

مطالعه ایمونوهیستوشیمی گیرنده های هورمونهای جنسی در تومور پستان سگ

دکتر فرهنگ ساسانی^{۱*} دکتر عیسی جهان زاد^۲ دکتر بنفشه غلامحسینی^۳

دریافت مقاله: ۲۲ دی ماه ۱۳۸۱

پذیرش نهایی: ۳۰ تیر ماه ۱۳۸۲

Immunohistochemical study of sex hormonal receptors in canine mammary gland tumors

Sasani, F.,¹ Jahanzad, I.,² Gholamhosseini, B.³

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. ²Department of Pathobiology, Faculty of Medicine, University of Tehran Medical Sciences, Tehran-Iran. ³Center of Science and Research, University of Azad Islamic, Tehran-Iran.

Objective: In this research, immunohistochemical method was used to study estrogen and progesterone receptors in canine mammary gland tumors.

Animals: Six dogs with mammary gland tumors.

Procedure: six out of 141 paraffin embedded blocks of canine mammary gland tumors, were selected from files of veterinary pathology department, faculty of veterinary medicine, Tehran university. Tissue samples were processed then H&E and immunohistochemistry staining carried out on sections.

Results: Neither of species showed positive reaction to oestrogenic receptor nor progesterone receptor.

Conclusion: Reasons for negative reactions may be one of these situations: malignancy of tumors, destruction of antigens in processing of tissues. It is necessary to remind that human being tumor markers have been used on uterus of horse with positive reaction to these hormones. Carcinoma is often observed with mixed tumors. Because of malignancy of carcinomatous tissues, there were no positive reactions. In this study 1D5 monoclonal Ab for oestrogenic receptor and 1A6 colon for progesterone receptor have been used. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 3: 283-285, 2003.*

Key words: Tumor, Mammary gland, Dog, Immunohistochemistry, Sex hormonal receptor.

Corresponding author email: fsasani@yahoo.com

می گردد. برداشت آنها بعد از ۲/۵ سالگی هیچ اثر محافظت کننده ای ندارد. این اثر همزمان در انسان نیز اگر در ۲۶ سالگی یائسه شود، وجود دارد (۱۰). این عمل باعث افت موقت رشد تومور پستانی می شود و برخی اثر برداشت تخمدان را روی تغییرات هیپرپلاستیک اطراف نئوپلاسم مؤثر دانسته اند. میزان استروژن ادراری در سگ ماده با نئوپلاسم پستانی افزایش می یابد. بزرگ شدن غده پستانی را در سگ ماده ای که ترکیبات استروژنی تزریقی را دریافت می نموده، مشاهده کرده اند. بعضی گیرنده استروژن را در ۵۲ درصد از کارسینوماهای پستان سگ کمتر از میزانی که در تومور پستانی انسان وجود دارد، یافته اند. محققان گزارشات بسیاری مبنی بر اینکه تومور پستانی در رابطه با اختلالات اندوکروینی می باشد، ارایه کرده اند (۴، ۱۳). در تومور پستانی عوامل متعددی مثل سن بروز، ظاهر مورفولوژیک، متاستاز مکرر و حضور گیرنده استروژن روی سلول توموری در سگ و انسان مشابه است و با شباهتهای بیان شده در تومور پستانی سگ و انسان می توان از آن جهت مدلی برای مطالعات مکانیسم پرولیفراسیون و گیرنده های هورمونی سرطانزای پستان انسان در پیشگیری و کنترل تومورهای پستانی انسان استفاده نمود. هدف کلی این پروژه امکان کاربرد مارکرهای تومور پستانی

هدف: هدف از این پژوهش استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و چگونگی کاربرد آن در تومورهای پستانی سگ و مطالعه گیرنده های استروژن و پروژسترون می باشد.

حیوانات: شش قلاده سگ مبتلا به تومور پستانی.

روش: به طور اتفاقی ۶ بلوک پارافینه تومور پستانی سگ از بین ۱۴۱ تومور پستانی موجود در پرونده های آسیب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت انجام رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی H&E انتخاب گردید.

نتایج: هیچ یک از نمونه ها واکنش مثبت به گیرنده استروژن و پروژسترون نشان ندادند.

نتیجه گیری: ممکن است نتیجه فوق به دلیل عدم حضور گیرنده به خاطر بدخیمی تومور، عدم حفظ آنتی ژن در موقعیت اصلی در حین پروسه تهیه بافت باشد.

البته لازم به ذکر است که مارکر تومور انسانی روی رحم اسب پاسخ مثبت نشان داد. کارسینوما در کنار تومور مختلط وجود داشته و مقاطع کارسینومایی به علت بدخیمی پاسخ مثبت نشان نداده اند. در این مطالعه از مونوکلونال آنتی بادی 1D5 برای گیرنده استروژن و از کلون 1A6 برای گیرنده پروژسترون استفاده شده است.

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۳، ۲۸۵-۲۸۳.

واژه های کلیدی: تومور، پستان، سگ، ایمونوهیستوشیمی، گیرنده هورمون جنسی.

ایمونوهیستوشیمی در تمام زمینه های بیولوژی مدرن و پزشکی اهمیت ویژه ای دارد و با به کارگیری آنتی بادی ها برای شناسایی آنتی ژنها با ایجاد کنتراست ویژه در اجزای بافتی در تشخیص و تحقیق به کار می رود. برای تعیین حضور گیرنده های هورمونی در سلول تومور پستانی از روش ایمونوهیستوشیمی می توان کمک گرفت و با مشاهده آنها در پیش آگهی، تشخیص، پیشگیری، میزان پاسخ به درمان و طبقه بندی تومورها با منشأ نامعلوم می توان اظهار نظر نمود (۱۲). ضمناً این تکنیک امکان بررسی گذشته نگر روی بلوکهای توموری که با پارافین قالب گیری شده اند را فراهم می سازد. تومور پستانی بعد از تومور پوستی شایعترین نئوپلاسم در سگ می باشد و حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد تومور سگ ماده را تشکیل می دهد که از این بین ۶۵ درصد تومور مختلط خوش خیم و ۲۵ درصد کارسینوما می باشد. بقیه موارد هیپرپلازی، آدنوما، تومور مختلط بدخیم و میو اپی تلیوما می باشد (۵، ۱۰، ۳۱). سن تقریبی سگهای دارای تومور پستانی ۶-۷ سال می باشد. گیرنده های هورمونی در تومور پستانی مهم می باشند. گیرنده استروژن و پروژسترون در سلولهای تومور پستانی سگ شناسایی شده اند (۴). منحنی توزیع سنی ابتلای به تومور پستانی منحنی زنگوله ای می باشد. تومور پستانی در سگهای مسن نسبت به سگهای ماده جوان بیشتر است. بروز تومور پستانی در سگها مشابه بروز کارسینوما پستان در انسان می باشد (۲، ۱۳). برداشت تخمدان و رحم در سگها قبل از اولین فعلی و رشد غدد پستانی، طبیعتاً خطر پیشروی نئوپلاسم پستانی را کاهش می دهد، ولی برداشت تخمدان بین اولین و چهارمین چرخه فعلی باعث افزایش تدریجی خطر پیشروی تومور

(۱) گروه آموزشی باتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه آموزشی باتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران.

(۳) مرکز علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران.

(* نویسنده مسؤول fsasani@yahoo.com



در مقاطع رنگ آمیزی شده با تکنیک ایمونوهیستوشیمی، سلولهای سرطانی در داخل آلونولها و مجاری وجود داشت که با سیتوپلاسم واکونله و روشن و با هسته های دارای کروماتین در حال تقسیم مشاهده گردیدند. واکنش مثبت که شامل رنگ شدن هسته ها به رنگ قهوه ای متمایل به سبز می باشد، مشاهده نشد. در بخشهای کوچکی واکنش کاذب با رنگ شدن سیتوپلاسم سلول دیده شد. یک نمونه از مقطع بافت اندومتر مربوط به رحم یک رأس اسب که با گیرنده استروژن انسانی واکنش مثبت داشت، برای مقایسه قرار داده شد که در آن مقطع هسته های سلولهای اندومتر همه رنگ گرفتند.

بحث و نتیجه گیری

مطالعات ایمونوهیستوشیمی در دستگاه تناسلی از جمله رحم و تخمدانها و پروستات در بسیاری از حیوانات از جمله موشها که به عنوان مدل تحقیقاتی می باشند انجام گرفته است و در مراحل مختلف سیکل فحلی توزیع گیرنده های هورمونی در دستگاه تناسلی ارزیابی شده است ولی در مورد تومور پستانی بررسی و مطالعه چگونگی توزیع گیرنده های هورمونی سابقه زیادی ندارد. حضور استروژن نقش مهمی در فیزیولوژی پستان دارد و گیرنده استروژنی در پیشرفت طبیعی غدد پستان انسان و سگ مهم می باشند و استروژن اثر پرولیفراتیو روی بافت پستان دارد و هورمونهای استروئیدی در پیشروی تومورها در بافت پستان انسان و سگ شرکت دارند (۱۰). با یافتن سلولهای هدف برای استروژنها که موجب ظهور فاکتورهای رونویسی و ترجمه وابسته به هورمون شده کمک به تنظیم ظهور متنوع فاکتورهای رشد پاراکرین و اتوکرین در لایه های سلولی تومور پستانی می شود، این هورمونها در پیشروی تومورها موثر می باشند. ظهور گیرنده های پروژسترون با آنتی بادی مونوکلونال هدایت شده علیه پروتئین انسانی در غدد پستانی سگ قابل شناسایی می باشد. واکنش ایمنی در بافت طبیعی و در تومور خوش خیم و بدخیم شناسایی می شود و نتایج حاصل از این روش با نتایج حاصل از روشهای بیوشیمی توافقی دارد و روش ایمونوهیستوشیمی برای مطالعه گیرنده پروژسترون در تومور پستانی سگ به اندازه روشهای دیگر می تواند مؤثر باشد. رابطه ای معکوس بین ظهور گیرنده استروئیدی و میزان پرولیفراسیون سلولی نیز مشاهده گردیده است و با توجه به رابطه معکوس بین شرایط هورمونی و ظهور چندین فاکتور رشد و گیرنده های آنها مثل ظهور بیش از حد cc-erb-2 که در سرطانهای پستان انسانی تشریح شده اند، شواهدی مبنی بر حمایت این فرضیه می باشد که پیشروی به سوی بدخیمی در تومور پستانی همراه با کاهش وابستگی هورمونی و افزایش رشد خود به خودی می باشد (۷،۸،۹،۱۰،۱۱).

در مطالعه ما از آنتی بادی مونوکلونال موجود برای ایمونوهیستوشیمی انسانی از کلون D51 برای گیرنده استروژن و از کلون A61 برای گیرنده پروژسترون استفاده شد (۱۰). با توجه به اینکه هیچ کدام از نمونه ها به گیرنده استروژن و پروژسترون واکنش مثبت نشان ندادند، ممکن است عدم حضور گیرنده هورمون استروئیدی به دلیل بدخیمی تومورها و یا عدم حفاظت آنتی ژنی در حین انجام مراحل پروسه کردن بافتها چنین نتیجه ای را به وجود آورده باشد. امید است که با معرفی این تکنیک، امکانات به کارگیری آن در شناسایی و پیشگیری بیماریهای دامی در آینده ای نزدیک فراهم گردد.

در تومورهای حیوانی بوده است. هدف ویژه شناسایی گیرنده هورمونی پستانی سگ از جمله گیرنده های استروژن و پروژسترون بوده، با فرض بر اینکه با رشد و تکامل تومور به سوی بدخیمی از وابستگی هورمونی آنها کاسته می شود.

مواد و روش کار

با مطالعه پرونده های بخش آسیب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تعداد ۱۴۱ تومور پستانی گزارش شده بود که همگی سگهای ماده از نژادهای خالص و مخلوط بودند. دامنه سنی آنها ۱۲-۴ سال بود. ۳۷ تومور پستانی فاقد پاسخ هیستوپاتولوژیک ثبت شده در پرونده ها وجود داشت. از بقیه تومورها ۳۵ مورد آدنوکارسینوما، ۳۲ مورد تومور مختلط پستانی، ۲۱ مورد لنفوسارکوما، ۷ مورد فیبر و سارکوما و بقیه موارد همانژیوپریسیایتوما، فیبروپاپیلوما، همانژیو آندوتلیوما، آدنوما، فیبر آدنوما، پاپیلوما، ماستوسیتوما و کارسینوما سلول بازال بودند که با استفاده از تکنیک همانتوکسیلین اتوزین تشخیص هیستوپاتولوژیک داده شده بود. از بین بلوکهای تومورهای پستانی ۶ مورد به طور تصادفی انتخاب و برای مطالعه حضور گیرنده استروژن و پروژسترون در بخش ایمونوهیستوشیمی بیمارستان امام مورد آزمایش قرار گرفتند. در ضمن یک نمونه بافت از اندومتر رحم یک رأس مادیان نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از قالبگیری با پارافین، برش بافت به ضخامت ۳ میکرون تهیه گردید. مقاطع ۲۰ دقیقه در دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه سانتیگراد در فور آنکوبه شدند، ۲ تا ۳ بار در گزلین (هر دفعه ۳ دقیقه)، ۲ بار آنکوباسیون در اتانل ۱۰۰ درصد (هر دفعه ۳ دقیقه) انجام شد. رهیدراسیون با قرار دادن مقاطع در اتانلهای ۹۰ درصد به مدت ۳ دقیقه انجام گردید. اگر پراکسید از داخلی مسئله ساز باشد، پراکسید از با آنکوباسیون ۵ دقیقه در هیدروژن پراکسید ۳ درصد غیر فعال می گردد. اول با آب و بعد از آن ۳ بار در بافر حداقل به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. بافر تریس - اسید کلریدریک ۰/۲۵ مول با pH = ۷/۴ می باشد. در برخی پروتوکلهای بافر فسفات می باشد.

اسلایدها با سرم ۵ درصد تهیه شده از گونه هایی که از آنها آنتی بادی ثانویه گرفته شده، برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در اتاق آماده شده که هوای مرطوب را ایجاد می کند، برای بلوک کردن زمینه آنکوبه شدند. اسلایدها در اتاق که هوای مرطوب دارد در تمام طول شب با آنتی بادی اولیه در یخچال قرار داده شدند. ۶۰-۵۰ میکرولیتر از آنتی بادی روی اسلاید قرار داده شد. اسلاید با یک جریان ملایم بافر شسته شد و حداقل ۵ دقیقه شستشو با بافر انجام شد. اسلایدها با آنتی بادی ثانویه در اتاق هوای مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه آنکوبه شدند. ۵ دقیقه مجدداً با بافر با جریان ملایم شستشو داده شدند، در مرحله بعد با استرپتاویدین نشاندار (با پراکسیداز) به مدت ۳۰ دقیقه آنکوبه گردیدند و پس از شستشو و قرار گرفتن در بافر (حداقل ۵ دقیقه) روی آن سوبسترا و کروموزن (DAB+H2O2) در بافر فسفات) ریخته شد و پس از ۱۰ دقیقه شستشو شده و محلول کات کبود به مدت ۱ دقیقه روی آنها ریخته شد. آنگاه با همانتوکسیلین مایر رنگ آمیزی گردیدند و ۱۵ دقیقه در آب روان قرار داده شده و نهایتاً با چسب و لامل پوشانده شدند.

نتایج

از ۶ نمونه تومور پستان بعد از رنگ آمیزی H&E و ایمونوهیستوشیمی ۵ نمونه تومور کارسینوما و یک نمونه تومور مختلط پستانی تشخیص و تأیید گردید.

