

افزایش بروز ژن P53 در سرطان ترانزیشنال مثانه

چکیده

بدخیمی مثانه ۵/۲٪ و ۲/۳٪ کل بدخیمیها را به ترتیب در مردان و زنان تشکیل می‌دهد. نود درصد بدخیمیهای مثانه از نوع ترانزیشنال (Transitional Cell Carcinoma, TCC) می‌باشد. آگاهی از عوامل پیشگویی کننده بقای بیمار برای درمان بهتر و پیگیری صحیحتر بیماران بسیار کمک کننده می‌باشد. از جمله این عوامل می‌توان از بروز انکوپروتئین P53 روی سلولهای تومورال در بیماران مبتلا به TCC مثانه نام برد. با توجه به تاثیر انکوپروتئین P53 بر پیش‌آگهی بیماری، در این مطالعه ارتباط آن با درجه و مرحله تومور مورد بررسی قرار گرفت. در صورت اثبات وجود این ارتباط، پزشک معالج می‌تواند از ابتدا بدون نیاز به رنگ‌آمیزی پرهزینه ایمونوهیستوشیمی P53، درمان مهاجمتری را برای بیمار در نظر بگیرد.

این مطالعه بر روی ۲۷ بیمار مبتلا به TCC مثانه در بیمارستان شهید هاشمی‌نژاد بعمل آمد. براساس سیستم درجه‌بندی (WHO/ISUP (World Health Organization/International Society of Urology Pathology) ۱۲ نفر از بیماران مبتلا به TCC درجه پایین و ۱۵ نفر از بیماران دچار TCC درجه بالا بودند. همچنین ۷ نفر از بیماران تومور مهاجم و ۲۰ نفر دیگر تومور سطحی داشتند. با انجام رنگ‌آمیزی P53 بر روی نمونه بیماران در تمام تومورهای درجه بالا و مهاجم، بیش از ۱۰٪ سلولها مثبت بودند، در حالیکه ارتباط آماری معنی‌داری بین تومورهای سطحی و درجه پایین با P53 بدست نیامد. با استفاده از آزمون آماری فیشر Pvalue بدست آمده بین بروز P53 با درجه و مرحله بیماری بترتیب ۰/۰۲۸ و ۰/۰۱۸ بدست آمد. با استفاده از ضریب همبستگی اسپیرمن میزان همبستگی بترتیب ۴۶٪ و ۵۰٪ بدست آمد. (Pvalue بترتیب ۰/۰۱۴ و ۰/۰۰۷).

I *دکتر مژگان عسگری

II دکتر صغری نوری

کلیدواژه‌ها: ۱- بدخیمی مثانه ۲- تومور سلول ترانزیشنال ۳- P53 ۴- ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

ذکر نموده است و ۹۲٪ موارد نیز از نوع TCC بوده است. با روند رو به گسترش صنعتی شدن جامعه و افزایش تماسهای شغلی از قبیل چرم‌سازی، نساجی، نقاشی، رنگ‌سازی، پتروشیمی، آشپزی، آرایشگری و مواد چاپ، شیوع سرطان ترانزیشنال مثانه رو به افزایش است.

از میان تمامی عوامل خطرسان، مصرف سیگار مهمترین عامل می‌باشد (۲).

بدخیمی مثانه حدود ۵/۵٪ کل بدخیمیها و چهارمین بدخیمی در مردان را شامل می‌شود، در حالیکه در خانمها هشتمین تومور شایع است و ۲/۳٪ کل بدخیمیها را در آنان تشکل می‌دهد. بیش از ۹۸٪ موارد سرطان مثانه منشأ اپیتلیال دارد که از این میان ۹۰٪ موارد را نوع ترانزیشنال تشکل می‌دهد (۱).

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در آمار سال ۱۳۷۵ شیوع بدخیمی مثانه را ۵/۲٪ کل سرطانها در ایران

این مقاله خلاصه‌ایست از پایان نامه دکتر صغری نوری جهت دریافت درجه تخصصی در رشته آسیب‌شناسی به راهنمایی دکتر مژگان عسگری، ۱۳۸۰. (I) استادیار آسیب‌شناسی، بیمارستان شهید هاشمی‌نژاد، بالاتر از میدان ونک، کوچه شهید والی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران (*مؤلف مسؤل)
(II) متخصص آسیب‌شناسی، بیمارستان ایزدی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قم، قم.

در مطالعه‌ای که در ژاپن بر روی ۵۴ بیمار مبتلا به TCC مثانه همراه دیسپلازی انجام شد، میزان بروز انکوپروتئین P53 در دیسپلازیهای مختصر، متوسط، شدید و سرطان به ترتیب ۱۸٪، ۳۵٪، ۵۵٪ و ۷۰٪ بدست آمد. همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش میزان آتیپی سلولی میزان بروز P53 نیز افزایش می‌یابد (۷). در مطالعه دیگری که بر روی ۷۲ بیمار مبتلا به TCC مثانه در ژاپن انجام شد، واکنش پذیری برای P53 در نزدیکی لایه بازال و حاشیه تومورهای مهاجم بطور مشخصی گسترده‌تر بود و این واکنش پذیری با درجه و مرحله بیماری ارتباط تنگاتنگی داشت ($P < 0.05$) (۸).

روش بررسی

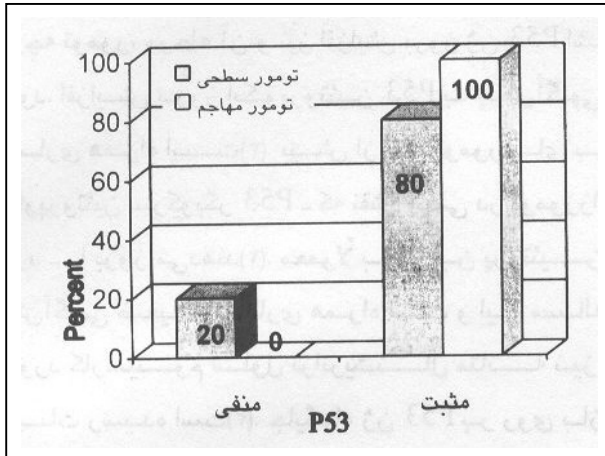
این مطالعه از نوع مشاهده‌ای توصیفی بود و روی ۲۷ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول ترانزیشنال مثانه که در فاصله مهرماه سال ۱۳۷۸ لغایت مهرماه سال ۱۳۷۹ به بیمارستان هاشمی‌نژاد مراجعه کرده بودند انجام گردید. لامهای این بیماران در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان هاشمی‌نژاد موجود بود و مجدداً مورد بازبینی قرار گرفت. درجه‌بندی تومور براساس سیستم WHO/ISUP انجام شد. بر همین اساس تومورها به دو گروه درجه بالا و پایین درجه‌بندی شدند. مرحله‌بندی نیز با استفاده از سیستم AJCC/UICC بر مبنای اطلاعات موجود در پرونده بیماران - از طریق مشاهدات جراح در هنگام جراحی و بررسیهای پاراکلینیک در تلفیق با مشاهدات میکروسکوپی - انجام شد. تومورهای درجا (insitu) و تومورهای پاپیلری با یا بدون تهاجم به آستر مخاطی (T1, Ta) تحت عنوان تومورهای سطحی و تومورهای با تهاجم به لایه عضلانی و مراحل پس از آن تحت عنوان تومورهای مهاجم طبقه‌بندی می‌شوند (M1-T2).

نمونه‌هایی که بعلت ناقص بودن اطلاعات پرونده و یا بعلت کم عمق بودن بیوپسی، انجام مرحله‌بندی برای آنها غیرممکن بود از مطالعه حذف شدند. در مجموع ۲۷ نمونه باقی ماند که پس از تعیین درجه و مرحله، بلوکهای پارافینی

از شاخصهای پیشگویی کننده پیش‌آگهی بیماری می‌توان به درجه تومور، مرحله آن و نیز افزایش بروز ژن P53 اشاره نمود. افزایش بروز انکوپروتئین P53 با پیش‌آگهی بد بیماری همراه است (۳). بیش از ۵۰٪ تومورهای بدن، انکوپروتئین سرکوبگر P53 - که نقش مهمی در تومورزایی دارد - را بروز می‌دهند (۲). معمولاً بروز این پروتئین با پیش‌آگهی ضعیف بیماری همراه است و این مساله در مورد کارسینوم سلول ترانزیشنال مثانه نیز به اثبات رسیده است (۳). جایگاه ژن P53 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ می‌باشد و یک فسفوپروتئین هسته‌ای با وزن ۵۲ کیلودالتون را کد می‌کند. نیمه عمر این ژن در سلولهای طبیعی ۳۰-۶ دقیقه است و بنابراین با روش ایمونوهیستوشیمی واکنش پذیری نخواهد داشت. جهش این ژن منجر به تولید محصول پروتئین جهش یافته P53 با نیمه عمر طولانی می‌شود که از طریق روشهای سیتوژنتیک، مولکولی و ایمونوهیستوشیمی قابل مشاهده خواهد بود (۴).

P53 مانع ورود چرخه سلولی به فاز S می‌شود و سلول را در مقابل سرطانزایی محافظت می‌کند، در این مدت سلول فرصت ترمیم DNA را بدست می‌آورد و در صورت عدم ترمیم، P53 با القاء مرگ سلولی منجر به آپوپتوز (apoptosis) سلول می‌شود (۳ و ۵).

البته بغیر از جهش ژنی موارد دیگری از قبیل اتصال پروتئینهای حاصل از DNA ویروسهایی مانند HPV و آدنوویروسها و نیز اتصال محصولات برخی انکوژن‌ها به P53 نیز منجر به غیرفعال شدن آن می‌شود (۶). در این تحقیق ارتباط بین درجه و مرحله تومور با بروز انکوپروتئین P53 بررسی گردید. در صورت اثبات این فرضیه، لزوم درمان مهاجم در همان ابتدای تشخیص توموری با درجه و مرحله بالا - بدون نیاز به رنگ‌آمیزی برای P53 - مسجل می‌گردد، در حالیکه در صورت عدم مشاهده چنین ارتباطی و با علم به ارتباط پیش‌آگهی بد موارد P53 مثبت، لزوم رنگ‌آمیزی P53 جهت تومورهای ترانزیشنال مثانه منتفی نمی‌شود.



تصویر شماره ۲- رنگ آمیزی P53 در TCC درجه پایین که کمتر از ۱۰٪ هسته‌ها رنگ شده‌اند (منفی)

نتایج

اغلب بیماران مورد مطالعه (۸۱٪) مرد بودند، بعبارتی نسبت مرد به زن در این مطالعه ۴ به ۱ بود.

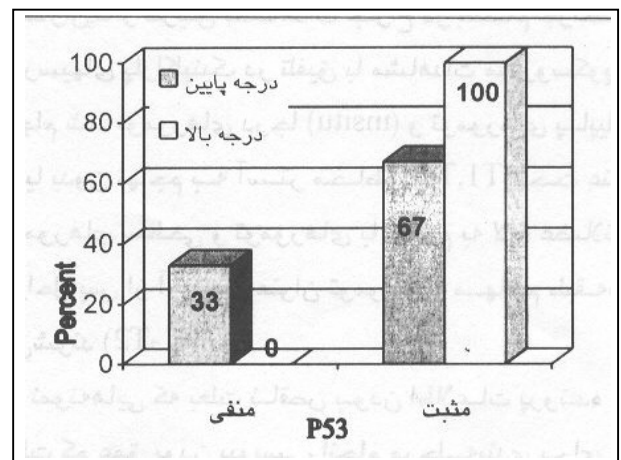
بیشترین شیوع سنی محدوده سنی ۶۰-۷۰ سال (۵۶٪) بود. همچنین ۳۰٪ بیماران بالای ۷۰ سال، ۱۱٪ بین ۶۰-۵۰ سال و ۳٪ نیز ۴۰ سال سن داشتند.

از ۲۷ مورد تومور ترانزیشنال مثانه ۱۲ مورد درجه پایین و ۱۵ مورد درجه بالا بودند. در ضمن ۲۰ مورد از تومورها از نوع سطحی و ۷ مورد از نوع مهاجم بودند. در بررسی میزان رنگ‌پذیری P53 در تومورهای با درجه پایین مشخص شد که در ۳۳٪ موارد میزان رنگ‌پذیری کمتر از ۱۰٪، در ۵۰٪ موارد بین ۱۰-۵۰ درصد و در ۱۷٪ موارد میزان رنگ‌پذیری P53 بالای ۵۰٪ بود در حالیکه در تومورهای با درجه بالا میزان رنگ‌پذیری P53 در ۶۰٪ موارد بین ۱۰-۵۰ درصد و در ۴۰٪ موارد این میزان بالای ۵۰٪ بود. بعبارتی در ۶۷٪ موارد تومورهای با درجه پایین و در ۱۰۰٪ موارد تومورهای با درجه بالا واکنش‌پذیری P53 مشاهده گردید (نمودار شماره ۱).

همچنین در مورد بررسی ارتباط مرحله تومور و میزان رنگ‌پذیری P53 مشخص شد که تمام تومورهای مهاجم

آنها جهت رنگ‌آمیزی - براساس دستورالعمل کیت ارسال شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمی در ۴-۵ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی بالا (HPF) - میدانهایی که بهتر رنگ شده بودند - بررسی و میانگین آنها تعیین شد. سپس براساس سیستم نمره‌دهی که اساس آن درصد هسته‌های رنگ‌آمیزی شده می‌باشد، نمره‌دهی انجام شد. بدین ترتیب نمونه‌ها براساس میزان رنگ‌پذیری هسته آنها در ۳ گروه زیر ۱۰٪، ۱۰-۵۰ درصد و بالای ۵۰٪ مرتب شدند ولی در نهایت و برای سهولت بررسی و تحلیل آماری، نمونه‌هایی که در آنها کمتر از ۱۰٪ هسته‌ها رنگ شده بودند بعنوان منفی و نمونه‌های بیش از ۱۰٪ بعنوان مثبت در نظر گرفته شدند. تصویر شماره ۱ رنگ‌آمیزی P53 مثبت را در TCC درجه بالا و تصویر شماره ۲ رنگ‌آمیزی P53 منفی را در TCC درجه پایین نشان می‌دهد.

متأسفانه بعلت عدم استاندارد شدن گزارش آزمایشگاه‌های ایمونوهیستوشیمی و استفاده از آنتی‌بادیهای مختلف (و با درجات خلوص متفاوت) روی این اپی‌توپهایی آنتی‌ژنی، هنوز مرز صحیحی بین P53 منفی و P53 مثبت بدست نیامده است. مبنای انتخاب حد (cut off) ۱۰٪، نتایج ارائه شده در مطالعات مشابه بوده است (۱، ۵، ۹ و ۱۰).



تصویر شماره ۱- رنگ‌آمیزی P53 در TCC درجه بالا با واکنش‌پذیری مثبت

پایین مورد مطالعه قرار گرفتند. با مراجعه به جداول شماره ۱ و ۲ مشخص می‌گردد که تمام تومورهای با درجه بالا و مهاجم برای P53 واکنش‌پذیری داشتند و بعبارتی، ارتباط کاملی بین تومورهای با درجه بالا و مهاجم با P53 در این مطالعه وجود داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که می‌بایست برای این تومورها از همان ابتدا و بدون نیاز به رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی درمان مهاجم اتخاذ گردد. در تومورهای با درجه پایین و سطحی این ارتباط ناکامل بود و بنابراین به نظر می‌رسد رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای P53 الزامی باشد. با مراجعه مجدد به پرونده‌های بیماران مورد مطالعه، مشاهده گردید که حدود ۶۵٪ این بیماران که برای P53 واکنش‌پذیری مثبت داشتند دچار عودهای مکرر بودند و بهمین دلیل نیاز به مطالعه تکمیلی دیگری که شامل ارتباط موارد P53 مثبت با پیش‌آگهی بیماران می‌باشد احساس می‌گردد.

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی درجه TCC با بروز P53

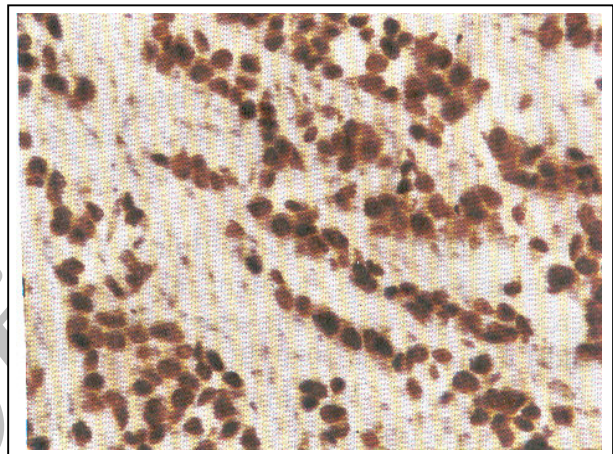
P53	درجه	پایین	بالا
مثبت	۸	۱۵	
منفی	۴	۰	
جمع	۱۲	۱۵	

جدول شماره ۲- توزیع فراوانی مرحله TCC با بروز P53

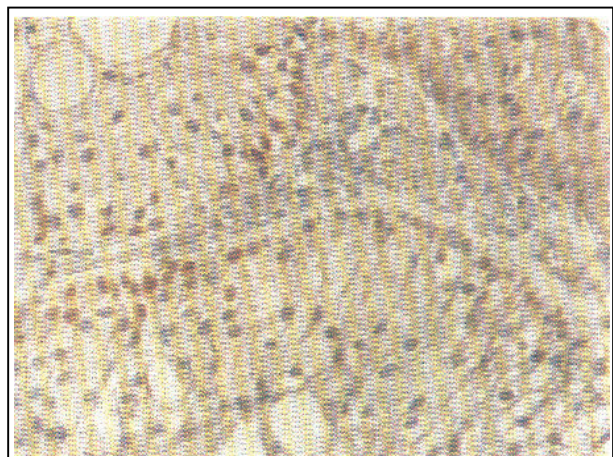
P53	مرحله	سطحی	مهاجم
مثبت	۱۶	۷	
منفی	۴	۰	
جمع	۲۰	۷	

میزان همبستگی P53 با درجه و مرحله تومور به ترتیب ۴۶٪ و ۵۰٪ بود که حجم کم نمونه می‌تواند در کاهش این میزان موثر باشد. بنابراین تکرار این مطالعه با حجم نمونه بیشتر پیشنهاد می‌شود. در مطالعات انجام شده در سایر کشورها، نتایج حاصله مؤید وجود ارتباط بین بروز P53 با درجه و مرحله بیماری است (۸ و ۱۱). بعنوان مثال در پژوهش انجام شده در کشور فرانسه روی ۱۰۴ مورد

بیش از ۱۰٪ رنگ‌پذیری برای P53 نشان دادند در حالیکه تنها ۸۰٪ موارد تومورهای سطحی برای P53 مثبت شدند (نمودار شماره ۲). با استفاده از آزمون فیشر، Pvalue بدست آمده در مورد ارتباط P53 با درجه (grade) ۰/۰۲۸ و با مرحله (stage) ۰/۰۱۸ می‌باشد. با استفاده از ضریب همبستگی اسپیرمن، این مقادیر بترتیب ۰/۰۱۴ و ۰/۰۰۷ و میزان همبستگی با درجه و مرحله نیز بترتیب ۴۶٪ و ۵۰٪ بدست آمد.



نمودار شماره ۱- توزیع درصد فراوانی درجه TCC مثانه برحسب واکنش‌پذیری در مقابل P53.



نمودار شماره ۲- توزیع درصد فراوانی مرحله TCC مثانه برحسب واکنش‌پذیری در مقابل P53

بحث

در بررسی که بر روی ۲۷ بیمار مبتلا به TCC مثانه انجام شد تقریباً تعداد برابری از تومورهای با درجه بالا و

منابع

- 1- Messing EM., catalona W., urothelial tumors of the urinary tract, Walsh P., Retik AB., vaughan Ed., et al., campbell's urology, 7 th ed, Philadelphia, W.B.Saunders, 1998, PP: 2329-2394.
- 2- Cotran RS., Kumar V., Collins T., Pathologic basis of disease, 6th ed., Philadelphia, W.B.Saunders, 1999, PP: 276-292, 1003-1008.
- 3- Rosai J., ackerman's surgical pathology, 8th ed, NewYork, Mosby, 1996, PP; 34-36, 1195-1204.
- 4- Cote RJ., Taylor CR., Immunohistochemistry and related marking techniques, Damjanov I., Linder J., Anderson's pathology, Tenth ed, NewYork, Mosby, 1996, 136-144.
- 5- Bernordini S., Adessi G., Billrrey G., et al., Immunohistochemical detection of P53 protein overexpression versus gene sequencing in uinary bladder tumor, J urol, 1999, 162, PP: 1469-1501.
- 6- Battifora H., Immunohistochemistry: technical aspects, pitfalls and problem solving, long immunohistochemistry, 1998, October 2, PP: 3-46.
- 7- Benyi LI., Hiroshi K., Sakon N., et al., Reciprocal expression of bcl2 and P53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder, urol Res, 1998, 26, PP: 235-241.
- 8- Vollmer RT., Humphrey PA., Swanson PE., et al., Invasion of the bladder by TCC: its relation to histologic grade and expression of P53, MIB-1, C-erb B-2, epidermal growth factor receptor and bcl2, cancer, 1998, 15: 82(4): PP: 715-23.
- 9- Menendes lepez V., Molina R., Alcaraz Asensio A., et al., Expression of the tumor suppressor gene P53 in superficial TCC of the bladder, Actas urol E sp, 1998, 22(8), PP: 642-9.
- 10- Dingwel YE., bcl2/box expression and P53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection, J urol, 1998, 160, PP: 2025-2029.
- 11- Skopelitu A., Hadjiyannakis M., bladder TCC: Correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) histological grade and clinical stage, Eur urol, 1997, 31, PP: 464-471.

TCC مثانه، ارتباط چشمگیری بین انکوپروتئین P53 با مرحله ($P < 0.001$) و درجه ($P < 0.001$) بدست آمد. در این مطالعه اذعان شده است که روش ایمونوهیستوشیمی روشی بسیار حساس، اختصاصی و ساده برای تشخیص افزایش میزان بروز P53 در تومورهای مثانه است (۵). در همین راستا، در یک پژوهش انجام شده روی ۴۳ بیمار در چین، عود بیماری طی یکسال پس از عمل جراحی در بیماران P53 مثبت ۶۴٪ و در گروه P53 منفی ۲۲٪ بوده است ($P < 0.05$). در همین مطالعه با توجه به یافته‌های پژوهش عنوان شد که مقادیر نسبی Bcl2، box و P53 بر میزان تأثیر دارو، ایجاد آپوپتوز و مقاومت به شیمی درمانی نقش بسزایی دارند (۱۰).

پیشنهادات

- ۱- برای رسیدن به نتیجه صحیح، با ارزش آماری بالا و قابل قبول توصیه می‌شود که مطالعه روی تعداد بیشتری از بیماران انجام شود.
- ۲- هدف از تحقیقات و بررسیها مخصوصاً در علم پزشکی نه تنها کشف نادانسته‌ها و مجهولات می‌باشد بلکه در قلب این مقصود، هدف دیگری نهفته است و آن افزایش بقای بیمار و مدت زمان فارغ از بیماری می‌باشد. به همین جهت پیشنهاد می‌شود میزان بقای بیماران مبتلا به TCC مثانه با P53 واکنش‌پذیر نسبت به مبتلایان به TCC مثانه P53 منفی مقایسه شود که این بررسی خود به چندین سال پیگیری نیاز دارد. همچنین می‌توان عود بیماری را در این دو گروه مقایسه نمود.
- ۳- لازم به ذکر است که انجام این پژوهشها و موارد مشابه ارتباط تنگاتنگی با بودجه مالی دارد و در صورت عدم مساعدت مراکز مسوول، هیچ گاه نمی‌توان از پژوهشهای انجام شده به نتیجه قطعی رسید. جهت حل این مشکل می‌توان هزینه پژوهش را مستقیماً در اختیار پژوهشگر قرار داد و یا اینکه زمینه استفاده از مراکز ارائه خدمات رایگان (آزمایشگاهی) را جهت پژوهشگران فراهم نمود.

P53 OVER EXPRESSION IN TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF BLADDER

^I
*M. Asgari, MD ^{II}
S. Noori, MD

ABSTRACT

Bladder cancer consists of about 5.2% of all cancers in men and 2.3% in women. About 90% of them have the origin of transitional cells(TCC).

There are some predictive factors that knowledge of them is useful for management and follow-up of the patients. Expression of oncoprotein P53 is one of these factors. Considering influence of P53 expression on prognosis, we decided to study the correlations between tumor grade and stage with P53. Whereas these correlations to be found, the clinician may treat their patients, with high-grade and invasive tumor with P53 expression, aggressively and earlier, without any need to stain for P53. In our study we reviewed 27 patients in Shahid Hashemi-Nejad hospital that 12 of them had low-grade urothelial carcinoma and the others had high-grade urothelial carcinoma according to WHO/ISUP system. Also 7 patients had invasive tumors and 20 of them had superficial tumors. After immunohistochemistry staining for P53, all the high-grade and invasive tumors were positive with the cut-off of 10%. But there was no meaningful statistical correlation between superficial and low-grade tumors and P53 expression. Obtained Pvalue with Fisher's test for P53 expression and tumor grade and stage were 0.028 and 0.018 respectively and with Spearman test were 46% and 50% respectively.

Key Words: 1) Bladder malignancy 2) Transitional Cell Carcinoma(TCC) 3) P53 expression
4) Immunohistochemistry

This article is a summary of the thesis of the degree of specialty in pathology of S.Noori,MD. under supervision of M.Asgri,MD., 2001.

I) Assistant professor of pathology, Shahid Hashemi Nejad hospital, Vanak sq., Shahid Vali Nejad Alley, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (*Corresponding author)

II) Pathologist, Qom University of Medical Sciences and Health Services, Qom, Iran.