/۹	۲۰	۱۰/۴	۷	
	۳/۲۰	۱۳	۲۶/۶	۱۷		۳۸/۸	۲۶	۹	۶	
	۳/۱	۲	.	.		۱/۵	۱	۱/۵	۱	
۰/۵۰	۱۵/۵	۱۱	۲۲/۵	۱۶	۰/۱۱	۳۲/۴	۲۴	۸/۱	۶	صفر ۱-۳ ۴-۹ ۹ و بیشتر نامعلوم
	۷	۵	۱۲/۷	۹		۱۰/۸	۸	۸/۱	۶	
	۵/۶	۴	۴/۲	۳		۵/۴	۴	۴/۱	۳	
	۱۲/۷	۹	۷	۵		۱۷/۶	۱۳	۱/۴	۱	
۰/۰۹	۹/۹	۷	۲۲/۹	۱۷	۰/۳۱	۲۷	۲۰	۸/۱	۶	2cm و کمتر 2-5cm 5cm و بیشتر نامعلوم
	۲۸/۲	۲۰	۱۹/۷	۱۴		۳۷/۸	۲۸	۹/۵	۷	
	۹/۹	۷	۷	۵		۱۲/۲	۹	۴/۱	۳	
	.	.	۱/۴	۱		.	.	۱/۴	۱	
۰/۱۴	۴/۲	۳	۱۶/۹	۱۲	۰/۰۶	۱۷/۶	۱۳	۴/۱	۳	I IIA IIB IIIA IIIB IIIC
	۱۹/۷	۱۴	۱۵/۵	۱۱		۲۹/۷	۲۲	۶/۸	۵	
	۵/۶	۴	۵/۶	۴		۶/۸	۵	۴/۱	۳	
	۵/۶	۴	۷	۵		۵/۴	۴	۶/۸	۵	
	.	.	.	.		.	.	.	.	
۰/۹۶	۴/۲	۳	۵/۶	۴	۰/۶۴	۹/۵	۷	۱/۴	۳	منفی ER مثبت نامعلوم
	۴۲/۳	۳۰	۴۵/۱	۳۲		۶۴/۹	۴۳	۱۸/۹	۱۴	
	۱/۴	۱	۱/۴	۱		۲/۷	۲	.	.	
۰/۹۹	۹/۹	۷	۱۱/۳	۸	۰/۶۵	۱۷/۶	۱۳	۶/۸	۵	منفی PR مثبت نامعلوم
	۳۶/۶	۲۶	۳۹/۴	۲۸		۵۶/۸	۴۲	۱۶/۲	۱۲	
	۱/۴	۱	۱/۴	۱		۲/۷	۲	.	.	
۰/۶۳	۳۱	۲۲	۲۸/۲	۲۰	۰/۴۰	۴۵/۹	۳۴	۱۰/۸	۸	منفی HER2 مثبت نامعلوم
	۱۵/۵	۱۱	۲۲/۵	۱۶		۲۸/۴	۲۱	۱۲/۲	۹	
	۱/۴	۱	۱/۴	۱		۲/۷	۲	.	.	
۰/۲۸	۵/۶	۴	۱۲/۷	۹	۰/۰۷	۹/۵	۷	۸/۱	۶	منفی Ki-67 مثبت نامعلوم
	۳۵/۲	۲۵	۲۹/۶	۲۱		۵۵/۴	۴۱	۱۰/۸	۸	
	۷	۵	۹/۹	۷		۱۲/۲	۹	۴/۱	۳	
۰/۹۹	۳۵/۲	۲۵	۳۸	۲۷	۰/۷۰	۵۴/۱	۴۰	۱۷/۶	۱۳	منفی P53 مثبت نامعلوم
	۱۱/۳	۸	۱۲/۷	۹		۲۰/۳	۱۵	۵/۴	۴	
	۱/۴	۱	۱/۴	۱		۲/۷	۲	.	.	

گرفته شد. مواردی که متوسط CD31 آنها زیر این میزان بود بعنوان MVD کم و مواردی که CD31 آنها بالای این میزان بود MVD بالا در نظر گرفته شدند که بر این اساس ۳۷ مورد (۵۲/۱٪) MVD پایین و ۳۴ مورد (۴۷/۹٪) نیز MVD بالا بودند. در مورد VEGF نیز ۵۷ مورد (۷۷٪) مثبت و ۱۷ مورد (۲۳٪) منفی بودند.

متوسط MVD در موارد VEGF-  $30/42 \pm 18/46$  و در موارد VEGF+  $29/42 \pm 17/45$  بود که اختلاف بین دو گروه معنی دار بود ( $P=0/041$  و  $Spearman r=0/24$ ). بنابراین ارتباط بین بروز VEGF و MVD وجود دارد. تومورهای حاوی VEGF در مقایسه با تومورهای فاقد این فاکتور دارای مقدار بیشتر MVD هستند.

در آنالیز تحلیلی ارتباط VEGF و MVD با فاکتورهای زمینه‌ای سن، گرید هیستولوژیک و گرید هسته‌ای، درگیری لنفاوی، سایز تومور، stage، رسپتور استروژن، رسپتور پروژسترون، HER2/Neu، Ki-67 و P53 مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصله نشان داد ارتباط معنی‌داری بین متغیرهای یاد شده وجود ندارد (جدول شماره ۱).

## بحث

آنژیوژنز نقش مهمی در متاستاز و رشد و پیشرفت تومور دارد.<sup>(۹)</sup> فاکتورهای رشد متفاوتی در این امر دخیل می‌باشند که یکی از این فاکتورها VEGF بوده که به عنوان یک فاکتور دخیل در آنژیوژنز در بسیاری از سرطانها شناخته شده است.<sup>(۹-۱۰)</sup> تعدادی از محققان نقش VEGF را در سرطان پستان مورد بررسی قرار داده و مشاهده کردند که این فاکتور یا VEGF mRNA در سرطانهای داکتال درجا و یا تهاجمی بیشتر از بافت غیر نئوپلاستیک است.<sup>(۹-۱۱)</sup> همچنین در سرطانهای تهاجمی داکتال ارتباط بین بیان مارکر VEGF و MVD که در اصل بیانگر وجود آنژیوژنز می‌باشد، دیده شده است. در مطالعه Lee و همکاران که به بررسی همراهی

نوع کارسینوم در ۷ مورد (۹/۵٪) لبولار و در ۶۷ مورد (۹۰/۵٪) نیز داکتال بود. سایز تومور در ۲۶ مورد (۳۵/۱٪) زیر ۲ سانتی متر، در ۳۵ مورد (۴۷/۳٪) ۲ تا ۵ سانتی متر، در ۱۲ مورد (۱۶/۲٪) ۵ سانتی متر و بالاتر بود و ۱ مورد (۱/۴٪) نیز سایز تومور نامعلوم بود.

تعداد عقده‌های لنفاوی درگیر در ۳۰ مورد (۴۰/۵٪) صفر، ۱۴ مورد (۱۸/۹٪) ۱ تا ۳ عقده، در ۷ مورد (۹/۵٪) ۴ تا ۹ عقده، در ۱۴ مورد (۱۸/۹٪) ۹ عقده و بالاتر و در ۹ مورد (۱۲/۲٪) نامعلوم بود.

Stage تومورهای مورد بررسی در ۱۶ مورد (۲۱/۶٪) I، در ۲۷ مورد (۳۶/۵٪) IIA، ۸ مورد (۱۰/۸٪) IIB، ۹ مورد (۱۲/۲٪) IIIA و ۱۴ مورد (۱۸/۹٪) نیز IIIC بود.

گرید هسته‌ای در ۶ مورد (۹٪) گرید I، ۴۷ مورد (۷۰/۱٪) گرید II، ۱۲ مورد (۱۷/۹٪) گرید III و ۲ مورد (۳٪) نامعلوم و ۷ مورد کارسینوم لبولار بود که قابل grading نبود. گرید هیستولوژیک نیز در ۶ مورد (۹٪) گرید I، ۲۷ مورد (۴۰/۳٪) گرید II، ۳۲ مورد (۴۷/۸٪) گرید III و ۲ مورد (۳٪) نامعلوم بود.

در بررسی بیومارکر ER مشخص شد ۱۰ مورد (۱۳/۵٪) منفی، ۶۲ مورد (۸۳/۸٪) مثبت و ۲ مورد (۲/۷٪) نامعلوم بود. در مورد PR ۱۸ مورد (۲۴/۳٪) منفی، ۵۴ مورد (۷۳٪) مثبت و ۲ مورد (۲/۷٪) نامعلوم بود. در مورد HER2 ۴۲ مورد (۵۶/۸٪) منفی، ۳۰ مورد (۴۰/۵٪) مثبت و ۲ مورد (۲/۷٪) نامعلوم بود. در مورد Ki-67 ۱۳ مورد (۱۷/۶٪) منفی، ۴۹ مورد (۶۶/۲٪) مثبت و ۱۲ مورد (۱۶/۲٪) نیز نامعلوم بود. در مورد P53 ۵۳ مورد (۷۱/۶٪) منفی، ۱۹ مورد (۲۵/۷٪) مثبت و ۲ مورد (۲/۷٪) نیز نامعلوم بود.

در مورد دانسیته عروقی بیومارکر CD31 ۷۱ مورد بررسی شد (۳ مورد بدلیل نامناسب بودن رنگ آمیزی لام جهت بررسی MVD حذف شدند) که بین ۵/۶ و ۱۰۶/۶ متغیر بود (Mean±SD  $37/39 \pm 17/95$ ) و میانه آن نیز ۳۴/۳ بود که این عدد به عنوان cut off در نظر

(حدود ۵۱) پایینتر می‌باشد.<sup>(۴)</sup>

همانطور که در نتایج این مطالعه مشاهده می‌شود بیشتر موارد بررسی شده (حدود ۸۰٪) VEGF را در سلول‌های تومورال بروز داده بودند و این در حالی است که تنها کمتر از نیمی از موارد MVD بالا داشتند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین بروز VEGF بافتی و MVD در این مطالعه وجود دارد که این یافته برخلاف مطالعه Ludovini و مطابق با نتایج مطالعات Adams, Lee و Callagy می‌باشد.<sup>(۳-۶)</sup>

در مطالعه حاضر ۵۷ مورد (۷۷٪) از سرطانهای پستان برای VEGF مثبت می‌باشد. تومورهای حاوی VEGF در مقایسه با تومورهای فاقد این فاکتور دارای مقدار بیشتری از MVD هستند که این نتیجه بیانگر این است که ایجاد و ترشح فاکتور VEGF توسط سلول‌های سرطانی در آنژیوژنز در سرطان پستان نقش دارد. اگر چه حضور سایر فاکتورهای آنژیوژنز را در ایجاد میکرووسل‌های جدید در سرطان تهاجمی پستان نباید نادیده گرفت همانطور که در مطالعه ما ۱۷ مورد (۲۳٪) از تومورهای تهاجمی پستان برای VEGF منفی بوده است.

فاکتورهای متعددی چون هورمون‌ها، فاکتور رشد و سیتوکین‌ها در تنظیم بیان فاکتور VEGF نقش دارند.<sup>(۱۷)</sup> از طرفی نقش انکوژن‌ها بعنوان کنترل‌کننده تظاهر فاکتور VEGF در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. موتاسیون در ژن P53 یکی از شایع‌ترین تغییرات ژنی است که در سرطان پستان دیده می‌شود و امروزه به نظر می‌آید که این موتاسیون در تنظیم بیان و ظهور فاکتور VEGF نقش دارد.<sup>(۳)</sup> القاء فاکتور VEGF از طریق مسیر Proteinase kinase C توسط ژن P53 موتاسیون یافته گزارش شده است.<sup>(۱۸)</sup> ارتباط بین موتاسیون P53 و تظاهر فاکتور VEGF در سرطانهایی مثل سرطان معده و سرطان کولورکتال گزارش شده است.<sup>(۱۹، ۲۰)</sup> از طرفی این ارتباط در مورد سرطانهایی مثل پروستات و کلیه مصداق ندارد.<sup>(۲۱ و ۲۲)</sup>

بیان VEGF و MVD در سرطان مهاجم داکتال پستان پرداخته اند، VEGF و MVD بطور مستقیم با هم پیوستگی داشتند. به عبارت دیگر در این مطالعه سرطانهای مهاجم پستان با VEGF مثبت دارای میزان MVD بیشتری در مقایسه با سرطانهای پستان VEGF منفی بوده اند. در این مطالعه به این نتیجه رسیده‌اند VEGF نقش مستقیمی در ایجاد آنژیوژنز دارد.<sup>(۳)</sup> در مطالعه Ludovini و همکارانش نقش پروگنوزی VEGF و MVD در مراحل ۱ و ۲ سرطان پستان ارزیابی شده است. هیچ ارتباط معنی‌داری بین VEGF و MVD در این مطالعه وجود نداشت. لذا به این نتیجه رسیده‌اند که احتمالاً فاکتورهای دیگری غیر از VEGF در ایجاد آنژیوژنز در سرطان پستان نقش دارد.<sup>(۴)</sup>

در مطالعه CALLAGY و همکارانش به مقایسه اهمیت VEGF بافت تومورال با VEGF سرمی و MVD در تعیین stage تومور در ۲۶ مورد سرطان پستان مهاجم (۲۴ مورد کارسینوم داکتال مهاجم و ۲ مورد سرطان پستان مهاجم لب‌ولار) پرداختند. آنها نتیجه گرفتند شمارش میکرووسل‌ها در بافت تومورال و نیز VEGF سرمی معیار مناسبی در مورد آنژیوژنز نمی‌باشد و نیز پیش‌بینی‌کننده مناسبی برای رفتار تومور نمی‌باشد ولی برای این منظور VEGF بافتی مارکر بسیار مناسب می‌باشد.<sup>(۵)</sup> Adams و همکاران نیز در مطالعه مشابهی به مقایسه VEGF بافتی و سرمی و نیز MVD در سرطان پستان پرداختند. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین VEGF بافتی و میزان MVD در تمام گروه‌های سرطان پستان (لوکالیزه و متاستاتیک) وجود داشت.<sup>(۶)</sup>

مطالعه حاضر نیز به منظور بررسی VEGF و MVD در موارد سرطان پستان مهاجم و بررسی رابطه بین این دو اندکس و وضعیت هیستوپاتولوژیک و سایر بیومارکرها انجام شد.

مطابق نتایج این مطالعه متوسط MVD حدود ۳۴ بوده است که از متوسط MVD در مطالعه Ludovini

در مطالعه‌ای که Lee و همکاران بر روی ۹۹ نمونه سرطان پستان انجام داده‌اند به بررسی همراهی بیان VEGF، P53 و MVD در سرطان مهاجم داکتال پستان پرداخته شده است. در این مطالعه VEGF و MVD بطور مستقیم با هم پیوستگی داشتند بروز VEGF نیز بطور معنی‌داری با P53 مرتبط بود. محققان در پایان نتیجه گرفتند VEGF در سرطان پستان مهاجم داکتال عامل ایجاد آنژیوژنز می‌باشد و P53 احتمالاً در تنظیم بروز VEGF دخالت دارد.<sup>(۳)</sup>

همچنین در مطالعه Linderholm و همکاران بر روی ۸۳۳ نمونه تهاجمی سرطان پستان ارتباط معنی‌داری بین موتاسیون P53 و VEGF دیده شده است. در مطالعه حاضر هیچ گونه ارتباطی بین VEGF و P53 مشاهده نگردیده است.<sup>(۳۳)</sup>

آمپلیفیکاسیون Her2/neu در ۲۰ تا ۳۰٪ از سرطان‌های مهاجم پستان دیده می‌شود در مطالعه Petit و همکاران و مطالعه Yen و همکاران دیده شده است که آمپلیفیکاسیون این ژن و پروتئین آن باعث افزایش میزان بازال VEGF شده و یا آنتی‌بادی بر علیه سلول‌های سرطانی مثبت برای Her 2/neu باعث کاهش VEGF می‌گردد با این وجود در این مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین بیان VEGF و Her2/neu مشاهده نگردید که این مطالعه همانند مطالعه Lee و همکاران می‌باشد.<sup>(۳۴،۳۵)</sup>

این مطالعه همچنین به بررسی ارتباط VEGF و MVD با فاکتور سن، گرید هسته‌ای، هیستولوژیک، درگیری لنفاوی، سایز تومور و stage تومور پرداخت که همانطور که در نتایج این مطالعه ملاحظه می‌شود هیچ ارتباط معنی‌داری در این رابطه بدست نیامد که این یافته نیز مشابه یافته‌های مطالعه Ludovini می‌باشد.<sup>(۴)</sup>

در مطالعه Ludovini و همکارانش هیچ یک از دو فاکتور VEGF و MVD در مراحل ۱ و ۲ سرطان پستان ارتباط معنی‌داری با فاکتورهای پروگنوز اثبات شده مثل

سن، سایز تومور، وضعیت لنفاوی و گرید هیستوپاتولوژیک نداشتند. همچنین ارتباطی بین MVD و VEGF با میزان بقای بدون عود و بقای کلی وجود نداشت. این مطالعه قادر به اثبات اثر تعیین پروگنوز برای VEGF و MVD در سرطان سینه مرحله ۱ و ۲ نبود.<sup>(۴)</sup>

در مطالعه Jong و همکارانش ارتباط معنی‌داری بین انواع روش‌های شمارش MVD و اندکس فعالیت میتوزی MAI، سایز تومور و مثبت بودن گره لنفی وجود نداشت.<sup>(۷)</sup>

در مورد سایر بیومارکرها شامل P53، Ki-67، ER، Her2/Neu و PR نیز مطالعه حاضر قادر به اثبات ارتباط این بیومارکرها با VEGF و MVD نیست. در مورد P53 تنها مطالعه Lee قادر به اثبات ارتباط این مارکر با VEGF بوده است ولی از حیث دیگر مارکرها شامل ER و PR در مطالعه Ludovini ارتباط بین ER و VEGF وجود داشت و نیز ارتباط بین MVD و Her2 در مطالعه مذکور نشان داده شده است که مطالعه حاضر از این حیث نیز تفاوت‌هایی با مطالعه مذکور دارد.<sup>(۴)</sup>

### نتیجه‌گیری

بعلت موربیدیتیه و مورتالیتیه بالای سرطان سینه مهاجم تحقیقات گسترده‌ای در جهت تعیین فاکتورهای پاسخ به درمان و پروگنوز انجام شده است. اما مطالعه حاضر بعلت بررسی همزمان چندین بیومارکر و نیز وضعیت هیستوپاتولوژیک منحصر به فرد است. VEGF بعنوان عامل مهم آنژیوژنز در موارد مطالعه شده در این بررسی بروز بالایی داشته است ولی متوسط MVD در این مطالعه از سایر مطالعات دیگر پایینتر بوده است. همچنین بین فاکتور آنژیوژنز VEGF و دانسیته عروقی در مطالعه حاضر و بیشتر مطالعات گذشته ارتباط وجود دارد که این نشانه تاثیر VEGF در تحریک آنژیوژنز در تومور و افزایش MVD است. در نهایت با توجه به نتایج این مطالعه ارتباطی بین VEGF و MVD با فاکتورهای پروگنوزی هیستوپاتولوژیک و سن و نیز بیومارکرها

VEGF بدست نیامد لذا به نظر می آید فاکتورهای دیگری در تنظیم بیان VEGF نقش داشته باشند.

PR.ER, HER2/Neu, Ki-67 و P53 بدست نیامد. از آنجا که هیچ رابطه معنی‌داری بین P53 و HER2/Neu با

## فهرست منابع

- 1- Rosai J. Breast. In: Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology, 9<sup>th</sup> edition, Edinburg: Mosby (Elsevier Inc). 2004. p. 1763-1876
- 2- De Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Hot spot microvessel density and mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology*. 2000; 36: 306-12
- 3- Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Kim YB, Lee MC, Park CS. Expression of vascular endothelial growth factor in invasive ductal carcinoma of the breast and the relation to angiogenesis and P53 and HER2-Neu protein expression. *Appl Immunohistochem mol morphol*. 2002; 10(4): 289-95
- 4- Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, Bellezza G, De Angelis V, Gori S, et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel densities in stages I and II breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2003; 81: 159-68
- 5- Callagy G, Dimitriadis E, Harmey J, Bouchier-Hayes D, Leader M, Kay E. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Immunohistochemistry and molecular morphology*. 2004; 8(2):104-9
- 6- Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer research*. 2000; 60: 2898-905
- 7- Tas F, Yavuz E, Aydiner A, Saip P, Disci R, Iplikci A, et al. Angiogenesis and p53 protein expression in breast cancer: prognostic roles and interrelationships. *Am J Clin Oncol*. 2000; 23(6): 546-53
- 8- Mylona E, Alexandrou P, Mpakali A, Giannopoulou I, Liapis G, Markaki S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors in invasive breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2007; 33(3): 294-300
- 9- Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005; 18(1): 143-52
- 10- Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Yagmurduur MC, Bal N, Demirhan B. Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: Correlations with prognostic parameters. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006; 25(3): 365-72
- 11- Chieng DC, Tabbara SO, Marley EF, Talley LI, Frost AR. Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in infiltrating lobular mammary carcinoma. *Breast J*. 2003; 9(3): 200-7
- 12- Valković T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjić N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch*. 2002; 440(6): 583-8
- 13- Callagy G, Dimitriadis E, Harmey J, Bouchier-Hayes D, Leader M, Kay E. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. *Immunohistochem Mol Morphol*. 2000; 8(2):104-9
- 14- Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. P53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2000; 89: 51-62
- 15- Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res*. 2001; 61(5): 2256-260
- 16- Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol*. 1997; 151: 1523-530
- 17- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol*. 1999; 72: 220-31
- 18- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. P53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression.



Oncogene. 1994; 9: 963-69

19- Kondo Y, Arai S, Furutani M, Onodera H, Chiba T, Imamura M. Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma. *Cancer*. 2000; 88: 1820-27

20- Saito H, Tujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Neoangiogenesis and relationship to nuclear p53 accumulation and vascular endothelial growth factor expression in advanced gastric carcinoma. *Oncology*. 1999; 57(2):164-72

21- Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Park CS, Lee MC. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma and the relation to angiogenesis and p53 protein expression. *J Surg Oncol*. 2001; 77: 55-60

22- Strohmeier D, Rössing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G, et al. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate*. 2000; 45: 216-24

23- Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. P53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2000; 89: 51-62

24- Yen L, You XL, Al Moustafa AE, Hynes NE, Mader S, Meloche S, et al. Heregulin selectively up regulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene*. 2000; 19: 3460-69

## *Evaluation of Microvessel Density and Vascular Endothelial Growth Factor in Invasive Breast Carcinoma via Immunohistochemistry and their Correlation with Clinicopathologic Parameters*

**\*M. Kadivar, MD<sup>I</sup>   A. Esmaili, MD<sup>II</sup>   A. Joolaei, MD<sup>III</sup>**

### *Abstract:*

**Background & Aim:** Angiogenesis has an important role in the progression and metastasis of breast cancer and is a predictor of patient's survival. This process is regulated by vascular endothelial growth factors (VEGF). The purpose of the present study is to determine the angiogenesis process through the evaluation of the relationship between MVD and VEGF based on immunohistochemistry in patients with invasive breast carcinoma and study their correlation with grading, staging, age, lymph node involvement and biomarkers including estrogen receptor(ER), progesteron receptor (PR), Ki-67, HER2 and P53.

**Patients and Method:** In this analytical cross-sectional study, after searching among paraffin embedded blocks in Pathology Ward of Hazrat Rasool-e-Akram and Atieh hospitals between 2004 and 2007, 74 blocks were included in the study and immunohistochemistry staining for biomarkers VEGF and CD31 were done, and the results were compared with ER, PR, Ki-67, HER2 and P53, age, lymph node involvement, histologic grade, and stage. Demographic information was gathered from the patients' files. Data was analyzed by SPSS v.12 software.

**Results:** The mean age of the patients was 49.4±11.94 years. The mean of CD31 was between 5.6 and 106.6(37.39±17.95) and the median of CD31 was 34.3, which was assumed as cut-off. Based on this value, 37cases(52.1%) were considered as low MVD and 34 cases(47.9%) as high MVD. 57 cases (7%) were VEGF positive and 17 cases (23%) were VEGF negative. Between mean MVD and VEGF was a significant correlation (Spearman  $r=0.24$  and  $P=0.041$ ), which means VEGF as an angiogenesis factor plays a role in increasing MVD. There was no significant relation between VEGF and MVD and age, histologic grade, nuclear grade, lymph node involvement, tumor size, stage, ER, PR, HER2/Neu, Ki-67 and P53.

**Conclusion:** Based on the results of this study, VEGF plays a role in promoting angiogenesis. With respect to the results of this study, there is no significant relationship between VEGF and MVD and histopathological prognostic factors, age, and biomarkers of ER, PR, HER2/Neu, Ki-67 and P53.

**Key Words:** 1) Invasive Breast Carcinoma    2) CD31    3) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)    4) Microvessel Density (MVD)

*This article is an abstract of Mr.Esmaili's thesis advised by Dr.Kadivar and read by Dr.Joolaei in partial fulfillment of a medical doctor's degree.*

*I) Associate Professor of Pathology. Pathology Department. Rasool-e-Akram Hospital. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (\*Corresponding Author)*

*II) Resident of Pathology. Pathology Department. Rasool-e-Akram Hospital. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

*III) Assistant Professor of Surgery. Mahdijeh Hospital. Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

