Archive of SID

تغییرات آلکالین فسفاتاز جفتی در بیماری مول هیداتی فرم کامل

مژده صالح نیا Ph.D.☆♦، طاهره ریاضی فرزاد Ph.D.☆، محمد تقی خانی Ph.D.☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** پیشنهاد روش تکمیلی در تشخیص بیماری مول هیداتی فرم از دیگر اشکال بیماریهای ترفوبلاستیک بارداری

* **مواد وروشها:** نمونه‌های سرمی و بافتی ۱۳ بیمار و ۳۰ زن باردار نرمال پس از زایمان یاکورتاژ تهیه شدند. برای بررسی فعالیت آنزیم از سوبسترای پارانیترو فنیل فسفات استفاده شد، برای افتراق ایزوآنزیم جفتی مقاوم به حرارت از بقیهٔ انواع آن، با استفاده از حرارت به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵° سانتی‌گراد، آنها غیرفعال شدند و سپس فعالیت آنزیم محاسبه شد.

* **یافته‌ها:** از نتایج به دست آمده مشخص شد که فعالیت آنزیمهای فوق چه در نمونه‌های سرمی و چه در نمونه‌های استخراج بافتی بیماران مول هیداتی فرم در مقایسه با افراد نرمال باردار کاهش معنی‌داری داشت ($P<0.05$) اما در مقایسه با نمونه‌های کنترل غیر باردار تفاوتی را نشان نداد و این نشانگر هیپوفسفاتازی شدید در بیماران مول هیداتی فرم بود.

* **نتیجه‌گیری:** کاهش فعالیت آنزیم در این بیماران ممکن است ناشی از سنتز ناکافی آنزیم توسط سلولهای تروفوبلاست بوده یا تغییرات بعد از کپه‌برداری آن باشد. از آنجایی که آنزیم آلکالین فسفاتاز در انتقال فعال قندها و فسفات از میکروویلیهای غشای سلولهای تروفوبلاست می‌تواند نقش داشته باشد؛ شاید یکی از علل اصلی تشکیل ویلیهای هیدروپیک در بیماران مول کاهش این آنزیم و بر هم خوردن تبادلات مواد باشد. همچنین اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز به خصوص نوع جفتی آن در سرم و استخراج بافتی بیماران مول هیداتی فرم می‌تواند در کنار اندازه‌گیری β hCG روش مؤثری در تشخیص به موقع این بیماری و معیاری برای بررسی سیر بهبود آن باشد.

گل واژگان: آلکالین فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز جفتی، مول هیداتی فرم، بیماری تروفوبلاستیک بارداری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از آنجایی که شناخت نئوپلاسم‌ها به خصوص انواع بدخیم آنها قبل از اینکه به مراحل بسیار پیشرفته برسند از اهمیت خاصی برخوردار است، کوششهای فراوانی برای شناخت زودرس این بیماریها انجام شده است. به علت ماهیت تومورهای بدخیم که آناپلازی شدید دارند بعضی از ژنهایی که در مراحل اولیه رشد فرد بارز شده و سپس غیر فعال شده بودند، مجدداً بروز پیدا کرده و شروع به فعالیت می‌کنند. حال اگر این ژنها مسئول سنتز پروتئین یا ترکیب خاصی باشند، محصول این ژن به مقدار زیادی ساخته خواهد شد. امروزه محققین در صدد یافتن پروتئینها یا آنزیمهایی هستند که بدین صورت در تومورها به طور فراوان و غیرطبیعی یا حتی اکتوپیک سنتز می‌شوند و به‌عنوان تومور مارکر معروف هستند. مقادیر کمی تومور نشانگر، نشان دهندهٔ پراکندگی و گسترش بافت توموری است. لازم به ذکر است که در بعضی از سرطانها مقدار تومور نشانگر کاهش می‌یابد و روند کاهش آن در بافت نشان دهندهٔ بروز بدخیمی است. از جملهٔ این آنزیمها آلکالین فسفاتاز جفتی است (۱). نوع خاصی از این آنزیم (ایزوآنزیم Ragan) در ۳۹ درصد از تومورهای سرویکس و تخمدان و ۱۰درصد از بیماران با سرطان آندومتر و تومورهای ناشی از سلولهای ژرم دیده شده است (۲، ۳).

مول هیداتی فرم نوع خوش خیمی از بیماری تروفوبلاستیک بارداری (GTD)[1] است در حالی که کوریوکارسینوما، بدخیم ترین حالت و به همراه متاستاز است (۴). این نئوپلاسمها از عناصر تروفوبلاستی بلاستوسیست در حال تکامل منشاء گرفته و ویژگی یک جفت نرمال از جمله توانایی تهاجم به آندومتر، تولید هورمون hCG[2] را به همراه دارند (۵، ۶). براساس ماهیت پاتولوژیک و سیتوژنتیک، مول هیداتی فرم را به دو بخش عمده تقسیم می‌کنند. یکی مول هیداتی فرم کامل یا کلاسیک و دیگری ناقص یا جزئی است. در نوع اول بافت جنین و عروق خونی درون پرزها دیده نمی‌شود. همچنین مول هیداتی فرم نوع کامل اغلب 2n کروموزومی ولی نوع ناقص 3n کروموزومی است و در کنار بافت مولی معمولاً جنین آنرونیه شده دیده می‌شود (۴). پس از ابتلای فرد به مول هیداتی فرم تعدادی از افراد دچار مول مهاجم و تعداد محدودتری دچار کوریوکارسینوما می‌شوند. بررسی روند پیشرفت بیماری بیشتر بر اساس محاسبهٔ زیر واحد β هورمون hCG است و در پاره‌ای از موارد سلولهای تروفوبلاست حالت غیر فعال داشته و به ظاهر بیماری رفع شده است، در حالی که بیمار در فاز غیر فعال به سر برده یا احتمالاً بیمار مجدداً دچار بارداری شده است، بنابراین در تشخیص بیماری اشتباه رخ می‌دهد (۷، ۹). گزارشهایی وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز جفتی در بیماریهای تروفوبلاستیک بارداری (GTD) کاهش می‌یابد. Bur اولین کسی است که در گزارش سال ۱۹۶۲ خود اعلام نمود که فعالیت این آنزیم در بیماریهای GTD کاهش یافته است (۱۰). محققین با کمک روشهای ایمونوهیستوشیمی نیز نشان داده‌اند که مقدار این آنزیم کاهش داشته است (۱۱، ۱۳). هدف این تحقیق انتخاب روش تکمیلی است که بتوان تشخیص روند پیشرفت بیماری را در کنار تکنیکهای روتین، کامل‌تر کرد و با محاسبهٔ فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز جفتی، آن را به‌عنوان تومور نشانگر معرفی کرد.

مواد و روشها

نمونه‌های بافتی و سرمی ۱۳ خانم غیر باردار، ۱۳ بیمار مول هیداتی فرم و ۳۰ خانم باردار طبیعی بعد از زایمان یا دیلاتاسیون و کورتاژ (D&G)[3] تهیه شدند. نمونه‌های سرمی پس از تهیه در ۲۰°- سانتی‌گراد نگهداری و نمونه‌های بافتی (جفت طبیعی و بافت مول هیداتی فرم) چندین بار با سرم فیزیولوژی خون شویی و به قطعات کوچکی تقسیم شده و در ازت مایع نگهداری شدند. برای تهیه استخراج بافتی، پس از ذوب نمونه‌ها، قطعات کوچکی از آنها (۵-۳ گرم) را توزین کرده و با افزودن دو حجم بافر تریس (۰/۰۱ مول Tris Hcl-buffered Salin, pH= ۸/۳)، هموژنیزه و فیلتر شدند.

پس از صاف کردن مخلوط حاصل با دور ۷۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشت شده و برای محاسبهٔ کمی آنزیم آلکالین فسفاتاز مورد استفاده قرار گرفت. سوبسترای به کار گرفته شده پارانیتروفنل فسفات (۱۰mMol/L) در بافر دی اتانل آمین (۱mol/L) با pH=۹/۸ به همراه کلرید منیزیم (۰/۵ mMol/L) بود. در pH قلیایی و حضور آنزیم آلکالین فسفاتاز، سوبسترا تبدیل به پارانیتروفنل می‌شود. در حالت معمولی این ترکیب بی‌رنگ است اما در pH قلیایی یون پارانیترو فنوکسید رنگ زرد تولید می‌کند که می‌توان در طول موج ۴۰۳ نانومتر میزان جذب نوری آن را محاسبه کرد. به منظور محاسبهٔ آلکالین فسفاتاز مقاوم به حرارت با ایزو آنزیم جفتی آن (PLAP) مقداری از سرم با استخراج بافتی (حدود ۲ سی‌سی) را در لوله‌های در پیچ‌دار ریخته و در بن ماری با حرارت ۶۵° سانتی‌گراد به گونه‌ای قرار گرفتند که سطح آب بن ماری دو سانتی متر بالاتر از نمونه‌ها باشد و به مدت ۱۵ دقیقه در این وضعیت باقی ماندند. سپس با سرد نمودن جدار لوله‌ها (در آب یخ قرار داده) باعث توقف واکنش شده و مطابق روش قبل فعالیت آنزیمی محاسبه شد.

با توجه به اینکه مقادیر نمونه‌های سرمی و بافتی با یکدیگر متفاوت بودند لازم بود که برای مقایسه فعالیت آنزیم گروهها، فعالیت مخصوص آنزیم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

فعالیت مخصوص= نسبت فعالیت آنزیم (واحد در لیتر) بر مقدار پروتئین (میلی گرم در لیتر)

محاسبهٔ پروتئین نمونه‌ها به روش بیوره انجام شد. روش آماری به کار گرفته شده در این تحقیق آزمون Student t test بود.

یافته‌ها

پس از محاسبهٔ فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز کل و مقاوم به حرارت و نیز مقدار پروتئین کل، فعالیت مخصوص آنزیم محاسبه شد

1. Gestational Trophoblastic Disease
2. human Chorionic Gonadotropin
3. Dilatation & Curtage

www.SID.ir

Archive of SID

که خلاصهٔ نتایج در جداول ۴-۱ آمده است.

در یک نگاه اجمالی کاملاً مشهود است که فعالیت مخصوص آنزیم هم در نمونه‌های سرمی و هم استخراج بافتی بیماران در مقایسه با افراد کنترل باردار کاهش دارد. به طور طبیعی فعالیت مخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز کل و مقاوم به حرارت در افراد طبیعی غیر باردار و باردار تفاوت معنی داری دارد ($P<0.05$) و این نیز ناشی از سنتز و ترشح مقدار زیادی از آنزیم در افراد باردار است. همچنین آزمون T وجود اختلاف شدیدی را بین نمونه‌های سرمی و استخراج بافتی افراد بیمار با افراد باردار نشان می‌دهد ($P<0.05$) که این امر نیز نشانگر آنزیم آلکالین فسفاتاز جفتی هستند و رابطهٔ مستقیمی بین افزایش طول مدت بارداری و افزایش این آنزیم در خون و بافت جفت (میکروویلی‌های سلولهای تروفوبلاست) (۶، ۷) وجود دارد. همان گونه که در بخش یافته‌ها نتایج نمونه‌های سرمی و استخراج بافتی بیماران مبتلا به مول هیداتی فرم آورده شده است، در مقایسه با نمونه‌های کنترل باردار میزان فعالیت آنزیم کاهش شدیدی یافته است. این مسئله می‌تواند بیشتر مربوط به کاهش سنتز این آنزیم توسط سلولهای تروفوبلاستی باشد.

نتایج دیگر این تحقیق که مربوط به مطالعات هیستوشیمی و

جدول ۱: فعالیت مخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های سرمی

گروه	تعداد	پروتئین کل (میلی‌گرم) میانگین(±SD)	فعالیت کل (واحد در لیتر) میانگین(±SD)	فعالیت مخصوص (واحد بر میلی‌گرم) میانگین(±SD)
زنان طبیعی غیرباردار	۱۲	(±۰/۱۴)۶/۶۵	(±۸۷/۲۸)۲۱۷	(±۰/۰۰۱۴۶۷)۰/۰۰۲۲۷
زنان باردار	۲۰	(±۱/۵۹)۶/۵۵	(±۲۳۹/۷۴)۶۵۷/۲	(±۰/۰۰۲۹۱)۰/۰۱۰۱
بیمار مول هیداتی فرم	۱۰	(±۰/۶۲)۶/۸۲	(±۱۱۹/۰۸)۳۱۴/۲	(±۰/۰۰۲۲۵)۰/۰۰۳۲۵

جدول ۲: فعالیت مخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز نمونه‌های استخراج بافتی

گروه	تعداد	پروتئین کل (میلی‌گرم) میانگین(±SD)	فعالیت کل (واحد در لیتر) میانگین(±SD)	فعالیت مخصوص (واحد بر (میلی‌گرم) میانگین(±SD)
بافت جفت طبیعی	۱۱	(±۰/۶۳)۲/۹۲	(±۵۵۶۱/۹۳)۱۳۴۲۰	(±۰/۱۴۵۸)۰/۴۵۵
بافت مول هیداتی فرم	۱۲	(±۱/۴۷۰)۳/۵۲	(±۵۷۱/۵)۸۱۰/۸۲	(±۰/۰۲۲۲)۰/۰۲۰۲

جدول شماره ۳: فعالیت مخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز مقاوم به حرارت در نمونه‌های سرمی

گروهها	تعداد	پروتئین کل (میلی‌گرم) میانگین(±SD)	فعالیت کل (واحد در لیتر) میانگین(±SD)	فعالیت مخصوص (واحد بر میلی‌گرم) میانگین(±SD)
سرم طبیعی غیرباردار	۱۳	(±۰/۱۴)۶/۶۵	(±۲۱/۲۲)۵۳/۶۹	(±۰/۰۰۰۵۰)۰/۰۰۰۶۶
زنان باردار	۳۰	(±۰/۲۰۶)۶/۷۶	(±۱۵۵/۲۱)۲۲۹/۲	(±۰/۰۰۲۲۶)۰/۰۰۳۵۶
بیماران مول هیداتی فرم	۱۰	(±۰/۶)۷/۱	(±۲/۲۷)۳/۵	(±۰/۰۰۰۰۲)۰/۰۰۰۰۵

جدول شماره ۴: فعالیت مخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز مقاوم به حرارت در نمونه‌های استخراج بافتی

گروهها	تعداد	پروتئین کل (میلی‌گرم) میانگین(±SD)	فعالیت کل (واحد در لیتر) میانگین(±SD)	فعالیت مخصوص (واحد بر میلی‌گرم) میانگین(±SD)
بافت جفت طبیعی	۱۱	(±۰/۶۳)۲/۹۲	(±۶۹۵۲/۱)۱۲۱۵۴/۵	(±۰/۱۸۷۳۳)۰/۳۳۰
بافت مول هیداتی فرم	۱۲	(±۱/۷۴)۲/۵۲	(±۱۱۰/۹)۱۱۷/۵	(±۰/۰۰۳۱۳)۰/۰۰۳۲۹

کاهش شدید فعالیت آنزیم در افراد مول هیداتی فرم است. حتی در بخش دیگری از آنالیزهای آماری که مقایسه‌ای بین میزان فعالیت آنزیم در سرم افراد طبیعی غیرباردار و افراد بیمار صورت گرفته، نشان می‌دهد که این دو گروه تفاوت معنی‌داری از نظر فعالیت آنزیم ندارند؛ به عبارت دیگر در افراد مول هیداتی فرم مقدار فعالیت آلکالین فسفاتاز کل به حدی کاهش یافته که مشابه افراد غیر باردار شده یا به عبارتی دچار هیپوفسفاتازی شدید شده‌اند.

بحث

سلولهای ترفوبلاست جفت مهمترین محل برای سنتز و استقرار

هیستوآنزیمولوژی این آنزیم بود نیز تایید کننده این نتایج است (۱۵). در زمینه هیستوشیمی و بیوشیمی بافت مول مطالعات بسیار کمی صورت گرفته است. گزارشهای نادری که در این زمینه وجود دارد، محققین از روشهای ایمونوهیستوشیمی استفاده کرده‌اند. نتایج این تحقیقات نیز نشان داده‌اند که مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز به خصوص نوع جفتی آن کاهش داشته است (۱۱، ۱۳). شاید یکی از اصلی‌ترین علت کاهش فعالیت این آنزیم مربوط به درجهٔ آناپلازی بافت مول هیداتی فرم باشد. آناپلازی می‌تواند باعث مهار یا کاهش سنتز پروتئین خاصی از جمله سنتز آنزیم ALP شود. احتمال دیگری که می‌توان برای کاهش فعالیت این آنزیم مطرح نمود تغییرات بعد از کپیه برداری در سنتز آنزیم ALP

www.SID.ir

Archive of SID

است که تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم است تا دلیل واقعی آن مشخص شود.

آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از مهمترین آنزیمهای دخیل در انتقال قندها و فسفات از غشای سلولهای تروفوبلاست بوده (۱۶) و جفت یکی از عناصر اصلی در تبادلات جنین و مادر است. بنابراین به علت کاهش فعالیت این آنزیم در بیماری مول هیداتی فرم، اختلال شدیدی در تبادلات جنین و مادر صورت می‌گیرد و شاید یکی از مهمترین دلایل تبدیل پرزهای جفتی به وزیکولهای هیدروپیک و تجمع مواد در این وزیکولها مربوط به اختلال در سنتز و عملکرد این آنزیم باشد.

یکی دیگر از مهمترین دستاوردهای این تحقیق کمک در تشخیص دقیق و نیز بررسی بهتر سیر بهبود بیماری مول هیداتی فرم است. چراکه به شکل معمول در پزشکی برای شناسایی و نیز پیگیری روند بهبود این بیماری پس از دیلاتاسیون و کورتاژ (D&C)، زیر واحد ß هورمون hCG را محاسبه می‌کنند. در پاره‌ای از موارد به‌کارگیری این تکنیک می‌تواند منتج به تشخیص غلط شود. به‌عنوان مثال اگر فرد بیمار مدتی پس از D&C باردار شود یا به علت وجود بعضی از سلولهای توموری دیگری که هورمون hCG را به مقادیر متفاوتی به شکل اکتوپیک تولید می‌کنند، باعث بروز یک پاسخ مثبت کاذب شود یا بالعکس در بعضی موارد به علت غیر فعال شدن موقتی بافت مولی باقی مانده در بدن سبب پاسخ منفی کاذب می‌شوند. این در حالی است که بافت غیرطبیعی در بدن وجود داشته و پس از مدتی فعالیت بدخیمی خود را از سر می‌گیرد؛ حتی می‌تواند تبدیل به کوریوآدنوما یا کوریوکارسینوما شود (۷، ۸، ۹).

بنابراین می‌توان با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به خصوص نوع مقاوم به حرارت آن در کنار اندازه‌گیری hCG ß روش کاملتر و مناسبتری را برای تشخیص و بررسی روند بهبود بیماری مول هیداتی فرم طرح و پیشنهاد کرد.

References

1. Beckstead JH: Alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms. AM J Surg Pathol 1983; 7: 341-349
2. Moss DW: Multiple forms of acid and alkaline phosphatases, genetics, expression and tissue specific modification. Clin Chem Acta 1986; .161: 123-135
3. Jacoby B: Placental type alkaline phosphatase from human tumors tissue. Clin Chem Acta 1971; 35: 473-481
4. Wang TH, Wag HS: Gestational trophoblastic diseases: Current trends and perspectives. J Formos Med Assoc 1995; 94: 449-57
5. Yusoff Dawood M, Faco G, Saxena BB, Landesman R: Human chorionic gonadotropin and its subunits in hydatidiform mole and choriocarcinoma. Obstet Gyncol 1977; 50: 172-180
6. Ozturk M, Berkowitz R, Goldstein O, Bellet D, Wands JR: Differential production of human chorionic gonadotropin and free subunits in gestational trophoblastic disease. Am J Obstet Gyncol 1988; 158: 193-198
7. Check JH, Nowroozi KH, Chase JS, Lauer C: False - positive human chorionic gonadotropin levels caused by a heterophile antibody with the immunoradiometric assay. Am J Obstet Gyncol 1988; 158: 99-100
8. Smith DB, O Reilly SM, Newland FS: Current approaches to diagnosis and treatment of gestational trophoblastic disease. Curr Opin Obstet Gyncol 1993; 5(1): 84-91
9. Chase JS, Check JH, Nowroozi KH, Wu CH: First trimester serum levels of the ß- subunit of human chorionic gonadotropin in a tubal molar pregnancy. Am J Obstet Gyncol 1987; 157: 910
10. Bur GE, Hertig AT, Faco G, Mckay DG, Adams EC, B.A: Histochemical aspects of hydatidiform mole and choriocarcinoma. Obstet Gynecol 1962; 19: 156-181
11. Losch A & Kainz C: Immunohistochemistry in the diagnosis of the gestational trophoblatic disease. Acta Obstet Gynecol Scand 1996; 75: 753-756
12. Danihel L, Porubsky J, Vojtassak J, Breitenecker G: Trophoblastic disease. I Use of imunohistochemistry in the diagnosis of complete hydatidiform moles. Cesk Patol 1994; 30: 76-79
13. Danihel L, Porubsky J, Vojtassak J, Breitenecker G: Trophoblastic disease II Immunohistochemical and cytogenetic parameters of partial hydatidiform moles. Cesk Patol 1994; 30: 80-84
14. Sonnenwright AC, Jarett L: Gradwohl's Clinical laboratory methods and diagnosis. 8ed, London, CV Mosby Company 1980; 256-271
15. Salehnia M, Riazi F, Tachi CM, Torghaban SH, AlTarihi T: Alkaline phosphatase histochemistry and biochemistry in the diagnosis of complete hydatidiform mole. Pathology Oncology Reaserch 2000; 28, 6(2): 105-110
16. Kaldor G: Clinical enzymology, New York, Prager Publisher 1983: 87-112

www.SID.ir