

## بررسی ارتباط پروتئین P<sub>53</sub> در سرم و ادرار بیماران با سرطان سلولهای ترانزیشنال مثانه

\* محمد رضا دارابی<sup>۱</sup> MD، ناصر طیبی میبیدی<sup>۲</sup> MD، داود عرب<sup>۳</sup> MD

<sup>۱</sup>دانشیار اورولوژی، <sup>۲</sup>استادیار پاتولوژی، <sup>۳</sup>رزیدنت اورولوژی

تاریخ دریافت: ۸۵/۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۸۵/۵/۳

### خلاصه

**مقدمه:** ژن P<sub>53</sub> یک ژن سرکوب کننده تومور باشد که در ۵۰٪ تومور های انسانی دچار موتاسیون می شود. هدف این مطالعه ارزیابی ارتباط بین وضعیت پروتئین P<sub>53</sub> در بافت، سرم و ادرار بیماران مبتلا به سرطان سلول ترانزیشنال مثانه می باشد.

**روش کار:** این مطالعه توصیفی در سال ۸۵ - ۱۳۸۴ در درمانگاه بیمارستان امام رضا (ع) مشهد انجام شده است. ۳۹ بیمار که هیچ گونه شیمی درمانی و رادیوتراپی دریافت نکرده بودند و سابقه بیماریهای سیستم ایمنی نداشتند مورد مطالعه قرار گرفتند. پروتئین P<sub>53</sub> در سرم و ادرار به روش الایزا و در بافت به روش ایمونوهیستوشیمی از کلیه بیماران اندازه گیری شد. مشخصات فردی، نتایج آزمایشگاهی در پرسشنامه جمع آوری و با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی پردازش شد.

**نتایج:** پروتئین P<sub>53</sub> در بافت ۲۹ بیمار (۷۴/۴٪) وجود داشت. پروتئین P<sub>53</sub> به ترتیب در ۲۰ و ۲۷ مورد (۵۱/۳٪ و ۶۹/۲٪) از نمونه های سرم و ادرار بیماران مبتلا به تومور مثانه بافت شد. میانگین سطح سرمی و ادرار P<sub>53</sub> در بیمارانی که P<sub>53</sub> بافتی مثبت داشتند به ترتیب ۱/۴۵ U/ml و ۲/۲۷ U/ml بود که به طور قابل توجه بالاتر از میانگین سطح سرمی و ادراری P<sub>53</sub> بیمارانی بود که P<sub>53</sub> بافتی منفی داشتند. از بیست بیمار که پروتئین P<sub>53</sub> سرم آنها مثبت بود، ۱۸ بیمار (۹۰٪) پروتئین P<sub>53</sub> در بافت مثبت داشتند و تنها در دو بیمار (۱۰٪) پروتئین P<sub>53</sub> بافت منفی بود که از لحاظ آماری قابل توجه نبود. از ۱۹ بیمار که سطح سرمی P<sub>53</sub> منفی بود ۸ بیمار (۴۳٪) در بافت آنها منفی بود و ۱۱ بیمار (۵۸٪) پروتئین P<sub>53</sub> مثبت در بافت تومورال داشتند. از ۲۷ بیمار که سطح ادراری آنها از لحاظ پروتئین P<sub>53</sub> مثبت بود، ۲۵ بیمار (۹۳٪) دارای پروتئین P<sub>53</sub> مثبت در بافت و ۲ بیمار فاقد پروتئین P<sub>53</sub> در بافت تومور مثانه شان بود. از لحاظ آماری ارتباط قوی بین وجود پروتئین P<sub>53</sub> در بافت و درجه آسیب شناسی تومور وجود داشت. (p=۰/۰۵) ولی چنین ارتباطی بین وجود پروتئین P<sub>53</sub> در سرم و ادرار و درجه سرطان مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه یک ارتباط قوی بین افزایش ظهور پروتئین P<sub>53</sub> در بافت و پروتئین P<sub>53</sub> در سرم و ادرار بیماران با تومور TCC مثانه وجود داشت. بنابراین پروتئین P<sub>53</sub> هم در سرم و هم در ادرار بیماران با تومور TCC مثانه قابل تشخیص بوده و دارای دقت تشخیصی بالایی برای مشخص کردن وضعیت ژن P<sub>53</sub> در بیماران مبتلا به TCC مثانه می باشد.

**کلمات کلیدی:** ژن P<sub>53</sub>، سرطان مثانه، آنتی بادی P<sub>53</sub>، تومور مثانه، ایمونوهیستوشیمی

\* مشهد - بیمارستان امام رضا (ع) - بخش اورولوژی - نویسنده رابط

تلفن: ۸۵۴۳۰۳۱

## مقدمه

سرطان مثانه یکی از شایعترین بیماریهایی است که توسط متخصصین جراح کلیه و مجاری ادراری درمان می‌شود. بیشتر سرطانهای مثانه از نوع (TCC)<sup>۱</sup> می‌باشد. این سرطان در مردان چهارمین و در زنان هشتمین سرطان شایع است (۱). مطالعات ژنتیک مولکولی سرطانهای مثانه مشخص نموده است که ناهنجاریهای ژنهای سرکوب کننده تومور در ایجاد و پیشرفت و پیش آگهی سرطان مثانه حائز اهمیت است. یکی از این ژنهای سرکوب کننده، تومور ژن P53 می‌باشد که شایعترین ژن تغییر یافته در سرطانهای انسان است (۲). نیمه عمر پروتئین P53 طبیعی کوتاه (۲۰ تا ۶۰ دقیقه) بوده اما بعضی از موتاسیونها باعث افزایش نیمه عمر پروتئین P53 (۶ ساعت) می‌شوند (۳). پروتئین P53 موتاسیون یافته با طول عمر طولانی بر روی تولید پروتئین P53 طبیعی مکانیسم فیدبک منفی دارد (۴). تغییر ژن P53 موجب تجمع پروتئین P53 درهسته سلول می‌شود و این نوع تجمع به روش ایمونوهیستوشیمی قابل تشخیص بوده و با موتاسیون در ژن P53 همراهی دارد (۳). تشخیص افزایش ظهور پروتئین P53 به روش ایمونوهیستوشیمی در مبتلایان به TCC مثانه با درجه آسیب‌شناسی<sup>۲</sup> بالاتر تومور و پیشرفت بیماری؛ همراهی دارد (۲). تجمع پروتئین غیرطبیعی در داخل سلول با یک مکانیسم نامشخص باعث افزایش سطح پروتئین P53 در مایعات خارج سلولی مثل سرم و ادرار می‌شود (۵). در مطالعات جدید مشخص شده که تجمع P53 مایعات خارج سلولی به وسیله الیزا قابل شناسایی است. گزارشات مختلف نظرات گوناگونی را در رابطه با وجود پروتئین P53 در سرم و ادرار بیماران و ارتباط آن با افزایش ظهور پروتئین P53 نشان می‌دهند (۱۰-۵).

این مطالعه، با هدف بررسی ارتباط پروتئین P53 در سرم و ادرار و پارامترهای پاتولوژی و کلینیکی را در بیماران مبتلا به تومور مثانه انجام شده است.

## روش کار

این مطالعه توصیفی در بیماران مبتلا به TCC مثانه مراجعه کننده به کلینیکهای خصوصی و درمانگاههای بیمارستان امام رضا (ع) مشهد در سال ۱۳۸۵ - ۱۳۸۴ انجام شده است. ۳۹ بیمار مبتلا به سرطان ترانزیشنال مثانه که قبلاً تزریق داخل مثانه‌ای BCG، اشعه درمانی یا شیمی درمانی دریافت نکرده بودند و سابقه ابتلا به بیماریهای درگیر کننده سیستم ایمنی و نقص ایمنی و یا مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی را نداشتند مورد مطالعه قرار گرفتند.

نمونه آسیب‌شناسی مثانه در روند تشخیصی یا درمانی با بیوپسی و رزکسیون ترانس یورترال<sup>۳</sup> یا سیستومی<sup>۴</sup> تهیه شده است، نمونه‌ها در اتاق عمل به طور کامل در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شده و در حد امکان در عرض کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه آسیب‌شناسی ارسال شدند.

در آزمایشگاه آسیب‌شناسی، نمونه های بعدی برداشت شده را بعد از پاساژ بافتی بلوک پارافینی نموده و برشهای بافتی به ضخامت ۴ میکرومتر انجام و نمونه‌ها از نظر درجه آسیب‌شناسی به وسیله یک آسیب‌شناس بررسی شد و سپس نمونه‌ها برای انجام ایمونوهیستوشیمی با روش بیوتین آویدین ایمنوآنزیماتیک<sup>۵</sup> رنگ آمیزی شده، نمونه‌هایی که در آنها ۱۰ درصد یا بیشتر از سلولهای تومورال رنگ گرفته بودند مثبت و کمتر از ۱۰ درصد منفی تلقی شدند.

از طرف دیگر به طور همزمان با گرفتن نمونه بافتی از تمامی بیماران، یک نمونه خون محیطی (۲ سی‌سی) و یک نمونه ادرار (۲ سی‌سی) گرفته شد.

<sup>3</sup> Transurethral resection, Cold-Cup Biopsy

<sup>4</sup> Cyctectomy

<sup>5</sup> Biotin - Avidin Immunoenzymatic Technique

<sup>1</sup> Transitional cell carcinoma

<sup>2</sup> grade

**جدول ۱ - مقایسه وجود پروتئین P53 سرم با درجه آسیب‌شناسی تومور**

پروتئین P53 سرم	درجه I	درجه II	درجه III	مجموع
مثبت	۴ (۰/۴۴/۴)	۹ (۰/۶۴/۳)	۷ (۰/۴۳/۸)	۲۰
منفی	۵ (۰/۵۵/۶)	۵ (۰/۳۵/۷)	۸ (۰/۵۶/۳)	۱۹
مجموع	۹	۱۴	۱۶	۳۹

از ۲۰ بیماری که وجود پروتئین P53 در سرمشان با تست الایزا تشخیص داده شده بود، ۱۸ بیمار در آزمایش ایمونوهیستوشیمی افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال مثانه را نشان دادند به طوری که در تجزیه و تحلیل آماری یک ارتباط قوی قابل توجه بین این دو وجود داشت (جدول ۲) ( $p=0/031$ ).

**جدول ۲ - مقایسه وجود پروتئین P53 در ادرار، درجه آسیب‌شناسی تومور**

پروتئین P53 ادرار	درجه I	درجه II	درجه III	مجموع
مثبت	۵ (۰/۵۵/۶)	۹ (۰/۶۴/۳)	۱۳ (۰/۸۱/۳)	۲۷
منفی	۴ (۰/۴۴/۴)	۵ (۰/۳۵/۷)	۳ (۰/۱۸/۸)	۱۲
مجموع	۹	۱۴	۱۶	۳۹

از مجموع ۳۹ بیمار مبتلا به کانسر TCC مثانه که ادرارشان برای پروتئین P53 بررسی شد در ۲۰ بیمار وجود پروتئین P53 در ادرارشان با تست الایزا اثبات شد. در مقابل هیچ یک از افراد سالم گروه کنترل تست الایزا پروتئین P53 در ادرار مثبت نبود. پس از تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که گرچه شیوع مثبت بودن پروتئین P53 در گرید III بیشتر از گرید II و I است (جدول ۳).

پس از جدا کردن سرم این نمونه‌ها در طی نیم ساعت، سرمها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس در یک روز تمام نمونه‌ها با روش الایزا به کمک کیت مخصوص خریداری شده از شرکت مد سیستم<sup>۶</sup> از کشور اتریش و با رعایت دقیق دستورالعمل کیت، از نظر وجود پروتئین P53 آزمایش شدند.

همچنین سرم و ادرار ۶ فرد سالم بدون سابقه ابتلا به بدخیمی که از نظر سنی و جنسی با بیماران مورد مطالعه همگن بودند نیز از نظر وجود پروتئین P53 بروش الایزا به شکل مشابه با بیماران بررسی شد.

مشخصات فردی، نتایج آزمایشگاهی در پرسشنامه جمع آوری شد. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی و آزمونهای فیشر تجزیه و تحلیل گردید.

**نتایج**

از مجموع ۳۹ نمونه رنگ آمیزی شده ۲۹ نمونه (۰/۷۴/۴) از نظر افزایش ظهور پروتئین P53 مثبت بود. آزمایش مثبت ایمونوهیستوشیمی در گریدهای بالاتر تومور مثانه شایعتر بود و این تفاوت از نظر آماری قابل توجه بود ( $p=0/025$ ) (۴ نمونه در درجه I مثبت بود ۱۰ بیمار از ۱۴ بیمار گرید II و ۱۵ بیمار از ۱۶ بیمار گرید III رنگ آمیزی مثبت داشتند).

از مجموع ۳۹ بیمار مبتلا به سرطان مثانه که سرمشان برای پروتئین P53 بررسی شد در ۲۰ بیمار (۰/۵۱/۳) وجود پروتئین با تست الایزا اثبات شد. در مقابل در هیچ یک از افراد سالم گروه کنترل، تست الایزا پروتئین P53 مثبت نبود.

گرچه شیوع تست سرمی مثبت در درجات بالاتر آسیب‌شناسی بیشتر بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۱).

<sup>6</sup> bender med system

### جدول ۳- ارتباط افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال با وجود P53 در سرم

مجموع	وجود پروتئین P53 در سرم		
	-	+	
۲۹	۱۱ (۳۷/۹٪)	۱۸ (۶۲/۱٪)	ظهور پروتئین P53 در ایمونوهیستوشیمی
۱۰	۸ (۸۰٪)	۲ (۲۰٪)	-
۳۹	۱۹	۲۰	مجموع

ولی این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود. در ۲۷ بیمار از ۳۹ بیماری که پروتئین P53 در ادرارشان وجود داشت ۲۵ بیمار در بافت تومورال متانه‌شان نیز افزایش ظهور پروتئین P53 داشتند و از ۱۲ بیماری که پروتئین P53 در ادرارشان منفی بود در ۸ بیمار افزایش ظهور پروتئین در بافت تومورال متانه وجود نداشت (جدول ۴).

### جدول ۴- ارتباط افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال با وجود P53 در ادرار

مجموع	وجود پروتئین P53 در ادرار		
	-	+	
۲۹	۴ (۱۳/۸٪)	۲۵ (۸۶/۲٪)	ظهور پروتئین P53 در نمونه بافتی در آزمایش
۱۰	۸ (۸۰٪)	۲ (۲۰٪)	-
۳۹	۱۲	۲۷	مجموع

بنابراین در تجزیه و تحلیل آماری یک ارتباط قوی بین افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت و وجود P53 در ادرار وجود داشت ( $p < 0/001$ ).

میانگین سطح سرمی و ادراری P53 در بیمارانی که P53 بافتی مثبت داشتند به ترتیب  $1/78 \text{ U/ml}$  و  $2/27 \text{ U/ml}$  بود که به طور قابل توجه بالاتر از میانگین سطح سرمی و ادراری P53 بیمارانی بود که P53 بافتی منفی داشتند ( $p < 0/001$ ).

### بحث

تغییر ژن P53 در انواع زیادی از تومورهای انسانی و از آن جمله سرطان مثانه گزارش شده است و مطالعات مختلف نشان دهنده این است که موتاسیون ژن P53 یک اتفاق شایع در تومورهای مثانه بوده و با مرحله و درجه آسیب شناسی آن ارتباط دارد (۱،۲). میزان یافتن ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال مثانه در مطالعات مختلف بین ۲۹ تا ۷۸ درصد بوده است. (۵-۲) در مطالعه حاضر نیز ۷۴/۴٪ بیماران مبتلا به سرطان TCC مثانه تجمع هسته ای پروتئین P53 را در بافت تومورال به روش ایمونوهیستوشیمی نشان دادند که از این نظر با مطالعات قبلی همخوانی دارد. به نظر می رسد که تفاوت این میزانها ممکن است به علت تفاوت مراحل و درجات آسیب شناسی تومورهای بیماران مورد مطالعه و یا نحوه آماده سازی بافتها برای آزمایش و تکنیک های بازیافت آنتی ژن و در نهایت اختلاف در تعریف نمونه P53 مثبت در بافت باشد (این که حد تعریف، ۵،۱۰ یا ۲۰ درصد در نظر گرفته شود).

وجود پروتئین P53 در سرم نیز در مطالعات مختلف در حدود ۳٪ تا ۶۸/۴٪ بوده است (۸-۵). در این مطالعه نیز ۵۱/۳٪ بیماران مبتلا به TCC مثانه تست مثبت الایزا برای پروتئین P53 داشتند. همچنین وجود پروتئین P53 در ادرار بیماران با تومور TCC مثانه به روش الایزا، ۶۰٪ بوده است (۹). در مطالعه حاضر نیز ۶۹/۲ درصد بیماران مبتلا به TCC مثبت الایزا برای پروتئین P53 در ادرار داشتند که این تفاوت ممکن است به علت بالا بودن گرید آسیب شناسی تومور در بیماران تحت مطالعه ما باشد.

در مطالعات قبلی در مورد ارتباط وجود پروتئین P53 با درجه آسیب شناسی تومور نتایج متفاوتی گزارش شده بود (۹-۵). در این مطالعه از نظر آماری ارتباط معنی داری بین افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت و درجات آسیب شناسی TCC مثانه یافت شد. ولی این ارتباط بین وجود پروتئین P53 در سرم و ادرار با درجه آسیب شناسی تومور وجود نداشت.

مثبتی برای پروتئین P53 داشتند ۱۸ بیمار در آزمایش ایمونوهیستوشیمی نیز تجمع پروتئین P53 را نشان دادند ولی ۱۱ نفر از ۳۹ بیماری که افزایش ظهور P53 داشتند درخونشان پروتئین P53 یافت نشد. همچنین در مطالعه حاضر ارتباط بین وجود پروتئین P53 در ادرار بافت بیماران مبتلا به TCC مورد مطالعه قرار گرفت که از ۲۹ بیماری که در نمونه بافت تومور مثانه آنها افزایش ظهور P53 داشتند. در ۲۵ بیمار P53 در ادرار به روش الایزا اثبات شد (۸۶٪). که این ارتباط در یک مطالعه مشابه در هلند در سال ۱۹۹۹ گزارش شده بود (۹).

### نتیجه گیری

بنابراین به نظر می رسد که تست سرولوژیک P53 در سرم و ادرار برای پیشگویی ظهور پروتئین P53 در مبتلایان به TCC مثانه ارزش اخباری مثبت بالایی دارد اما در مقابل منفی شدن تست سرولوژیک رد کننده افزایش ظهور پروتئین P53 نیست بر اساس یافته های این مطالعه در بیماران مبتلا به TCC مثانه تست مثبت الایزا برای پروتئین P53 در سرم و ادرار را می توان همتراز با افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال در نظر گرفت. با توجه به ارزانی و سهولت انجام این تست در صورت مثبت شدن آن می توان از انجام آزمایش نسبتا پیچیده و پرهزینه ایمونوهیستوشیمی تا حدودی خودداری کرد.

در این مطالعه گرچه شیوع پروتئین P53 در سرم و ادرار مبتلایان به درجات بالاتر آسیب شناسی TCC مثانه بالاتر بود ولی از نظر آماری ارزش آن قابل توجه نبود. بنابراین گرچه به نظر می رسد که وجود پروتئین P53 در ادرار و سرم با درجه آسیب شناسی بالا و در نتیجه رفتارهای تهاجمی تر تومور مثانه همراهی داشته باشد ولی اثبات این فرضیه نیاز به مطالعات گسترده تری دارد.

در نهایت مهمترین هدف این مطالعه بررسی ارتباط وجود پروتئین P53 در سرم و ادرار مبتلایان به TCC مثانه با افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال بود. در مطالعه ای که در هند، در سال ۲۰۰۲ بر روی مبتلایان به تومور مثانه انجام گرفت چنین ارتباطی گزارش شده بود، بدین صورت که ۱۷ بیمار از ۱۸ بیمار که پروتئین P53 در بافت به روش ایمونوهیستوشیمی اثبات شده بود. P53 در سرمشان مثبت بود. (۵) در مطالعه دیگر در آرژانتین در آوریل ۲۰۰۶ ارتباط بین P53 در سرم و ظهور پروتئین در بیماران مبتلا به تومور مثانه ۸۳/۳٪ گزارش شد (۱۴ - ۸).

در این مطالعات همواره وجود پروتئین P53 نشانگر افزایش ظهور پروتئین P53 در بافت تومورال بود ولی عکس این موضوع صادق نبود (۵). این مطالعه نیز از این نظر با مطالعات قبلی همخوانی داشت به طوری که از ۲۰ بیماری که تست الایزا

\*\*\*\*\*

### References :

- 1- Edward, Messing EM, Gatalona W. Urothelial tumor of urinary tract. In: Walsh pc, Retick AB. **Campelle's urology** Philadelphia: WB saunders company; 2002, 76: 2733.
- 2- Adam S, Joel B. Molecular Genetics and cancer biology. In: Walsh. Pc, Retick A B. **campelle's urology**. Philadelphia: WB saunder's company; 2002, 74: 2637-8.
- 3- Levine A, Momand J, Finaly CA. the P<sub>53</sub> tumor suppressor gene. **Nature** 1991; 351: 453-6.
- 4- Fountanini G, fiore l, Bigini D, et al: levels of P<sub>53</sub> antigen in serum of non - small cell lung cancer patient.... **Int J oncol** 1994;5: 553-8.
- 5- Gopi kishore M, Arif Hamid OS, et al. The correlation of Tissue P<sub>53</sub> protein overexpression and antigen in serum of patient with bladder cancer. **Urooncology** 2002; 2(3) 121-8.
- 6- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P<sub>53</sub> mutations in human cancers. **Science** 1991; 253: 49-53.
- 7- Luo J C, Neugut A, Imforde K A, et al: Level of P<sub>53</sub> antigen in the plasma of patient with adenomas and carcinoma of the colon. **Cancer lett** 1995; (91): 235-240.

- 8- Suwa H, Ohshio G, Okada N, et al. Clinical significant of serum P<sub>53</sub> antigen in patient with pancreatic. **Gut** 1997; 49,: 647-653.
- 9- Janusz A, Indulski, Waldemar L, et al. Serum and urine P<sub>53</sub> protein in bladder cancer paitnet and in worker occupationally Eposed to gentoxic. **Cejoen** 1999; 5(1):17-25.
- 10- Lipponen P, K. Over - expression of P53 nuclear oncoprotein in transitional - cell bladder cancer and its prognostic value. **Int J cancer**1993; 53: 365-70.
- 11- Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman, et al. Accumulation of nuclear P53 and tumor progression in bladder cancer. **N. Engl. J. Med** 1994; 331: 1259-1264.
- 12- Kay E.W, Barry Walsh CJ, et al. Interobserver variation of P<sub>53</sub> immunohistochemistry - an assessment of a practical problem and comparison with other studies. **Br. J. biomed Sci** 1996; 101-7.
- 13- Christopher P, Evans MD. P53 immunodletection in urine sample successful and predictive of Bladder tumor prognession. **Br J cancer** 2005; 93: 242-7.
- 14- Balogh GA, Malio OA, et al. Mutunt P53 protein in serum could be used as a molecular marker in human cancer. **Int oncol** 2006 April; 28(4): 995-1002.

Archive of SID