

## مطالعه بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و آنزیم تلومراز و ارتباط آنها با گیرنده های استروئیدی در بیماران مبتلا به سرطان پستان

دکتر نصرت اله ضرغامی\*، عباس مهاجری\*\*، دکتر اشرف فخرجو\*\*\*، دکتر علی منتظری\*\*\*\*، جهانبخش اسدی\*\*\*\*\*

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۴، پذیرش: ۸۶/۳/۲۱

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** سرطان پستان متداول ترین سرطان در زنان است. بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و آنزیم تلومراز در سرطان پستان با پیشرفت بیماری متفاوت است. هدف از این تحقیق مطالعه بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز در بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آنها با گیرنده های استروئیدی است.

**روش کار:** در این مطالعه از نوع موردی-شاهدی تعداد ۵۰ زن مبتلا به تومورهای خوش خیم پستان به عنوان گروه کنترل و ۵۰ زن مبتلا به سرطان پستان به عنوان گروه مورد وارد مطالعه شدند. میزان بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات با تکنیک RT-PCR، فعالیت نسبی آنزیم تلومراز با روش TRAP Assay، پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات با تکنیک کیمو لومینسانس و میزان گیرنده های استروژنی و پروژسترونی با روش ایمنو هیستوشیمی در کلیه تومورها اندازه گیری شد. اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار spss و آزمون تی زوج آنالیز گردید.

**نتایج:** با بکار گیری روش TRAP فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در تمام نمونه های سرطانی مبتلا به سرطان پستان مثبت ارزیابی شد. تفاوت میزان فعالیت نسبی تلومراز در تمام مراحل و درجات توموری از لحاظ آماری کاملاً معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). تنها در نمونه های خوش خیم و بدخیم با مرحله و درجه ۱ توموری mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات قابل تشخیص بود. تفاوت سطوح آنتی ژن اختصاصی پروستات سیتوزول تومورال بین افراد مورد و شاهد و همچنین بین کلیه مراحل و نیز درجات مختلف توموری کاملاً معنی دار بود ( $p < 0/05$ ) و تفاوت معنی داری بین گیرنده های استروئیدی مثبت و منفی با میزان آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز در بافت های توموری مشاهده شد.

**نتیجه نهایی:** نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز تحت کنترل هورمونهای استروئیدی قرار دارد و این امر می تواند در هدف درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

آنتی ژن اختصاصی پروستات / تلومراز / سرطان پستان

### مقدمه:

سال و ۱۸٪ کل بدخیمی ها، فراوانترین سرطان زنان را تشکیل می دهد. براساس مطالعات انجام شده اخیر سرطان پستان فراوانترین بدخیمی زنان است و آمار جدید مبین افزایش نسبتاً سریع میزان بروز این بیماری

سرطان پستان جزو شایعترین سرطانها در همه دنیا می باشد که از نظر مرگ و میر های ناشی از آن، در رتبه دوم قرار دارد و با بیش از یک میلیون مورد جدید در

\* دانشیار گروه بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (Zarghami@tbzmed.ac.ir)

\*\* کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\*\*\* دانشیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\*\*\*\* دانشیار گروه جراحی توراکیس دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

\*\*\*\*\* دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

در زنان می باشد(۱).

بافت پستان همانند بافتهای پروستات ، آندومتریوم ، رحم و تخمدانها جزو بافتهای پاسخگو به هورمونهای استروئیدی محسوب می شود و دارای گیرنده های هورمونهای استروئیدی می باشد. گیرنده های هورمونهای استروئیدی به خانواده بزرگ فاکتورهای نسخه برداری قابل القا با لیگاند تعلق دارند که ژنهای پاسخگو به هورمون را کنترل می کند. بافت پستان گیرنده های هورمون های استروئیدی را به شکل غیر فعال در خود دارد و زمانی که این گیرنده ها با هورمون های مربوط به خود متصل می شوند فعال می گردند. از طرفی بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز در بافت پستان به عنوان دو تومورمارکر تحت کنترل گیرنده های استروئیدی می باشد (۲،۳). تومورمارکرها محصولات سلولی هستند که اغلب پروتئینی بوده و در پاسخ به وجود یا پیشرفت سرطان توسط تومور یا بدن میزبان تولید می شوند. تومورمارکرها را می توان در بافت ها و مایعات مختلف بدن و روی سطح سلول های سرطانی ردیابی کرد میزان تومورمارکرها معمولا انعکاسی از حجم و فعالیت تومور می باشد. تومورمارکرها جنبه های کاربردی مهمی در علم پزشکی دارند(۴).

آنتی ژن اختصاصی پروستات یک گلیکوپروتئین تک زنجیره ای با وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون است که توالی اصلی آن ۲۳۷ اسیدآمینو می باشد(۵). این تومور مارکر ابتدا در پروستات مشاهده شد که بعدا آنرا از این بافت جدا کردند. با توجه به اینکه تا آن زمان آنتی ژن اختصاصی پروستات [ Prostate Specific Antigen (PSA) ] فقط در پروستات مشاهده شده بود به این نام نامیده شد و به عنوان یک تومورمارکر در تشخیص سریع ، تعیین مرحله و کنترل سرطان پروستات مطرح شد(۶،۷). تفاوت اساسی بین پروستات و دیگر بافت ها در تولید PSA این است که مقدار تولید آن در دیگر بافت ها نسبتا کم است. بافت های سینه ، رحم و تخمدان از نظر بیان ژن و تولید پروتئین شبیه پروستات مقداری PSA تولید می کنند و رشد و تمایزشان توسط هورمونهای استروئیدی کنترل می شود(۸). بیان mRNA آنتی ژن اختصاصی پروستات در سرطان پستان اول بار توسط دیاماندیس و همکاران گزارش شد(۹). بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات در بافت پستان تحت کنترل هورمون های استروئیدی

بخصوص آندروژن ها و پروژستین قرار دارد که این کنترل از طریق فعال نمودن پاسخ های استروئیدی در منطقه پروموتور / افزایش دهنده(Enhancer) ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات صورت می گیرد(۱۰). بیشتر سرطانهای پستان تولید کننده آنتی ژن اختصاصی پروستات از لحاظ گیرنده های هورمون های استروئیدی مثبت می باشند و این بدان معنی نیست که همه آنها می باشند که از لحاظ گیرنده های هورمون های استروئیدی مثبت هستند تولید آنتی ژن اختصاصی پروستات می کنند(۱۱). یکی از مهمترین آنزیم هایی که در پیشرفت سرطان از اهمیت خاصی برخوردار است آنزیم تلومراز می باشد. تلومراز یک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس است که با اضافه کردن توالی تکراری TTAGGG ، مانع کوتاه شدن تلومر می شود. سلولهای سوماتیک طبیعی انسان دارای فعالیت تلومراز نیستند و این فعالیت تنها در سلول های بنیادی، زایا و توموری دیده می شود(۱۲). وجود فعالیت تلومراز باعث ایجاد سلولهای نامیرا و مسئول تکثیر نامحدود سلولهای سرطانی می گردد. مطالعات نشان داده اند که بیان ژن تلومراز تحت کنترل هورمون های استروئیدی است و استروژن در بافت هایی که دارای گیرنده های استروژن است فعالیت تلومراز را افزایش می دهد. هورمون جنسی پروژسترون که آنتاگونیست استروژن است تکثیر سلولی القا شده به وسیله استروژن را مهار می کند و از لحاظ درمانی برای درمان سرطان های وابسته به استروژن استفاده شده است(۱۳). با توجه به مطالب فوق امروزه درک ارتباط بین فعالیت عوامل ایجاد کننده سرطان در سطح ژنتیکی بعنوان یک مسئله مهم در تحقیقات بشمار می رود و با توجه به اینکه بیان ژن PSA و تلومراز توسط هورمون های استروئیدی تنظیم می شوند و هر دو به عنوان تومورمارکر در تشخیص انواع تومورهای خوش خیم و بدخیم سرطان پستان ، تخمدان ، پروستات و سایر سرطان ها مطرح می باشند. بنابراین ، در این مطالعه میزان گیرنده های استروژن ، پروژسترون ، بیان ژن PSA ، میزان تغییرات پروتئین PSA در سیتوزول توموری و میزان فعالیت آنزیم تلومراز ، در بافت سرطانی پستان بررسی شد و در نهایت همبستگی بین PSA و تلومراز با گیرنده های استروژن و پروژسترون مورد بررسی قرار گرفت.

## روش کار:

در این مطالعه مورد - شاهدی، نمونه های توموری مورد نظر از بیمارانی که در مدت ۲۳ ماه در فاصله زمانی آبان ماه ۱۳۸۲ تا مهر ماه ۱۳۸۴ به بیمارستان امام تبریز مراجعه کرده بودند جمع آوری گردیدند. نمونه های مناسب پس از برداشت بافت توسط جراح در اتاق عمل و زیر نظر پاتولوژیست با توجه به علائم پاتولوژیکی در دو گروه تومورهای خوش خیم و تومورهای بدخیم دسته بندی شدند. در نهایت ۵۰ مورد تومور بد خیم (داکتال کارسینوما، لوبولار کارسینوما) و ۵۰ مورد تومور خوش خیم (فیبرو آدنوما، تغییرات فیبروکیستیک، آبسه و آدنوزیس) انتخاب شدند. در مجموع ۱۰۰ نفر زن با محدوده سنی ۲۴ تا ۷۶ سال و با میانگین سنی  $44/12 \pm 12/72$  سال مورد مطالعه قرار گرفتند که همگی مبتلا به بیماری تومور پستان بودند که ۵۰ نفر دارای تومور بدخیم (گروه مورد) و ۵۰ نفر دارای تومور خوش خیم (گروه شاهد) بودند. محدوده سنی گروه مورد ۳۰ تا ۷۶ سال و با میانگین سنی  $38/56 \pm 12/08$  سال که ۸۰ درصد کارسینومای داکتال و ۲۰ درصد کارسینومای لوبولار بودند. محدوده سنی گروه شاهد ۲۱ تا ۶۸ سال با میانگین سنی  $48/09 \pm 11/78$  سال که ۲۴ درصد دارای تغییرات فیبروکیستیک و ۲۴ درصد دارای آبسه و ۵۲ درصد دارای فیبروآدنوما بودند. ۱۷ نفر از این افراد دارای سرطان پستان با مرحله یک توموری، ۱۸ نفر دارای مرحله ۲ توموری و ۱۵ نفر دارای مرحله سه توموری بودند. همچنین از این ۵۰ نفر ۲۵ نفر دارای تومور با درجه یک، ۱۲ نفر با درجه دو و ۱۳ نفر درجه سه توموری بودند.

اندازه گیری گیرنده های استروژن و پروژسترون: اندازه گیری گیرنده های استروژن و پروژسترون بافت های توموری با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی مبتنی بر سیستم آویدین - بیوتین انجام گرفت. در این روش ابتدا برش ها با یک آنتی بادی اولیه انکوبه شده، سپس با انکوباسیونهای پیاپی با یک آنتی بادی ثانویه مرتبط به بیوتین و یک پراکسیداز کونژوگه با آویدین، رنگ آمیزی با کیفیت بالایی حاصل شد. در این مطالعه برای اندازه گیری گیرنده استروژن از کیت Estrogen Receptor  $\alpha$  (شماره کاتولوگ CE N1575) و برای اندازه گیری گیرنده پروژسترون کیت Progesterone Receptor (شماره کاتولوگ CE N1549) ساخت DakoCytomation, Denmark مورد استفاده قرار

گرفت.

بررسی بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات: ابتدا استخراج Total RNA با استفاده از روش Trizol™ (Gibco BRL, USA) انجام گردید. نمونه ها پس از استخراج در DEPC Water حل شد و برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. کیفیت RNA استخراج شده با روش اندازه گیری میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید.

پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم افزار الیگو ویرایش پنجم بر اساس توالی حاصله در NCBI طراحی گردید. پرایمر اختصاصی بتا اکتین نیز به عنوان کنترل طراحی شد. در ادامه RT-PCR انجام گرفت و به منظور بهینه سازی شرایط RT، غلظت واکنشگرها بر اساس دستور العمل کیت (شرکت Gibco BRL, USA) بر اساس بکار گیری از جفت پرایمرهای توالی ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات به عنوان متغیر با توالی 3'-TGCGCAAGTTCACCCTCA-5' PSAF، 3'-CCCTCTCCTTACTTCATCC-5' و با اکتین به عنوان کنترل با توالی 3'-ACAATGAGCTGCGTGTGGCT-5'، Beta F، 3'-TCTCCTTAATGTCACGCACGA-5' Beta R برای حجم ۲۵ میکرولیتر تنظیم و داخل لوله های میکروتیوب آماده شد (۹). پس از آماده سازی واکنشگرهای PCR برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندروف آلمان مدل AG) تنظیم گردید. بعد از اتمام PCR، کلیه محصولات آن همراه با مارکر ملکولی DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. از ژل ها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و رنگ زدایی با آب مقطر در زیر نور UV توسط دستگاه UVPDoc عکس برداری شدند. شرایط استخراج RNA، انجام PCR و میزان لود نمونه PCR در تمامی موارد یکسان در نظر گرفته شد.

پروتکل TRAP Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) جهت استخراج سیتوزول توموری، ابتدا نمونه های بافت توموری با استفاده از دستگاه Tissue hammering که در آزمایشگاه طراحی شده بود در ازت مایع پودر شدند. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی { ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH ۸)، یک میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۱ میلی مولار بنزآمیدین، ۵ میلی مولار بتامرکاپتواتانل،

### نتایج:

در این پژوهش مشخص شد گیرنده های پروژسترون در ۶۲ درصد و گیرنده های استروژن در ۴۵/۷ درصد تومورهای بدخیم پستان بیان شده است. در کلیه بافتهای مورد مطالعه میزان پروتئین PSA در بافت هایی که دارای گیرنده های استروژن و پروژسترون هستند به ترتیب ۶۱ و ۵۲/۶۶ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام و فعالیت آنزیم تلومراز به ترتیب ۱۸/۳۵ و ۲۴/۳۷ درصد می باشد. میزان پروتئین PSA در بافت هایی که از نظر گیرنده های استروژن و پروژسترون منفی هستند به ترتیب ۵/۷ و ۸/۶۶ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام و فعالیت آنزیم تلومراز به ترتیب ۳۸/۱۴ و ۲۸ درصد می باشد. در این بافت ها تفاوت معنی داری بین بیان گیرنده های استروژن با میزان بیان PSA و تلومراز مشاهده شد ولی تفاوت معنی داری بین بیان گیرنده های پروژسترون با میزان بیان PSA و تلومراز مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱: ارتباط بیان گیرنده های استروئیدی با بیان آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز در بافتهای توموری

آنتی ژن اختصاصی پروستات (نانوگرم در گرم پروتئین تام)	گیرنده استروژن		گیرنده پروژسترون	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی
۰/۰۲	۶۱	۵/۷	۰/۰۹	۵۲/۶۶
فعالیت نسبی تلومراز (درصد)	۱۸/۳۵	۳۸/۱۴	۰/۶۶	۲۴/۳۷

بررسی بافت های توموری خوش خیم نشان داد که میزان پروتئین PSA در بافت هایی که دارای گیرنده های استروژن و پروژسترون هستند ۹۷ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام می باشد و این نوع بافت های توموری فاقد فعالیت آنزیم تلومراز بودند. میزان پروتئین PSA در بافت هایی که از نظر گیرنده های استروژن و پروژسترون منفی هستند ۱۵ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام می باشد و این نوع بافت های توموری فاقد فعالیت آنزیم تلومراز بودند. بررسی یافت های توموری بدخیم نشان داد که میزان پروتئین PSA در بافت هایی که دارای گیرنده های استروژن و پروژسترون هستند به ترتیب ۹/۴ و ۶/۳۶ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام می باشد و فعالیت آنزیم تلومراز به ترتیب ۴۴/۷ و ۴۹/۸ درصد می باشد. میزان پروتئین PSA در بافتهایی که از نظر گیرنده های استروژن

۰/۵ درصد chaps، ۱۰ درصد گلیسرول و ۱ میلی مولار EDTA { اضافه شده و به مدت ۲ ساعت روی روتاتور با دور ۳۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد shak شدند و در ادامه به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به آرامی به میکروتیوب جدید منتقل شد (۱۴). مقدار پروتئین استخراجی بر طبق روش برادفورد با استفاده از رنگ آبی کوماسی ۲۵۰ و منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی تعیین گردید (۱۵). در ادامه جهت اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز از روش TRAP Assay مبتنی بر دو تکنیک واکنش های زنجیره ای پلیمرز و الیزا بر اساس روش هولت استفاده شد. به منظور بهینه سازی شرایط TRAP-Assay غلظت واکنشگر برای حجم ۵۰ میکرولیتر تنظیم و آماده شد. لازم به ذکر است که در این واکنش آنزیم تلومراز نقش Taq Polymerase را ایفا میکند. پس از آماده سازی واکنشگرها برنامه لازم جهت انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر تنظیم گردید. پس از انجام PCR برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم تلومراز روش ELISA استفاده شد. با اندازه گیری مقادیر جذب شده نمونه ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و قرار دادن در منحنی استاندارد بدست آمده میزان فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در نمونه های مجهول شناسایی شد (۱۴).

اندازه گیری پروتئین آنتی ژن اختصاصی پروستات: اندازه گیری سطح آنتی ژن اختصاصی پروستات در سیتوزول توموری با استفاده از تکنیک کیمیو لومینسانس از نوع سانداویچی با بکارگیری دو آنتی بادی اختصاصی ( اختصاصی آنزیم کنژوگه و ثابت شده) با میل ترکیبی بالا (High Affinity) و دارای نواحی متفاوت و شاخص اپی توپی و با استفاده از سیستم بیوتین- استرپتوآویدین برای دو اپی توپ مختلف (کیست شرکت Monobind آمریکا با شماره کاتولوگ 300-2175) انجام گرفت (۱۶).

آنالیز آماری: محاسبه آماری داده های حاصل با استفاده از ویرایش شماره ۱۳ نرم افزاری آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد. از آزمون T مزدوج جهت تجزیه و تحلیل داده های کمی استفاده شد. معنی دار بودن آماری به میزان  $p < 0/05$  دو دنباله در نظر گرفته شد. تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید.

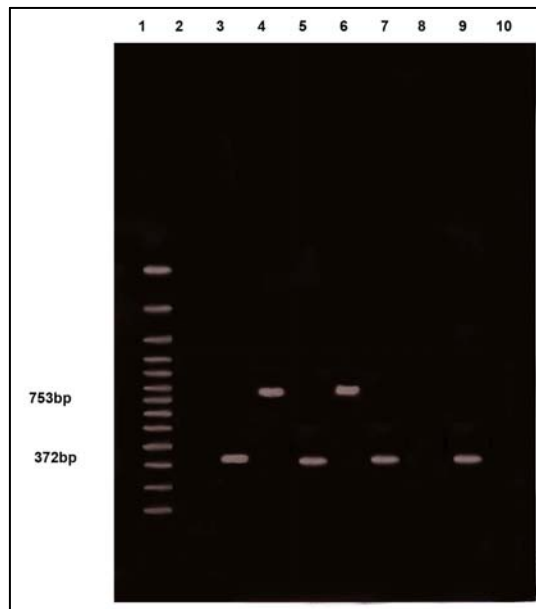
باند های PSA و بتا اکتین در افراد بیمار با مراحل توموری مختلف در تصویر ۱ قابل مشاهده می باشند. مشاهده باندها در تصاویر فوق گویای این مطلب است که ژن PSA در افراد با مرحله (stage) توموری خوش خیم و نیز در بافت های توموری بدخیم با مرحله توموری ۱ بیان شده است ولی در بافت های توموری بدخیم با درجه (grade) توموری بالا باند مربوط به PSA قابل شناسایی نیست. از طرف دیگر در تصویر ۱ ژن بتا اکتین در مراحل توموری مختلف بیان شده است. به عبارت دیگر مشاهده بیان ژن بتا اکتین نشانگر سلامت نمونه های مورد مطالعه از نظر بررسی بیان ژن PSA است.

و پروژسترون منفی هستند ۴/۷ و ۷/۶۹ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام و فعالیت آنزیم تلومراز به ترتیب ۴۲/۱ و ۴۹/۸ درصد می باشد. در بافت های توموری بدخیم تفاوت معنی داری بین بیان گیرنده های پروژسترون و فعالیت آنزیم تلومراز مشاهده شد (جدول ۲).

بررسی قطعات به دست آمده نشان داد، طول باند های بدست آمده ۷۵۳ bp مربوط به PSA و ۳۷۲ bp مربوط به بتا اکتین است. اعداد مربوطه از طریق مقایسه باند های بدست آمده با مارکر ملکولی gene Ruler که دارای باندهای DNA با اندازه بین ۱۰۰ bp تا ۱۰۰۰ bp می باشند تعیین گردید.

جدول ۲: ارتباط بیان گیرنده های استروئیدی با بیان آنتی ژن اختصاصی پروستات و تلومراز در بافتهای توموری خوش خیم و بدخیم

ارزش P	گیرنده استروژن		گیرنده پروژسترون		ارزش P	تومور خوش خیم
	مثبت	منفی	مثبت	منفی		
۰/۳۷	۹۷	۱۵	۰/۳۷	۹۷	۱۵	آنتی ژن اختصاصی پروستات (نانوگرم در گرم پروتئین تام) فعالیت نسبی تلومراز (درصد)
۰/۱۹۸	۹/۴	۴/۷	۰/۷۲۴	۶/۳۶	۷/۶۹	تومور بدخیم
۰/۷۴۱	۴۴/۷	۴۲/۱	۰/۰۲	۴۹/۸	۳۲/۳	آنتی ژن اختصاصی پروستات (نانوگرم در گرم پروتئین تام) فعالیت نسبی تلومراز (درصد)

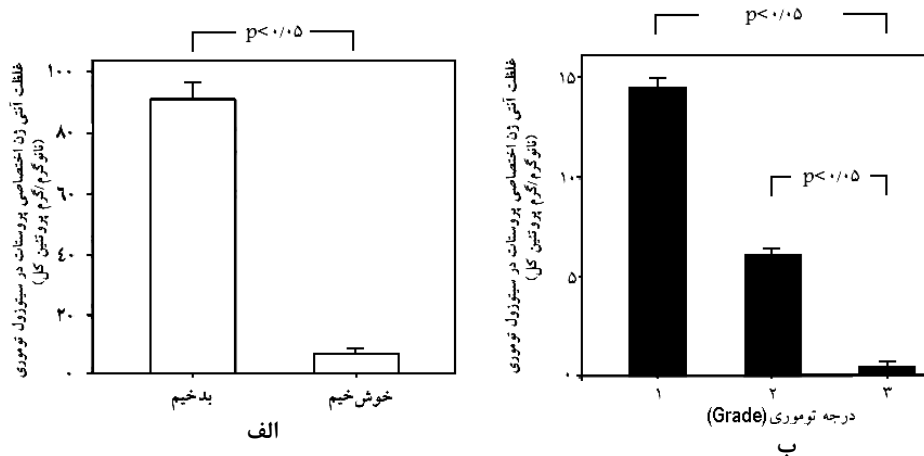


تصویر ۱: مقایسه بیان ژن PSA در بافت های توموری پستان

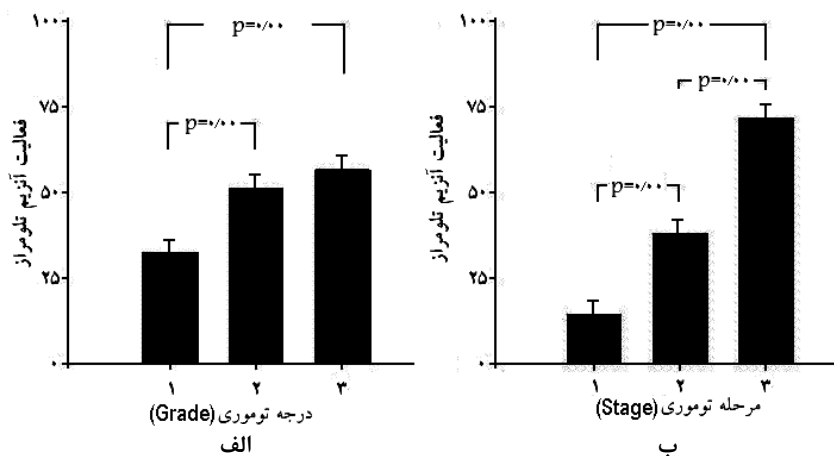
۱- مارکر، ۲- کنترل منفی، ۳- تومور خوش خیم بتا اکتین مثبت، ۴- تومور خوش خیم PSA مثبت، ۵- تومور بدخیم (مرحله ۱) بتا اکتین مثبت، ۶- تومور بدخیم (مرحله ۱) PSA مثبت، ۷ و ۹- تومورهای بدخیم (مرحله ۲ و ۳) بتا اکتین مثبت، ۸ و ۱۰- تومورهای بدخیم (مرحله ۲ و ۳) PSA منفی

این اختلاف در مراحل ۲ با ۳ و ۱ با ۳ از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۱-ب). میانگین فعالیت نسبی تلومراز Relative Telomerase activity یا RTA در گروه توموری بدخیم (شاهد)  $3/81 \pm 43/34$  درصد اندازه گیری شد. در ضمن میانگین RTA در درجه یک  $2/21 \pm 14/85$  درصد در درجه دو  $2/04 \pm 38/50$  درصد و در درجه سه  $4/16 \pm 72$  درصد بود که این افزایش بین درجات یک با دو، درجات دو با سه و درجات یک با سه معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۲-الف). میانگین فعالیت نسبی تلومراز RTA در مرحله یک توموری  $3/96 \pm 32/11$  و در مرحله ۲ توموری  $51/22 \pm 56/58$  و در مرحله ۳ توموری  $8/85 \pm 56/66$  درصد بود که این اختلاف در بین مراحل ۱ با ۲، ۲ با ۳ و ۱ با ۳ از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۲-ب). در ۵۰ نمونه گروه شاهد فعالیت نسبی تلومراز مثبت نبود.

میزان پروتئین PSA در سطح سیتوزول توموری مورد ارزیابی قرار گرفت که میانگین میزان پروتئین در گروه مورد (تومورهای بدخیم)  $1/77 \pm 6/86$  نانوگرم در گرم پروتئین تام و در گروه شاهد (تومورهای خوش خیم)  $3/34 \pm 90/4$  نانوگرم در گرم پروتئین تام اندازه گیری شد که این اختلاف میزان پروتئین بین دو گروه از نظر آماری معنی دار بود (نمودار ۱-الف). در ضمن میانگین PSA در درجه یک توموری  $2/6 \pm 8/23$  نانوگرم در گرم پروتئین تام، در درجه ۲ توموری  $4/63 \pm 7$  نانوگرم در گرم پروتئین تام و در درجه ۳ توموری  $1/66 \pm 3/33$  نانوگرم در گرم پروتئین تام که این افزایش بین درجات ۱ با ۲، ۲ با ۳ و ۱ با ۳ معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). میانگین میزان پروتئین در مرحله ۱ توموری  $4/28 \pm 15/71$  نانوگرم در گرم پروتئین تام و در مرحله ۲ توموری  $7/22 \pm 2/53$  نانوگرم در گرم پروتئین تام و در مرحله ۳ توموری صفر نانوگرم در گرم پروتئین تام بود که



نمودار ۱: مقایسه سطح سیتوزول تومورال آنتی ژن اختصاصی پروستات (الف) در افراد نرمال و بیماران مبتلا به سرطان پستان و (ب) در مراحل مختلف توموری



نمودار ۲: مقایسه فعالیت آنزیم تلومراز در درجات مختلف توموری (الف) و مراحل مختلف توموری (ب)

## بحث:

علل متعددی برای ایجاد سلول های سرطانی ذکر کرده اند از جمله هورمون های استروئیدی ، آنزیم تلومراز و آنتی ژن اختصاصی پروستات. در این مطالعه نتایج نشان داد که گیرنده هورمون پروژسترون در ۶۲ درصد و گیرنده هورمون استروژن در ۴۵/۷ درصد تومورهای بدخیم پستان بیان شده است. این نتایج همسو با یافته های کاموری و همکاران است که هدف آنها بررسی پروتئین و بیان ژن بخش کاتالیک آنزیم تلومراز و گیرنده های استروژن و پروژسترون در بیماران مبتلا به سرطان پستان بود. نتایج این بررسی نشان داد که در ۶۶ درصد کارسینوما ها، گیرنده های پروژسترون و استروژن بیان شده است (۱۷). در ادامه بررسی حاضر، بیان ژن آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) در بافت های توموری مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که PSA mRNA در ۷۲ درصد بافتهای توموری خوش خیم و نیز در ۱۴ درصد بافت های توموری بدخیم مرحله اول (stage 1) ، قابل تشخیص هستند که مطابق با مطالعات دیاماندیس و همکاران است همچنین مونه و همکاران نشان دادند، بیان PSA mRNA در تومورهای پستانی که دارای پروتئین PSA هستند، قابل تشخیص می باشد ولی در تومورهای فاقد پروتئین PSA ، قابلیت حداقل تشخیص PSA mRNA وجود ندارد. نتایج به عمل آمده در این تحقیق نشان داد که mRNA فقط در بافتهای توموری خوش خیم و توموری بدخیم مرحله اول که میزان بالای PSA (برابر یا بیشتر از ۰/۰۳ نانوگرم در میلی گرم پروتئین تام) دارند، قابل تشخیص است (۹،۱۶).

در این مطالعه مشخص گردید که میزان پروتئین PSA در بافت های توموری خوش خیم نسبت به بافتهای توموری بدخیم به طور معنی داری بالا است و در بافت های سرطانی با افزایش اندازه و پیشرفت تومور میزان PSA پائین می باشد بطوریکه اختلاف در بین مرحله ۱ و ۲، مرحله ۳ و ۱، مرحله ۳ و ۲ از نظر آماری معنی دار است و این نتایج موافق با نتایج تحقیق زاویاچیک و همکاران است. آنان نشان دادند که بالاترین میزان PSA در بافت پستان در سطح پروتئین در بافت های خوش خیم پستان می باشد و پایین ترین میزان PSA نیز در مراحل پیشرفته بافت های سرطانی دیده می شود و این مطلب نشان می دهد که میزان PSA در

بافت های بدخیم پستان نسبت به بافت های هایپرپلاستیک خوش خیم یا بافت های سالم پایین تر است (۱۸). علت بالا بودن میزان PSA در بافت های توموری خوش خیم نسبت به بافت های سرطانی این است که احتمالاً منشا تولید PSA در بافت پستان سلول های طبیعی پستان باشند و به این دلیل در زنان مبتلا سرطان پستان ، PSA افزایش نمی یابد (۱۹،۲۰).

در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم تلومراز مورد ارزیابی قرار گرفت که میزان فعالیت تلومراز در بافت های سرطانی بالا بود در حالیکه در بافت های خوش خیم فاقد فعالیت بود و اختلاف فعالیت تلومراز بین بافت های سرطانی و بافت های خوش خیم پستان از نظر آماری معنی دار بود و به این ترتیب اندازه گیری فعالیت تلومراز در بافت های توموری به تشخیص سرطان پستان کمک می کند که این مطلب نشان دهنده یک ارتباط بین فعالیت تلومراز و پیش آگهی بیماری است که این نتایج مشابه با یافته های موکبل و همکاران در سال ۲۰۰۰ است (۲۱). هارلی و همکارانش در ارتباط با سرطان و ظهور تلومراز گزارش دادند ، فعالیت آنزیم تلومراز در اغلب سلولهای سرطانی بدخیم دچار تنظیم افزایشی می گردد (۲۲) و ما نیز در این مطالعه مشاهده کردیم که در بافت های سرطانی با افزایش درجه و مرحله بیماری میزان فعالیت تلومراز افزایش می یابد ، این اختلاف در بین مراحل و درجات ۱ و ۲، ۱ و ۳، ۳ و ۲ از نظر آماری معنی دار است. در این مطالعه مشخص گردید که بین میزان PSA و گیرنده های استروژن در بافت های توموری ، ارتباط معنی داری وجود دارد و نیز میزان PSA در بافت های توموری دارای گیرنده های پروژسترون، گرایش به افزایش دارد. این نتایج در راستای یافته های ایلوان و همکاران و سایر محققین است که نشان دادند ارتباط معنی داری بین گیرنده های استروژن و پروژسترون با میزان PSA در تومورهای پستان وجود دارد (۲۳،۲۴). در این مطالعه مشاهده شد که در بافت های توموری بین فعالیت نسبی آنزیم تلومراز با گیرنده های استروژن تفاوت معنی داری وجود دارد و همچنین در بافت های توموری بدخیم بین فعالیت نسبی آنزیم تلومراز با گیرنده های پروژسترون اختلاف معنی داری وجود دارد که این یافته ها همسو با نتایج ژائو وانگ و همکاران است که نشان دادند، بیان ژن تلومراز تحت کنترل هورمونهای

3. Zarghami N, Grass L, Diamandis EP. Steroid hormone regulation of prostate specific antigen expression in breast cancer. *Br J Cancer* 1997;75:579-588.
4. Watt KWK, Lee PJ, Mtimkulu T, Chan WP, Loo R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:3166-3170.
5. Yousef GM, Ordon MH, Foussias G, Diamandis EP. Genomic organization of the siglec gene locus on chromosome 19q13.4 and cloning of two new siglec pseudogenes. *Gene* 2002; 286: 259-70.
6. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett* 1987; 214:317-322.
7. Wang MC, Pasidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate specific antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate* 1981; 2: 89-96.
8. Diamandis E. P, Yu H. Nonprostatic sources of prostate-specific. *Antigen Urol Clin N Am* 1997; 24: 275-282.
9. Diamandis EP, Yu H, Sutherland DJA. Detection of prostate-specific antigen Immunoreactivity in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32:301-310.
10. Majumdar S, Diamandis EP. The promoter and the enhancer region of the KLK3 (prostate-specific antigen) gene is frequently mutated in breast tumors and in breast carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1999;79:1594-1602.
11. Zarghami N, Diamandis EP. Detection of prostate specific antigen mRNA and protein in breast tumors. *Clin Chem* 1996;42:361-366.
12. Ahmed A, Tollefsbol TO. Telomerase, telomerase inhibition, and cancer. *J Anti Aging Med* 2003; 6(4): 315-25.
13. Henderson B.E, Ross R.K, and Pike MC. Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science* 1993;259:633-638.
14. Holt SE, Norton JC, Wright WE, Shay WJ. Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAPeze telomerase detection kit. *Methods Cell Sci* 1996; 18: 237-248.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem* 1976;72:248-254.
16. Monne M, Croce CM, Yu H, Diamandis EP. Molecular characterization of prostate-specific antigen mRNA expressed in breast tumors. *Cancer Res* 1998; 54:6344-6347.
17. Kammori M, Izumiyama N, Hashimoto M, Nakamura K, Okano T, Kurabayashi R, et al.

استروئیدی قرار دارد بطوریکه استروژن با فعال سازی زیر واحد کاتالیتیک تلومراز موجب افزایش فعالیت تلومراز می شود. پروژسترون نیز بیان mRNA زیر واحد کاتالیتیک تلومراز را افزایش می دهد ولی این تاثیر موقتی بوده و پروژسترون به عنوان آنتاگونیست، بیان زیر واحد کاتالیتیک تلومراز را که توسط استروژن افزایش می یابد بلوکه می کند این امر به واسطه مسیر آبشاری MAP Kinase صورت می گیرد (۲۵).

### نتیجه نهایی :

مقایسه میزان پروتئین و نیز بیان PSA mRNA با فعالیت آنزیم تلومراز در بافت های توموری نشان داد یک رابطه معکوس بین میزان پروتئین و نیز بیان mRNA PSA با فعالیت آنزیم تلومراز وجود دارد بطوریکه با افزایش سرطانی شدن ، فعالیت تلومراز افزایش یافته و در مقابل میزان PSA کاهش یافته بود و نیز PSA mRNA قابل تشخیص نبود. مزیت این مطالعه نسبت به سایر مطالعات صورت گرفته این است اولاً گیرنده های استروئیدی با دو تومورمارکر به صورت موازی در تومورهای خوش خیم و سرطانی پستان مورد مطالعه قرار گرفته اند. ثانیاً بررسی این عوامل به صورت موازی می تواند حساسیت تشخیص کلینیکی و پیش آگهی را بالا برده که جهت بررسی مکانیسم تنظیم این دو ژن در سرطان های وابسته به هورمونهای استروئیدی به ویژه سرطان پستان نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

### سپاسگزاری :

نویسندگان این مقاله از حمایت مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در جهت تامین اعتبارات این پژوهش با کد طرح ۹۳-۸۳ ، و نیز کارکنان آزمایشگاه تخصصی و فوق تخصصی پاتوبیولوژی مرکزی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به ویژه از آقای امیر رضا امیرهجری برای همکاری در این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### منابع :

1. Malin A, Matthews CE, Shu X, Cai H, Dai Q, Jin F, et al. Energy balance and breast cancer risk cancer epidemiology. *Biomarkers Prevention* 2005;14:1496-1501.
2. Mokbel K, Ghilchik M, Williams G , Akbar N, Parris C, Newbold R. The association between telomerase activity and hormone receptor status and p53 expression in breast cancer. *Int J Surg Investig* 2000;1(6):509-16.



- Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and protein, and of estrogen and progesterone receptors, in breast tumors: preliminary data from neo-adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 2005 Nov; 27(5): 1257-63.
18. Zaviacic M, Ablin RJ, Ruzickova M, Stvrtina S, Danihel L, Zaviacic T, et al. The normal female and the male breast epithelium does not express prostate-specific antigen: preliminary immunohistochemical observations of autopsy breast tissues. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18:41-44.
  19. Diamandis EP. New diagnostic applications and physiological functions of prostate specific antigen. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55 (Suppl 21): 105-111.
  20. Diamandis EP. Prostate- specific antigen - new applications in breast and other cancers. *Anticancer Res* 1996;16:3983-3986.
  21. Mokbel K, Williams NJ. Telomerase and breast cancer: from diagnosis to therapy. *Int J Surg Investig* 2000; 2(1): 85-8.
  22. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, et al. Telomerase, Cell Immortality, and Cancer. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 1994; 59: 307-315.
  23. Ilvans S, Celik V, Centinaslan I, Calay Z, Ferahaman M. Immunohistochemical analysis of Prostate- specific antigen in female breast cancer. *J BUON* 2004;9(2): 183 – 6.
  24. Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJ. Immunoreactive prostate - specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem* 1994;27(2):75 -9.
  25. Zhuo W, Satoru K, Masahiro T, Masaaki T, Noriyuki Y, Yoshiko M, et al. Progesteron regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen – activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 2001;60:5376-5381.