

Investigation of *ERBB1* gene mutation and expression in Iranian women with sporadic breast cancer and its relationship with Clinical and Histopathology features of the disease

ARTICLE INFO

Article Type

Original Article

Authors

Reza Pazhoomand^{1,2,3}, Elahe Keyhani^{4*}, Farkhondeh Behjati^{3,5,6*}

1 Genetic Laboratory of Shiraz Fertility Center, Shiraz, Iran.

2 Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran.

3 Genetics Research Centre, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran.

4 Clinical Research Development Center of Rofeideh Rehabilitation Hospital-University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran.

5 Sarem Gynecology, Obstetrics and Infertility Research Center, Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Science (IUMS), Tehran, Iran.

6 Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran.

*Corresponding Authors

*Corresponding Authors: 1- Prof. Farkhondeh Behjati; Sarem Gynecology, Obstetrics and Infertility Research Center, Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Science (IUMS), Tehran, Iran & Genetics Research Centre, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran. Phone: +98 (21) 44670888. Email addresses: fbehjati@gmail.com & f_behjati@uswr.ac.ir. 2- Dr. Elahe Keyhani; Clinical Research Development Center of Rofeideh Rehabilitation Hospital, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran. Phone: +982122205326. Email address: Ekeyhani1058@gmail.com & Ekeyhani1058@uswr.ac.ir. Orcid ID: 0000-0003-2607-3729.

Received: December 11, 2021

Accepted: March 10, 2022

e Published: December 13, 2022

Article History

ABSTRACT

Introduction: *ERBB1* gene is highly expressed in various human tumors, including breast cancer, and is considered as the initiator of various important stages during malignancy. The aim of this study was to investigate of mutation and expression of the *ERBB1* gene in Iranian women with primary breast cancer and its relationship with the pathobiology characteristics of the disease.

Material and methods: Women with primary breast cancer were admitted to Mehrad Hospital in Tehran and underwent surgery. Part of the macroscopically visible tissue sample was collected from 121 patients with this cancer. 81 patients were appropriate for entry into the study. DNA and RNA were extracted. *ERBB1* copy number was investigated using the MLPA technique. *ERBB1* RNA was extracted from the tissue samples and cDNA synthesis was performed with a kit. Samples were analyzed using Real-time PCR for the determination of *ERBB1* gene expression level.

Results: The age range of the patients was between 41 and 70 years, and the patients were divided into two categories, below and above 50 years. In 7 patients with *ERBB1* copy increase, none showed increased expression for this gene. Also, five patients who had an increase in the expression of this gene did not show an increase in the number of copies of this gene. No statistically significant relationship was observed between increased expression and copy number of this gene in the patients. But; there was significant association between *ERBB1* gene expression and III-I stage of the disease ($P<0.001$); however, there was no significant association between clinical and histopathological parameters with *ERBB1* gene mutation and expression.

Conclusion: This study shows that an increase in the expression of the *ERBB1* gene does not necessarily reflect an increase in copy number of the gene. Other mechanisms such as epigenetics might be involved. There was significant association between *ERBB1* gene expression and III-I stage of disease. However, these findings should be investigated in a larger sample size.

Keywords: Breast Cancer; *ERBB1* Gene Expression; *ERBB1* Gene Mutation; Real-Time PCR; MLPA.

دیگری برای افزایش بیان این ژن نظیر اپیژنتیک علت آن می‌باشد. از طرفی ارتباط خاصی با فاکتورهای بالینی و هیستوپاتولوژی با بیان ژن *ERBB1* مشاهده نشد. بیان ژن این ژن در بیماران مرحله I-III بیماری افزایش معناداری وجود داشت. ولیکن این یافته‌ها بایستی در تعداد نمونه‌ی بیشتری بررسی گردد.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان؛ بیان ژن *ERBB1*؛ جهش ژن *ERBB1*؛ Real-time PCR؛ MLPA.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۹

***نویسندگان مسئول:** ۱- پروفسور فرخنده بهجتی؛ مرکز تحقیقات زنان، زایمان و نابروری صرم، بیمارستان فوق تخصصی صرم، دانشگاه علوم پزشکی ایران (IUMS)، تهران، ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۴۶۷۰۸۸۸. آدرس ایمیل: f_behjati@uswr.ac.ir & f_behjati@gmail.com. ۲- دکتر الهه کیهانی؛ واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان توانبخشی رفیده، دانشگاه علوم توان بخش و سلامت اجتماعی، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۲۲۲۰۵۳۲۶. آدرس ایمیل: Ekeyhani1058@uswr.ac.ir & Ekeyhani1058@gmail.com. کد ارکید: ۰۰۰۳-۰۰۰۰-۲۶۰۷-۳۷۲۹.

مقدمه

سرطان پستان بعد از سرطان پوست، شایع‌ترین و اولین علت مرگ و میر در زنان با دامنه سنی ۴۰ تا ۴۴ ساله است. این بیماری علت ۲۸ درصد موارد سرطان تازه تشخیص داده شده در زنان سراسر جهان می‌باشد^[۱]. هر ساله تقریباً ۱٫۷ میلیون مورد جدید از این بیماری در سراسر جهان تشخیص داده می‌شود^[۲]. با توجه به افزایش تعداد این سرطان در هر سال، محققان انتظار دارند که بروز آن در سال‌های بعد افزایش یابد^[۳]. از این نظر، تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۳۰ میزان بروز این بیماری به حدود ۳٫۲ میلیون نفر در سال افزایش یابد^[۴]. علیرغم افزایش تشخیص سرطان پستان در طول سال‌ها، مرگ و میر افراد به دلیل تشخیص زودهنگام و پیشرفت در درمان کاهش یافته است^[۵]. در دهه اخیر، تست‌های مولکولی جایگاه ویژه‌ای در تشخیص و طبقه‌بندی سرطان‌ها یافته‌اند. این تست‌های تشخیصی نه تنها می‌توانند برای تشخیص فردی کمک کننده باشند، بلکه می‌توانند برای درمان اختصاصی مناسب کاربرد داشته باشند و مقاومت، عدم جوابدهی و سمیت دارویی را برای بیماران محدود سازند^[۶].

اعضای خانواده‌ی *ERBB* شامل *ERBB1* (*EGFR*)، *ERBB2* (*HER2*)، *ERBB3* (*HER3*) و *ERBB4* (*HER4*) که متعلق به زیرخانواده گروه تیروزین کیناز I هستند. این اعضا از چهار گیرنده تیروزین کیناز غشایی نزدیک به هم تشکیل شده‌اند که همه آن‌ها توسط پروتئوآنکوژن *HER1-4* کدگذاری می‌گردند. همه این ژن‌ها دارای فعالیت تیروزین کیناز هستند و نقش کلیدی در انتقال سیگنال دارند. دومین فعال تیروزین کیناز هر یک از اعضای خانواده *ERBBs* با درجه بالایی از هومولوژی در ساختار و عملکرد حفظ شده است که عمده‌تاً در دوران رشد جنین انسان بیان

بررسی جهش و بیان ژن *ERBB1* در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان تک گیر و ارتباط آن با فاکتورهای بالینی و هیستوپاتولوژی

رضا پژومند^{۱،۲،۳}، الهه کیهانی^{۴*}، فرخنده بهجتی^{۵،۶}

^۱ آزمایشگاه ژنتیک مرکز درمان نابروری شیراز، شیراز، ایران.

^۲ مرکز تحقیقات پزشکی قانونی، سازمان پزشکی قانونی، تهران، ایران.

^۳ مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی، تهران، ایران.

^۴ واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان توانبخشی رفیده، دانشگاه علوم توان بخشی و سلامت اجتماعی، تهران، ایران.

^۵ مرکز تحقیقات زنان، زایمان و نابروری صرم، بیمارستان فوق تخصصی صرم، دانشگاه علوم پزشکی ایران (IUMS)، تهران، ایران.

^۶ مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی صرم (SCRC)، بیمارستان فوق تخصصی صرم، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: ژن *ERBB1* در تومورهای مختلف انسانی از جمله سرطان پستان بیان بالایی داشته و به عنوان شروع کننده انواع مراحل مهم در جریان روند بدخیم شدن در نظر گرفته می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی جهش و بیان این ژن در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر و ارتباط آن با ویژگی‌های بالینی و هیستوپاتولوژی بیماری بود.

مواد و روش‌ها: زنان مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر به بیمارستان مهراد تهران ارجاع، بستری و جراحی شدند. قسمتی از نمونه بافتی قابل مشاهده ماکروسکوپی ۱۲۱ نفر بیمار مبتلا به این سرطان جمع‌آوری گردید. از تعداد ۸۱ نمونه بافت مورد بررسی در این مطالعه، DNA و RNA استخراج گردید. تعداد کپی ژن *ERBB1* با روش MLPA و میزان بیان ژن با روش Real-time PCR بررسی شد.

نتایج: محدوده‌ی سنی بیماران بین ۴۱ تا ۷۰ سال بود و بیماران به دو دسته کمتر و بیشتر از ۵۰ سال تقسیم گردیدند. از تعداد ۸۱ نمونه بررسی شده، در ۷ نفر بیمار، ژن *ERBB1* واجد افزایش تعداد کپی بودند، درحالی که، افزایش بیان ژن را نداشتند. از طرفی، از این تعداد موردنظر، در ۵ نفر بیمار افزایش تعداد کپی این ژن مشاهده نشد، در صورتی که، افزایش بیان ژن دیده شد. هیچ ارتباط معنی‌داری بین افزایش تعداد کپی و بیان برای این ژن در این افراد مشاهده نگردید. اما، بیان ژن *ERBB1* در بیماران مرحله I-III بیماری افزایش معناداری وجود داشت ($P<0.001$)؛ درحالی‌که برای سایر شاخص‌های بالینی و هیستوپاتولوژی ارتباط معناداری با جهش و بیان این ژن دیده نشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه افزایش بیان ژن *ERBB1* ارتباط مستقیمی با افزایش تعداد کپی ژن *ERBB1* نشان نداد و احتمالاً مکانیسم‌های

جراحی، قسمتی از نمونه بافتی قابل مشاهده ماکروسکوپی (با اطلاع پاتولوژیست بیمار) ۱۲۱ نفر بیمار مبتلا به این سرطان جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به دو قسمت تقسیم شده و بلافاصله در دو ویال جداگانه در محلول فرمالین-بافر تازه ۱۰ درصد و با نسبت حجمی ۱ به ۱۰ و محلول نگهدارنده RNA به نام RNA later غوطه‌ور شدند. بافت‌های توموری در اسرع وقت (قبل از ۳۶ ساعت) پس از جراحی به مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی منتقل شدند. تعداد ۱۱۳ نمونه سرطان پستان مهاجم بدون سابقه پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی قبل از عمل جراحی انتخاب شدند که ۹۵ مورد سرطان پستان مجاری و ۱۰ مورد سرطان پستان لوبولار بودند. تعداد ۲۰ نمونه به دلیل پرونده ناقص و بافت غیربهنه برای استخراج DNA از مطالعه حذف شدند. اطلاعات بالینی و هیستوپاتولوژی قبل و بعد از جراحی بیماران نیز از مطب جراحان گرفته و پرونده و نمونه بافتی بیماران کدگذاری شدند.

استخراج DNA از بافت

از ۴۰ تا ۵۰ میلی‌گرم نمونه بافت تومور پستان و کنترل‌ها، DNA استخراج گردید. برای این منظور از کیت استخراج High Pure PCR Template Preparation Kit ساخت کمپانی ROCHE استفاده شد. مراحل استخراج دقیقاً بر طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. وضعیت کیفیت DNA توسط ژل آگارز بررسی شد. برای الکتروفورز نمونه‌های DNA از ژل آگارز ۱٫۵ درصد استفاده شد. پس از بررسی وضعیت نمونه‌ها بر روی ژل، نمونه‌هایی که از کیفیت قابل توجهی برخوردار نبودند و خوردشدگی بر روی ژل نشان دادند، مجدداً از بافت‌های مورد مطالعه استخراج شدند.

بررسی کمی و خلوص DNA با روش اسپکتروفتومتری

جهت تعیین غلظت و درجه خلوص نمونه‌های DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ استفاده شد. غلظت و خلوص نمونه‌های DNA را می‌توان از طریق اسپکتروفتومتری و قابلیت آن‌ها برای جذب اشعه ماوراء بنفش تعیین کرد. غلظت نمونه DNA براساس میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه می‌شود. همچنین، از نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخصی برای میزان خلوص نمونه استفاده می‌گردد. نسبت ۲۸۰/۲۶۰ یک نمونه DNA خالص ۱٫۸±۰٫۱ می‌باشد و تغییرات در خارج از این محدوده نشاندهنده آلودگی است. همچنین، نسبت ۲۳۰/۲۶۰ برای عاری بودن DNA از مواد شیمیایی اندازه‌گیری شد که در صورت آلوده بودن به مواد شیمیایی موجود در پروسه استخراج این نسبت از ۱/۵ پایین‌تر می‌رود و توصیه می‌شود این نسبت بالای ۱/۷ باشد؛ چون در غیر این صورت یک بازدارنده برای واکنش MLPA محسوب می‌شود تمامی DNA استخراج شده در صورت پایین‌تر بودن این نسبت از ۱/۷ دوباره از بافت استخراج شدند.

بررسی مولکولی توسط روش MLPA

روش تکثیر پروب‌های چندگانه وابسته به اتصال (MLPA) روشی جدید به منظور بررسی مناطق حذف و اضافه در ژنوم می‌باشد. این روش به مراتب سریع‌تر و ارزان‌تر از تکنیک FISH است و بنابراین دسترسی آن

می‌شود و رشد، بقا، تبدیل و آپوپتوز طبیعی را تنظیم می‌کند^[۸]. فعال شدن آن‌ها بر فرآیندهای تومورزایی ضروری تأثیر می‌گذارد و نقش مهمی در پاتوژنز سرطان پستان ایفا می‌کند^[۹].

گزارش شده است که اعضای خانواده *ERBB* به طور بالقوه به عنوان عوامل پیش‌آگهی یا اهداف درمانی مفید هستند. *ERBB1* به عنوان یکی از این اعضا در تومورهای مختلف انسانی از جمله سرطان پستان بیان بالایی داشته و به عنوان شروع کننده انواع مراحل مهم در طول بدخیمی شدن در نظر گرفته می‌شود. mRNA این ژن در سرطان‌های پستان و در سطوح بالاتر شناسایی می‌شود و بیان بیش از حد آن با گرید بالای بافت‌شناسی و درگیری غدد لنفاوی مرتبط است، اگرچه همه مطالعات موجود موافق این مطلب نیستند^[۱۰-۱۲]. اهمیت پیش‌آگهی *ERBB1* در بیماران مبتلا به سرطان پستان نامشخص است، اگرچه به عنوان یک عامل نامطلوب در سایر تومورها در نظر گرفته می‌شود^[۱۳].

در کشور ایران، تحقیقات و گزارش‌های کمی درباره اپیدمیولوژی این بیماری در دسترس است. تحقیقات نشان داده‌اند که سرطان پستان، زنان ایرانی را یک دهه زودتر از کشورهای پیشرفته درگیر می‌کند که میانگین سن ابتلای آن بین ۴۷٫۱ تا ۴۸٫۸ می‌باشد. آمار وزارت بهداشت ایران در سال ۲۰۰۰ نشان داد که سرطان پستان به عنوان اولین سرطان در بین زنان ایرانی با میزان ۲۱٫۴ درصد مطرح است^[۱۴]. با توجه به اینکه انکوژن *ERBB1* نقش کلیدی در پروسه تکثیر سلولی (القای میتوز) و نسخه برداری DNA و در نهایت تومورزایی ایفا می‌کند و نیز ابهاماتی که در همراهی افزایش نسخه و افزایش بیان و نیز ارتباط آن‌ها با شاخص‌های پاتولوژی و پیش‌آگهی و پیش‌بینی کننده تومور وجود دارد؛ این پژوهش انجام شد تا با جایگزینی روشی ساده‌تر (MLPA) جهت بررسی میزان کپی DNA به جای روش پیچیده و پرهزینه و وقت گیر Array CGH و همچنین روش Real-time PCR جهت بررسی تغییرات بیانی در سطح mRNA مشخص نماییم که آیا می‌توان ارتباط معنی‌داری بین این شاخص‌ها و ارتباط آن‌ها مطرح شده، مشاهده نمود یا خیر. تا در این صورت بتوان مدیریت بهتری برای درمان و تعیین پیش‌آگهی بیماران مشخص نمود. بنابراین؛ هدف از این مطالعه، بررسی تعداد کپی و بیان ژن *ERBB1* در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان غیر ارثی و ارتباط آن با ویژگی‌های بالینی، هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی بود.

مواد و روش‌ها

افراد مورد مطالعه و نمونه برداری بافتی

زنان مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر، در فاصله دی ماه ۱۳۹۰ تا آذر ۱۳۹۱ بدون در نظر گرفتن سن یا زیرگروه هیستوپاتولوژیک، به بیمارستان مهراد تهران ارجاع، بستری و جراحی شدند. قبل از گرفتن بافت توموری از این بیماران، رضایت‌نامه اخلاقی آگاهانه مبتنی بر اهدای بافت مطابق پروتکل کمیته کشوری اخلاق در پژوهش‌های پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی گرفته شد. با هماهنگی‌های لازم با تیم

^۱ Multiplex-Ligation Dependent Probe Amplification

سنتز cDNA

بر اساس اهداف آزمایش، پرایمر مورد استفاده می‌تواند اختصاصی یک ژن خاص و یا بصورت غیر اختصاصی باشد و به تمام مولکول‌های RNA متصل شود. در این بررسی به منظور سنتز cDNA با بالاترین کارایی، ترکیبی از مقادیری از هر دو پرایمر غیر اختصاصی Oligo-dT و Random Hexamers در یک واکنش مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد، با استفاده از کیت سنتز cDNA به نام RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ساخت شرکت Fermentas و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده cDNA با اندکی تغییر ساخته شد. برای بررسی کیفیت و یکپارچگی cDNA، واکنش PCR با ژن خانه‌دار HPRT^۴ به عنوان یک کنترل داخلی انجام گرفت. سپس، الکتروفورز محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۲ درصد انجام شد و پس از بررسی نتایج به دست آمده، نمونه‌هایی که باند مربوط به قطعه ۱۱۷ جفت بازی حاصل از RT-PCR ژن HPRT در ژل آن‌ها مشاهده نشد و یا از شدت قابل توجهی برخوردار نبود، مجدداً از نمونه‌های RNA مربوطه سنتز شدند.

روش ریل تایم پی سی آر (Real-time PCR)

در این روش از نمونه‌های DNA یا RNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. غلظت DNA یا RNA استاندارد با اسپکتروفوتومتر تعیین و سپس از روی وزن مولکولی نمونه به تعداد نسخه‌های آن تبدیل گردید.

تعیین غلظت مناسب پرایمر و cDNA

برای تعیین بهترین غلظت پرایمر و cDNA ابتدا واکنش Real-time PCR برای غلظت‌های مختلف پرایمر و cDNA برای یک کنترل انجام شد. به این منظور از پرایمر به غلظت (۱۰ میکرومولار) به ترتیب حجم‌های ۰٫۴، ۰٫۸، ۱٫۲ و ۱٫۶ میکرولیتر و از cDNA به غلظت ۱ میکروگرم بر ۲۰ میکرولیتر و نیز حجم‌های مختلف ۰٫۵، ۱، ۱٫۵ و ۲ میکرولیتر برای ژن مورد نظر و HPRT در نظر گرفته شد. در نهایت حجم cDNA در نظر گرفته برای ژن ERBB1 مقدار یک میکرولیتر تعیین گردید.

واکنش Real-time PCR

این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد و در آن از رنگ سایبر گرین^{۵۲} به منظور ردیابی قطعات cDNA محصول واکنش PCR استفاده گردید. برای انجام واکنش از مخلوط واکنش Real-time PCR آماده (ساخت شرکت TAKARA) استفاده شد. مواد مورد استفاده در واکنش به صورت دو مخلوط جداگانه آماده شده و با هم مخلوط شدند. در هنگام آماده‌سازی مسترمیکس واکنش برای انجام واکنش‌ها، حجم مسترمیکس ۱۰ درصد بیش از حجم مورد نیاز در نظر گرفته شد. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش این نمونه‌ها در دستگاه Applied Biosystems 7500

برای بیماران راحت‌تر می‌باشد. اساس و روش MLPA اتصال پروب‌های طراحی شده برای منطقه خاصی از ژنوم می‌باشد. به دنبال اتصال پروب‌ها، پرایمرها که از نوع همگانی بوده و به دو انتهای پروب وصل می‌باشند؛ تکثیر می‌یابند. هر پروب MLPA متشکل از دو الیگونوکلوئید است که باید برای متصل شدن به هم دقیقاً در مجاورت یکدیگر قرار گیرند. مقدار نسبی هر فرآورده تکثیر پروب، به میزان نسبی توالی هدف پروب در نمونه DNA بستگی دارد. تعداد نسخه‌های غیرعادی، توسط مقایسه نمونه‌های بیمار با نمونه‌های مرجع قابل شناسایی می‌شوند به منظور جداسازی قطعات با روش الکتروفورز موئینه‌ای، یک قطعه الیگوی دارای اندازه متغیر داخل یکی از دو پروب جداسازی شده است. بنابراین می‌توان ۴۰ تا ۵۰ پروب را در یک واکنش در کیت‌های تجاری استفاده نمود. حساسیت این روش با ۲۰ نانوگرم DNA و ویژگی آن تشخیص تفاوت در یک بازونوکلوئیدی می‌باشد و در این پروسه می‌توان ۹۶ نمونه را در طی ۳ ساعت کاری انجام داد. DNA تکثیر شده توسط دستگاه الکتروفورز موئینه‌ای ABI3100 Genetic Analysis، جداسازی می‌گردد و نواحی ژنومی که دچار افزایش/کاهش گردیده‌اند، مشخص می‌گردند. امروزه، کیت‌های MLPA برای نواحی مختلف ژنومی از جمله ژن‌های دخیل در سرطان پستان به صورت تجاری تهیه گردیده (MRC-Holland) این روش در مقایسه با سایر روش‌ها روشی سریع، ارزان و بنابراین قابل دسترس‌تر برای بیماران می‌باشد.

استخراج RNA از بافت

از نمونه بافت تومور پستان و کنترل‌ها، ۱۵ تا ۲۰ میلی‌گرم، RNA استخراج گردید. برای این منظور از کیت استخراج RNA (RNeasy Plus; Kiagene Company) استفاده شد. مراحل استخراج دقیقاً بر طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت (RNeasy Plus Universal Handbook 09/2010). قبل از شروع این پروسه، نمونه بافت موردنظر به دفعات منجمد و در هاون چینی کوبیده شد تا کاملاً خرد شود. پس از اضافه کردن محلول لیزکننده کیت، چندین بار این نمونه از سرنگ عبور داده شد تا کاملاً هوموژنیزه شود. برای بررسی کیفی RNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد، حضور باندهای RNA ریبوزومی یوکاریوتی ۲۸S و ۱۸S و نیز نسبت شدت نور فلورسنت^۲ حدوداً ۲ به ۱ بررسی شد^{۱۵}. جهت بررسی کمی و خلوص RNA با روش اسپکتروفوتومتری نیز از دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ استفاده گردید.

طراحی پرایمرها

تمام پرایمرها بر اساس توالی موجود در بانک اطلاعات ژنوم NCBI و با استفاده از برنامه طراحی پرایمر^۳ که بصورت آنلاین موجود بود، طراحی شدند. تمام پرایمرهای طراحی شده دارای دمای ذوب حدود ۵۷ تا ۵۹ درجه و محتوی CG حتی‌الامکان یکسان بودند تا بتوان از یک برنامه واکنش برای بررسی تمام آن‌ها استفاده نمود.

^۴Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
^۵Syber green II

^۲Fluorescence Intensity
^۳Primer3

نیز به سبب مناسب نبودن کیفیت DNA یا RNA از مطالعه خارج شدند و در نهایت ۸۱ نمونه وارد این مطالعه گردیدند (جدول ۱).

در این مطالعه میانگین سن بیماران دارای سرطان تک‌گیر پستان 54.1 ± 1.8 سال محاسبه شد. محدوده سنی بیماران بین ۴۱ تا ۷۰ سال متغیر بود و بیماران به دو دسته زیر ۵۰ سال و بالای ۵۰ سال تقسیم گردیدند. به دلیل اینکه سرطان‌های دوطرفه در اغلب موارد ارثی می‌باشند، دو بیمار دوطرفه که در سنین پایین قرار داشتند و سابقه فامیلی آن‌ها مثبت بود، حذف شدند. بنابراین، تمام بیماران این مطالعه در یک پستان ضایعه وجود داشت. از نظر وضعیت آناتومیک، ۳۶ مورد در پستان سمت چپ و ۲۸ مورد در پستان سمت راست گزارش شدند. دو تکنیک جراحی در این مطالعه وارد شد. یکی برداشتن کامل پستان و دیگری برداشتن بافت تومور و حفظ پستان^{۱۰} تعداد بیمارانی که از طریق جراحی حفظ پستان (۸۹ درصد) تحت درمان قرار گرفتند، بیشتر از ماستکتومی اصلاح یافته (۱۱ درصد) بود (جدول ۱). دامنه سائز تومورها در این مطالعه، بین ۰٫۷ تا ۸ سانتی‌متر تخمین زده شد. میانگین اندازه این تومورها 1.34 ± 3.01 سانتی‌متر بود. بیماران بر اساس اندازه تومور به سه گروه کوچکتر از ۲ سانتی‌متر، بین ۲ تا ۵ سانتی‌متر و بزرگتر یا مساوی ۵ سانتی‌متر تقسیم شدند. بیش از ۸۸ درصد از تومورها کمتر از ۵ سانتی‌متر بودند. تومورهای بین ۲ تا ۵ سانتی‌متر بالاترین حجم از نمونه‌ها را به خود اختصاص داد.

نوع هیستوپاتولوژی و مرحله‌بندی تومور

از نظر بافت‌شناسی، ۷۲ تومور از نوع سرطان تهاجمی مجرای و ۴ تومور از نوع سرطان تهاجمی لوبولی و بقیه را سایر فرم‌های بافتی تشکیل می‌دادند. به طور کلی ۴ مرحله برای سرطان وجود دارد اما در این مطالعه، مرحله ۴ مشاهده نشد و بیماران در سه گروه مراحل ۱، ۲ و ۳ قرار گرفتند. مرحله‌بندی تومور به دلیل دسترسی به اطلاعات دقیق از وضعیت گره‌های لنفی زیر بغل به دقت و مطابق پروتکل توسط جراح و انکولوژیست تعیین شد. مرحله ۲ با داشتن ۵۴ مورد بیشترین حجم از نمونه‌ها را به خود اختصاص داد. بیماران مورد مطالعه بر اساس این شاخص به سه گروه با گریدهای بدخیمی نوع ۱، ۲ و ۳ تقسیم شدند. درجه بدخیمی نوع ۲ بیشترین حجم نمونه را به خود اختصاص داد و درجه بدخیمی نوع ۳ با ۱۰ بیمار پایین‌ترین تعداد را داشت.

جدول ۱. فراوانی و درصد مشخصات بالینی و پاتولوژی در بیماران مبتلا به سرطان پستان.

پارامتر	مشخصات پارامتر	تعداد	فراوانی	درصد
نوع جراحی	برداشتن کامل پستان	۸	۱۱	
	برداشتن بافت تومور و حفظ پستان (**BCS)	۷۳	۸۹	
سمت درگیری	راست	۲۸	۶۳٫۸	
	چپ	۳۶	۵۶٫۲	

^{۱۰} Modified radical mastectomy (MRM)
^{۱۱} Breast conserving surgery (BCS)

Real-time PCR قرار داده شدند و طبق برنامه مشخص شده واکنش انجام گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR

تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از داده‌های حاصل از Real-time PCR براساس روش $\Delta\Delta Ct$ بررسی شدند. حدود میزان کارایی پرایمرها با نرم افزار LinRegPCR Ruijter, 2009 ورژن ۱۲٫۷ بررسی شد و با استفاده از نرم افزار REST-RG ورژن ۳، میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه تعیین و P value تغییرات بیانی تعیین شده با-Pair Wise Fixed Reallocation Randomization test انجام شده توسط این نرم‌افزار مورد سنجش قرار گرفت^{۱۶}.

آنالیز آماری

از آن جایی که هیچ سطح نرمال از پیش تعیین شده‌ای برای مقادیر بدست آمده Real-time PCR وجود نداشت، نیاز به تعیین ملاکی برای مشخص کردن حد نرمال این آزمون بود. یک راه حل منطقی، در نظر گرفتن مقادیر عددی افراد گروه کنترل سالم در ژن به صورت جداگانه و تعیین بازه‌ای بر اساس توزیع t-استودنت آماری برای ژن مورد نظر بود. میانگین و انحراف استاندارد این توزیع t با استفاده از مقادیر Real-time PCR افراد گروه کنترل تعیین گردید. بیمارانی که مقادیر عددی بدست آمده آن‌ها بزرگتر از مقدار A بود، بیماران دارای افزایش بیان محسوب شدند. سایر بیماران نرمال در نظر گرفته شدند. در صورتی که تعداد داده‌ها کم و فرض نرمال بودن آن‌ها معقول نباشد، از ضریب همبستگی اسپیرمن (Spearman Correlation Coefficient) استفاده می‌شود. ضریب همبستگی‌ای که بر اساس رتبه داده‌ها محاسبه می‌شود، توسط اسپیرمن محاسبه شد.

نتایج

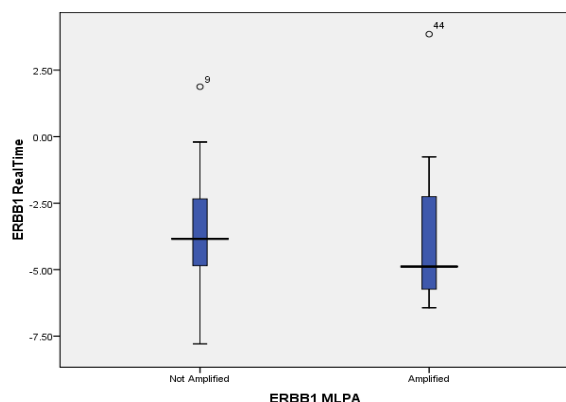
وضعیت شاخص‌های بالینی و هیستوپاتولوژی بیماران

در این مطالعه، تعداد ۱۰۳ نفر بیمار مبتلا به سرطان تک‌گیر وارد مطالعه شدند. این تعداد بیمار از بین ۱۲۱ نمونه ارسالی از بیمارستان مهراد تهران در بازه زمانی بهار ۱۳۹۰ تا تابستان ۱۳۹۱ انتخاب شدند. پس از اخذ سابقه بیماری و همچنین کسب اطلاعات در مورد سابقه فامیلی بیماری، ۸ نفر بیمار بدلیل احتمال ارثی بودن سرطان حذف شدند. در دو مورد نیز به دلیل اینکه نمونه ارسالی از پستان مرد مبتلا بود، نمونه وارد مطالعه نشد. در چهار مورد نیز اطلاعاتی از بیمار در پرونده پزشک معالج ثبت نشده بود. سه مورد از تومورها درجا^۷ بوده و یک مورد نیز به علت تشخیص گرانولوما و دو بیمار نیز که تحت درمان از نوع نئوآدجوانت درمانی^۸ قرار گرفته بودند، از مطالعه حذف شدند. از این ۱۰۳ نفر بیمار، ۱۲ مورد به علت کم بودن^۹ نمونه جهت استخراج DNA (ابتدا از بافت مورد نظر RNA استخراج و سپس DNA استخراج گردید) و ۱۰ نمونه

^۷ Male breast cancer
^۸ In situ
^۹ Neoadjuvant Therapy
^{۱۰} Suboptimal

مقایسه تغییرات بیانی و تعداد کپی ژن *ERBB1*

در ۷ بیماری که *ERBB1* در آن‌ها افزایش کپی داشته‌اند، هیچ‌یک افزایش بیان برای این ژن را نشان ندادند و متقابلاً هیچ‌کدام از ۵ بیماری که افزایش بیان ژن *ERBB1* داشتند نیز افزایش تعداد کپی این ژن مشاهده نشد. همانطور که در جدول مشخص شد، ارتباط معنی‌داری بین افزایش بیان و افزایش تعداد کپی این ژن از نظر آماری وجود نداشت (شکل ۱) (جداول ۳ تا ۵، جداول ۳ و ۴ در انتهای مقاله). اما، بیان ژن *ERBB1* در بیماران مرحله ی I-III بیماری افزایش معناداری وجود داشت ($P < 0.001$)؛ ولی برای سایر شاخص های بالینی و هیستوپاتولوژی ارتباط معناداری با جهش و بیان این ژن دیده نشد (جدول ۵).



شکل ۱. باکس پلات تغییرات بیان ژن *ERBB1* بر اساس سطح کپی این ژن.

جدول ۵: مقادیر P مربوط به ارتباط مشخصات بالینی و پاتولوژی چند متغیره در ژن *ERBB1* مورد بررسی با استفاده از آزمون استقلال کای اسکوتر.

متغیر	نوع تست	سطوح مورد مقایسه	P-Value
مرحله ی بیماری	MLPA	I-II	۰.۷۲
		II-III	۰.۵۸
		I-III	۰.۶۱
	RealTime	I-II	۰.۵۶
		II-III	۰.۴۵
		I-III	<۰.۰۰۱
اندازه تومور	MLPA	<2, 2-5 cm	۰.۵۶
		2-5, >5 cm	۰.۴۵
		<2, >5cm	۰.۷۳
	RealTime	<2, 2-5 cm	۰.۶۹
		2-5, >5 cm	۰.۸۲
		<2, >5cm	۰.۸۰
MVD	MLPA	۲۰-۴۰, <۲۰	۰.۸۷
		>۲۰-۴۰, ۴۰	۰.۶۱
		>۴۰, <۲۰	۰.۸۵
	RealTime	۲۰-۴۰, <۲۰	۰.۹۳
		>۲۰-۴۰, ۴۰	۰.۶۱
		>۴۰, <۲۰	۰.۸۸
	MLPA	Luminal A, Luminal B	۰.۳۴
		Luminal A, Basal Like	۰.۰۹
		Luminal A, Enriched	۰.۸۳
		Luminal B, Basal Like	۰.۹۰
		Luminal B, Enriched	۰.۷۱
		Basal Like, Enriched	۰.۸۳
	RealTime	Luminal A, Luminal B	۰.۵۵

متاهل یا مجرد	مجرد	۶۳	۳	۴.۸	۹۵.۲
مرحله بیماری	I	۷۳	۹	۱۲	۷۲
	II				
	III			۱۶	۱۲
درجه بدخیمی تومور	I	۷۳	۱۳	۱۶.۲	۷۱.۲
	II				
	III			۱۲.۵	۱۰
اندازه تومور	کوچکتر از ۲ سانتی متر	۷۳	۱۴	۱۸.۴	۶۹.۷
	بین ۲ تا ۵ سانتی متر				
	بزرگتر یا مساوی ۵ سانتی متر			۱۱.۸	۹
گره لنفاوی	منفی	۷۳	۳۹	۵۲	۴۸
	مثبت				
طبقه بندی هیستوپاتولوژیک	سرطان تهاجمی مجرای (IDCA) ^{۱۲}	۷۶	۷۲	۹۴.۷	
	سرطان تهاجمی لوبولی (ILCA) ^{۱۳}			۵.۳	۴
وضعیت گیرنده استروژن	منفی	۷۶	۲۵	۳۰.۹	۶۹.۱
	مثبت				
وضعیت گیرنده پروژسترون	منفی	۷۶	۲۸	۳۴.۶	۶۵.۴
	مثبت				
وضعیت Ki-67	پایین (کوچکتر از ۱۴٪)	۷۱	۶۶	۸۴.۶	۱۵.۴
	بالا (بالا تر یا مساوی ۱۴٪)				
وضعیت MVD	پایین (کوچکتر از ۲۰٪)	۷۱	۳۴	۴۳.۶	۳۵.۹
	متوسط (بین ۲۰ تا ۴۰٪)				
	بالا (بالا تر از ۴۰٪)			۲۰.۵	۱۶
وضعیت TP53	پایین (کوچکتر از ۵٪)	۷۲	۵۱	۶۶.۲	۳۳.۸
	بالا (بالا تر از ۵٪)				
وضعیت Annexin V	پایین (کوچکتر از ۱۴٪)	۷۱	۶۲	۷۹.۵	۲۰.۵
	بالا (بالا تر یا مساوی ۱۴٪)				
طبقه بندی مولکولی	لومینال A		۴۷	۶۵.۳	
	لومینال B		۱۱	۱۵.۳	
	شبه بازال ^{۱۴}	۷۱	۱۰	۱۳.۹	
	غنی شده با گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ^{۱۵}			۵.۶	۴

*MRM : Modified Radical Mastectomy

**BCS : Breast Conserving Surgery

فراوانی تغییرات کپی و بیان ژن‌ها

نتایج تغییرات کپی و بیان ژن *ERBB1* در ۸۱ بیمار مبتلا به سرطان پستان نمایش داده شد (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی (درصد) تغییرات کپی و بیان ژن *ERBB1* در بیماران مبتلا به سرطان پستان.

ژن	وضعیت MLPA		وضعیت Real Time	
	تعدادکپی نرمال	افزایش تعدادکپی	بیان نرمال	افزایش بیان
<i>ERBB1</i>	۷۵ (۹۱٫۵٪)	۷ (۸٫۵٪)	۷۶ (۹۳٫۸٪)	۵ (۶٫۲٪)

^{۱۲} Invasive Ductal Carcinoma
^{۱۳} Invasive Lobular Carcinoma
^{۱۴} Basal Like
^{۱۵} HER2- enriched

مولکولی این بیماری منجر به ایجاد یک تقسیم‌بندی وسیع می‌گردد که هر روز بر وسعت آن افزوده می‌شود و می‌تواند در آینده نزدیک منجر به طراحی درمان‌های اختصاصی برای هر فرد شود (هر تومور یک درمان). تعیین پروفایل مولکولی موثر در ایجاد فنوتیپ‌های مختلف این سرطان می‌تواند سیر پیشرفت بیماری را پیش‌بینی کرده و نحوه پاسخ به درمان با داروهای مختلف را بر این اساس تعیین نماید تا در نهایت بتوان براساس آن پروتکل درمانی دقیق‌تر و مفیدتری ارائه نمود. در مطالعات متعددی ارتباط تغییرات کپی و بیان انکوژن *ERBB1* با شاخص‌های هیستوپاتولوژی و پیش‌آگهی تومور پستان و همچنین رابطه تعداد کپی این ژن‌ها با میزان بیان آن‌ها بررسی گردیده است. نتایج حاصل از این مطالعات دارای تفاوت‌های نسبتاً زیادی هستند. با توجه به نقش بسیار موثری که این انکوژن در پروسه تکثیر سلولی (القای میتوز) و نسخه‌برداری DNA و در نهایت تومورزایی سرطان پستان ایفا می‌کند^[۱۸]، هدف از این مطالعه، بیان ژن *ERBB1* در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان غیر ارثی و ارتباط آن با ویژگی‌های بالینی پاتولوژیک بیماری بود.

مقایسه تغییرات بیانی و تعداد کپی ژن *ERBB1* و ارتباط آن‌ها با شاخص‌های بالینی و هیستوپاتولوژی

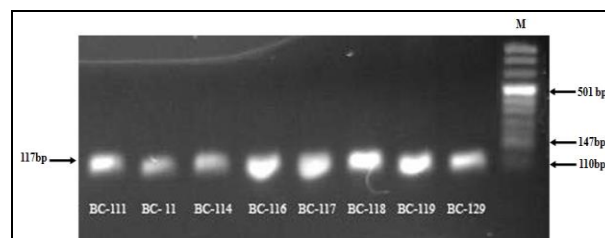
در این مطالعه از ۷ بیماری که ژن *ERBB1* در آن‌ها افزایش کپی داشت، هیچ یک افزایش بیان برای این ژن را نشان ندادند و متقابلاً هیچ یک از ۵ بیماری که افزایش بیان این ژن را داشتند نیز افزایش تعداد کپی این ژن مشاهده نشد. به عبارتی دیگر، بین افزایش کپی و افزایش بیان این ژن در بیمارانی مورد بررسی هیچ ارتباطی وجود نداشت. در مطالعه‌ای که Bhargava و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ۱۷۵ نفر بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام دادند، از میان ۱۱ نفر بیمار افزایش کپی برای ژن *ERBB1*، ۵ نفر بیمار برای بررسی mRNA مناسب بودند و سه مورد از آن‌ها افزایش بیان نشان دادند. تغییرات کپی در این مطالعه با روش Affymetrix U133 Gene Chip و بررسی mRNA با روش CISH^۱ و بررسی microarray انجام گرفت^[۱۹]. در مطالعه این محققان، میزان افزایش کپی برای این ژن حدود ۶ درصد گزارش شد. در این مطالعه افزایش کپی با استفاده از روش MLPA برای این ژن ۸،۵ درصد و افزایش بیان mRNA ۶،۲ درصد برآورد شد. در مطالعه هم‌ارز دیگری که با استفاده از روش MLPA نیز انجام شد، میزان افزایش کپی این ژن ۹ درصد بیان گردید. به طور کلی، افزایش کپی این ژن در مطالعات مختلف بین ۵ تا ۹ درصد بیان شده است. در مقاله‌ای که Park و همکاران منتشر کردند نیز بین افزایش کپی و افزایش بیان ژن *ERBB1* هیچ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد^[۲۰]. Lauand و همکاران در سال ۲۰۱۳ تحقیقی بر روی دو لاین سلولی مختلف سرطان ریه انجام دادند، مشاهده نمودند که هیچ ارتباطی بین افزایش کپی و افزایش بیان در سطح mRNA برای این ژن وجود نداشت^[۲۱].

در مطالعه‌ای که Kersting و همکاران انجام دادند، مشخص شد که میزان افزایش کپی ژن *ERBB1* با استفاده از روش FISH بسیار کم و برابر با

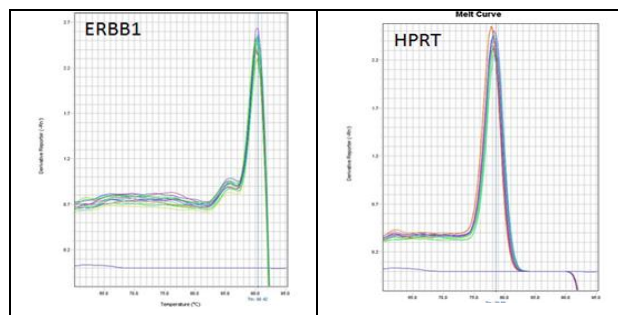
۰،۹۷	Luminal A, Basal Like
۰،۷۲	Luminal A, Enriched
۰،۷۷	Luminal B, Basal Like
۰،۶۲	Luminal B, Enriched
۰،۹۱	Basal Like, Enriched

نتایج Real-time PCR

در ابتدا از میان ژن‌های خانه‌دار انتخاب شده، ژن *HPRT* جهت نرمال کردن نمونه‌ها انتخاب گردید. در ادامه تمامی نمونه‌ها از نظر بیان ژن خانه‌دار (*HPRT*) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲. بررسی بیان mRNA ژن *HPRT* در چند نمونه که بر روی ژل آگاروز ۱،۵ درصد برده شد. طول محصول RT-PCR ۱۱۷ جفت باز بود. در این ژل از مارکر وزنی VIII DNA محصول ROCHE استفاده گردید.



شکل ۳. تصویر مربوط به نمودارهای منحنی ذوب محصولات Real time PCR در دستگاه ABI 7500. همانطور که در تصاویر مشهود است وجود یک قله در واکنش‌ها نشان‌دهنده اختصاصی بودن پرایمرهاست. در نمودار مربوط به منحنی ذوب ژن *HPRT* و *ERBB1* به ترتیب دمای ذوب محصولات RT-PCR ۷۸،۵۶ و ۹۰،۴۲ درجه سانتی‌گراد است. در این نمودار، تمامی محصولات نمونه‌های مربوط به یک سری واکنش نمایش داده شد. خط صاف در هر نمودار نماینده نمونه کنترل منفی می‌باشد.

بحث

تشخیص زود هنگام سرطان پستان، باعث کاهش مرگ و میر ناشی از این سرطان در جهان شده است^[۱۷]. سهم روش‌های مولکولی برای تقسیم‌بندی در کارسینوماها هنوز خیلی زیاد نمی‌باشد. بیشترین مطالعات به‌وسیله روش‌های مولکولی از بین بدخیمی‌های اپیتلیال بر روی سرطان پستان صورت گرفته است. مناطق مختلف کروموزومی در بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش کپی و/یا افزایش بیان می‌یابند، که این مهم می‌تواند در درمان و تعیین پیش‌آگهی تعیین کننده باشد. تقسیم بندی‌های رایج در مورد سرطان پستان که این بیماری را در قالب چند گروه محدود تقسیم‌بندی می‌نماید، دیگر برای توضیح رفتارها و پاسخ‌های این بیماری به درمان پاسخگو نیست. در مقابل، شناسایی پروفایل

^{۱۱} Chromogenic In Situ Hybridization

همخوانی نداشت و بررسی انواع دیگری از این ژن‌ها را می‌توان به عنوان پیشنهاد در مطالعات آتی در نظر گرفت.

نتیجه‌گیری

همانگونه که در بحث این مطالعه بیان شد، بیشتر ارتباطات ذکر شده مورد توافق همه مقالات نمی‌باشند و در این مورد تناقضات بسیاری وجود دارد. به نظر می‌رسد تفاوت بین مطالعات، مربوط به متغیرهایی مانند جامعه آماری مورد بررسی، تکنیک‌های ژنتیکی به کار رفته و حجم نمونه کم می‌باشد. Real-time PCR یک روش مناسب جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مختلف می‌باشد. البته روش مطلق آن به علت داشتن Cut-off مشخص از دقت بالاتری نسبت به روش نسبی آن بر خوردار است. در مطالعاتی که مورد بحث قرار گرفت در مواردی افزایش کپی/بیان یک ژن با یک فاکتور کلینیکال پاتولوژی در سطوح DNA و پروتئین ارتباط داشت؛ اما این ارتباط در سطح mRNA مشاهده نشد. این موارد در مطالعاتی که با روش RT-PCR نسبی بیان mRNA بررسی شده بود بیشتر مشاهده شد.

پیشنهادهای

این پروژه با توجه به عوامل مختلفی مانند محدودیت زمان نتوانست تحقیقی در مورد ارتباط یافته‌های به دست آمده از این پروژه و شاخص‌های تعیین کننده‌ای چون طول عمر بدون بیماری و طول عمر کلی بیمار انجام دهد. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد نظر به اینکه این مطالعه برخی عوامل ژنتیکی موثر در سرطان پستان و همچنین برخی از فاکتورهای پاتولوژی و کلینیکی را بررسی کرده است، این مطالعه در فاز کلینیکی و تعداد نمونه‌های بیشتریادامه یابد و ارتباط این یافته‌ها با دو شاخص تعیین کننده ذکر شده، بررسی شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه متخصصان و پزشکانی که بیماران را ارجاع دادند، از کارکنان آزمایشگاه مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی و خانواده‌های ارجاعی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تاییدیه اخلاقی

از کلیه شرکت کنندگان در طرح فرم رضایت نامه آگاهانه اخذ گردید و داده‌های هویتی آن‌ها محرمانه باقی ماند.

تعارض منافع

در این مطالعه تعارض منافی وجود نداشته است.

منابع مالی

منابع مورد نیاز این مطالعه توسط مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی تامین شده است.

منابع

1. Siegel R, Naishadham D, and Jemal A, Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin, 2013. 63(1): p. 11-30.
2. Winters S, et al., Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. Progress in molecular biology and translational science, 2017. 151: p. 1-32.

۴,۷ درصد و افزایش بیان با روش IHC برابر با ۱۷ درصد بود و ارتباط معنی‌داری بین افزایش بیان پروتئینی و افزایش کپی مشاهده شد^[۲۳]. همچنین، در مطالعه‌ای که توسط Reis-filho و همکاران انجام گرفت، مشاهده شد که از ۳۲ موردی که دارای افزایش بیان برای ژن *ERBB1* بودند، تنها ۱۱ مورد (۳۴ درصد) از آن‌ها با افزایش تعداد کپی این ژن همراه بودند^[۲۳]. در حالی که در مطالعه ما هیچ یک از بیماران با افزایش بیان، افزایش کپی نشان ندادند. در مطالعاتی نیز که Toyama و Shien انجام دادند، هیچ ارتباطی بین افزایش کپی این ژن و افزایش بیان در سطح پروتئین مشاهده نشد^[۲۵، ۲۴]. افزایش بیان این ژن در بیشتر مطالعات ذکر شده به صورت مستقل از افزایش کپی گزارش شده و به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های دیگری غیر از افزایش کپی در افزایش بیان این ژن از جمله فاکتورهای اپی‌ژنتیک نقش دارند و می‌توانند در افزایش بیان ژن *ERBB1* نیز دخیل باشند. این ژن یک گیرنده سطح سلولی است که افزایش نسخه و افزایش بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها گزارش گردید. در تعداد کمی از مطالعات، ارتباطی بین افزایش بیان این ژن و افزایش درجه بدخیمی تومور یا درگیری گره لنفاوی مطرح گردیده است. با این حال، تمامی تحقیقات انجام شده در این زمینه اتفاق نظر ندارند و در حال حاضر پیش‌آگهی مشخصی برای ژن *ERBB1* در سرطان پستان وجود ندارد.

در مطالعه Moelans و همکاران افزایش کپی ژن *ERBB1* با وضعیت منفی گیرنده استروژن ارتباط معنی‌دار داشت. آن‌ها همچنین، ارتباطی بین افزایش کپی این ژن و وضعیت منفی گیرنده پروژسترون را مشاهده کردند؛ هر چند این ارتباط از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=0.052$). همچنین، Koutras و همکاران در مطالعه گذشته‌نگر بر روی ۲۶۸ نفر بیمار مبتلا به سرطان پستان اولیه بیان کردند که افزایش بیان ژن *ERBB1* ارتباط معنی‌دار معکوسی با گیرنده استروژنی دارد^[۲۶]. از طرفی در تحقیقی که Ansquer و همکاران انجام دادند، هیچ ارتباطی بین افزایش بیان این ژن و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی از جمله سن، اندازه تومور، وضعیت گره‌های لنفاوی، گیرنده‌های استروژن و پروژسترون و Ki-67 مشاهده نکردند^[۲۷]. همچنین، در مطالعه پیش رو نیز هیچ ارتباط معنی‌داری بین هیچ کدام از فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی مورد بررسی و افزایش کپی و بیان مشاهده نشد که این اختلاف در نتایج بین مطالعات مختلف بیان شده است.

Soosanabadi و همکاران در سال ۲۰۲۲، بیان خانواده‌ی ژن *ERBB* در زنان مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آن با ویژگی‌های بالینی پاتولوژیک بیماری را مورد بررسی قرار دادند. یافته‌هایشان در این مطالعه رابطه معنی‌داری را بین ویژگی‌های آسیب‌شناسی بالینی نامطلوب با بیان بیش از حد *ERBB1* و *ERBB2* نشان دادند. اما، بیمارانی که بیان بیش از حد *ERBB4* را داشتند، با پیامدهای مطلوب همبستگی داشتند. این محققان نتیجه گرفتند که *ERBB1* و *ERBB2* را می‌توان به عنوان عوامل پیش‌آگهی ضعیف در نظر گرفت، در حالی که *ERBB4* یک عامل پیش‌آگهی خوب برای سرطان پستان بود^[۲۸]. نتایج این تحقیق به دلیل بررسی همزمان خانواده‌ی ژن *ERBB* با داده‌های حاصل از کار ما

expression results in real-time PCR. Nucleic acids research, 2002. 30(9): p. e36-e36.

17. Ma J and Jemal A, Breast cancer statistics. Breast cancer metastasis and drug resistance, 2013: p. 1-18.

18. Barok M, et al., Characterization of a novel, trastuzumab resistant human breast cancer cell line. Frontiers in Bioscience-Elite, 2010. 2(2): p. 627-640.

19. Bhargava R, et al., EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. Mod Pathol, 2005. 18(8): p. 1027-1033.

20. Park K, et al., EGFR gene and protein expression in breast cancers. Eur J Surg Oncol, 2007. 33(17374474): p. 956-960.

21. Lauand C, et al., Independent of ErbB1 gene copy number, EGF stimulates migration but is not associated with cell proliferation in non-small cell lung cancer. Cancer cell international, 2013. 13(1): p. 38.

22. Kersting C, et al., Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. Laboratory investigation, 2004. 84(5): p. 582-587.

23. Reis-Filho JS, et al., Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. Breast Cancer Res, 2005. 7(6): p. 1028-1035.

24. Shien T, et al., Frequent overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mammary high grade ductal carcinomas with myoepithelial differentiation. Journal of clinical pathology, 2005. 58(12): p. 1299-1304.

25. Toyama T, et al., Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. BMC cancer, 2008. 8(1): p. 309.

26. Koutas AK, et al., Evaluation of the prognostic and predictive value of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. Br J Cancer, 2008. 99(11): p. 1775-1785.

27. ANSQUER Y, et al., Expression of BRCA1, HER-1 (EGFR) and HER-2 in sporadic breast cancer and relationships to other clinicopathological prognostic features. Anticancer research, 2005. 25(6C): p. 4535-4541.

28. Soosanabadi M, et al., Expression of ERBB gene family in females with breast cancer and its correlation with clinicopathological characteristics of the disease. Molecular Biology Reports, 2022. 49(9): p. 8547-8553.

3. Ferlay J, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer, 2015. 136(5): p. 359-386.

4. Bray F, et al., Cancer Incidence in Five Continents: inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. International journal of cancer, 2015. 137(9): p. 2060-2071.

5. Hortobagyi GN, et al., The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. Clinical breast cancer, 2005. 6(5): p. 391-401.

6. Ahmad A, Breast cancer statistics: recent trends. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance, 2019: p. 1-7.

7. Zoon CK, et al., Current molecular diagnostics of breast cancer and the potential incorporation of microRNA. Expert Rev Mol Diagn, 2009. 9(5): p. 455-467.

8. Jørgensen JT and Hersom M, HER2 as a prognostic marker in gastric cancer-a systematic analysis of data from the literature. Journal of Cancer, 2012. 3: p. 137-144.

9. Moasser MM, The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene, 2007. 26(45): p. 6469-6487.

10. Rimawi MF, et al., Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2010. 116(5): p. 1234-1242.

11. Rydén L, et al., 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 research and treatment, 2010. 120(2): p. 491-498.

12. Yamamoto Y, et al., Clinical significance of basal-like subtype in triple-negative breast cancer. Breast Cancer, 2009. 16(4): p. 260-267.

13. Fujiwara S, et al., Association of ErbB1-4 expression in invasive breast cancer with clinicopathological characteristics and prognosis. Breast cancer, 2014. 21(4): p. 472-481.

14. Sadjadi A, et al., Epidemiology of breast cancer in the Islamic Republic of Iran: first results from a population-based cancer registry. East Mediterr Health J, 2009. 15(6): p. 1426-1431.

15. Farrell RE, RNA methodologies. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2012.

16. Pfaffl MW, Horgan GW, and Dempfle L, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative

جدول ۳. ارتباط افزایش بیان ژن *ERBB1* مورد بررسی با مشخصات بالینی و پاتولوژی.

P-value	<i>ERBB1</i>		پارامترها
	افزایش بیان	بیان نرمال	
۰,۶۹	۲ (۴۰٪)	۲۳ (۳۱,۵٪)	منفی
	۳ (۶۰٪)	۵ (۶۸,۵٪)	مثبت
۰,۷۹	۲ (۴۰٪)	۲۵ (۳۴,۳٪)	منفی
	۳ (۶۰٪)	۴۸ (۶۵,۸٪)	مثبت
۰,۲۶	۱ (۲۰٪)	۳۱ (۴۵,۶٪)	> ۵۰ سال
	۴ (۸۰٪)	۳۷ (۵۴,۴٪)	≤ ۵۰ سال
۰,۴۶	۳ (۶۰٪)	۲۵ (۴۲,۴٪)	راست
	۲ (۴۰٪)	۳۴ (۵۷,۶٪)	چپ
۰,۰۹	۱ (۲۰٪)	۲ (۳,۴٪)	مجرد
	۴ (۸۰٪)	۶ (۹۶,۶٪)	متاهل
۰,۴۹	۰ (۰,۰٪)	۱۳ (۱۹,۱٪)	> ۲ سانتی متر
	۴ (۸۰٪)	۴۸ (۷۰,۶٪)	بین ۲ تا ۵ سانتی متر
	۱ (۲۰٪)	۷ (۱۰,۳٪)	≤ ۵ سانتی متر
۰,۳۸	۰ (۰,۰٪)	۸ (۱۱,۹٪)	I
	۵ (۱۰۰٪)	۴۸ (۷۱,۶٪)	II
	۰ (۰,۰٪)	۱۱ (۱۶,۴٪)	III
۰,۶۵	۵ (۱۰۰٪)	۶۱ (۸۵,۹٪)	(I-II) A
	۰ (۰,۰٪)	۱۰ (۱۴,۱٪)	(III) B
۰,۵۰	۴ (۸۰٪)	۶۱ (۸۹,۷٪)	BCS
	۱ (۲۰٪)	۷ (۱۰,۳٪)	MRM
۰,۳۱	۱ (۲۰٪)	۶۵ (۹۴,۳٪)	IDCA
	۴ (۸۰٪)	۳ (۴,۳٪)	IICA
	۱ (۲۰٪)	۱ (۱,۴٪)	Medullary
۰,۶۹	۴ (۶۶,۷٪)	۳۴ (۵۰,۷٪)	منفی
	۲ (۳۳,۴٪)	۳۳ (۴۹,۳٪)	مثبت
۰,۸۱	۳ (۶۰٪)	۴۵ (۶۵,۳٪)	پایین (<۵٪)
	۲ (۴۰٪)	۲۴ (۳۴,۸٪)	بالا (>۵٪)
۰,۵۲	۲ (۴۰٪)	۲۹ (۴۱,۴٪)	پایین (<۲۰٪)
	۱ (۲۰٪)	۲۷ (۳۸,۶٪)	متوسط (بین ۲۰ تا ۴۰٪)
	۲ (۴۰٪)	۱۴ (۲۰٪)	بالا (>۴۰٪)
۰,۸۰	۴ (۸۰٪)	۹ (۱۳,۳٪)	پایین (<۱۴٪)
	۱ (۲۰٪)	۱۱ (۱۵,۷٪)	بالا (>۱۴٪)
۰,۲۲	۵ (۱۰۰٪)	۴ (۷۷,۱٪)	پایین (<۱۴٪)
	۰ (۰,۰٪)	۱۶ (۲۲,۹٪)	بالا (>۱۴٪)
۰,۵۷	۳ (۶۰٪)	۳۹ (۵۶,۵٪)	لومینال A
	۱ (۲۰٪)	۱۳ (۱۸,۸٪)	لومینال B
	۰ (۰,۰٪)	۸ (۱۱,۶٪)	Basal Like
	۱ (۲۰٪)	۹ (۱۳,۱٪)	Enriched
۰,۴۷	۲ (۴۰٪)	۳۹ (۵۶,۵٪)	لومینال A
	۳ (۶۰٪)	۳۰ (۴۳,۵٪)	سایر

جدول ۴. ارتباط افزایش کپی ژن *ERBB1* مورد بررسی با مشخصات بالینی و پاتولوژی.

P-value	ERBB1		پارامترها
	افزایش تعداد کپی	تعداد کپی نرمال	
۰,۱۳	۴ (۵۷,۱٪)	۲۱ (۲۹,۲٪)	منفی
	۳ (۴۲,۹٪)	۵۱ (۷۰,۸٪)	مثبت
۰,۱۸	۴ (۵۷,۱٪)	۲۳ (۳۱,۹٪)	منفی
	۳ (۴۲,۹٪)	۴۹ (۶۸,۱٪)	مثبت
۰,۳۷	۲ (۲۸,۶٪)	۳۱ (۴۶,۳٪)	۵۰ > سال
	۵ (۶۲,۵٪)	۳۶ (۵۳,۷٪)	۵۰ ≤ سال
۰,۲۶	۱ (۲۰٪)	۲۷ (۴۵,۸٪)	راست
	۴ (۸۰٪)	۳۲ (۵۴,۲٪)	چپ
۰,۶۰	۰ (۰,۰٪)	۳ (۵,۲٪)	مجرد
	۵ (۱۰۰٪)	۵۵ (۹۴,۸٪)	متاهل
۰,۳۷	۱ (۱۴,۳٪)	۱۲ (۱۷,۹٪)	> ۲ سانتی متر
	۴ (۵۷,۱٪)	۴۸ (۷۱,۶٪)	بین ۲ تا ۵ سانتی متر
	۲ (۲۸,۶٪)	۷ (۱۰,۴٪)	≤ ۵ سانتی متر
۰,۹۶	۱ (۱۴,۳٪)	۷ (۱۰,۶٪)	I
	۵ (۷۱,۴٪)	۴۹ (۷۴,۲٪)	II
	۱ (۱۴,۳٪)	۱۰ (۱۵,۲٪)	III
۰,۶۵	۵ (۱۰۰٪)	۶۲ (۸۶,۱٪)	(I-II) A
	۰ (۰,۰٪)	۱۰ (۱۳,۹٪)	(III) B
۰,۵۰	۴ (۸۰٪)	۶۱ (۸۹,۷٪)	BCS
	۱ (۲۰٪)	۷ (۱۰,۳٪)	MRM
۰,۳۲	۴ (۸۰٪)	۶۵ (۹۴,۲٪)	IDCA
	۱ (۲۰٪)	۳ (۵,۸٪)	ILCA
۰,۶۹	۳ (۶۰٪)	۳۴ (۵۱,۵٪)	منفی
	۲ (۴۰٪)	۳۳ (۴۸,۸٪)	مثبت
۰,۸۱	۳ (۶۰٪)	۴۵ (۶۵,۷٪)	پایین ($\geq ۰,۵$)
	۲ (۴۰٪)	۲۴ (۳۴,۳٪)	بالا ($< ۰,۵$)
۰,۹۱	۳ (۵۰٪)	۲۹ (۴۱,۴٪)	پایین ($> ۰,۲$)
	۲ (۳۳,۳٪)	۲۶ (۳۷,۱٪)	متوسط (بین ۰,۲ تا ۰,۴)
	۱ (۱۶,۷٪)	۱۵ (۲۱,۴٪)	بالا ($< ۰,۴$)
۰,۹۵	۵ (۸۳,۳٪)	۵۹ (۸۴,۳٪)	پایین ($> ۰,۱۴$)
	۱ (۱۶,۷٪)	۱۱ (۱۵,۷٪)	بالا ($\leq ۰,۱۴$)
۰,۷۸	۵ (۸۳,۳٪)	۵۵ (۷۸,۶٪)	پایین ($\geq ۰,۱۴$)
	۱ (۱۶,۷٪)	۱۵ (۲۱,۴٪)	بالا ($< ۰,۱۴$)
۰,۱۳	۱ (۱۶,۷٪)	۴۱ (۵۹,۴٪)	لومینال A
	۲ (۳۳,۳٪)	۱۳ (۱۸,۸٪)	لومینال B
	۲ (۳۳,۳٪)	۶ (۸,۷٪)	Basal Like
	۱ (۱۶,۷٪)	۹ (۱۳٪)	Enriched
۰,۰۴	۱ (۱۶,۷٪)	۴۱ (۵۹,۴٪)	لومینال A
	۵ (۸۳,۳٪)	۲۸ (۴۰,۶٪)	سایر