مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (38) العدد (5) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (38) No. (5) 2016

دور الكاثبسينB في بيئة الورم عند مريضات سرطان الثدي

مرام ياسين بلال*

(تاريخ الإيداع 26 / 7 / 2016. قُبِل للنشر في 25 / 9 /2016)

□ ملخّص □

هدف الدراسة: دراسة التعبير عن الكاثبسين B (أحد الأنزيمات الحالة للبروتين) في نسج بشرية من سرطان الثدي، وربط النتائج مع المعلومات المتوفرة عن الورم.

المواد والطرق: تمت الدراسة على 23 عينة نسيجية من سرطان الثدي مثبتة بالفورم ألدهيد ومغمورة بشمع البارافين، حيث جُمعت العينات من مشفى الأسد الجامعي ومخبر خاص للتشريح المرضي في محافظة اللاذقية ، وباستخدام تقنية التلوين المناعي النسيجي تم التحري عن الكاثبسينB في النسج السرطانية،واستخدم نسيج اللوزة كشاهد إيجابي للتلوين بالأضداد.

النتائج: ظهر التعبير السيتوبلاسمي للكاثبسين B في نسيج اللوزة في البالعات المتواجدة في المراكز المنتشة إضافة إلى الخلايا البطانية للأوعية الدموية. لوحظ لدى تلوين عينات سرطان الثدي تلون كل من الخلايا الورمية والخلايا البطانية والخلايا المناعية المتسللة في السدى. وقد ارتبط تعبير الخلايا البطانية عن الكاثبسين B بعلاقة هامة إحصائياً مع درجة الورم ($p=0.049$).

الاستنتاجات: أظهرت الدراسة دور الكاثبسينB في تحفيز تشكل الأوعية الجديدة في الورم، ويبقى تحديد العوامل الالتهابية التي تزيد فعالية الكاثبسين Bهاماً في تحديد بعض الجزيئات التي يمكن استخدامها كأهداف جزيئية جديدة لعلاج السرطان.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، الأنزيمات الحالة للبروتين، الكاثبسين، السدى.

*ماجستير– قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة– كلية الصيدلة – جامعة تشرين– اللاذقية –سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (38) العدد (5) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (38) No. (5) 2016

The Rule of Cathepsin Bin the Tumor Environment in Patients with Breast Cancer

Maram Bilal*

(Received 26 / 7 / 2016. Accepted 25 / 9 / 2016)

□ ABSTRACT □

Aim: to assess the expression ofcathepsin B(ctsB; an important protease) in human breast cancer and correlate that with the tumor grade.

Materials and Methods:Serial sections were obtained from 23 formalin-fixed paraffin embedded breast cancer tissue specimens which were collected from Alasad University Hospital and a pathological laboratory in Lattakia - Syria. Tissues were stained for cathepsin B using immunohistochemistry. Tonsil tissues were also included as a positive control.

Results:Positive cytoplasmic staining of CtsB was observed in both follicular macrophages and endothelial cells in tonsil sections. In breast cancer tissues, tumor cells, endothelial cells and stroma stained positive for CtsB. The presence of CtsB in blood endothelium significantly correlated with the tumor grade ($p=0.049$).

Conclusion: These results supported the important role of cathepsin B in tumor progression, particularly in angiogenesis. Future studies should investigate the regulating mechanisms of cathepsin activities within the tumor environment, and that can be considered as new tagets for cancer treatment.

Key words: Breast cancer**,** proteases, cathepsins, angiogenesis,stroma**.**

* **Master, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يعتبر سرطان الثدي السرطان الأكثر شيوعاً من حيث معدل الإصابة ومعدل الوفياتبين النساء في العالم وفي سوريا. ينشأ السرطان اعتباراً من طفرة مورثية في إحدى الخلايا، ولكن إضافة إلى الدور الذي يلعبه تراكم مثل هذه الطفرات في تطور الورم فقد تم الكشف عن العديد من العوامل الالتهابية والأنزيمات الحالة للبروتين في بيئة الورم والتي تساهم في تطور الخباثة.

تضم بيئة الورم إلى جانب الخلايا السرطانية tumor cells ما يُعرف بالسدى stroma وهو تجمع غير متجانس من الخلايا. تتمثل خلايا السدى في الخلايا الالتهابية والمناعية كالبالعات والوحيدات، الخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظم، الخلايا البطانية وحول الوعائية، الخلايا الشحمية، الأورمات الليفية العضلية (Valdivia-Silva et al, 2011).

تعتمد المراحل التشريحية لسرطان الثدي على تقدم الورم الذي يتم عبر عدد من الخطوات. تتطور الظهارة القنوية ductal epithelium الطبيعية إلى ظهارة مفرطة التنسج epithelial hyperplasia، ثم تتحول إلى فرط تنسج قنوي غير نموذجي atypical ductal hyperplasia (ADH) ثم إلى كارسينوما غير غازية (لابدة) non-invasive carcinoma (in situ). يخترق السرطان غير الغازي الغشاء القاعدي للقناة الثديية ليتحول إلى سرطان غازٍ invasive cancer ينتشر عبر الأوعية الدموية واللمفية إلى العقد اللمفية المجاورة محدثاً اعتلالاً غدّياً adenopathy وأخيراً ينتشر إلى أماكن بعيدة من الجسم. (Sugg and Donegan, 2002;Ma et al, 2003). يحدث خلال تشكل الورم ما يُسمى angiogenesis وهو عملية تشكل أوعية دموية جديدة بدءاً من الأوعية الموجودة مسبقاً (Lee and Nan, 2012).

تتجه استراتيجيات المعالجة الهدفية لسرطان الثدي إلى استخدام أدوية تستهدف جزيئات في الخلية الورمية متّهمة بآلية التسرطن، وأصبح بعضها في الأسواق والبعض الآخر مازال قيد التطوير أو التجريب في المراحل السريرية المختلفة. على سبيل المثال، يستخدم الـ trastuzumab (Herceptin®) لعلاج سرطان الثدي إيجابي التعبير عن مستقبلات Her-2، ويثبط هذا الدواء مستقبلات عائلة epidermal growth factor receptors (EGFR/Her-2/neu) وبالتالي يثبط إشارات مستقبل الخلايا البشروية التي تسببها عوامل النمو المنتجة من السدى. يُعد مجال الأدوية الهدفية حديثاً جداً ويجري الآن البحث عن مزيد من الأهداف الجزيئية التي يمكن استهدافها لإيقاف نمو الكتلة الورمية أو لقتل الخلايا الورمية(Lee and Nan, 2012)،مثل استهداف السيتوكينات الالتهابية والبروتيازات مثل الكاثبسينات (Joyce et al, 2004).

أهميةالبحث وأهدافه:

يهدف البحث إلى التحري عن دور الكاثبسين B في سرطان الثدي عند البشر عن طريق دراسة التعبير عنه في نسج مأخوذة من مريضات سرطان الثدي باستخدام تقنية التلوين المناعي النسيجي (Immunohistochemistry)، ومعرفة مدى وجود علاقة بين التعبير عن الكاثبسين وبين خصائص الورم.

نظراً لعدم جدوى الطرق التقليدية في علاج السرطان كالعلاج الشعاعي والكيماوي في العديد من الحالات، توجهت الدراسات إلى البحث عن أهداف جديدة للعلاج ضمن البيئة الميكروية للورم من خلال دراسة العلاقة بين مكونات البيئة الورمية وبين تطور الورم، ومن هنا تأتي أهمية الدراسة الحالية من الانتشار الواسع لسرطان الثدي بين

النساء في سوريا والعالم، ومن كونها تبحث في التعبير عن الكاثبسين B في النسج البشرية لسرطان الثدي، مما يضيف فكرة للأفكار المنشورة سابقاً حول بيولوجيا سرطان الثدي عند البشر، مما يفيد بدوره في تطوير طرق معالجة هدفية جديدة لسرطان الثدي.

طرائق البحث ومواده:

عينةالدراسة:

جُمعت عينات المريضات من مشفى الأسد الجامعي ومخبر خاص للتشريح المرضي في محافظة اللاذقية، وأُجريت الدراسة في مخبر التشريح المرضي في كلية الطب البشري ـ جامعة تشرين. درست ملفات (23) عينة سرطان ثدي جمعت بين عامي 2009–2013، وشملت التقارير من طبيب التشريح المرضي معلومات عن حجم الورم، ودرجة الورم، ووجود أو غياب النقائل الورمية إلى العقد اللمفية ، إضافة إلى حالة مستقبلات هرمونات الاستروجين والبروجسترون وحالة مستقبل الـ Her–2/*neu*. استخدمت العينات الورمية النسيجية المثبتة سابقاً في الفورم ألدهيد (10%) والمغمورة في شمع البارافين (formalin–fixed paraffin–embedded (FFPE) sections)، حيث جمعت العينات قبل خضوع المريضات لأي علاج كيماوي.

تراوحت أعمار المريضات patient age بين 32 سنة و 75 سنة (متوسط العمر 53.5 سنة)، أما متوسط حجم الورم tumor size في العينات المنتقاة فقد كان 4.8 سم (حيث أصغر قيمة للحجم 1.5 سم وأكبر قيمة 8 سم)، وتنوعت درجة الورم بين الدرجة الأولى grade I في عينتين فقط (8.7%) والدرجة الثانية grade II في 8 عينات (34.8%) والدرجة الثالثة grade III في 7 عينات (30.4%) مع عدم توفر معلومات عن درجة الورم في 6 عينات. يلخص (الجدول 1) خصائص عينة الدراسة.

الجدول 1: خصائص عينة الدراسة

Age (32-75 yr)	> 53.5 yrs:8	LN metastasis	Positive metastasis: 6
	< 53.5 yrs:6		No metastasis: 2
	Missing: 9		Missing: 15
Grade	I: 2	Tumor Size (1.5-8)cm	<4.8 cm: 3
	II: 8		
	III: 7		>= 4.8 cm: 4
	Missing: 6		
ER, PR, Her-2 status	Present: 5		Missing: 16
	Missing: 18		

تحضير المقاطع النسيجية:

تم تقطيع نسج سرطان الثدي إلى مقاطع نسيجية بثخانة 5µm، ووُضعت على شرائح زجاجية، ثم وضعت الشرائح الزجاجية النسيجية في المحم (70°م) لمدة 15 ساعة بغرض إذابة شمع البارافين وتثبيت النسج على الشرائح الزجاجية.

تلوين المقاطع النسيجية بتقنية التلوين المناعي النسيجي:

يُعتبر التلوين المناعي النسيجي إحدى الطرق المناعية المتبعة لتحديد مكان وجود بروتينات محددة ضمن النسيج. كذلك تمكِّن هذه الطريقة من تتبع أحداث خلوية هامة كالموت الخلوي، ومن متابعة تطور بعض الأمراض كالسرطان واقتراح طرق جديدة للعلاج (Matos et al, 2010).

تعتمد تقنية التلوين المناعي النسيجي على استخدام أضداد معلومة الهوية ضمن محاليل معلومة التركيز تتمكن من تمييز مستضداتها النسيجية بألفة ونوعية عالية. يتم جعل تفاعل الضد مع المستضد مرئياً عبر استخدام ضد ثانوي موسوم بأنزيم، حيث يتجلى دور هذا الأنزيم في تحويل ركازته –المضافة لاحقاً– إلى مادة ملونة، وبالنتيجة يترسب اللون في مكان تواجد البروتين في النسيج (Kroese, 2001).

لإجراء التلوين المناعي النسيجي، غمرت العينات النسيجية في ثلاثة أحواض متتالية من الزايلين، ثم في أحواض متتالية من تراكيز متدرجة من الإيتانول. تركت العينات بعدها في الماء المقطر لمدة دقيقتين قبل أن توضع في حوض الميثانول مع الماء الأوكسيجيني (3%) لمدة 20 دقيقة بغرض تثبيط فعالية البيروكسيداز الداخليendogenous peroxisase، ثم نُقلت الشرائح إلى الماء المقطر لمدة 5 دقائق حيث تعد النسج في هذه المرحلة جاهزة لعمليات التلوين اللاحقة.

بعد إماهة النسج، تأتي مرحلة استعادة المستضد antigen retreival (D'Amico et al, 2008)، حيث غمرت الشرائح بوقاء سيترات الصوديوم pH=6، ووضعت في حمام مائي مسخن للدرجة 60°م لمدة ساعة وتركت بعدها لتبرد في درجة حرارة الغرفة وغسلت بالماء.

تلت استعادة المستضد مرحلة حضن النسج مع وقاء حاوٍ على بروتين الكازئينلمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة بغرض تغطية مناطق الارتباط غير النوعية non–specific binding، وبعد إزالة الفائض من الوقاء أُضيف الضد الأولي للكاثبسين B بتركيز 4µg/ml (تمديد 1:50 من التركيز المركز في العبوة الأصلية)، وذلك في الدرجة 4°م لمدة 12–15 ساعة (overnight). في اليوم التالي غُسلت الشرائح بوقاء تريس (Tris buffered saline TBS).

أضيف بعد ذلك الضد الثانوي الموسوم بأنزيم البيروكسيداز لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة (HRP–conjugated anti–goat antibody) بعد تمديده بنسبة (1:500). ثم غُسلت الشرائح بوقاء تريس TBS، ثم أُضيفت ركيزة أنزيم البيروكسيداز (DAB, Biocare Medical) diaminobenzidine وتركت لمدة دقيقة حتى ظهور اللون البني.

غسلت الشرائح بوقاء تريس TBS ولونت العينات في الهيماتوكسيلين (1 دقيقة) لإظهار نوى الخلايا. بعد ذلك أزيل الماء من النسج dehydration عبر وضع الشرائح في الإيتانول متدرج التركيز ، ثم في الزايلين. تركت الشرائح لتجف في الهواء ثم أضيفت قطرة من بلسم كندا Canada Balsam قبل وضع الساترة. فحصت العينات باستخدام المجهر الضوئي (Nikon–Eclipse 50i) المزود بكاميرا(Nikon–DS–Fi1) واستخدم برمجية (NIS–Elements F software) لعرض الصور على جهاز الحاسب.

تم استخدام نسيج اللوزة كشاهد إيجابي positive control، ونسج من اللوزة وسرطان الثدي حذف في تلوينها خطوة إضافة الضد الأولي، حيث أضيف محلول الكازئين background sniper® بدلاً منه كشاهد سلبي negative control.

الفحص المجهري:

استخدم المجهر الضوئي (التكبيران x100 وx400) للتحري عن توزع التعبير عن الكاثبسين B، واعتمد فيتقييم التعبير عنه على إعطاء كل نوع من الخلايا المعبرة عن الكاثبسين أحد الأرقام (0، +1، +2، +3)، حيث تعني القيمة (0) أن جميع الخلايا سلبية التعبير عن الأنزيم المدروس، (+ 1) أن النسبة المئوية للخلايا المعبرة عن الأنزيم أقل من 30%، (+2) أن نسبة الخلايا الإيجابية تتراوح بين 30%–60% من الخلايا الكلية، (+ 3) أن أكثر من 60% من هذا النوع من الخلايا إيجابية التعبير عن الأنزيم المدروس (Castiglioni et al, 1994; Barthell et al; 2007). جرى تقييم التعبير عن الكاثبسينات على مستوى المقطع في 8 ساحات مجهرية مختلفة، بحيث تعطى القيمة (0–3) لكل ساحة ومن ثم يؤخذ متوسط القراءات للمقطع.

التحليل الإحصائي:

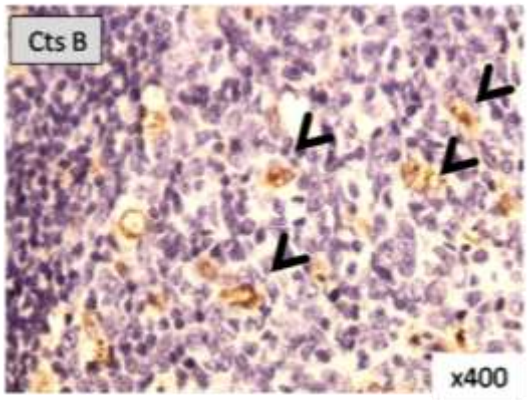
استخدم برنامجSPSS، النسخة 19.0 لتحليل النتائج حيث استخدم اختبار كاي مربعChi-squared test لدراسة أهمية العلاقة بين خصائص الورم (درجة الورم، حجم الورم، تشكل النقائل إلى العقد اللمفية، عمر المريضة) وبين مدى التعبير عن الكاثبسين B في كل من الخلايا الورمية والبطانية وخلايا السدى . اعتبرت العلاقة هامة إحصائياً عندما تكون قيمة$p\leq0.05$.

النتائج والمناقشة:

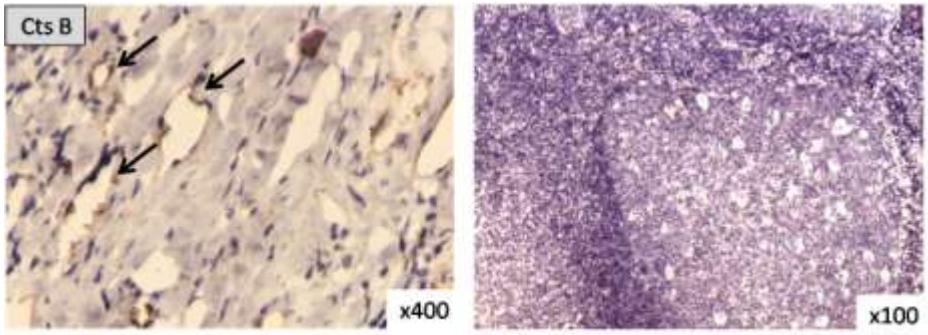
النتائج:

نتائج التلوين المناعي لنسيج اللوزة:

استخدم نسيج اللوزة كشاهد إيجابي للتعبير عن الكاثبسينB كون اللوزة أحد الأعضاء اللمفية الحاوية على خلايا مناعية تمر بمراحل تمايز وتفعيل مختلفة. تشكل اللمفاويات النسبة العظمى من الخلايا المناعية في نسيج اللوزة بالإضافة إلى وجود البالعات والمحببات. أظهر الفحص المجهري لعينات اللوزة تواجد التعبير عن الكاثبسين B في سيتوبلاسما عدد كبير من البالعات الموجودة في المركز المنتش (الشكل 1) وفي بطانة الأوعية الموجودة في نسيج اللوزة (الشكل 2).



الشكل 1: التلوين المناعي النسيجي لنسيج اللوزة باستخدام أضداد الكاثبسين B.يمثل اللون الأزرق نوى الخلايا المتلونة بالهيماتوكسيلين في حين يمثل اللون البني الكاثبسينB. يظهر التعبير عن الكاثبسينB في سيتوبلاسماالبالعات في المراكز المنتشة في اللوزة (رؤوس الأسهم).

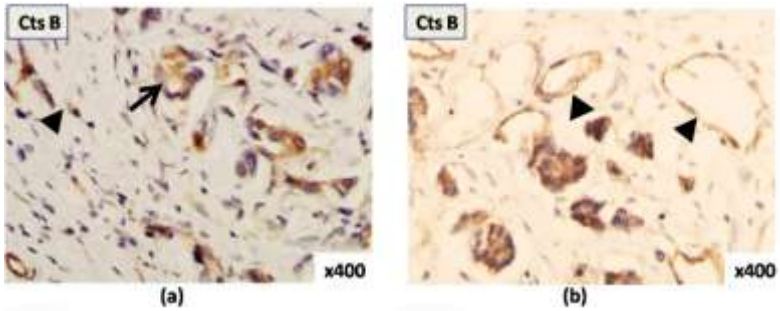


الشكل 2: تلون الأوعية الدموية في نسيج اللوزة بالكاثبسينB (الأسهم)(a). يمثل الشكل (b) الشاهد السلبي بعد حذف الضد الأولي.

نتائج التلوين المناعي للنسج الورمية:

لدى تلوين 23 عينة من نسج سرطان الثدي بأضداد الكاثبسين B ، لوحظ في العينات الإيجابية ظهور تعبير سيتوبلاسميفي كل من الخلايا الورمية وبعض خلايا السدى والخلايا البطانية للأوعية (الشكل 3).

ظهرت إيجابية التعبير عن الكاثبسين B في الخلايا الورمية في معظم العينات (21 عينة، 91%). جرى أيضاً تقدير نسب التعبير عن الكاثبسين B في سدى الأورام والخلايا البطانية للأوعية فكانت 70% (16 عينة) من العينات حاوية على خلايا مناعية في السدى معبرة عن الكاثبسين B. كذلك كانت نسب العينات الحاوية على أوعية ملونة بأضداد الكاثبسين B هي 87% (جدول 2). وتنوع التعبير عن ctsB بين (+1، +2، +3) مع ملاحظة أن حوالي 40% من العينات كانت نتيجتها (+3) (الجدول 3).



الشكل 3: التلوين المناعي النسيجي لمقاطع من نسج سرطان الثدي باستخدام أضداد ctsB. (a) أحد نسج سرطان الثدي المعبّرة عن ctsB في كل من الخلايا الورمية والسدى (يشير السهم إلى تجمع للخلايا الورمية، ويشير رأس السهم إلى إحدى بالعات السدى). (b) تلون معظم الخلايا البطانية للأوعية (رؤوس الأسهم) بأضداد ctsB.

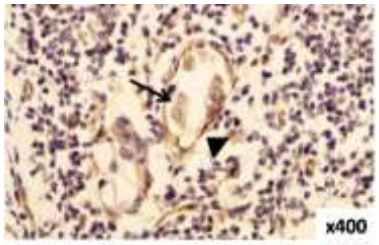
الجدول 2: نسبة العينات إيجابية التعبير عن الكاثبسينB تبعاً لنوع الخلايا.

نوع الخلايا	نسبة العينات إيجابية التعبير عنctsB (%)
الخلايا الورمية	91% (21عينة)
الخلايا البطانية	87% (20عينة)
خلايا السدى	70% (16عينة)

الجدول 3: نسبة العينات إيجابية التعبير عن الكاثبسينB تبعاً لمساحة التعبير في أنواع الخلايا الثلاثة.

تصنيف التعبير الإيجابي	في الخلايا الورمية	في الخلايا البطانية	في خلايا السدى
0 (لا يوجد تعبير)	9% (عينتان)	13% (3عينات)	30% (7عينات)
1+ (<30%)	39% (9عينات)	17% (4عينات)	35% (8عينات)
2+ (30–60%)	13% (3عينات)	26% (6عينات)	26% (6عينات)
3+ (>60%)	39% (9عينات)	44% (10عينات)	9% (عينتان)

لوحظ في عدد من المقاطع النسيجية الملونة تلوُّن بعض الخلايا الورمية ذات القدرة الغازية للنسج الأخرى والمساهمة في تشكيل النقائل، حيث توضعت هذه الخلايا داخل لمعة بعض الأوعية المتواجدة في بيئة الورم (الشكل 4).



الشكل 4: التلوين المناعي النسيجي لمقاطع من نسج سرطان الثدي باستخدام أضداد ctsB
يُظهر تلوُّن بعض الخلايا الورمية (السهم الرفيع) والخلايا البطانية (رأس السهم)

دراسة العلاقة الإحصائية بين التعبير عن الكاثبسينB والمعلومات المتوفرة عن الأورام:

جرى توزيع التعبير عن الكاثبسين إلى مجموعات (0، 1، 2، 3) (الجدول 3). وزعت أيضاً المعلومات الموجودة عن الأورام (عمر المريضة، حجم الورم) إلى مجموعتين (<المتوسط و>=المتوسط)، كذلك ظهرت بيانات وجود أو غياب النقائل إلى العقد اللمفية في مجموعتين (موجود/غير موجود) (الجدول 1). بالاعتماد على اختبار كاي مربع ظهرت علاقة هامة إحصائياً بين مستوى تعبير بطانة الأوعية عن الـ CtsB وبين درجة الورم (p=0.049)، أما مستوى التعبير عن CtsB في الخلايا الورمية وخلايا السدى فلم يرتبط بشكل واضح مع درجة الورم (الجدول 4). كذلك لم توجد أي علاقة إحصائية هامة بين مستوى التعبير عن الأنزيم (في أي من أنواع الخلايا) وبين حجم الورم أو عمر المريضة أو تشكل النقائل إلى العقد اللمفية (الجدول 4)، ولا يمكن تعميم هذه النتيجة نظراً لعدم توفر معلومات كافية عن خصائص الورم، الأمر الذي يستدعي القيام بدراسة أوسع.

الجدول 4: نتائج اختبار كاي مربع في دارسة العلاقة الإحصائية بين التعبير عن الكاثبسين B وبين خصائص الورم

نوع الخلية المعبرة	الورمية	البطانية	السدى
عمر المريضة	0.285	0.463	0.784
حجم الورم	0.327	0.233	0.175
درجة الورم	0.451	0.049	0.87
النقائل إلى العقد اللمفية	0.641	0.217	0.149

المناقشة:

هناك أدلة كثيرة على العلاقة القوية للأنزيمات الحالة للبروتين ، وبالأخص الكاثبسينات، مع تطور الورم وذلك في العديد من السرطانات عند الفئران مثل سرطانة الجزر البنكرياسية وأورام الثدي (Reinheckel et al, 2012)، حيث تبين وجود فعالية عالية للكاثبسينات لاسيما في البالعات الموجودة في البيئة الورمية(Gocheva et al, 2010). تتابعت الدراسات في إثبات دور الكاثبسينات في تطور الورم، وحظي الكاثبسين D بالاهتمام الأكبر في مجال سرطان الثدي حتى أصبح دوره معروفاً لاسيما في زيادة نمو الورم (Garcia et al, 1990)، وتشكل الأوعية الجديدة(Briozzo et al, 1991; González-Vela et al, 1999) وتشكل النقائل (Westley and May, 1999). بينما مازالت المعلومات عن دور الكاثبسينات الأخرى في سرطان الثدي عند البشر قليلة نسبياً.

أثبتت الدراسات السابقة على كل من سرطان جزر البنكرياس وسرطان الثدي وسرطان العنق عند الفئران دور الكاثبسينات(B, C, L) في تحريض الخلايا الورمية على التكاثر وبالتالي زيادة نمو الورم بالإضافة إلى دورها في تشكيل أوعية جديدة للورم (Joyce et al, 2004). كما تبين أن إحداث طفرات mutations في مورثة ctsB أدى إلى خلل في غزو الخلايا الورمية للنسج المجاورة وزيادة الموت الخلوي لخلايا الورم (Gocheva et al, 2006).

توسع Gocheva وزملاؤه (Gocheva et al, 2010) في دراسة الكاثبسينات في كل من سرطان الثدي وسرطان البنكرياس في نماذج فأرية لهذه الأورام البشرية، حيث بينت الدراسة أن الخلايا الورميةوالبالعات في بيئة الورم تعبر عن مستويات عالية من الكاثبسينات مقارنة مع أقرانها في النسج الطبيعية الفأرية، كما أن حذف deletion مورثة ctsB من البالعاتالورمية أحدث خللاً في تطور الورم سواء في مرحلة الغزو أو تشكل الأوعية الجديدة.

تأتي أهمية الدراسة الحالية من الانتشار الواسع لسرطان الثدي بين النساء في سوريا والعالم، وهي تبحث في التعبير عن الكاثبسينB في نسج سرطان الثدي بعد المعلومات المنشورة عن دوره الهام في النماذج الفأرية.

أظهرت النتائج أن أضداد الكاثبسين B تلون البالعات الموجودة في نسيج اللوزة إضافة إلى تلوينها للأوعية الدموية، وهذا ما يدل على أن التلوين بالأضداد المستخدمة يوافق النتائج المتوقعة من خلال التعبير المذكور في الدراسات السابقة (Strojnik et al, 1999; Gocheva et al, 2010). أما نسج سرطان الثدي فقد عبرت عن الكاثبسينB في سيتوبلاسما الخلايا الورمية وخلايا السدى بما فيها الخلايا المناعية والخلايا البطانية للأوعية الدموية. ظهرت نتيجة مماثلة حول الكاثبسين B في دراسة قام بها Castiglioni وزملاؤه (Castiglioni et al, 1994) على نسج مأخوذة من مريضات سرطان الثدي، حيث ظهر التعبير الإيجابي عن CtsB في سيتوبلاسما الخلايا الورمية وخلايا السدى. كما أثبت Strojnik وزملاؤه (Strojnik et al, 1999) في دراستهم على نسج من مرضى سرطان الدماغ أن هذه النسج تعبر عن CtsB في كل من خلاياها الورمية والبطانية الوعائية المتكاثرة والبالعات القريبة من الأوعية الدموية. بينما عندما درس Gocheva وزملاؤه (Gocheva et al, 2006) التعبير عن CtsB في نسج من سرطان البنكرياس عند البشر، ظهرت إيجابية التعبير عن CtsB في الخلايا الورمية والبطانية. وعند متابعة Gocheva وزملاؤه دراستهم على سرطان البنكرياس ولكن على الفئران بدلاً من النسج البشرية (Gocheva et al, 2010) عبَّرت الخلايا الورمية عن ctsB كما تلوَّنت كل البالعاتالورمية بأضداد ctsB ، وتوصلوا إلى نفس النتائج عند إكمال الدراسة على سرطان الثدي عند الفئران.

ومن الجدير بالملاحظة أن بعض الخلايا الورمية التي أبدت إيجابية مع أضداد الكاثبسين B ظهرت ضمن لمعة بعض الأوعية الموجودة في بيئة الورم ، أي أن هذه الخلايا ذات قدرة على غزو النسج المجاورة أو على تشكيل النقائل إلى أعضاء بعيدة. وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج الدراسات التي أكدت دور الكاثبسينات في مرحلتي الغزو وتشكيل النقائل من تطور الورم، كالدراسة التي أُجريت على خلايا بشرية من سرطان الثدي الالتهابي والتي قام بها Victor وزملاؤه (Victor et al, 2011)، حيث أدى التثبيط الانتقائي للكاثبسين B إلى تراجع في الخاصية الغازية للخلايا الورمية، كذلك دراسة Withana وزملائه (Withana et al, 2012) على أنسجة من سرطان الثدي لدى الفئران وعلى نقائلها إلى العظام والرئة، حيث تبين في هذه الدراسة أن تطفير مورثة ctsB أو تثبيط هذا الكاثبسين انتقائياً أنقص بشكل ملحوظ تشكيل النقائل. وأُثبت أن حذف مورثة الكاثبسين B من البالعاتالورمية أو إحداث طفرات في هذهالمورثة أدى إلى حدوث خلل في الغزو في سرطان البنكرياس عند الفئران (Gocheva et al, 2010).

عند دراسة العلاقة بين التعبير عن الكاثبسينات والمعلومات المتوفرة عن الأورام في عينة الدراسة اقتصرت العلاقات الهامة من الناحية الإحصائية على العلاقة بين مستوى تعبير البطانة الوعائية عن الـ CtsB وبين درجة الورم (p=0.049) ، وهذا قد يشير إلى الدور الهام الذي يلعبه الكاثبسين B في تطور سرطان الثدي وبالأخص في تشكيل أوعية جديدة للورم angiogenesis، الأمر الذي يتوافق مع دراسة Gocheva (Gocheva et al, 2010) حيث لوحظ فيها تناقص هام في تشكيل الأوعية الجديدة في سرطان البنكرياس عند الفئران كنتيجة لإحداث طفرة null في مورثة ctsBوكان التناقص بنسبة 48%.

لم تظهر في هذه الدراسة أي أهمية في علاقة درجة الورم مع مستوى التعبير عن CtsB في الخلايا الورمية(p=0.451)، وبشكل مشابه لم توجد علاقة هامة إحصائياً لدرجة الورم مع مستوى التعبير عن CtsB في السدى.كذلك في هذه الدراسة لم تظهر أي علاقة إحصائية هامة بين مستوى التعبير عن الأنزيم وبين حجم الورم أو عمر المريضة أو تشكل النقائل إلى العقد اللمفية ، ويعزى ذلك إلى قلة عدد العينات المدروسة بالإضافة إلى عدم توفر بيانات كافية عن بعض المريضات،فمثلاً لم تتوفر معلومات عن حجم الأورام إلا في 7 عينات، كذلك لم تتواجد بيانات عن حالة مستقبلات الاستروجين والبروجستيرون إلا في 5 عينات، كما اقتصر توفر بيانات عن حالة النقائل إلى العقد اللمفية على 8 عينات، ويعود عدم توفر المعلومات عن حالة مستقبلات الاستروجين والبروجسترونإلى عدم قيام المريضة بهذه التحاليل بشكل روتيني نظراً لارتفاع كلفة التحليل، في حين تقتصر المعلومات المتوفرة عن وجود أو غياب النقائل إلى العقد اللمفية على الحالات التي يتم فيها استئصال ثدي كامل mastechtomy.

لم يكن مستوى التعبير عن الكاثبسينB مرتبطاً مع درجة الورم ووجود النقائل الورمية في العقد اللمفية. كذلك في دراسة سابقة لم تظهر أي علاقة إحصائية بين مستوى التعبير عن CtsB في البالعات وبين أي من درجة الورم أو تشكل النقائل لسرطان الرئة غير صغير الخلايا عند البشر (Wang et al, 2011)، بينما وُجدت في دراسة أخرى على سرطان البنكرياس عند البشر علاقة واضحة بين زيادة التعبير عن CtsB في بيئة الورم وبين تطور الخباثة (Gocheva et al, 2006). ربما يعود التناقض في النتائج الإحصائية لهذه الدراسات إلى أن بيئة الورم تختلف باختلاف السرطان المدروس، فقد يلعب الكاثبسين B دوراً هاماً في البيئة الورمية لسرطان البنكرياس في حين يمكن أن تلعب أنزيمات بروتياز من مجموعات أخرى الدور الأبرز في تطور سرطان الرئة.

بالخلاصة، قدمت هذه الدراسة دليلاً على تواجد الكاثبسين **B** في بيئة الورم وعلى تعدد أنواع الخلايا المنتجة له ضمن هذه البيئة. حال العدد القليل للعينات المدروسة دون إيجاد علاقة إحصائية بين مستوى تواجد الكاثبسين وبين خصائص الورم. إن تأكيد نتائج هذه الدراسة بدراسة أوسع يمكن أن يساهم في فهم التغيرات الالتهابية التي تحدث في البيئة الورمية وعلاقتها مع تطور الورم وحدوث النقائل، كما أنها قد تقدم أهداف علاجية هدفية جديدة تعطى لمجموعة المرضى المناسبة التي تعبر عن الكاثبسينات.

الاستنتاجات والتوصيات:

من هذه الدراسة يمكن استنتاج مايلي:

1. يعبر نسيج اللوزتين عن الكاثبسين B في سيتوبلاسماالبالعات في المراكز المنتشة وفي الخلايا البطانية للأوعية الدموية.
2. يظهر التعبير عن الكاثبسين B في النسج الورمية لسرطان الثدي في سيتوبلاسما الخلايا الورمية وبطانة الأوعية الدموية إضافة إلى خلايا السدى الأخرى.
3. في دراستنا لم توجد علاقة هامة إحصائياً بين التعبير عن الكاثبسين B في الخلايا الورمية وخلايا السدى وبين المعلومات المتوفرة عن الورم (حجم الورم، عمر المريضة، نقائل العقد اللمفية) ، ولكن من الصعب تعميم هذه النتيجة نظراً لقلة عدد العينات وعدم توفر المعلومات الكافية عن الورم.
4. ظهرت علاقة هامة إحصائياً ($p=0.049$) بين الكاثبسينB في الأوعية ودرجة الورم.

وبعد التوصل إلى النتائج السابقة يمكن اقتراح إجراء أبحاث مستقبلية حول:

- دراسة العلاقة بين أنماط سرطان الثدي والتعبير عن الكاثبسينB
- هل كل الأوعية الورمية تفرز الكاثبسين (تلوين بواسمات الأوعية CD34)، ودراسة خصائص الأوعية المفرزة للكاثبسين.
- دراسة أنماط البالعات المفرزة للكاثبسينات باستخدام واسمات خاصة (CD206, NOS, IP−10, CD163)
- دراسة التعبير عن أنزيمات البروتياز الأخرى من عائلة MMPs والسيرين بروتياز مع الكاثبسينات (الكاثبسينB) ومقارنة أهمية التعبير عن كل منها في سرطان الثدي

المراجع:

1. BARTHELL E, MYLONAS I, SHABANI N, KUNZE S, KUHN C, JESCHKE U, AND FRIESE K. *ImmunohistochemicalVisualisation of Cathepsin-D Expression in Breast Cancer*. Anticancer Research 2007; 27: 2035-2040.

2. BRIOZZO P, BADET J, CAPONY F, PIERI I, MONTCOURRIER P, BARRITAULT D, AND ROCHEFORT H. *MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D*. Exp Cell Res. 1991; 194(2): 252-259.

3. CASTIGLIONI T, MERINO M, ELSNER B, LAH T, SLOANE B, AND EMMERT-BUCK M. l*mmunohistochemical Analysis of Cathepsins D, B, and L in Human Breast Cancer.* Human Pathology1994; 25(9): 857-862.

4. D'AMICO F, SKARMOUTSOU E, AND STIVALA F. *State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry.* Journal of Immunological Methods 2008: 1-18.

5. GARCIA M, DEROCQ D, PUJOL P AND ROCHEFORT H. *Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency.* Oncogene. 1990; 5(12):1809-1814.

6. GOCHEVA V, WANG HW, GADEA B, SHREE T, HUNTER K, GARFALL A, BERMAN T, AND JOYCE J. *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. *Genes Dev.* 2010; 24: 241-255.

7. GOCHEVA V, ZENG W, KE D, KLIMSTRA D, REINHECKEL T, PETERS C, HANAHAN D, AND JOYCE J.*Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis.* Genes & Development 2006; 20:543–556.

8. GONZALEZ-VELA MC, GARIJO MF, FERNANDEZ F, BUELTA L, AND VAL-BERNAL JF. *Cathepsin D in host stromalcellsisassociatedwith more highlyvascular and aggressive invasive breastcarcinoma.*Histopathology. 1999;34(1): 35-42.

9. JOYCE J,BARUCH A, CHEHADE K, MEYER-MORSE N, GIRAUDO E, TSAI FY, GREENBAUM D, HAGER J, BOGYO M, AND HANAHAN D. *Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis*. CancerCell 2004; 5: 443-453.

10. KROESE F. *Immunohistochemical Detection of Tissue and Cellular Antigens.* Encyclopedia of Life Sciences 2001: 1-9.

11. LEE J. AND NAN A. *Combination Drug Delivery Approaches in Metastatic Breast Cancer.* Journal of Drug Delivery 2012: 1-17.

12. MA XJ,SALUNGA R, TUGGLE J, GAUDET J, ENRIGHT E, MCQUARY P, PAYETTE T, PISTONE M, STECKER K, ZHANG B, ZHOU Y, VARNHOLT H, SMITH B, GADD M, CHATFIELD E, KESSLER J, BAER T, ERLANDER M, AND SGROI D. *Gene expression profiles of human breast cancer progression*. PNAS 2003; 100(10): 5974–5979.

13. MATOS L, TRUFELLI D, MATOS M AND PINHAL M. *Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice*. Biomarker Insights 2010;5: 9–20.

14. REINHECKEL T, PETERS C, KRÜGER A, TURK B, AND VASILJEVA O. *Differential impact of cysteine cathepsins on genetic mouse models of de novo carcinogenesis: cathepsin B as emerging therapeutic target*. Frontiers in Pharmacology 2012; 3(133): 1-6.

15. STROJNIK T, KOS J, ZIDANIK B, GOLOUH R, AND LAH T. CATHEPSIN B.*Immunohistochemical Staining in Tumor and Endothelial Cells Is a New Prognostic Factor for Survival in Patients with Brain Tumors*. Clin Cancer Res 1999;5: 559-567.

16. SUGG SL. AND DONEGAN WL. *Staging and prognosis. In. Donegan, WL and Spratt, JS*. Cancer of the breast 2002: 477-506.

17. VALDIVIA-SILVA J, FRANCO-BARRAZA J, CUKIERMAN E, AND GARCÍA-ZEPEDA E.A.*Breast Cancer – Focusing Tumor Microenvironment*, Stem Cells and Metastasis.Novel Insights Into the Role of Inflammation in Promoting Breast Cancer Development: 2011. 129-164.

18. VICTOR B, ANBALAGAN A, MOHAMED M, SLOANE B, AND CAVALLO-MEDVED D. *Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion*. Breast Cancer Research 2011, 13: 1-14.

19. WANG HW AND JOYCE JA. *Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions*. Cell Cycle. 2011;9(24): 4824-4835.

20. WESTLEY B. AND MAY F. *Prognostic value of cathepsin D in breast cancer.* British Journal of Cancer 1999; 79(2): 189–190.

21. WITHANA N, BLUM G, SAMENI M, SLANEY C, ANBALAGAN A, OLIVE M, BIDWELL B, EDGINGTON L, WANG L, MOIN K, SLOANE B, ANDERSON R, BOGYO M, AND PARKER B. *Cathepsin B Inhibition Limits Bone Metastasis in Breast Cancer*. Cancer Res 2012; 72(5): 1199-1209.