

بروز آنتی ژن P53 در ملانوما پوستی و ارتباط آن با ضخامت تومور

دکتر گیتا فقیهی^۱، دکتر نرگس قانعی^۲، دکتر پروین رجیبی^۳، دکتر دینا طاهری^۴

۱- استادیار، ۲- دستیار، گروه پوست؛ ۳- استاد، ۴- استادیار، گروه آسیب شناسی؛ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

از ۱۰٪ سلولها)، متوسط (۵۰-۱۰٪) و شدید (بالای ۵۰٪) درجه بندی شد.

یافته‌ها: از ۵۰ مورد نمونه بافتی، ۲۷ مورد (۵۴٪) متعلق به بیماران زن و ۲۳ مورد (۴۶٪) متعلق به بیماران مرد بود. ۴۰٪ از نمونه‌ها منفی گزارش گردید. ۳۶٪ رنگ پذیری خفیف، ۱۴٪ رنگ پذیری متوسط و ۱۰٪ رنگ پذیری شدید را نشان دادند. محل بروز آنتی ژن بصورت منحصر به فرد در هسته سلول بود. بین جنس و گروه سنی بیمار، نوع ملانوما و ضخامت آن با درجه رنگ پذیری رابطه معنی داری بدست نیامد ($P > 0/05$).

نتیجه گیری: احتمالاً جهش در ژن سرکوب کننده تومور P53 در مراحل اولیه در ملانوما اتفاق می افتد.

واژه‌های کلیدی: ملانوما، رنگ آمیزی

ایمنو هیستوشیمی، آنتی ژن P53

فصلنامه بیماریهای پوست، بهار ۱۳۸۳؛ ۲۷: ۱۴۵-۱۵۱

مقدمه: جهش در ژن سرکوب کننده تومور P53 یکی از شایعترین تغییرات ژنتیکی در بدخیمی‌های انسانی است. شکل جهش یافته این ژن پایدار بوده و توسط روشهای ایمنو هیستوشیمی شناسایی می شود. اختلاف نظر زیادی در مورد میزان بروز این آنتی ژن در ملانوما پوستی وجود دارد.

هدف: بررسی فراوانی بروز آنتی ژن P53 در ملانوما بدخیم برحسب جنس و سن بیمار، نوع و ضخامت ملانوما و محل بروز آن در سلول.

روش اجرا: بلوکهای بافتی ۵۰ بیمار مبتلا به ملانوما (۴۵ مورد اولیه و ۵ مورد متاستاتیک) پارافین زدایی شده و با آنتی بادی منوکلونال DO-۷ رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی شدند. میزان رنگ پذیری نمونه‌ها به درجات: منفی (بدون رنگ آمیزی)، ضعیف (کمتر

مقدمه

P53 یک ژن شناخته شده سرکوب کننده تومور است که روی کروموزوم 17PB-1 قرار دارد. کمی بیش از ۵۰٪ تومورهای انسانی حاوی جهش‌های این ژن هستند (۱). پروتئین P53 یک پروتئین شدیداً فعال باغلظت فیزیولوژیک سلولی پایین است (۲). بدلیل نیمه عمر پایین (حدود ۲۰ دقیقه)، یافتن پروتئین در بافت طبیعی سخت است. افزایش

مؤلف مسئول: دکتر گیتا فقیهی - اصفهان - بیمارستان الزهرا (س)، گروه پوست، صندوق پستی ۸۹۵

دوام پروتئین در موارد جهش یافته منجر به افزایش سطح و در نتیجه ظهور بیشتر پروتئین می گردد (۳). در موارد آسیب DNA سلولی توسط اشعه ماوراء بنفش یا مواد شیمیایی، P53 بعنوان سرکوبگر فوری احضار می شود. افزایش سریع در سطح P53 و فعالیت آن و سپس رونویسی چندین ژن که واسطه عمل P53 هستند، منجر به توقف چرخه سلول و آپوپتوز (apoptosis) می گردد. لذا P53 به درستی بعنوان محافظ ژنوم لقب گرفته است. در موارد از دست دادن هموزیگوت این ژن، آسیب DNA ترمیم نشده باقی مانده

و سلول به سمت تغییر شکل بدخیمی پیش می‌رود (۱).

شکل جهش یافته این ژن در مقاومت سلولهای ملانوما نسبت به شیمی درمانی نقش عمده‌ای ایفا می‌کند (۴). اخیراً ترکیبی بنام CP-31398 ساخته شده که جایگاه اتصال به DNA را در شکل ذاتی P53 پایدار ساخته و باعث مهار رشد سلولهای سرطانی موش می‌گردد. این ترکیب همچنین بطور قابل ملاحظه‌ای آپوپتوز ایجاد شده در اثر UVB در سلولهای ملانومای انسانی را افزایش داده است (۵). با پیشرفت تکنیک‌های بیولوژی مولکولی، از این ژن در سرطان سلول مطبق سنگفرشی با هدف جایگزینی شکل ذاتی ژن با شکل جهش یافته استفاده درمانی به عمل آمده است.

ارزیابی بروز آنتی ژن P53 به روش ایمنوهیستوشیمی در تومورهای پوستی هدف بسیاری از محققین بوده است. نتایج بررسی‌ها اختلاف فاحشی (۳-۹۷٪) با هم دارند (۶، ۷). برخی اختلاف معنی‌داری بین ظهور آنتی ژن در انواع اولیه و متاستاتیک تومور پیدا کردند و این آنتی ژن را در ایجاد فنوتیپ متاستاتیک تومور دخیل دانستند، در حالیکه دیگران به نتایجی مخالف نتیجه فوق دست یافتند (۸-۱۰). برخی پیش‌آگهی بهتری را برای گروه P53 مثبت ذکر کردند و گروهی نیز با ذکر اینکه میزان مثبت شدن در تومورهای با ضخامت بالاتر بیشتر است، مثبت شدن P53 را با پیش‌آگهی بدتر مربوط دانستند (۱۱، ۱۲). لذا با توجه به وجود موارد ابهام متعدد در مورد بروز این آنتی ژن در ملانوم پوستی و اهمیت آن در آپوپتوز سلولهای تومورال و ایجاد مقاومت به داروهای شیمی درمانی، لازم دانستیم مطالعه‌ای در مورد بروز این ژن در بیماران ملانومای جامعه خود بعمل آوریم. اهداف فرعی این مطالعه شامل بررسی فراوانی نسبی بروز آنتی ژن برحسب سن، جنس، نوع بافتی ملانوما و جایگاه بروز آنتی ژن (هسته - سیتوپلاسم) و در پایان تعیین ارتباط بین ظهور P53 و ضخامت ملانوما بود.

روش اجرا

نوع مطالعه case-series بوده و بر روی ۵۰ بلوک بافتی بیمار مبتلا به ملانوما که در آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان الزهرا (س) اصفهان نگهداری می‌شد، انجام گرفته است. از بلوکهای پارافینی برشهای ۵ میکرونی تهیه شده و نمونه‌ها بر روی لام آغشته به Poly-L-Lysin به منظور جلوگیری از کنده شدن بافت قرار داده شدند. پس از مراحل deparaffinization & rehydration نمونه‌ها در محلول بافرسیترات با PH=۶ به منظور پایدار کردن آنتی ژن‌ها قرار داده شدند. این مجموعه در مایکروویو قرار گرفت تا ساختمان مولکولی آنتی ژن که به دلیل فیکساسیون تغییر شکل یافته بود بوسیله حرارت تنظیم شده بحالت طبیعی برگردد. سپس نمونه‌ها به محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) منتقل شده و جهت بلوک فعالیت پراکسیداز درون زا با هیدروژن پراکساید انکوبه گردیدند. سپس شستشو با آب مقطر و محلول PBS انجام شده و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه توسط تریپسین ۰/۱٪ در ۳۷ درجه سانتیگراد بمنظور رنگ پذیری بهتر انکوبه شدند. بعد از شستشوی نمونه‌ها با محلول PBS لام‌ها بمدت ۱۰ دقیقه در monoclonal antibody که با نسبت $\frac{1}{50}$ رقیق شده بود قرار گرفتند. آنتی بادی مورد استفاده D0-7 محصول شرکت DAKO دانمارک بود. در مرحله بعد قطره Link Ab که یک آنتی بادی بر علیه آنتی بادی اولیه است جهت افزایش حساسیت تکنیک اضافه می‌شد. مراحل بعدی با اضافه کردن قطره‌های avidin و دی - آمینوبنزیلیدین بعنوان کروموزن ادامه می‌یافت و در نهایت رنگ آمیزی زمینه‌ای با هماتوکسیلین و آبگیری و mount انجام می‌شد.

در تمام مراحل از شاهد مثبت و شاهد منفی به منظور تفسیر دقیق لام‌ها و اطمینان از صحت تکنیک رنگ آمیزی انجام شده استفاده گردید. ارزیابی نمونه‌ها با کمک دو نفر

در مجموع ۲۰ نمونه (۴۰٪) منفی گزارش گردید. از ۳۰ نمونه مثبت ۱۸ عدد رنگ پذیری خفیف (۳۶٪)، ۷ عدد رنگ پذیری متوسط (۱۴٪) و ۵ مورد رنگ پذیری شدید (۱۰٪) را نشان دادند (تصاویر شماره ۱ و ۲). توزیع فراوانی نسبی ظهور آنتی ژن در دو جنس و در گروه های مختلف سنی از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$). در تمام نمونه هایی که آنتی ژن را بروز دادند، آنتی ژن در هسته ظاهر شده و هیچ موردی از رنگ پذیری سیتوپلاسم گزارش نشد. رابطه ای بین بروز این آنتی ژن و نوع آسیب شناسی ملانوما مشاهده نشد (جدول شماره ۱).

متخصص آسیب شناسی انجام شد و درجه بندی شدت رنگ پذیری بصورت زیر به انجام رسید (۱۲):
مثبت ضعیف: رنگ پذیری مثبت در کمتر از ۱۰٪ سلولها،
مثبت متوسط: رنگ پذیری مثبت در ۵۰-۱۰٪ سلولها،
مثبت شدید: رنگ پذیری مثبت در بیش از ۵۰٪ سلولها.
جهت بررسی رابطه ظهور آنتی ژن P53 و نوع ملانوما، از بلوکهای بیماران مقاطع هماتوکسیلین و ائوزین تهیه و بصورت جداگانه بررسی و مقایسه شد. یافته ها
از ۵۰ نمونه مورد بررسی ۲۷ مورد (۵۴٪) متعلق به بیماران زن و ۲۳ مورد (۴۶٪) مربوط به بیماران مرد بود.

تصویر شماره ۱: رنگ پذیری هسته ای آنتی ژن P53 با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)

تصویر شماره ۲: رنگ پذیری هسته‌ای آنتی ژن P53 با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)

جدول شماره ۱- میزان ظهور آنتی ژن P53 در انواع مختلف آسیب شناسی ملانوما پوستی

جمع		مثبت شدید		مثبت متوسط		مثبت ضعیف		منفی		درجه رنگ پذیری نوع ملانوما
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰	۵	۲۰	۱	۲۰	۱	۴۰	۲	۲۰	۱	NM
۴۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۴	۳۰	۶	۵۰	۱۰	ALMM
۱۴	۷	۲۶/۶	۲	۰	۰	۴۲/۹	۳	۲۸/۶	۲	LMM
۲۶	۱۳	۷/۷	۱	۷/۷	۱	۴۶/۲	۶	۳۸/۵	۵	SSMM
۱۰	۵	۲۰	۱	۲۰	۱	۲۰	۱	۴۰	۲	M

NM: Nodular Melanoma
 ALMM: Acral Lentiginous Malignant Molanoma
 LMM: Lentigo Malignant Melanoma
 SSM: Superficial Spreading Malignant Melanoma
 M: Metastasis

جدول شماره ۲- فراوانی نسبی میزان ظهور آنتی ژن P53 بر حسب ضخامت ملانوما

ضخیم		نازک		ضخامت ملانوما درجه رنگ پذیری
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۴۰	۱۴	۴۰	۴	منفی
۳۷/۱	۱۳	۴۰	۴	مثبت خفیف
۱۴/۳	۵	۱۰	۱	مثبت متوسط
۸/۶	۳	۱۰	۱	مثبت شدید

بخصوص در صورتیکه نمونه‌ها در مایکروویو قرار داده شوند) در مقایسه با مواردی که با پروتئاز تماس داده شوند سنجش آنتی ژن بیشتر خواهد بود (۲). بعلاوه آنتی بادیهای مونوکلونال ضد P53 گوناگونی وجود دارند که شامل D 0-1 ، D 0-2 ، D 0-7 ، P240 ، 1801 ، CM1 می‌باشند. برخی از این آنتی بادیها نتایج غیراختصاصی در نمونه‌های پارافینه ایجاد خواهند نمود. در این مطالعه از آنتی بادی D 0-7 استفاده شده است زیرا این آنتی بادی برای بلوکهای پارافینه اختصاصی است. همچنین این آنتی بادی قادر است هم موارد وحشی (wild) و هم جهش یافته را شناسایی نماید .

در تحقیق بعمل آمده ارتباطی بین بروز آنتی ژن و سن و جنس بیمار پیدا نکردیم که این یافته مطابق با سایر مطالعات است (۱۱).

جایگاه شناسایی آنتی ژن نیز در تحقیق بعمل آمده بصورت منحصر بفرد در هسته سلولهای ملانوما بود که با نتایج برخی محققین یکسان است (۶). در مطالعه Weiss و همکارانش، آنتی ژن بصورت غالب در سیتوپلاسم سلول بروز کرده بود، در حالیکه P53 یک آنتی ژن هسته‌ای بوده و عملکرد P53 سیتوپلاسمی دقیقاً مشخص نیست. آنان چنین تصور کردند که تشکیل کمپلکس هایی بین P53 و سایر پروتئین‌های سلولی ممکن است در انتقال این پروتئین

بر اساس اندکس Breslow از ۴۵ نمونه اولیه ملانوما، ۱۰ مورد در دسته نازک (کمتر یا مساوی ۱ میلیمتر) و ۳۵ مورد در دسته ضخیم (بالای ۱ میلیمتر) قرار گرفتند. بین ضخامت ملانوما و بروز این آنتی ژن ارتباط آماری معنی‌داری بدست نیامد (جدول شماره ۲) ($P > 0.05$).

بحث

در این مطالعه فراوانی نسبی واکنش ایمنی نسبت به آنتی ژن P53، ۶۰٪ بود که اکثراً (۳۶٪) نیز موارد مثبت ضعیف را شامل می‌شد. موارد رنگ پذیر متوسط و شدید در مجموع ۲۴٪ از نمونه‌های آسیب شناسی را شامل می‌شدند. یافته‌های ما با نتایج McGregor و همکارانش که بر روی ۲۴ نمونه ملانوما پستی انجام شد مطابقت دارد (۱۳). علت محدوده وسیع (۳-۹۷٪) واکنش به آنتی ژن را در مطالعات قبلی می‌توان به چند عامل نسبت داد (۷،۶). نخست آنکه آستانه مثبت فرض نمودن در تحقیقات مختلف با هم متفاوت بوده است (۲، ۱۲). برخی محققین تنها رنگ پذیری هسته را مورد ارزیابی قرار دادند (۶) و برخی هسته و سیتوپلاسم هر دو را وارد مطالعه نمودند (۱۲، ۷، ۶، ۲). از طرفی میزان و شدت رنگ‌پذیری به تکنیک رنگ‌آمیزی نیز بستگی دارد. بسیاری از تحقیقات بعمل آمده بر روی نمونه‌های پارافینه بعمل آمده و در این مورد

آنتی ژن ممکن است یک یافته تأخیری و در رابطه با پیشرفت تومور باشد (۱۵،۸). این فرضیه با یافته‌هایی که از سرطانهای مشابه نظیر کولون بدست آمده بود مطابقت داشت (۱۶). هر چند در مورد سرطان کولون نیز اختلاف نظر وجود داشته و یافته‌هایی برخلاف مورد فوق گزارش شده است (۱۷). در این تحقیق نیز ما بدین نتیجه رسیدیم که بین ضخامت تومور یا اولیه و متاستاتیک بودن آن و بروز آنتی ژن ارتباطی وجود نداشته و بروز این آنتی ژن احتمالاً یک یافته اولیه در پاتوژنز تومور می‌باشد. در مدل‌های حیوانی نیز نقشی برای P53 در ایجاد ملانوما قائل شده‌اند (۱۸،۹).

در پایان باید ذکر کرد که هر چند بروز شدید آنتی ژن P53 در تومور ملانوما پوستی شایع نیست، نقش آن در ایجاد تومور و ایجاد مقاومت دارویی به شیمی درمانی انکار ناپذیر است (۱۸،۴).

تقدیر و تشکر

از جناب آقای دکتر محمدرضا مهاجری و سرکار خانم فرزانه محمودی که در انجام مراحل تکنیکی پژوهش ما را یاری رساندند، سپاسگزاریم.

منابع

- 1-Cotron RS, Kumar Y, Collins T. Pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders Company 1999: 290-92.
- 2-Weiss J, Heine M, Korner B, et al. Expression of P53 protein in malignant melanoma: Clinicopathological and prognostic implication. Br J Dermatol 1995; 133: 23-31.

به هسته اختلال ایجاد کرده و باعث تجمع آن در سیتوپلاسم گردد (۲).

هر چند حجم نمونه ما برای مقایسه درجه رنگ پذیری در انواع مختلف ملانوما کافی نبود، ارتباطی نیز بین بروز آنتی ژن و انواع مختلف ملانوما (اعم از اولیه یا متاستاتیک) نیافتیم. این موضوع با یافته‌های Stretch و همکارانش تطابق ندارد. آنان اختلاف معنی داری بین ظهور آنتی ژن در انواع اولیه و متاستاتیک پیدا کردند و اینگونه نتیجه گرفتند که این ژن احتمالاً در ایجاد فنوتیپ متاستازی تومور نقش ایفا می‌کند (۸). ولی یافته‌های ما تأییدی بر تحقیق Barnhill می‌باشد که در مطالعه‌ای با حجم نمونه بالاتر (۸۷ عدد)، اختلاف آماری معنی داری بین انواع اولیه و متاستاتیک تومور پیدا نکرد و پیشنهاد نمود که احتمالاً تغییر در این ژن نقش کمی در پیشرفت ملانوما دارد (۹). Zhang و همکارانش نیز که چندین مارکر را در سلول‌های ملانوما اولیه و متاستاتیک مورد تحقیق قرار دادند، نقشی برای P53 در پیشرفت تومور از فاز اولیه به متاستاتیک قائل نشدند (۱۴). Stretch و Lassam واکنش ایمنی بیشتری را در ضایعات ملانوما متاستاتیک گزارش کردند و هر دو بروز آنتی ژن را با ضخامت تومور بر اساس اندکس Breslow مرتبط دانستند. آنان نتیجه گرفتند که بروز این

- 3-Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The P53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. J Oral Pathol Med 2000; 29: 413-25.
- 4-Gang L, Jason AB, Vincent C. P53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. J Invest Dermatol 2000; 114: 514-19.

- 5-Yvonne L, Gang L. The P53- stabilizing compound CP-31398 enhances ultraviolet-B-Induced apoptosis in a human melanoma cell line MMRU. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1207-09.
- 6-Ro YS, Cooper PN, Lee JA, et al. P53 protein expression in benign and malignant skin tumours. *Br J Dermatol* 1993; 129: 739-43.
- 7- Akslen LA, Morkve O. Expression of P53 protein in cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1992; 52: 13-16.
- 8-Stretch JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, et al. Expression of mutant P53 in melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5976-79.
- 9-Barnhill RL, Castresana JS, Rubio MP, et al. P53 expression in cutaneous malignant melanoma: an immunohistochemical study of 87 cases of primary, recurrent and metastatic melanoma. *Mod Pathol* 1997; 7: 533-35.
- 10-Rhim K J, Hong SI, Hong WS, et al. Aberrant expression of P53 gene product in malignant melanoma. *J Korean Med Sci* 1994; 9: 376-81.
- 11-Loggini B, Rinaldi I, Pingitore R, et al. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanoma: P53, PCNA, Bcl.2 expression and multidrug resistance. *Tumor* 2001; 87: 179-86.
- 12-Straume O, Akslen LA. Alteration and prognostic significance of P16 and P53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 535-39.
- 13-McGregor JM, Yu C, Dublin EA, et al. P53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic nevi. *Br J Dermatol* 1993; 128: 606-611.
- 14-Zhang H, Schneider J, Rosdahl I. Expression of P16, P27, P53, P73 and N4P88 proteins in matched primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2002; 21: 43-48.
- 15-Lassam NJ, From L, Kahn HJ. Over expression of P53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2235-38.
- 16-Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, et al. Prognostic significance of cytoplasmic P53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 1369-73.
- 17-Scott N, Sagar P, Stewart J, et al. P53 in colorectal cancer: Clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1991; 63: 317-19.
- 18-Noonan FP, Dudek J, Merlino G, et al. Animal models of melanoma: An HGF/SF transgenic mouse model may facilitate experimental access to UV initiating events. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 16-25.