



بررسی ارزش بالینی سیتوکراتین ۱۹ در تشخیص سرطان پستان

بهناز بکائیان^۱، مهرا ن غلامین^{۳*}، سید عباس طباطبایی یزدی^۴، محمد ناصر فرقانی^۵

۱- گروه ژنتیک مولکولی - واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی - مرودشت - ایران.

۲- گروه ژنتیک مولکولی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات فارس - فارس - ایران.

۳- گروه علوم آزمایشگاهی - دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - مشهد - ایران.

۴- گروه پاتولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - مشهد - ایران.

۵- مرکز تحقیقات جراحی سرطان - دانشگاه علوم پزشکی مشهد - مشهد - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۹

چکیده

مقدمه: شیوع روبه افزایش و میزان بالای مرگ ناشی از سرطان پستان ضرورت شناخت ساز و کار مولکولی را به امری مهم مبدل ساخته است. از آنجا که درگیری غدد لنفاوی زیر بغل یک عامل پیش‌گویی‌کننده مهم محسوب می‌شود لذا شناسایی بیومارکرهای اختصاصی برای تشخیص زودهنگام درگیری غدد لنفاوی در بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌تواند میزان پاسخ به درمان و در نهایت شانس بقا در بیماران را افزایش دهد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۵۴ غده لنفاوی نگهبان منفی بر اساس جواب پاتولوژی و ۱۰۶ غده لنفاوی نگهبان با درگیری متاستاتیک از نمونه‌های پارافینه مورد بررسی قرار گرفت. مارکر سیتوکراتین ۱۹ (CK19) به‌عنوان نشانگر متاستاز در غدد لنفاوی استفاده شد و میزان بیان آن توسط تکنیک qPCR (Real-time PCR) و روش کمی‌سنجی مطلق ارزیابی شد.

نتایج: با تحلیل نتایج به‌دست آمده از دو گروه بیماران دارای غدد لنفاوی مثبت و منفی مشخص شد که بیان سیتوکراتین ۱۹ در نمونه‌های مثبت نسبت به نمونه‌های منفی افزایش یافته است ($P=0/005$) همچنین سطح زیر منحنی ROC (AUC) با $P=0/006$ معنی‌دار بود. با توجه به CUT OFF ۲۵۰، اختصاصیت و حساسیت به‌دست آمده برای سیتوکراتین ۱۹ به‌ترتیب ۶۳٪ و ۸۹٪ می‌باشد. نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده این است که مقادیر بالاتر سیتوکراتین ۱۹ با عمق تهاجم (T) بیشتر، درگیری گره لنفاوی نگهبان و مرحله بالاتر بیماری مرتبط است.

نتیجه‌گیری: به‌منظور کاهش نتایج منفی کاذب سنجش همزمان سیتوکراتین ۱۹ در کنار روش‌های متداول تشخیصی حین عمل توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، غدد لنفاوی نگهبان، سیتوکراتین ۱۹.

*نویسنده مسئول: مشهد، پردیس دانشگاه فردوسی، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، تلفن: ۲۰-۹۸۵۱۳۸۸۴۶۷۱۰، نمابر: ۹۸۵۱۳۸۸۴۶۷۲۸، Email: GholaminM@mums.ac.ir

ارجاع: بکائیان بهناز، غلامین مهرا ن، طباطبایی یزدی سیدعباس، فرقانی محمدناصر. بررسی ارزش بالینی سیتو کراتین ۱۹ در تشخیص

سرطان پستان. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛ ۱۵(۳): ۲-۱۰.

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است و علت اصلی مرگ و میرهای ناشی از سرطان را در سنین ۵۹-۲۰ سالگی به خود اختصاص می‌دهد (۱). سرطان پستان با شیوع ۲۶٪ مسئول ۱۴٪ از مرگ و میر وابسته به سرطان در زنان است (۲).

شایع‌ترین محل درگیری در سرطان پستان غدد لنفاوی زیر بغل (آگزیلاری) است و بیش از ۵۰٪ سرطان‌های پستان با درگیری لنف نودهای آگزیلاری همراه می‌باشند. وضعیت غدد لنفاوی زیر بغل نقش مهمی را در تعیین بقای بیماران، پیش‌آگهی بیماری و کمک به پزشکان برای تصمیم‌گیری در مورد مناسب‌ترین روش جراحی ایفا می‌کند. تعیین نوع تکنیک جراحی وابسته به درگیری غدد لنفاوی می‌باشد (۳).

گره لنفاوی نگهبان اولین غده‌ای است که لنف حاوی تومور به آن تخلیه و سپس از طریق مجاری لنفاتیک به غدد دیگر موجود در زنجیره لنفاوی زیر بغل تخلیه می‌گردد (۴). گاهی اوقات بیش از یک گره لنفاوی نگهبان وجود دارد. برداشتن گره لنفاوی نگهبان (Sentinel lymph node) به صورت اولیه برای ارزیابی گره‌های لنفاوی منطقه‌ای در زنان مبتلا به سرطان اولیه پستان که در معاینه بالینی و تصویربرداری از نظر گره‌های لنفاوی منفی هستند مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵).

روش‌های معمول برای تجزیه و تحلیل گره لنفاوی نگهبان شامل فروزن سکشن در حین عمل جراحی و ارسال نمونه جهت پاتولوژی دایمی است (۶) یکی از مشکلاتی که در این زمینه وجود دارد مواردی هستند که با وجود گزارش عدم درگیری غده نگهبان سایر گره‌های لنفاوی زیر بغل درگیر هستند که به این موارد منفی کاذب گفته می‌شود. نتایج منفی کاذب حاصل از ارزیابی فروزن سکشن از ۲۶٪ تا ۴۳٪ بسته به مهارت متخصص سیتوپاتولوژی متغیر است (۷). با توجه به آمار بالای نتایج منفی کاذب در تکنیک‌های تشخیصی حین عمل و گاه نتایج پاتولوژی دایم، جایگزینی آنها با روش‌های نوین تشخیصی مولکولی احساس می‌شود (۸). واکنش زنجیره‌ی رونویسی-پلیمرز معکوس (RT-PCR) به عنوان یک ابزار تشخیصی بسیار حساس با ارزیابی میزان بیان بیومارکرهای مولکولی مانند MUC1، CK19 و CEA، متاستاز گره‌های لنفاوی را با دقتی بالا در بیماران مبتلا به سرطان مهاجم پستان شناسایی کند (۷).

سیتوکراتین ۱۹ (CK19) یکی از مارکرهای سلولی اپیتلیال است و در حالت عادی در بافت غدد لنفاوی وجود ندارد. میزان بیان mRNA ژن سیتوکراتین ۱۹ با اندازه کانون متاستاتیک در ارتباط است و می‌تواند نشانگر متاستاز در غدد لنفاوی زیر بغل باشد (۹). بیان سیتوکراتین ۱۹ به عنوان مارکر سلول اپیتلیال در بیش از ۹۰٪ سرطان‌های پستان دیده

می‌شود. میزان بیان mRNA سیتوکراتین ۱۹ با اندازه درگیری متاستاتیک غدد لنفاوی رابطه مستقیم دارد (۱۰). بر اساس تحقیقات انجام شده، میزان CUT OFF در این بیومارکر توسط تعداد نسخه‌های mRNA سیتوکراتین ۱۹ در غدد لنفاوی نگهبان به عنوان یک معیار برای تشخیص میزان درگیری استفاده می‌شود که در گره‌های لنفاوی منفی (کمتر از ۲۵۰ نسخه)، در گره‌های لنفاوی دارای میکرومتاستاز (بین ۲۵۰-۵۰۰ نسخه یا ۲-۰/۲ میلی‌متر در قطر) و برای گره‌های لنفاوی دارای ماکرومتاستاز (بیش از ۵۰۰ نسخه) تعیین شده است (۱۱).

در این مطالعه از کمی‌سنجی مطلق Absolute Quantitative RT-PCR (Real-Time) که روشی بسیار دقیق و حساس جهت تعیین بیان mRNA است، استفاده کردیم. این روش به یک منحنی استاندارد متکی است، که بر اساس مقدار معلوم همان ژن و Threshold Cycle هر نمونه رسم می‌شود (۱۲).

در بررسی جامعه ایرانی تنها مطالعات اندکی در خصوص افزایش بیان سطح پلاسمایی این بیومارکر در سرطان پستان رویت می‌شود و ما برای نخستین بار به بررسی بیان ژن سیتوکراتین ۱۹ به صورت کمی در نمونه‌های غدد لنفاوی نگهبان ناحیه زیر بغل در بیماران مبتلا به کانسر پستان در جامعه ایرانی می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت گذشته‌نگر طی سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ بر روی ۷۰ بیمار و ۱۶۰ غده لنفاوی نگهبان بیمار مبتلا به سرطان پستان مرحله اول و دوم در بیمارستان امید وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. مشخصات دموگرافیک اولیه در جدول ۱ قابل رؤیت است. معیارهای ورود در این مطالعه در برگزیده بیماران مبتلا به سرطان پستان مرحله اول و دوم که در معاینه بالینی و سونوگرافی غده لنفاوی زیر بغل قابل کشف نداشتند.

معیارهای خروج شامل بیماران مبتلا به سرطان پستان مرحله سوم و چهارم، بیماران با غدد لنفاوی زیر بغل قابل لمس، سابقه جراحی انکولوژی و غیرانکولوژیک در ناحیه آگزیلا و سابقه کموتراپی بودند.

مرحله‌بندی قبل از عمل جراحی شامل معاینه کامل پستان و ناحیه آگزیلاری و همچنین ارزیابی تصویربرداری بیماران با ماموگرافی و سونوگرافی بود. تشخیص سرطان اولیه با استفاده از روش‌های تشخیص بافتی مانند بیوپسی سوزنی با انواع ظریف یا درشت و یا بیوپسی اکسیژنیوال انجام شد.

برای تمام بیماران، ارزیابی پاراکلینیکی نظیر شمارش گلبول‌های خونی، آزمایش‌های کبدی، گرافی قفسه سینه و ارزیابی گیرنده‌های هورمونی انجام گرفت که در صورت تشخیص سرطان پستان در مرحله بالینی ۱ و ۲ بیماران انتخاب شده جهت بررسی غده لنفاوی نگهبان، با

buffer و ۱۰ میکرولیتر محلول استوک DNaseI و سپس سانتریفوژ، مایع باقی‌مانده جدا شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق، ۳۳۰ میکرولیتر بافر RBC جهت تنظیم شرایط باندینگ به آن افزوده شد سپس ۷۲۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰٪ به نمونه اضافه شد و ۷۰۰ میکرولیتر از نمونه به ستون RNeasy MinElute spin انتقال داده شد و به مدت ۱۵ ثانیه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر RPE به ستون RNeasy MinElute spin اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. ستون RNeasy MinElute spin در تیوب جدید قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه در سرعت بالای سانتریفوژ شد و تیوب جمع‌آوری دور انداخته شد. در انتها ستون RNeasy MinElute spin در تیوب جدید قرار داده شد و جهت زنده نگه داشتن RNA، RNase-free water، مستقیماً به غشاء ستون اضافه شد. سپس با سرعت بالا سانتریفوژ شد. پس از استخراج برای اطمینان از درستی مراحل استخراج و تأیید کیفیت RNA، حجم ۵ میکرولیتر از آنها بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد.

برای انجام سنتز cDNA ابتدا ۲ میکرولیتر 5X PrimeScript Buffer/۰/۵ میکرولیتر RT Enzyme، ۲ میکرولیتر Random hexamer primer به همراه ۰/۵ میکرولیتر OligodT با هم مخلوط، سپس ۵ میکرولیتر از RNA نمونه اضافه شده و پس از آن مخلوط واکنش را ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم. PCR تأیید سنتز cDNA، با استفاده از پرایمر GAPDH به‌طور جداگانه برای تمامی نمونه‌ها انجام شد.

جهت ساخت محلول‌های استاندارد با غلظت مشخص برای سیتوکرین‌ها ۱۹ کلونینگ محصولات PCR انجام شد. برای کلون کردن قطعه موردنظر از پلاسمید (+) pBlusScript SK II استفاده شد و کتور نوترکیب برای انتقال به باکتری مستعد E. coli DH5- α ، سپس این مخلوط روی پلیت آگار LB حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ μ g/ml)، IPTG (۱/۰ mM) و X-gal (۲۰ μ g/ml) پخش شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

کلونی‌های نوترکیب که به رنگ سفید هستند در مرحله بعد یک کلونی سفید رنگ تک از این پلیت برداشته و در ۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ μ g/ml) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه و دور ۲۵۰ کشت داده شد و سپس وکتور از این محیط استخراج شد.

به‌منظور استخراج پلاسمید از روش لیز سلول با قلیا و رسوب پلاسمید با روش salting out استفاده شد.

به‌منظور تهیه استانداردهای با غلظت مشخص جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت مولی پلاسمید استخراج شده با نانودراپ اندازه‌گیری

استفاده همزمان از روش تزریق ماده ایزوتوپ (سنتی‌گرافی) مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند.

جدول ۱- مشخصات دموگرافیک اولیه بیماران و تومور

مشخصات	ویژگی‌ها	فراوانی
میانگین سن	(۵۲) ۳۱-۷۰	۷۰
نوع سرطان		
داکتال		۶۹
لوبولار		۱
نوع بافت		
غده لنفاوی منفی		۳۰
غده لنفاوی مثبت		۴۰
گرید		
GI		۱۰
GII		۴۴
GIII		۱۶
سایز تومور		
T1		۳۰
T2		۴۰
مرحله پاتولوژیک تومور		
IIA		۲۸
IIB		۳۲
IIIA		۱۰

پس از شناسایی غدد لنفاوی نگهبان، غدد لنفاوی مذکور برداشته شد و جهت ارزیابی برای فروزن سکشن و سپس برای پاتولوژی دایم ارسال شد. در صورت مثبت بودن نتیجه فروزن سکشن (وجود متاستاز در غدد لنفاوی نگهبان)، برداشتن غدد لنفاوی زیر بغل در سطح ۱ و ۲ انجام شد. ۵۰ بیمار با نتیجه فروزن سکشن مثبت، تحت دایسکشن آگزیلاری قرار گرفتند.

در این مطالعه موردی- شاهدهی نمونه‌های بافتی فیکس شده با فرمالین استفاده شد. ابتدا قطعاتی با ضخامت ۵ میکرو متر توسط میکروتوم از بلاک‌های پارافینه برش داده شد. سپس پارافین‌زدایی توسط گزینن بر اساس دستورالعمل کیت کیاژن انجام گرفت به این منظور پس از افزودن گزینن و جدا کردن سوپرناتانت جهت حذف گزینن از اتانول ۹۶٪ استفاده شد. پس از جدا کردن سوپرناتانت و افزودن بافر پروتئاز و پروتئیناز k در دمای ۵۶°C به مدت ۱۵ دقیقه و سپس در ۸۰°C به مدت ۱۵ دقیقه اینکوبه شد.

برای استخراج RNA از بافت پارافینه از کیت RNeasy FFPE Kit (Lot No. 154047449) استفاده شد. در ابتدا بافت پارافین‌زدایی شده را ۳ دقیقه در یخ قرار داده شد سپس به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۵۰۰ سانتریفوژ شده و سوپرناتانت را به تیوب میکروسانتریفوژ جدید منتقل شد و پس از افزودن ۱۶ میکرولیتر DNase booster

شایع‌ترین محل تومور اولیه پستان در ۸۰٪ بیماران در ربع فوقانی خارجی بود که در سطح خطای ۵ درصد اختلاف معنی‌داری بین محل تومور اولیه پستان، وجود داشت ($P < 0/001$). شایع‌ترین پاتولوژی تومور اولیه پستان در ۶۹ بیمار کارسینوم داکتال مهاجم بود و نوع پاتولوژی تومور از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$) که نتایج آن در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

در مجموع در ۷۰ بیمار شامل ۳۰ بیمار با ۵۴ غده لنفاوی نگهبان منفی بر اساس جواب پاتولوژی و ۴۰ بیمار با تعداد ۱۰۶ غده لنفاوی نگهبان با درگیری متاستاتیک جهت مقایسه میزان بیان بیومارکر سیتوکراتین ۱۹ و نتایج پاتولوژی در بین غدد لنفاوی نگهبان منفی و درگیر مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲- مشخصات فراوانی متغیرهای کیفی بیماران مبتلابه سرطان

پستان		متغیر
P.V	فراوانی (%)	غدد لنفاوی
	۴۷ (۶۶/۲۵)	متاستاتیک
	۲۳ (۳۳/۷۵)	غیر متاستاتیک
		محل تومور
	۵۶ (۸۰)	کوداران فوقانی خارجی
	۷ (۱۰)	کوداران فوقانی تحتانی
<0/001	۳ (۴/۳)	کوداران تحتانی خارجی
	۴ (۵/۷)	کوداران تحتانی داخلی
		سابقه فامیلی
	۷ (۱۰)	دارد
<0/001	۶۲ (۹۰)	ندارد

بررسی بیان سیتوکراتین ۱۹ توسط واکنش Real-time PCR و نشانگر TaqMan به صورت سه‌گانه برای هر دو گروه مثبت و منفی انجام شد (نمودار ۱).

نتایج آزمون Mann-Whitney U برای مقایسه بیان سیتوکراتین ۱۹ بین گروه پاتولوژی منفی و مثبت نشان داد که میزان بیان آن در گروه مثبت نسبت به منفی افزایش می‌یابد. این افزایش بیان ژن از نظر آماری معنادار است ($P = 0/005$) (نمودار ۲).

میانگین تعداد نسخه‌های ژن سیتوکراتین ۱۹ بر اساس داده‌های کمی‌سنجی مطلق در گروه بیماران پاتولوژی منفی برابر با ۷۴۸/۵۸ نسخه و در گروه پاتولوژی مثبت ۹۸۵۶۳/۵۸ نسخه بود که افزایش ۱۳۱ برابری را نسبت به گروه پاتولوژی منفی نشان می‌دهد.

بر اساس میزان CUT OFF در این بیومارکر نتایج به دست آمده از میزان بیان ژن سیتوکراتین ۱۹ نشان داد که وضعیت غدد لنفاوی در بیماران پاتولوژی منفی، ۵۰٪ منفی، ۴۳/۴٪ میکرومتاستازیک و ۶/۶٪ (دو مورد) ماکرو متاستازیک می‌باشند (نمودار ۳) در بیماران پاتولوژی

شد ($2/24 \text{ ng/ul}$)، سپس رقت‌سازی صورت گرفت. از استانداردهایی با غلظت ۱۰۲ تا ۱۰۶ برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. کپی نامبر جهت استانداردها از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{DNA (کپی)} = \frac{\text{میزان DNA (گرم)} \times 6.02 \times 10^{23} \text{ (کپی بر مول)}}{\text{طول DNA (bp)} \times 660 \text{ (g mol}^{-1} \text{ bp}^{-1})}$$

که در این معادله $6/02 \times 10^{23}$ عدد آووگادرو و ۶۶۰ برابر با میانگین وزنی یک جفت باز می‌باشد.

نمونه‌های استاندارد رقیق شده در دستگاه Real-time PCR قرار داده شد. ابتدا یک نمودار از نمونه‌های رقیق شده بدین صورت که محور X میزان رقیق‌سازی یا تعداد کپی ژن و محور Y میزان CT قرائت شده از دستگاه است، رسم کرده در ادامه عدد CT نمونه‌های هدف را با دستگاه محاسبه کرده سپس در نمودار رسم شده قرار داده و میزان کپی و یا غلظت آن را به دست می‌آوریم.

واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از Step One™ Real-time PCR انجام شد و از پروب TaqMan به عنوان نشانگر استفاده شد. پرایمرها و پروب‌های الیگونوکلوئوتیدی توسط ماکروژن کره طراحی و ساخته شد برنامه دمایی واکنش به صورت زیر طراحی شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن چرخه ۴۰-۴۵ در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه. تمام واکنش‌ها در نمونه‌های منفی و مثبت به صورت سه‌گانه انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از SPSS22 انجام شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{Standard Deviation}$ گزارش شد. از آزمون One sample Kolmogorov Smirnov جهت طبیعی یا غیرطبیعی بودن توزیع داده‌ها و همچنین در توصیف از درصد فراوانی نیز استفاده شد. همچنین از آزمون‌های Kruskal Wallis, Mann whitney و ضریب همبستگی spearman استفاده شد. تجزیه و تحلیل ROC و مساحت زیر نمودار یا AUC برای پی‌بردن به ارزش تشخیصی این مارکر نیز توسط نرم‌افزار محاسبه شد. ارتباط معنادار آماری به صورت $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

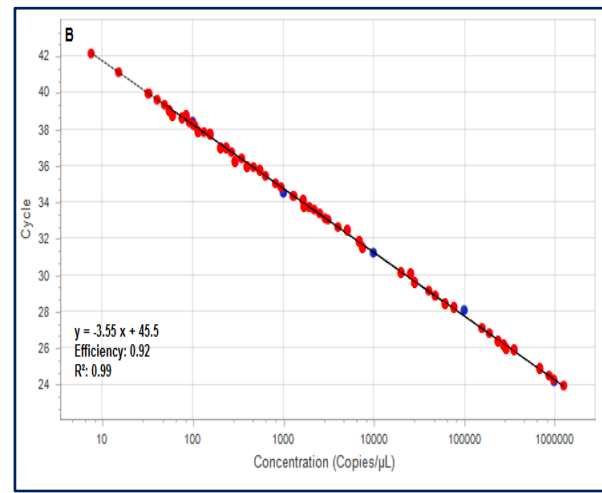
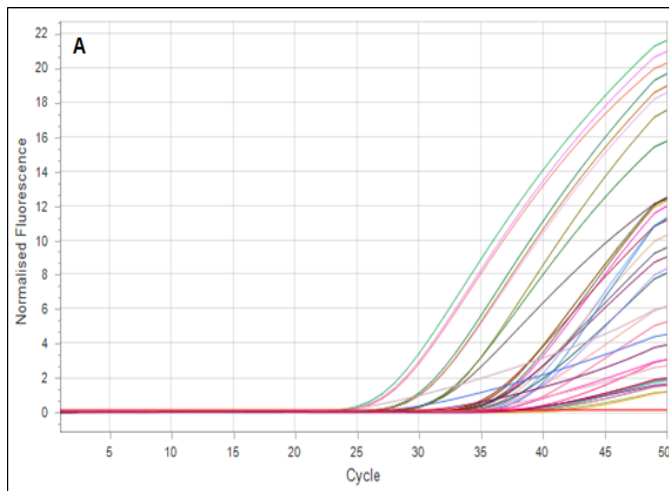
یافته‌ها

در مطالعه حاضر، در مجموع ۷۰ بیمار با تشخیص سرطان پستان، تحت ارزیابی غدد لنفاوی نگهبان قرار گرفتند. از ۱۰۰ بیمار بررسی شده، ۷۰ نفر از بیماران که پرونده کاملی داشتند و تحت پیگیری قرار گرفتند، وارد مطالعه شدند. تمام بیماران مورد مطالعه، خانم بودند. میانگین سن بیماران ۵۲ سال بود که جوان‌ترین بیمار ۳۱ سال و مسن‌ترین آنها ۷۰ سال سن داشت.

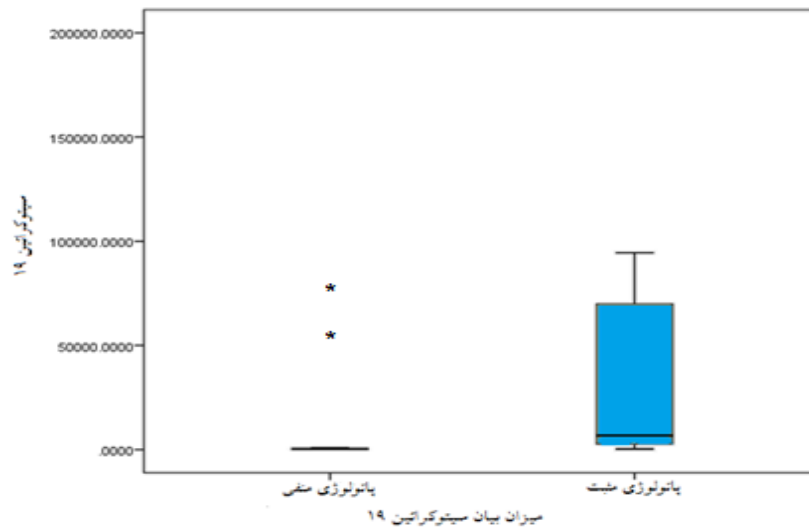
در استفاده از تجزیه و تحلیل ROC جهت ارزیابی کاربرد تشخیصی سیتوکراتین ۱۹ در درگیری غدد لنفاوی در سرطان پستان مشاهده شد که سطح زیر منحنی (AUC, Area Under Curve) با $P=0/006$ معنی‌دار است ($AUC=0/812$). با توجه به CUT OFF ۲۵۰ برای این ژن اختصاصیت ۶۳٪ و حساسیت ۸۹٪ می‌باشد (نمودار ۵). همچنین در بررسی‌های انجام شده می‌توان افزایش معنی‌دار بیان بیومارکر CK19 را با افزایش مرحله پاتولوژی تومور مشاهده نمود ($P=0/001$) (نمودار ۶).

مثبت، ۶۰٪ بیماران میکرومتاستاتیک و ۳۵٪ ماکرومتاستاتیک و ۵٪ منفی بودند (نمودار ۴).

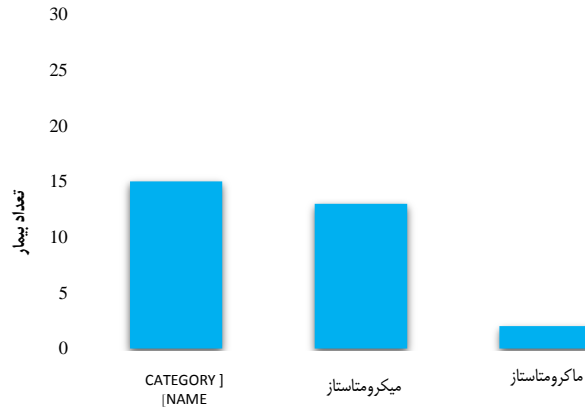
در بررسی انجام شده جهت مقایسه سطح بیان سیتوکراتین ۱۹ و عمق تهاجم (T) یا سایز تومور میانگین بیان آن در بیماران با سایز کمتر از ۲ سانتی‌متر (T1) و در بیماران با ≤ 5 سایز تومور < 2 (T2) $31674/7$ بوده است ($P < 0/001$).



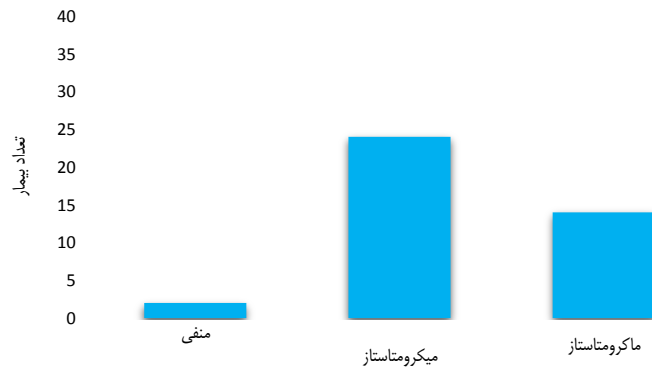
نمودار ۱- A. منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR. B. نمودار استاندارد رسم شده با غلظت ۱۰۲ تا ۱۰۶ کپی نامبر مشخص (آبی) و نمونه‌های هدف (قرمز)



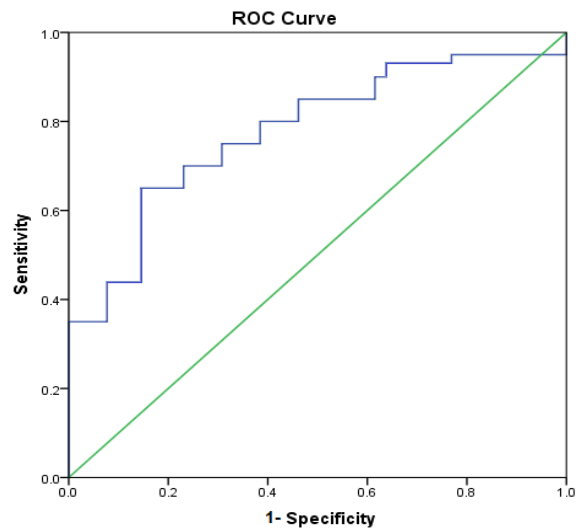
نمودار ۲- بیان سیتوکراتین ۱۹ در بیماران پاتولوژی منفی و مثبت



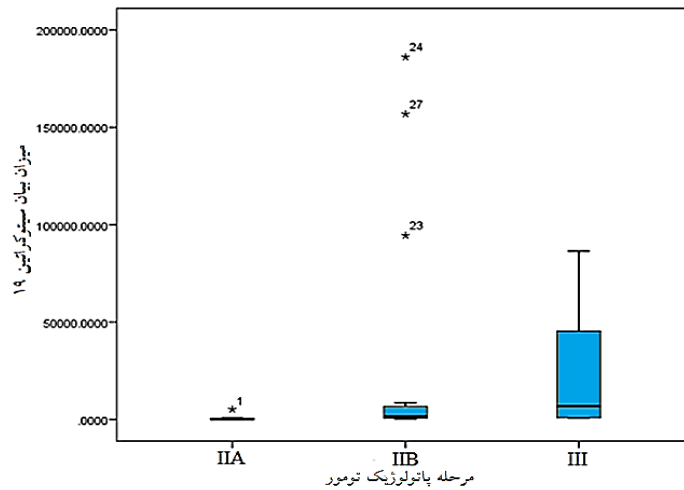
نمودار ۳- وضعیت غدد لنفاوی بر اساس بیان سیتوکراتین ۱۹ در بیماران پاتولوژی منفی



نمودار ۴- وضعیت غدد لنفاوی بر اساس بیان سیتوکراتین ۱۹ در بیماران پاتولوژی مثبت



نمودار ۵- منحنی ROC مربوطه سیتوکراتین ۱۹



نمودار ۶- بیان سیتوکرآتین ۱۹ در بیماران با مراحل IIA, IIB و III پاتولوژیک

بحث

با توجه به اینکه امروزه سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است از طرفی میزان بقای حاصل از سرطان پستان بستگی به مرحله تشخیص آن دارد و شناسایی زودهنگام بیماری در مراحل اولیه و با گرید پایین، پیامدهای بالینی بسیار مطلوب‌تری خواهد داشت. به همین دلیل گروه‌های تحقیقاتی بسیاری جهت توسعه بیومارکرهای مبتنی بر خون و بافت برای سرطان پستان شکل گرفته‌اند.

شایع‌ترین فرم سرطان‌های پستان کارسینوم مجرای می‌باشد (۱۳) در مطالعه حاضر ۹۸/۵۷٪ درصد بیماران با تشخیص کارسینوم مجرای می‌هاجم و ۱/۴۳٪ درصد آنها با تشخیص سرطان لوبولی می‌هاجم مورد بررسی قرار گرفتند.

عود بیماری رابطه مستقیمی با درگیری غدد لنفاوی دارد در بیماران بدون درگیری غدد لنفاوی ۳۰٪ و در بیماران با غدد لنفاوی متاستاتیک ۷۵ درصد احتمال عود وجود دارد (۱۴).

بسیاری از مطالعات برای تشخیص زود هنگام و دقیق‌تر میکرومتاستاز در گره‌های لنفاوی زیر بغل، از رونویسی معکوس برخی از بیومارکرها مانند CK19، که حساسیت و اختصاصیت بالایی برای تشخیص متاستاز غدد لنفاوی سرطان پستان استفاده می‌کنند.

در مطالعه‌ی انجام شده توسط Catherine Alix-Panabieres و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مورد سیتوکرآتین ۱۹ با طول کامل به این نتیجه دست یافتند که سیتوکرآتین ۱۹ از سلول‌های تومور انسان آزاد می‌شود و نقش بالقوه‌ای در پیشرفت و متاستاز سرطان پستان دارد (۱۵).

در مطالعه‌ای که سیتوکرآتین ۱۹ را با مرحله‌بندی پاتولوژیک مقایسه کردن که مجموع ۳۴۶ نمونه از ۳۲ بیمار را مورد بررسی قرار دادن که

از این تعداد با هر دو روش ۲۶۷ نمونه منفی و ۶۱ عدد مثبت بودند. ۳ نمونه از لحاظ پاتولوژی مثبت و از لحاظ سیتوکرآتین ۱۹ منفی بودند. ۱۵ نمونه که از لحاظ پاتولوژی منفی بودن با سیتوکرآتین ۱۹ مثبت شدند. این مطالعه تطابق نتایج سیتوکرآتین ۱۹ را با پاتولوژی ۹۴/۸٪، حساسیت ۹۵/۳٪ و اختصاصیت ۹۴/۷٪ برای سیتوکرآتین ۱۹ تعیین کردند (۱۶). در مطالعه ما نیز سطح بیان سیتوکرآتین ۱۹ در نمونه‌های پاتولوژی مثبت به‌طور قابل توجهی بالا بود (P=۰/۰۰۶) و بر اساس تجزیه و تحلیل‌های آماری سیتوکرآتین ۱۹ با اختصاصیت ۶۳٪ و حساسیت ۸۹٪ در cut off ۲۵۰ می‌تواند به‌عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان مطرح باشد.

فوجیسو و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه دیگری در مورد اهمیت بالینی سیتوکرآتین ۱۹ در سرطان‌های پستان منفی انجام دادند. در این مطالعه اهمیت بالینی موارد منفی سیتوکرآتین ۱۹ در ۲۱۹ بیمار مبتلابه سرطان پستان اولیه مورد بررسی قرار گرفت. در ۱۷۹ بیمار با غدد لنفاوی بالینی منفی، OSNA (تکنیک تک مرحله‌ای اسید نوکلئیک) و بررسی سیتوژنتیک لنف نودهای نگهبان به‌طور همزمان انجام شد. نتیجه OSNA در ۲۴/۶٪ غدد لنفاوی مثبت شد. موارد منفی سیتوکرآتین ۱۹ به‌طور واضحی با میزان منفی ER-PR و میزان بیان بالاتر Ki67 همراه می‌باشد و همچنین گرید بالاتر هسته‌ای و بیان بالاتر P53. در مواردی که سرطان پستان triple negative می‌باشد، میزان بیان سیتوکرآتین ۱۹ پایین‌تر است. در نتیجه منفی بودن سیتوکرآتین ۱۹ با میزان تهاجم تومور اولیه مرتبط است (۱۷ و ۱۸). در مطالعه ما نیز می‌توان یک رابطه معنادار مستقیم بین بیان سیتوکرآتین ۱۹ و مرحله پاتولوژیک تومور رؤیت می‌شود (P=۰/۰۰۱).

- 1989;63:181-7. doi: 10.1002/1097-0142(19890101)63:1<181::aid-cncr2820630129>3.0.co;2-h
4. Cabanas R. The concept of the sentinel lymph node. *Recent Results Cancer Res* 2000;157:109-20. doi: 10.1007/978-3-642-57151-0_9
 5. Boughey JC, Ballman KV, Le-Petross HT, McCall LM, Mittendorf EA, Ahrendt GM, et al. Identification and resection of the clipped node decreases the false negative rate of sentinel lymph node surgery in patients presenting with node positive breast cancer (T0-T4, N1-2) who receive neoadjuvant chemotherapy—results from ACOSOG Z1071 (Alliance). *Ann Surg* 2016;263:802-7. doi: 10.1097/SLA.0000000000001375
 6. Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, et al. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer* 2009;115:1555-62. doi: 10.1002/cncr.24182
 7. Layfield D, Agrawal A, Roche H, Cutress R. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg* 2011;98:4-17. doi: 10.1002/bjs.7229
 8. St John ER, Al-Khudairi R, Ashrafian H, Athanasios T, Takats Z, Hadjiminias DJ, et al. Diagnostic accuracy of intraoperative techniques for margin assessment in breast cancer surgery. *Ann Surg* 2017;265:300-10. doi: 10.1097/SLA.0000000000001897
 9. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey R, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004;203:661-71. doi: 10.1002/path.1559
 10. Chu P, Weiss L. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39. doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x
 11. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807-16. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2512
 12. Dhanasekaran S, Doherty TM, Kenneth J, Group TTS. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* 2010;354:34-9. doi: 10.1016/j.jim.2010.01.004
 13. Pang J-MB, Savas P, Fellows AP, Arnau GM, Kader T, Vedururu R, et al. Breast ductal carcinoma in situ carry mutational driver events representative of invasive breast cancer. *Mod Pathol* 2017;30:952-63. doi: 10.1038/modpathol.2017.21
 14. Roberts MC, Miller DP, Shak S, Petkov VI. Breast cancer-specific survival in patients with lymph node-positive hormone receptor-positive invasive breast cancer and oncotype DX recurrence score results in the SEER database. *Breast Cancer Res Treat* 2017;163:303-10. doi: 10.1007/s10549-017-4162-3
 15. Alix-Panabières C, Vendrell J-P, Slijper M, Pellé O, Barbotte E, Mercier G, et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11:R39. doi: 10.1186/bcr2326
 16. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, Van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2562-7. doi: 10.1002/ijc.23451
 17. Fujisue M, Nishimura R, Okumura Y, Tashima R, Nishiyama Y, Osako T, et al. Clinical significance of CK19 negative breast cancer. *Cancers* 2013;5:1-11. doi:10.3390/cancers5010001
 18. Alizadeh S, Moshfeghi K, Kalantari M, Ebrahimi K. Lymph-node involvement and tumor markers in patients with breast cancer. *J Arak Uni Med Sci* 2010;12:44-50.
 19. Chen C-C, Hou M-F, Wang J-Y, Chang T-W, Lai D-Y, Chen Y-F, et al. Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and hMAM with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett* 2006;240:279-88. doi: 10.1016/j.canlet.2005.09.017

افزایش بیان ۱۳۱ برابری سیتوکراتین ۱۹ در بیماران پاتولوژی مثبت نسبت به گروه مقابل می‌تواند تأییدی بر تغییرات بیانی این ژن در سرطان‌های متعدد و بخصوص در سرطان پستان باشد. در مطالعه‌ای که توسط چن و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی افزایش بیان mRNA بیومارکرهای مختلف در سرطان پستان انجام شد، توانستند ارتباط معناداری ما بین افزایش بیان سیتوکراتین ۱۹ را با مرحله پاتولوژیک تومور و افزایش اندازه تومور و درگیری بیشتر غدد لنفاوی زیر بغل را نشان دهند. در مطالعه ما نیز افزایش معنادار سطح بیان سیتوکراتین ۱۹ با افزایش سایز تومور ($T2 > T1$) رویت شد ($P < 0.001$) (۱۹).

در مطالعه دیگری که توسط وایزر و همکاران در هلند در خصوص بررسی میزان بیان سیتوکراتین ۱۹ در غدد لنفاوی درگیر حین عمل در بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام گرفت میزان تطابق نتایج این بیومارکر با پاتولوژی دایم ۹۴/۸٪ گزارش شد (۱۶). در مطالعه ما نیز، تطابق ۹۳/۴ درصد میان نتایج سیتوکراتین و پاتولوژی دایم رویت شد که در دو بیمار با نتایج منفی کاذب بعد از بررسی مجدد نمونه‌ها توسط پاتولوژیست دوم خطای تشخیصی به اثبات رسید. در بیماران با پاتولوژی مثبت نتایج بیان سیتوکراتین ۱۹ نسبتاً مشابه بود که با توجه به تطابق این امار با نتایج پاتولوژی دایم می‌توان انتظار داشت که در مدت زمان کمتری در حین عمل جراحی می‌شود به پاسخی به دقت پاتولوژی دایم رسید.

تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR در مقایسه با تکنیک‌های میکروسکوپی سریع‌تر، دقیق‌تر، ارزان‌تر و آسان‌تر است. با توجه به اهمیت تشخیص سرطان پستان در مراحل ابتدایی به منظور بهبود درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری تشخیص و درمان به خصوص درمان تلفیقی در مراحل اولیه سرطان امری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نتایج مطالعه می‌توان گفت که بررسی افزایش بیان سیتوکراتین ۱۹ در کنار سایر روش‌های تشخیصی متداول می‌تواند نتایج قطعی‌تری را در اختیار ما قرار دهد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه علوم پزشکی مشهد بابت حمایت مالی و دیگر عزیزی که ما را در این مطالعه یاری نمودند اعلام می‌داریم.

References

1. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 2011;61:408-18. doi:10.3322/caac.20134
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90. doi:10.3322/caac.20107
3. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*.



Clinical Diagnostic Value of Cytokeratin 19 In Breast Cancer

Behnaz Bakaeen (Ph.D.)^{1,2}, Mehran Gholamin (Ph.D.)^{3*}, Seyed Abbas Tabatabaee Yazdi (M.D.)⁴,
Mohammad Naser Forghani (M.D.)⁵

1- Dept. of Molecular Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

2- Dept. of Molecular Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

3- Dept. of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

4- Dept. of Pathology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

5- Surgical Oncology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received: 21 June 2020, Accepted: 30 September 2020

Abstract:

Introduction: Breast cancer is the most prevalent cause of cancer death in women worldwide. The increasing prevalence and high mortality rate of this cancer has made it necessary to understand the molecular mechanism. Axillary lymph node involvement plays a great role in 5 year survival rate. So, identifying specific biomarkers for early detection of lymph node involvement in breast cancer patients can greatly increase survival rates and treatment responses.

Methods: In this study, 54 negative sentinel lymph nodes and 106 positive sentinel lymph nodes with metastatic involvement were examined from paraffin samples. Cytokeratin 19 (CK19) was used as a marker of lymph node metastasis and its expression was assessed by Real-time PCR (qPCR) and absolute quantification.

Results: Higher cytokeratin 19 mRNA copy number was identified in metastatic lymph nodes group ($P=0.005$). The area under the ROC curve (AUC) was significant with $P=0.006$., the specificity and sensitivity were 63% and 89%, respectively for breast cancer detection on the basis of ROC curve analyses determining the optimum cut-off 250. we demonstrated that CK 19 overexpression was significantly correlated with tumor size, lymph nodes metastasis and pathological stage

Conclusion: Our data indicate that simultaneous use of molecular and conventional diagnostic methods can increase the sensitivity and specificity of pathologic results and decrease the false negative cases.

Keyword: Biomarkers, Breast cancer, Sentinel lymph nodes; CK19.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Gholamin, Email: gholamin@mums.ac.ir

Citation: Bakaeen B, Gholamin M, Tabatabaee Yazdi SA, Forghani MN. Clinical diagnostic value of cytokeratin 19 in breast cancer. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;15(3):2-10.