

بررسی لکتین هیستوشیمی گلیکوکونژوگه‌های سطحی سلول در پولیپ و آدنوکارسینومای کولون

دکتر محمدرضا عرب^۱، دکتر شیراحمد سارانی^۲، دکتر مهربد کریمی^۳، دکتر محمدرضا خمیری^۴

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان کولون بعلت پیش آگهی بد، فراوانی شیوع و علائم غیر اختصاصی، یکی از دلایل اصلی مرگ و میر سرطانها محسوب می گردد و بدین دلیل توجه تعداد زیادی از محققین به آن معطوف شده است. مطالعات جدید تغییرات زیادی را در قندهای انتهایی سطح سلول در روند نئوپلازی نشان داده است. اهمیت این ترکیبات در تشخیص به موقع ضایعات، تعیین پیش آگهی و رفتارهای بیولوژیک سلولهای سرطانی و انتخاب پروتکل درمانی مناسب برای بیماران مورد تأکید قرار گرفته است. هدف از این مطالعه شناسایی قند انتهایی گالاکتوز/ N - استیل گالاکتوز آمین در پولیپ و آدنوکارسینومای کولون بود.

مواد و روشها: تحقیق به روش توصیفی صورت گرفت. بدین منظور بلوکهای پارافینی ۴۷ بیمار با تشخیصهای فوق از بخش آسیب شناسی بیمارستان خاتم الانبیا زاهدان انتخاب شدند. پس از تأیید تشخیص قبلی، از بلوکهای مناسب مقاطعی به ضخامت ۷-۵ میکرومتر از ۱۰ بیمار (۵ نمونه خوش خیم و ۵ نمونه بدخیم) تهیه گردید. برشها تحت رنگ آمیزی اختصاصی لکتینی PNA (با رقت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر در بافر فسفات با غلظت یک دهم مولار و $pH = 6/8$) و آلسین بلو در $pH = 2/5$ قرار گرفت و گزارشات بافتی تهیه شد.

یافتهها: در پولیپ وجود قند انتهایی گالاکتوز/ N - استیل گالاکتوز آمین را فقط در هسته و بخش فوق هسته‌ای سلولهای انتروسیتی کولون نشان داد. در حالی که در سلولهای سرطانی این قند انتهایی عمدتاً در سطوح لومینال سلولی و ترشحات درون تشکیلات تومورال مشاهده شد. شدت واکنش به لکتین در سلولهای نئوپلاستیک به مراتب بیشتر از انتروسیت‌ها در پولیپ بود. بدین ترتیب حضور قند انتهایی گالاکتوز/ N - استیل گالاکتوز آمین در سیتوپلاسم و هسته سلولهای انتروسیتی و غشای آپیکال سلولهای نئوپلاستیک در آدنوکارسینومای نشان داده می شود.

نتیجه گیری و توصیهها: به نظر می رسد در سیر تغییرات نئوپلاستیک نه تنها شدت واکنش به لکتین‌ها، بلکه محل واکنش نیز تغییر می کند.

واژگان کلیدی: گلیکوکونژوگه، کولون، آدنوکارسینوما، پولیپ، لکتین.

۱- گروه بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۲- گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۳- گروه آسیب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۴- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

Archive of SID

مقدمه

کارسینوم‌های کولورکتال به عنوان یک بیماری نئوپلاستیک با توزیع جهانی در مردان نسبت به زنان شیوع بیشتری دارد. این بیماری معمولاً در افراد مسن ۶۰-۷۰ ساله بیشتر از سایرین دیده می‌شود (۱). از آنجا که پیش‌آگهی این بیماری معمولاً خوب نیست، توجه به تکنیک‌های هیستوشیمی به منظور تشخیص به موقع ضایعات و تعیین رفتار بیولوژیک سلولهای با پتانسیل بالا برای تغییرات بدخیمی همیشه مورد توجه محققین بوده است (۲). با توجه به اینکه ارتباط زیادی میان آدنوماها و آدنوکارسینوما در کولون وجود دارد، امروزه فرضیه آدنوما- آدنوکارسینوما در کولون بنا به دلایل زیادی مورد توجه قرار گرفته است. تغییرات مورفولوژی سلولها و تغییرات ساختمانی در غدد در آدنوماها و آدنوکارسینوماها در واقع انعکاسی از مجموعه تغییرات ژنتیکی و بیوشیمیایی در ترکیبات سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی می‌باشد (۱).

سلولهای طبیعی اپی‌تلیال در کولون در سیر طبیعی تمایز سلولی خود از قاعده کریپت‌ها تا سطوح لومینال اپی‌تلیوم، گلیکوکونژوگه‌های متعددی در سطح خود نمایان می‌سازند که قندهای انتهایی این ترکیبات قابلیت اتصال به لکتین‌ها را داشته و هم‌چنین گویای وضعیت طبیعی تمایز در پوشش کولون نیز می‌باشند. بنابراین تغییر الگوی واکنش سلولها به لکتین‌ها می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات غیر طبیعی سلولهای پری‌نئوپلاستیک و ضایعات نئوپلاستیک باشد (۳).

مطالعات جدید نشان داده است که قابلیت سلولها در آدنوماهای با پتانسیل تبدیل به کارسینوما به مراتب بیشتر از سایر آدنوماها برای واکنش به

لکتین *PNA (Peanut Agglutinin)* می‌باشد. این موضوع اهمیت این لکتین را در نشان دادن تغییرات تمایزی و پروليفراتیو سلولها در مسیر آدنوما- آدنوکارسینوما در کولون نشان می‌دهد (۳). لکتین *PNA* دی ساکارید *Gal/GalNac* را به طور کاملاً اختصاصی ردیابی می‌کند. این دی ساکارید به عنوان معرف آنتی ژنیک *antigenic determinant* برای آنتی‌ژنهای گروه‌های خونی نیز عمل می‌نماید، که به عنوان *T-antigen* معرفی می‌شود (۴، ۵). واکنش سلولها به این لکتین در سلولهای آدنومایی و کارسینومایی نشان‌دهنده سنتز ناکامل گلیکوپروتئین‌های حامل این دی ساکارید می‌باشد (۴). از آنجا که دی ساکارید فوق به عنوان یک تومور مارکر در سرطان‌های کولورکتال شناخته می‌شود (۵) هدف از این مطالعه ردیابی قند انتهایی گالاکتوز / *N-استیل گالاکتوز آمین* در پولیپ و آدنوکارسینومای کولون بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. بلوکهای پارافینی از ۴۷ بیمار با تشخیص پولیپ و آدنوکارسینوما از بخش آسیب‌شناسی بیمارستان خاتم‌الانبیاء زاهدان انتخاب گردید. پس از مطالعه لامهای هماتوکسیلین - انوزین این بیماران، از بلوکهای پارافینی مناسب ۱۰ بیمار برشهایی با ضخامت ۶-۵ میکرومتر (۴ برش از هر بلوک) تهیه شد. برای انجام واکنش لکتین هیستوشیمی از لکتین *PNA* با رقت ۱۰ میکروگرم/ میلی لیتر، رقیق شده در بافر فسفات (*PBS*) با غلظت ۰/۱ مولار و $pH=۶/۶$ استفاده شد.

برش‌ها پس از پارافین زدائی و آبدهی به روش معمول در آسیب‌شناسی به مدت ۲ ساعت در اتافک مرطوب در مجاورت لکتین قرار گرفتند.

در بیمارآنپولیپی تمایزات سلولی از نظر پولاریته حفظ شده بود هر چند که هسته سلولها قدری بزرگتر و هیپرکروم به نظر می‌رسید.

موقعیت بازال هسته سلولها تقریبا در تمام آنها دیده می‌شد. لامینا پروپریا حالت ادماتوز نشان می‌داد و عروق خونی متسع‌تر از معمول بودند. به نظر می‌رسید تعداد سلولهای جامی نسبت به انتروسیت‌ها کاهش یافته است.

انفیلتراسیون آماسی در نمونه‌ها مشخص بود. تغییرات ساختمانی و سلولی در بخش‌های لومینال کریپت‌ها بیشتر از بخش‌های قاعده‌ای آنها بود (فتومیکروگراف ۱).

مقاطع پس از شستشو در بافر فسفات به منظور ظهور واکنش به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در محلول ۰/۰۳% DAB که محتوی ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات بود، قرار گرفتند. برای توقف واکنش مقاطع به مدت ۵-۲ دقیقه در آب جاری شستشو شدند. سپس برشها به مدت ۵-۲ دقیقه در محلول آلسین بلو با $pH=2/5$ قرار گرفتند و آنگاه به روش معمول آبگیری و چسبانده شدند (۶). تمام مواد و رآژین‌های لازم از شرکت سیگما خریداری شدند.

یافته‌ها

در مطالعه لامهای هماتوکسیلین-انئوزین

فتومیکروگراف ۱- انفیلتراسیون سلولهای التهابی و وازودیلاتاسیون همراه با حالت ادماتوز در نمونه ای از پولیپ التهابی نشان داده شده است ($H-E \times 125$)

سلولهای مدور و چند شکلی بودند که نمای هیپرکروم هسته‌ها به خوبی مشخص بود. هستک‌ها در

در لامهای هماتوکسیلین-انئوزین بیماران کارسینومائی سلولهای نئوپلاستیک به صورت

...
 نئوپلاستیک با اتصال به هم نمای طنابی شکلی را پیدا کرده بودند. انفیلتراسیون آماسی و هم‌چنین افزایش عناصر رشته‌ای در استرومای تومور قابل ملاحظه بود (فتومیکروگراف ۲).

سلول به وضوح دیده می‌شدند. در بعضی از سلولها هسته تقریباً تمام فضای سلول را پر کرده بود و سیتوپلاسم به صورت حاشیه‌ای در اطراف دیده می‌شد. در قسمت‌هایی از تومور سلولهای

فتومیکروگراف ۲- بهم ریختگی سلولی و ساختمانی در عناصر غددی همراه با افزایش رشته‌ها در استرومای آدنوکارسینوم کولونی نشان داده شده است ($H-E \times 250$)

گلیکوزآمینوگلیکانی وجود دارد. سلولهای جامی شکل به شدت با آلسین بلو واکنش نشان داده بودند در حالی که لکتین *PNA* عمدتاً در ناحیه گلژی با سلولهای کولونی واکنش نشان داده بود و بنابراین

نتایج مطالعه لامهای لکتینی *PNA* با آلسین بلو در بیماران پولیپی نشان داد که از نظر ترکیبات موسینی اختلاف زیادی میان سلولهای کولونی و جامی شکل از نظر ترکیبات اسیدی

التهابی واکنشی به لکتین از خود نشان ندادند. واکنش لکتین با هسته سلولها بسیار ضعیف بود (فتومیکروگراف ۳).

وجود دی ساکارید *Gal/GalNac* در این بخشها نشان داده می‌شود. استرومای تومور تقریباً واکنشی به لکتین از خود نشان نداد. واکنش سلولهای جامی شکل محدود به نواحی اینفرانوکلئار بود. سلولهای

فتومیکروگراف ۳- واکنش شدید سلولهای جامی شکل به آلسین بلو و واکنش ضعیف ناحی اینفرانوکلئار سلولی به لکتین نشان داده شده است ($\times 400$ PNA/Alcian blue pH=2.5)

اسیدی سولفات‌ها و کربوکسیله در استروما نشان داده می‌شود. هسته سلولهای نئوپلاستیک واکنشی به لکتین از خود نشان نداد. واکنش ترشحات درون سلولهای نئوپلاستیک به لکتین واکنش شدیدتری نسبت به سطوح آپیکال سلولی بود (فتومیکروگراف ۴).

در بیماران کارسینومائی سلولهای نئوپلاستیک در سطوح آپیکال خود با شدت بالائی به لکتین پاسخ دادند و بدین ترتیب وجود دی ساکارید *Gal/GalNac* در این بخشها نشان داده می‌شود. استرومای تومور واکنشی به لکتین از خود نشان نمی‌داد ولی پاسخ شدیدی از استروما به آلسین بلو دیده شد و بدین ترتیب وجود گلیکوزآمینوگلیکانهای

فتمیکروگراف ۴- واکنش شدید سلولهای نئوپلاستیک در سطوح آپیکال و به صورت منتشر در سرتاسر سیتوپلاسم نشان داده شده است ($PNA/Alcian\ blue\ pH=2.5 \times 250$)

بحث

است که سلولهای طبیعی کولون به لکتین *Jack* *frutt agglutinin* در ۶۰ درصد سلولهای نئوپلاستیک واکنشی شدید نشان داده‌اند در حالی که تنها ۳۰ درصد سلولهای آدنومایی به این لکتین از خود واکنش نشان می‌دهند. سلولهای مهاجم نئوپلاستیک به این لکتین تقریباً واکنشی از خود نشان نمی‌دهند. بدین ترتیب نوعی ارتباط منفی میان شدت واکنش به این لکتین و درجه بدخیمی در سلولهای کولونی وجود دارد (۷).

مطالعات *Brinck* و همکاران (۱۹۹۶) نشان داده است که میزان واکنش سلولهای اپی‌تلیال به لکتین *PNA* به درجه تمایز سلولها بستگی دارد، آنچنان که الگوی متفاوتی از واکنش به این لکتین در سلولهای عمقی کریپتها نسبت به سلولهای سطحی اپی‌تلیوم کولونی وجود دارد (۸).

تحقیق حضور قند انتهایی *Gal/GalNac* را در بخش سوپرانوکلتار سلولهای انتروسیستی کولونی در ناحیه گلژی در سلولهای آدنومایی را نشان داد. در حالی که سلولهای جامی عمدتاً در بخش اینفرانوکلتار خود با لکتین *PNA* واکنش می‌دادند. در هیچ یک از این سلولها واکنش درون هسته ای به لکتین دیده نشد.

لکتین‌ها ترکیباتی گلیکوپروتئینی هستند که قابلیت اتصال به قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه‌های سلولی و ترشحات آنها را دارند. این ترکیبات برای ردیابی قندهای انتهایی فوق کاملاً اختصاصی بوده و از این رو نشان دهنده وضعیت تمایز سلول و هم‌چنین درجه بدخیمی سلولهای سرطانی هستند. مطالعات *Remani* و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده

آدنوما تا آدنوکارسینوما توزیع قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه‌های سلول به میزان زیادی تغییر می‌نماید، آنچنان که شدت واکنش سلولها به لکتین، محل واکنش و الگوی آن می‌تواند مبنایی برای *grading* سلول‌های تومورال باشد (۱۲). با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات دیگر محققان پیشنهاد می‌شود از آنجا که قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه‌های سلولی با اسید سیالیک پوشیده می‌شوند و لذا امکان ردیابی آنها به میزان زیادی محدود می‌گردد، برای ردیابی تمام این مولکولها از تکنیک هضم آنزیمی سیالیداز (*Sialidase* / *PNA* digestion) استفاده شود.

به نظر می‌رسد علیرغم تغییر این مولکولها در سلولهای نئوپلاستیک و ترشحات آنها، این موضوع که لکتین‌ها می‌توانند تغییرات مرحله‌ای روند نئوپلازی را نشان دهند باید مورد ارزیابی جدی قرار گیرد. مطالعات آینده احتمالاً نقش بیشتر این مولکولها در روند نئوپلازی و اهمیت تشخیصی یا پروگنوستیک آنها را در بیماریهای سرطانی نشان خواهد داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از همکاری شورای محترم پژوهش دانشکده پزشکی زاهدان در تصویب این کار پژوهشی صمیمانه تشکر نمایند. هم‌چنین از همکاران محترم بخش‌های تشریح دانشکده پزشکی و آسیب‌شناسی بیمارستان خاتم‌الانبیا زاهدان و مرکز تحقیقات دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

مطالعه حاضر هم‌چنین نشان داد که الگوی متفاوتی از واکنش به لکتین *PNA* در آدنوما و آدنوکارسینومای کولونی وجود دارد. آن چنان که سلولهای نئوپلاستیک واکنش شدیدی به این لکتین در سطوح آپیکال سلولی و ترشحات درون تشکیلات تومورال از خود نشان دادند. واکنش سیتوپلاسم به این لکتین به صورت منتشر بود. بعلاوه واکنش نسبتاً ضعیفی به این لکتین در استرومای پولیپ در مقایسه با واکنش شدید استرومای موارد تومورال دیده شد. به نظر می‌رسد این تغییر الگوی واکنش به لکتین حاصل تغییر در روند گلیکوزیلاسیون ترکیبات پروتئینی و یا تجمع ترکیبات غیر طبیعی در سلول باشد (۹). مطالعات *Philips* و همکاران (۱۹۹۰) نشان داده است که گلیکوکونژوگه‌های ترشعی سلولهای طبیعی فاقد دی‌ساکارید *Gal/GalNac* می‌باشند در حالی که ترکیبات ترشعی سلولهای نئوپلاستیک در ۷۰ درصد موارد به این لکتین پاسخ می‌دهند (۱۰). این نتایج با مطالعه ما همخوانی دارد. مطالعات *Ota* و همکاران (۱۹۸۸) نشان داده است که الگوی واکنش سلولها به لکتین‌های مختلف نیز متفاوت می‌باشد آن چنان که واکنش سلولهای طبیعی و آدنومایی کولون به این لکتین محدود به ناحیه گلژی می‌باشد. در حالی که واکنش همین سلولها به لکتین *Griffonia simplicifolia agglutinin* محدود به سطوح آپیکال سلولی می‌باشد بعلاوه سلولهای سرطانی واکنش خفیف‌تری نسبت به سلولهای طبیعی و آدنومایی از خود نشان می‌دهند (۱۱). مطالعه *Campo* و همکاران (۱۹۸۸) نشان داده است که در سیر نئوپلازی از

References:

1. Crawford JM, Kumar V. The oral cavity and GI tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, eds. Robbins Basic Pathology. 7th edi. Philadelphia: WB Saunders; 2003. p. 80-5.
2. Kemeny N, Selter K. Colorectal carcinoma. In: Calabersi P, editor. Medical Oncology. 2nd edi. New York: Mc Graw Hill; 1993. p. 749-83.

3. Boland CR, Martin MA, Goldstein IJ. Lectin reactivity as intermediate as intermediate biomarkers in premalignant colorectal epithelium. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16: 103-9.
4. Cooper HS, Reuter VE. Peanut lectin binding sites in polyps of the colon and rectum. Adenomas, hyperplastic polyps and adenoma with in situ carcinoma. *Lab Invest* 1983; 49(6): 655-61.
5. Said IT, Shamsuddin AM, Sherief MA, et al. Comparison of different technique for detection of Gal/GalNac, an early marker of colonic neoplasia. *Histol Histopathol* 1999; 14(2): 351-7.
6. Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cell differs with genera. *Anat Res* 1990; 228(2): 177-84.
7. Remani P, Nair RA, Sreelekha TT, et al. Altered expression of Jack fruit agglutinin specific glycoconjugate in benign and malignant human colorectum. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19(4): 519-23.
8. Brinck U, Bosbach R, Korabiowska M, et al. Histochemical study of expression of lectin reactive carbohydrate epitopes and glycoligand binding sites in normal human appendix vermiformis, colonic mucosa, acute appendicitis and colonic adenoma. *Histol Histopathol* 1996; 11(4): 919-30.
9. Kolar Z, Mikolaskova J, Majerova S, et al. Occurrence of some blood group antigen –like glycoconjugate in colorectal tumors. *Acta Univ Palacki Fac Med* 1990; 125: 73-8.
10. Philips TE, Frisch EB. Secretory glycoconjugate of a mucin synthesizing human colonic adenocarcinoma cell line. Analysis using double labeling with lectins. *Histochemistry* 1990; 93(3): 311-7.
11. Ota H, Nakayama J, Katsuyama T, et al. Histochemical comparison of specificity of three bowel carcinoma reactive lectins, Griffonia simplicifolia agglutinin_II, Peanut agglutinin and Ulex europaeus agglutinin. *Acta Pathol Jpn* 1988; 38(12): 1547-59.
12. Campo E, Condom E, Palacin A, et al. Lectin binding patterns in normal and neoplastic colonic mucosa. A study of Dolichos biflorus agglutinin, Peanut agglutinin, Wheat germ agglutinin. *Dis Colon Rectum* 1988; 131(11): 892-9.

Archive

The Study of Cell Surface Glycoconjugate of Polyp and Adenocarcinoma of Colon by Lectin Histochemistry

Dr. M.R. Arab, Dr. M. Karimi, Dr. S.A. Sarani, Dr. M.R. Khamari

Depth of Anatomy, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences Because of bad prognosis, nonspecific signs and high incidence, carcinoma of the colon is one of the main reasons of cancer death and therefore attention of researchers focused on it. New studies were showed that cell surface glycoconjugate greatly change in neoplasia. The importance of these compounds were confirmed in early diagnosis, prognosis and a good treatment protocol for neoplastic patients. The aim of the present study was to identify the Gal/GalNac in cell surface glycoconjugate of polyp and adenocarcinoma of colon.

For this purposes 47 patients with polyp and adenocarcinoma of colon chose from file of pathology of Khatam – Al-Anbia hospital in Zahedan. Sections with 5-7 μm in thickness were prepared from suitable paraffin blocks of 10 patients (5 polyp & 5 adenocarcinoma) and lectin histochemistry using PNA were done (lectin dilute 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS 0.1 M, pH = 6.8 and alcian blue pH = 2.5). Sections studied and histologic reports were prepared.

Results of this study showed existence of Gal/GalNac in enterocytes of polyp cells in region of nuclei and supranuclear portion of cytoplasm. Cancerous cells showed the presence of this terminal sugar principally in luminal surface and intraluminal secretion of glandular components. The reaction of cells to lectin was higher in neoplastic cells than enterocytes of polyp. Therefore the existence of Gal/GalNac was confirmed in cytoplasm of enterocytes of polyp and luminal surface of neoplastic cells in adenocarcinoma of colon.

It seems that the degree and location of reactivity of cells to lectins were changed in neoplasia

Key words: Glycoconjugate, colon, adenocarcinoma, polyp and lectin.

Archive of SID