

مقایسه چگونگی بروز پروتئینهای P16، P21، P53، E-Cadherin و β -Catenin در آدنوکارسینوم کولورکتال و مخاط کولون غیرتوموری با استفاده از روش آرایه بافتی و ایمونوهیستوشیمی

دکتر نیلوفر سدیفی^۱، دکتر مسعود ستوده^۲، دکتر زهرا فروهش تهرانی^۳، دکتر داریوش نصراله زاده^۴

^۱ پژوهشگر، جهاد دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۲ استاد، بخش پاتولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ استادیار، بخش پاتولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۴ فلوی پژوهشی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف

آدنوکارسینوم کولورکتال یکی از شایعترین و قابل درمان ترین بدخیمیهای دستگاه گوارش است. نشان داده شده است که چگونگی بروز پروتئینهای P16، P21، P53، E-Cadherin و β -Catenin در پیش آگهی این بدخیمی مؤثر است. هدف از این مطالعه مقایسه وضعیت پروتئینهای فوق در سلولهای توموری و غیرتوموری کولون افراد مبتلا به این بدخیمی با افراد غیرمبتلا و تعیین ارتباط آن با یافته‌های میکروسکوپی تعیین کننده پیش آگهی است.

روش بررسی

از نقاط مورد نظر بلوکهای پارافینی بافت توموری و غیرتوموری ۵۸ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم و ۵۰ کولون برداشته شده به دلیل ضایعات غیرتوموری نمونه‌های سیلندری شکل به قطر ۲/۵ میلی متر تهیه شد و در دسته‌های ۳۰ تایی در بلوک آرایه بافتی قرار گرفت. برشهای حاصل به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ آمیزی و بروز پروتئینهای فوق در آنها بررسی شد.

یافته‌ها

بروز P53 در سلولهای توموری بیش از سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا و غیرمبتلا بود ($p < 0.001$) و با تهاجم عروقی تومور ارتباط مستقیم داشت ($p = 0.017$). سایر یافته‌های مهم عبارت بودند از: ارتباط بروز E-Cadherin با کاهش تمایز سلولی ($p = 0.023$) و ارتباط معکوس آن با تهاجم عروقی ($p = 0.025$)، ارتباط معکوس بروز غشایی β -Catenin با تهاجم عروقی ($p = 0.049$) و بروز بیشتر سیتوپلاسمی و هسته‌ای β -Catenin در تومور نسبت به بافتهای غیرتوموری ($p < 0.001$). بروز این پروتئین در سیتوپلاسم ارتباط معکوس با افزایش مرحله ($p = 0.013$) و در هسته ارتباط مستقیم با کاهش تمایز سلولی نشان داد ($p = 0.012$). چگونگی بروز پروتئینهای P21 و P16 با عوامل پیش آگهی ارتباط نداشت.

نتیجه‌گیری

به نظر می رسد که بررسی الگوی بروز پروتئینهای P53، E-Cadherin و β -Catenin در سلولهای توموری آدنوکارسینوم کولون که در بیوپسی از طریق کولونوسکوپی قابل انجام است، می تواند رفتار تهاجمی تومور را پیشگویی کند که ممکن است در انتخاب نوع درمان کمک کننده باشد.

کلید واژه: آدنوکارسینوم کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، P53، E-Cadherin، β -Catenin

گوارش / دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، ۲۰-۲۶

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۰/۲۱

تاریخ اصلاح نهایی: ۸۵/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲۸

زمینه و هدف

سرطان کولورکتال یک معضل عمده بهداشتی در بیشتر کشورهای جهان است. (۱)، ۹۸٪ از کلیه بدخیمی‌های روده بزرگ از نوع نویسنده مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی،

بخش پاتولوژی، کدپستی ۱۴۱۱۴

تلفن و نامبر: ۸۸۰۱۲۹۹۲

E-mail: sotoudeh@ams.ac.ir

آدنوکارسینوم است. (۲)، این بدخیمی در آمریکا فراوانترین و درمان پذیرترین سرطان دستگاه گوارش به شمار می رود. (۲ و ۳)، طبق آمارهای منتشر شده مراکز ثبت سرطان در ایران، بدخیمی‌های ناحیه روده بزرگ سومین سرطان شایع در ایران می باشند و بروز استاندارد شده آن بر اساس سن، ۸/۶ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ نفر است. (۴)

عوامل محیطی و ژنتیکی، هر دو در بیماریزایی این بدخیمی نقش دارند؛ از نظر ژنتیکی وقوع آن یک فرآیند چندمرحله‌ای و پیشرونده

آن در پیش‌آگهی و پاسخ به درمان تعیین شده است. (۲۰-۱۳)
در مطالعه حاضر که هدف آن بررسی چگونگی بیان پروتئینهای
ژنهای فوق در سرطان کولورکتال بیماران ایرانی با استفاده از روش آرایه
بافتی و ایمونوهیستوشیمی است، فراوانی بروز پروتئینهای حاصل از
این ژنها در سلولهای توموری و غیرتوموری کولون افراد مبتلا به
آدنوکارسینوم با فراوانی بروز آنها در کولون افراد غیرمبتلا مقایسه
می‌گردد و ارتباط فراوانی و الگوی بروز آنها با عوامل بافت‌شناسی
تعیین‌کننده در پیش‌آگهی تعیین می‌شود تا روشهای ساده‌تری با امکان
کاربرد بالینی، برای تشخیص و کمک به تعیین پیش‌آگهی و چگونگی
پاسخ به درمان بیماران مورد آزمایش پیشنهاد شود.

روش بررسی

مطالعه به روش مورد-شاهدی بر روی بلوکهای پارافینی تهیه‌شده از
بخش توموری کولون ۵۸ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال (به
عنوان موارد) و بخش غیرتوموری کولون همان ۵۸ بیمار (به عنوان
شاهد های نوع اول) و ۵۰ مورد کولکتومی با دلایل غیرتوموری و جدای از
بیماریهای التهابی ایدیوپاتیک روده نظیر تروما، ایسکمی و ... (به
عنوان شاهد های نوع دوم) در فاصله سالهای ۸۳-۱۳۸۰ در بیمارستان
دکتر شریعتی تهران انجام گرفت.

معیار انتخاب منطقه مناسب از نمونه‌ها برای تهیه آرایه بافتی تأیید
وجود آدنوکارسینوم کولورکتال با بررسی هیستوپاتولوژی اسلایدهای
رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین در موارد و فیکس بودن
مناسب و نداشتن خونریزی و نکروز وسیع در موارد و شاهد ها بود. برای
این کار اسلایدهای موجود بازبینی شدند و پس از نشانه‌گذاری مناطق
مورد نظر برای نمونه‌گیری روی اسلایدها و مطابقت آنها با بلوکهای
پارافینی مربوط، نمونه‌ها با ابزار ۲/۵ میلی‌متری یک‌بار مصرف پانچ
بیوپسی به صورت قطعات استوانه‌ای شکل از بلوکهای اولیه خارج
گشتند. نمونه‌های حاصل در ظرفهای جداگانه نگهداری و بر اساس
شماره پاتولوژی نشانه‌گذاری شدند.

قالبهای مورد استفاده برای تهیه آرایه بافتی شامل دو قطعه فلزی
L شکل بودند که برای جلوگیری از نشت پارافین، در کف پلیت
میکروب‌شناسی قرار گرفتند و با پارافین مایع پر شدند؛ پارافین هنگام
چیدن نمونه‌ها با حرارت ملایم چراغ الکلی، گرم نگه داشته شد تا در
زمان چیدن بافتها که مستلزم صرف زمان و دقت زیاد است به صورت نرم
و نیمه جامد باشد.

است که بخشی از آن از اختلال تنظیم تزاید در چرخه تقسیم سلولی
ناشی می‌شود. در این چرخه ژنهای مهارکننده تومور، یعنی P21، P53 و
P16، در دو مرحله G₁ و G₂ مانع از ورود سلولهای واجد DNA
آسیب‌دیده به مراحل بعدی تقسیم می‌شوند. (۲)، پروتئین حاصل از ژن
P53 سبب مهار چرخه سلولی از طریق القای سنتز P21 و نیز القای
آپوپتوز وابسته به ژن BAX می‌شود. (۲)، نوع طبیعی P53 ژنی است
که به طور طبیعی در سلول قرار دارد و دچار جهش نشده است. از آنجا که
پروتئین حاصل از این ژن نیمه عمر کوتاهی (حدود ۲۰ دقیقه) دارد،
به سرعت در سطح سلول متابولیزه می‌شود و از بین می‌رود. بنابراین با
رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بازیافت نمی‌شود و بروز آن در این
رنگ‌آمیزی معمولاً به معنای وجود جهش در همان ژنی است که سبب
افزایش نیمه عمر پروتئین محصول (حدود ۶ ساعت) می‌گردد. P21 و
P16، دو عضو خانواده مهارکننده‌های کینازی وابسته به سیکلین
(CDKs) هستند که در هسته قرار دارند و توقف چرخه سلولی را در
مرحله G₁، به ترتیب، با P53 که مهار مجموعه cyclin D-CDK4 در
فسفریله کردن ژن رتینوبلاستوم (RB) است، به عهده می‌گیرند. (۵ و ۲)
E-Cadherin گلیکوپروتئین غشایی است که اتصال بین سلولی را در
بافت‌های اپی تلیال میانجی‌گری می‌کند و جهش آن سبب افزایش
خاصیت تهاجمی سلولهای سرطانی می‌شود. (۵ و ۲)

β -Catenin پروتئین مرتبط با ژنهای APC و E-Cadherin
(adenosis polyposis coli) است که به طور طبیعی در زیر غشای
پلاسمایی سلول قرار دارد و با ورود به سیتوپلاسم و سپس به هسته،
رونیسی ژنهای محرک رشد C-myc و cyclin-D₁ را فعال می‌کند.
APC با کاهش سطح سیتوپلاسمی β -Catenin با اثرات محرک رشد
مقابل می‌کند. از طرفی عملکرد طبیعی E-Cadherin وابسته به اتصال
آن به β -Catenin است. (۵ و ۲)

تکنیک آرایه بافتی، روشی برای جمع‌آوری دهها تاصدها نمونه بافتی
استوانه‌ای شکل کوچک در یک بلوک پارافینی واحد برای آنالیز همزمان
تعداد زیادی از نمونه‌های بافتی به همراه شاهد های مربوط در شرایط
یکسان است که سبب صرفه‌جویی در زمان و منابع و کنترل بهتر نتایج
می‌شود. از این تکنیک برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین،
ایمونوهیستوشیمی*، فلوئورسنت هیبریدیزاسیون درجا**،
هیبریدیزاسیون درجا*** و واکنش پلیمرز زنجیره‌ای درجا****
استفاده شده است. (۸-۶)، تهیه بلوکهای آرایه بافتی در اغلب مطالعات با
استفاده از دستگاه مخصوص و به روش خودکار انجام شده است و
مطالعات محدودی از روش دستی برای تهیه بلوکها استفاده
کرده‌اند. (۹-۱۲)

چگونگی بروز پروتئینهای ژنهای P21، P53، P16، E-Cadherin و
 β -Catenin در مطالعات متعددی به طور جداگانه بررسی شده و نقش

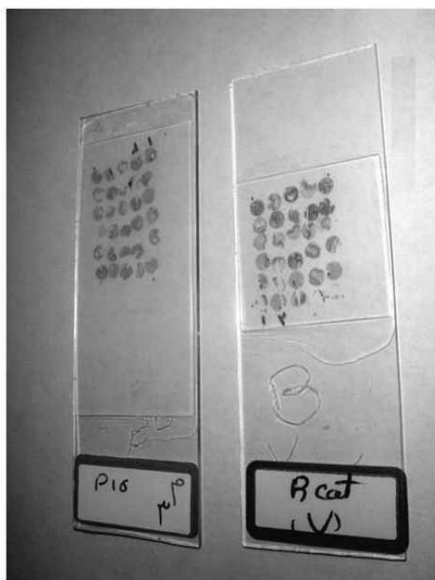
* immunohistochemistry

** flourescent insitu hybridization

*** insitu hybridization

**** insitu polymerase chain reaction

دکتر سیدی و همکاران



شکل ۲

اطلاعات ثبت گردید:

شدت رنگ پذیری: صفر = منفی، یک = مثبت خفیف، دو = مثبت متوسط و سه = مثبت شدید.

وسعت رنگ پذیری: صفر = کمتر از ۵ درصد، یک = ۲۵-۵۰ درصد، دو = ۵۰-۷۵ درصد، سه = ۷۵-۱۰۰ درصد سلولها.

نمره نهایی، نتیجه حاصل ضرب شدت دروسعت رنگ پذیری است که محدوده‌ای بین صفر تا ۱۲ دارد. نمرات صفر تا ۴ به عنوان رنگ پذیری منفی و نمرات ۵ تا ۱۲ به عنوان رنگ پذیری مثبت در نظر گرفته شدند.

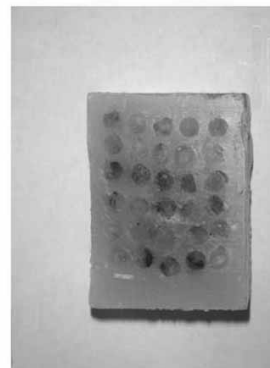
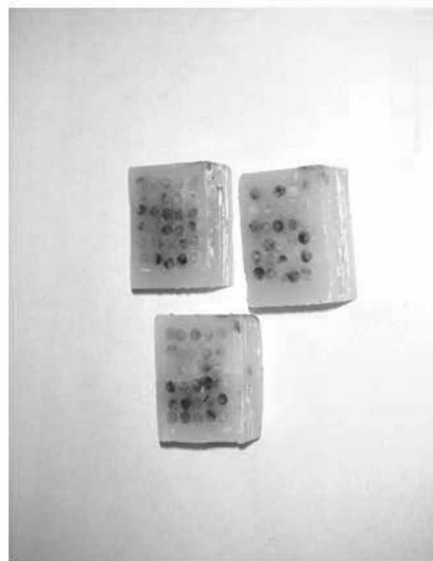
الگوهای مورد قبول برای رنگ پذیری مثبت سلولها شامل هسته برای سه شاخص P21، P16 و P53، غشای سلول برای E-Cadherin و هسته، سیتوپلاسم یا غشای سلول برای β-Catenin بود.

در برگه ورود اطلاعات، علاوه بر نتایج رنگ آمیزی برای شاخصها، جنس، سن، محل و نوع تومور (NOS)، موسینی و سلول نگین انگشتی)، grade بافت شناسی، Astler & Coller stage (به صورت دو حالت کمتر یا مساوی و بیشتر از ۳)، تهاجم عروقی و تهاجم دور عصبی برای موارد و جنس، سن و محل کولکتومی برای شاهد های نوع اول و دوم درج شد.

نتایج رنگ آمیزی پنج شاخص در سه گروه مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شدند و ارتباط رنگ پذیری سلولهای توموری با stage، grade، تهاجم عروقی، تهاجم دور عصبی و نوع تومور معین گشت. آنالیز این اطلاعات توسط نسخه ۱۰ نرم افزار آماری SPSS و بر حسب لزوم با بهره گیری از دو آزمون Fisher یا Pearson chi-square انجام گرفت.

فراوانیهای بروز شاخصهای مربوط، در مورد سن، جنس و محل

۲۷ نمونه از مورد یا شاهد ها به همراه ۳ نمونه شاهد مثبت خارجی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در هر بلوک قرار داده شد (شکل ۱). شاهد های مثبت خارجی که با مطالعه تحقیقات دیگران (۳۰-۱۳) و همچنین با استفاده از بروشور آنتی بادی های ایمونوهیستوشیمی، به طور اولیه انتخاب شده بودند، پس از تأیید توسط رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفتند؛ این موارد شامل کارسینوم سلول سنگفرشی گردن رحم برای P21، کارسینوم مهاجم مجرای پستان برای دو شاخص P53 و P16 و نیز اپی تلیوم نرمال معده یا بافت آدنوم پاراتیروئید برای دو شاخص E-Cadherin و β-Catenin بودند. پس از برش و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین، برای اطمینان از مناسب بودن بلوکها و بافتها، برشهای بیشتری جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی پنج شاخص مورد مطالعه تهیه شد (شکل ۲). نتایج پس از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی به روش استاندارد بر اساس مثبت یا منفی بودن، الگو، شدت و وسعت بروز پروتئینهای مورد مطالعه به صورت زیر طبقه بندی و در برگه ورود



شکل ۱

تومور، محاسبه و به صورت داده‌های خام ارائه شدند.

یافته‌ها

فراوانی بروز P53 در سلولهای توموری (۳۹/۷٪) به طور معنی داری بیشتر از سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال (صفر) و کولون افراد غیرمبتلا (صفر) بود (p-value < ۰/۰۰۱). فراوانی بروز P21 و P16 در گروه بیماران (به ترتیب برابر با ۳۹/۷٪ و ۱۹٪) به طور معنی داری کمتر از بروز آنها در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا (به ترتیب برابر با ۸۹/۷٪ و ۶۹٪) و کولون افراد غیرمبتلا (به ترتیب برابر با ۷۸٪ و ۵۶٪) بود (p-value < ۰/۰۰۱).

فراوانی بروز غشایی E-Cadherin و β -Catenin در سلولهای تومور نسبت به گروههای شاهد تفاوت معنی داری نداشت (p-value = ۰/۸۹۱) و به ترتیب برابر با ۶۷/۲٪ و ۹۳/۱٪ در بیماران: ۶/۵۸ و ۱۰۰٪ در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا و ۶۶٪ و ۱۰۰٪ در کولون افراد غیرمبتلا بود. فراوانی بروز سیتوپلاسمی و هسته‌ای در تومور (به ترتیب برابر با ۶۰/۳٪ و ۴۸/۳٪) به طور معنی داری بیشتر از بروز آن در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا (به ترتیب برابر با ۵/۲٪ و ۱/۷٪) و کولون افراد غیرمبتلا (به ترتیب برابر با ۲٪ و صفر) بود (p-value < ۰/۰۰۱).

بروز کلیه پروتئینهای مورد مطالعه در سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال با بروز آنها در کولون افراد غیرمبتلا تفاوت معنی داری نداشت.

فراوانی بروز P53 در سلولهای آدنوکارسینوم کولورکتال با تهاجم عروقی تومور ارتباط مستقیم داشت (۶۶/۷٪ تومورهای P53 مثبت دارای تهاجم عروقی و ۳۰/۲٪ فاقد آن بودند؛ p-value = ۰/۰۱۷).

فراوانی بروز P21 و P16 با هیچ کدام از فاکتورهای تعیین کننده پیش آگهی ارتباط معنی دار نداشت.

بروز غشایی E-Cadherin، ارتباط مستقیم با کاهش تمایز سلولی (فراوانی بروز در gradeهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۸۴٪، ۵۸/۶٪ و ۲۵٪) بود؛ (p-value = ۰/۰۲۳) و ارتباط معکوس با احتمال تهاجم عروقی داشت (۴۰٪ از تومورهای E-Cadherin مثبت دارای تهاجم عروقی و ۷۶/۷٪ فاقد آن بودند؛ p-value = ۰/۰۲۵).

بروز غشایی β -Catenin با احتمال تهاجم عروقی نسبت معکوس داشت (۸۰٪ تومورهای β -Catenin مثبت دارای تهاجم عروقی و ۹۷/۷٪ فاقد آن بودند؛ p-value = ۰/۰۴۹). بروز سیتوپلاسمی این پروتئین ارتباط معکوس با افزایش stage داشت (فراوانی بروز سیتوپلاسمی β -Catenin در stageهای کمتر یا مساوی ۳ برابر با ۷۳٪ و در stageهای بیشتر از ۳ برابر با ۳۸/۱٪ بود؛ p-value = ۰/۰۱۳)، در صورتی که بروز هسته‌ای آن با کاهش تمایز سلولی ارتباط مستقیم نشان داد (فراوانی بروز هسته‌ای در gradeهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۶۸٪، ۳۷/۹٪ و صفر بود؛ p-value = ۰/۰۱۲).

خلاصه ارتباط بروز پروتئینها با عوامل تعیین کننده پیش آگهی در جدولهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: درصد بروز پروتئینهای مختلف در ارتباط با عوامل تعیین کننده پیش آگهی

عوامل تعیین کننده پیش آگهی													
نوع پروتئین مورد مطالعه (موارد مثبت در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی)	مرحله پیشرفت (stage)	درجه تمایز (grade)			تهاجم عروقی		تهاجم دور عصبی		نوع تومور				
		خوب	متوسط	بد	وجود دارد	وجود ندارد	وجود دارد	وجود ندارد	*NOS	موسینوس	حلقه انگشتی		
P53	≤ ۳	۳۸/۱	۴۰/۵	۳۲	۴۸/۳	۲۵	۶۶/۷	۳۰/۲	۳۷/۵	۴۰	۴۱/۲	۴۰	۰
P21	≤ ۳	۴۲/۹	۳۷/۸	۳۲	۴۱/۴	۲۵	۴۶/۵	۲۰	۴۶/۵	۵۰	۳۹/۲	۴۰	۵۰
P16	≤ ۳	۱۴/۳	۲۱/۶	۲۰	۱۳/۸	۵۰	۱۳/۳	۲۰/۹	۱۲/۵	۲۰	۱۷/۶	۴۰	۰
E-Cadherin	≤ ۳	۶۶/۷	۶۷/۶	۸۴	۵۸/۶	۲۵	۷۶/۷	۴۰	۷۶/۷	۵۰	۷۰/۶	۶۰	۰
روی غشاء سلولی	≤ ۳	۸۵/۷	۹۷/۳	۹۲	۹۳/۱	۱۰۰	۹۷/۷	۸۰	۹۷/۷	۱۰۰	۹۴/۱	۹۲	۵۰
β -Catenin سیتوپلاسمی	≤ ۳	۳۸/۱	۷۳	۶۴	۶۵/۵	۰	۶۲/۸	۵۳/۳	۶۲/۵	۶۰	۶۲/۷	۶۰	۰
درون هسته‌ای	≤ ۳	۳۸/۱	۵۴/۱	۶۸	۳۷/۹	۰	۴۶/۵	۵۳/۳	۴۶/۵	۵۰	۵۱	۴۸	۵۰

*NOS= Not otherwise specified

جدول ۲: خلاصه ارتباط بروز پروتئینهای مختلف با عوامل تعیین کننده پیش آگهی*

پروتئین مورد مطالعه	مرحله پیشرفت	درجه تمایز	تهاجم عروقی	تهاجم دور عصبی	نوع تومور
P53	۱	۰/۳۹۲	۰/۰۱۷ ارتباط مستقیم	۱	۰/۵۰۶
P21	۰/۷۸۳	۰/۲۵۵	۰/۱۲۴	۰/۷۰۰	۰/۹۵۴
P16	۰/۷۲۹	۰/۲۲۰	۰/۷۱۰	۱	۰/۳۷۴
E-Cadherin	۱	۰/۰۲۵ ارتباط معکوس	۰/۰۲۳ ارتباط معکوس	۰/۴۱۸	۰/۱۰۶
روی غشاء سلولی	۰/۱۳۰	۰/۸۴۲	۰/۰۴۹ ارتباط معکوس	۱	۰/۰۴۴
β -Catenin سیتوپلاسمی	ارتباط معکوس ۰/۰۱۳	۰/۰۳۸	۰/۵۵۳	۱	۰/۲۰۵
درون هسته‌ای	۰/۲۸۴	۰/۰۱۲ ارتباط معکوس	۰/۷۶۷	۱	۰/۴۱۶

* اعداد ذکر شده برابر با p-value محاسبه شده می باشند.

بحث

آدنوکارسینوم کولورکتال شایعترین و درمان پذیرترین سرطان دستگاه گوارش است. (۱ و ۲)، عوامل محیطی و ژنتیکی، هر دو در بیماریزایی آن نقش دارند. (۲)، از نظر ژنتیکی وقوع این بدخیمی چندمرحله‌ای و پیشرونده است که بخشی از آن از اختلال در تنظیم چرخه تقسیم سلولی منشأ می‌گیرد. ورود سلول از مرحله G_0 به G_1 و سپس به S در کنترل ژنهای متعددی از جمله سرکوبکننده‌های توموری P53، P21 و P16 است. (۲)

چسبندگی بین سلولی در بافتهای اپی تلیال توسط پروتئین غشایی E-Cadherin تأمین می‌شود و علاوه بر ایفای نقش در افزایش تحریک تقسیم سلولی، واسطه عملکرد Cadherin نیز است. (۲ و ۵)

مطالعات متعددی به طور جداگانه روی این پروتئینهای کلیدی مرتبط با چرخه سلولی انجام شده که نشانگر ارتباط چگونگی بروز آنها با پیش آگهی و چگونگی پاسخگویی به درمان در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال بوده‌اند. (۳۰-۱۳)

در مطالعه حاضر تلاش شد با رفع مشکلات تکنیکی روش دستی آرایه بافتی (manual tissue array) و ایمونوهیستوشیمی، فراوانی بروز P53، P21، P16، E-Cadherin و β -Catenin در سلولهای توموری و غیرتوموری کولون بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال با بروز آنها در کولون افراد غیرمبتلا مقایسه شود و ارتباط فراوانی و چگونگی بروز

این شاخصها با فاکتورهای بافت‌شناسی مؤثر بر پیش آگهی نیز تعیین گردد. مشکلات تکنیکی آرایه بافتی و روش به‌کارگرفته شده برای رفع آنها به شرح زیر است:

انتخاب محل پانچ در بلوک پارافینی برای استخراج نمونه‌ها باید با دقت صورت بگیرد و حتی المقدور از مکانهای دارای بافت چربی استفاده نشود، در غیر این صورت برش بلوکها دچار مشکل می‌شود و احتمال کنده شدن بافت هنگام کار از روی لام وجود دارد. نمونه‌های بافتی استوانه‌ای کوچک باید در قالب آرایه بافتی در یک سطح قرار بگیرند که مستلزم صرف زمان و دقت بسیار است. استفاده از بلوکهای پارافینی از پیش آماده شده که حفره‌های جایگاه نمونه‌ها توسط پانچ در آنها تعبیه شده بودند به دلیل ترک خوردن بلوک حین چیدن نمونه‌ها در روش دستی امکان پذیر نشد. آنتی‌بادی مورد استفاده در روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی باید تمام سطح لام را بپوشاند.

مزایای روش آرایه بافتی حفظ خصوصیات مورفولوژیک بافت و قابلیت استفاده از آن در روشهای رنگ‌آمیزی مانند هماتوکسیلین و اتوزین، ایمونوهیستوشیمی و همچنین امکان مطالعات مختلف مولکولی روی بافت است. این روش صرفه جویی در زمان، هزینه و مواد مصرفی را به دنبال دارد و امکان مقایسه بهتر نتایج را با یکدیگر و بافتهای شاهد فراهم می‌آورد و به دلیل مقرون به صرفه بودن به انجام تحقیقات آینده کمک خواهد نمود.

در مطالعه حاضر افزایش بروز P53، کاهش بروز P21 و P16 و

سلول در سلولهای آدنوکارسینوم کولورکتال بیش از سلولهای غیرتوموری مشاهده شد و با افزایش خاصیت تهاجمی تومور همراه بود که با نتایج مطالعه ما مشابهت داشت. در دو تحقیق اسلونکوا***** و همکارانش در ۲۰۰۱ در چک (۲۹) و جیسوس***** و همکارانش در ۲۰۰۵ در برزیل (۳۰) بروز E-Cadherin ارتباطی با پیش آگهی نشان نداد که این نتیجه مغایر با مطالعه ما بود.

نتیجه گیری

می توان چنین گفت که بررسی چگونگی بروز پروتئین حاصل از ژنهای P53، E-Cadherin و β -Catenin با استفاده از روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در نمونه های کوچک بیوپسی فیکس شده در فرمالین می تواند قبل از عمل جراحی ماهیت تهاجمی تومور، احتمال وجود متاستازهای عروقی-لنفوی و چگونگی پاسخگویی به درمان را پیشگویی نماید و اطلاعات جامعتری را برای انتخاب بهترین روشهای درمانی در اختیار متخصصان جراحی، دستگاه گوارش و انکولوژی قرار دهد.

سیاسگزارى

این مقاله نتیجه پایان نامه تخصصی خانم دکتر نیلوفر صدیقی و طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمان تهران به شماره قرارداد ۱۳۲/۱۱۱۶۰ مورخ ۸۴/۱۲/۲۰ است. بدین وسیله از سرکار خانم سیده پری سیما عظیمی کارشناس واحد ایمونوهیستوشیمی بخش پاتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی که زحمت رنگ آمیزی بافتها را در این مطالعه متقبل شدند، قدردانی می نمایم.

جابه جایی بروز پروتئین β -Catenin از غشای سلولی به سیتوپلاسم و هسته سلول در سلولهای آدنوکارسینوم کولورکتال بیش از افراد غیرمبتلا مشاهده شد؛ اما بروز این پروتئینها در سلولهای پوششی غیربدخیم فرارگرفته در مجاورت بافت توموری افراد مبتلا به سرطان با سلولهای پوششی کولون افرادی که به آدنوکارسینوم کولون مبتلا نبودند، تفاوت معنی داری نداشت. بروز غشایی E-Cadherin و β -Catenin هر سه گروه تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند و بدین علت نمی توان هیچ یک از شاخصهای فوق را به عنوان شاخص تشخیص دهنده ابتدایی سرطان کولون در نظر گرفت.

در مقایسه با stageهای پایین تر، در stageهای بالاتر تومور کاهش بروز سیتوپلاسمی β -Catenin مشاهده شد؛ کاهش تمایز میکروسکوپی سلول با کاهش بروز غشایی E-Cadherin و کاهش بروز هسته ای β -Catenin همراه بود. تهاجم عروقی تومور با افزایش بروز P53 و کاهش بروز غشایی E-Cadherin و β -Catenin همراهی داشت. تهاجم دور عصبی تومور با هیچ کدام از شاخصهای فوق ارتباط معنی داری را نشان نداد.

در مطالعه والاسیادو* و همکارانش در سال ۱۹۹۷ (۱۸) و نیز مطالعه گوسسیا** و همکارانش در ۲۰۰۰ (۱۹) در یونان تومورهای P53 مثبت با احتمال کمتر متاستاز لنفوی و خصوصیات تهاجمی کمتری همراه بودند که با مطالعه ما مغایرت داشت. در تحقیق هیرویکوسکی*** و همکارانش در ۱۹۹۹ در فنلاند (۲۰) و نیز در مطالعه کولین**** و همکارانش در ۲۰۰۵ در انگلستان (۲۱) جهش یا افزایش بروز P53 ارتباطی با پیش آگهی نداشت. در مطالعه دیز***** و همکارانش در ۲۰۰۵ در اسپانیا (۲۲) همراهی افزایش بروز P53 با افزایش عود فقط در ۳ stage Duck مشاهده شد. میتومی***** و همکارانش در ۲۰۰۵ در ژاپن (۲۳) نشان دادند که کاهش بروز P21 با افزایش درگیری لنفوی و کبد همراه است. در تحقیق یاسویی***** و همکارانش در ۱۹۹۷ در ژاپن (۲۴) نیز کاهش بروز P21 با تهاجم عمیقتر تومور به لایه عضلانی و بالاتر stage همراهی داشت. تادا***** و همکارانش در ۲۰۰۳ در ژاپن (۲۵) نشان دادند که متاستاز لنفوی در تومورهای دارای کاهش بروز P16 دیده می شود. در مطالعه ما میزان بروز P21 و P16 در سلولهای توموری نسبت به سلولهای غیرتوموری کولون افراد مبتلا و کولون غیرمبتلایان کاهش نشان داد؛ اما ارتباطی با پیش آگهی نداشت. در مطالعات هرتر***** و همکارانش در ۱۹۹۹ در آلمان و اوتسونومیا***** و همکارانش در ۲۰۰۱ در ژاپن (۲۷) و دلکتورسکایا***** و همکارانش در ۲۰۰۵ در مسکو (۲۸) انتقال بروز پروتئین β -Catenin از غشای سلولی به سیتوپلاسم و هسته

* Valassiadu

** Goussia

*** Hirvikoski

**** Colin

***** Diez

***** Mitomi

***** Yasui

***** Tada

***** Herter

***** Utsunomiya

***** Delektorskaya

***** Sloncova

***** Jesus

References

1. Haskell CM .Colorectal cancer Natural history, diagnosis and staging. In: Haskell CM. Cancer Treatment. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. page 703-5.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Neoplasia Chen L, James M. The gastrointestinal tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 7th ed. Philadelphia: *Elsevier Saunders*; 2005. p. 859-68.
3. Rosai J. Gastrointestinal tract. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's Surgical pathology. 9th ed. Edinburg: *Mosby*; 2004. p. 799-821.
4. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraei M, Sotoudeh M, *et al.* Cancer occurrence in Ardabil: Result of a population-based cancer registry from Iran. *Int J Cancer* 2003; 107: 113-8.
5. Sherbet GV, Lakshmi MS. The Genetics of Cancer, Genes Associated With Cancer Invasion, Metastasis and Cell Proliferation. 1st ed. San Diego: *Academic Press*; 1997. p. 29-31, 66-7, 77, 103-6, 174, 204-5.
6. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7.
7. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified... tissue microarray technology. *Mol pathol* 2003; 56: 198-204.
8. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, *et al.* Validation of microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimen using the examples of human fibroblastic tumor. *Am J Pathol* 2001; 158: 1245-51.
9. Wang L, Deavers MT, Deavers MT, Malpica A, Silva EG, Liu J. Tissue microarray: a simple and cost effective method for high- throughput studies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 174-6.
10. Pan CC, Chen PC, Chiang H. An easy method for manual construction of high-density tissue arrays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 370-2.
11. Hidalgo A, Pina P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M. A simple method for construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol* 2003; 56: 144-6.
12. Wang SL, Yang CH, Chen HH, Chai CY. A Simple and economic method for the manual construction of well-aligned tissue arrays. *Pathol Res Pract* 2006 22; [Epub ahead of print].
13. Mackay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Murray GI, Cassidy J, *et al.* Protein expression and gene ploymorphism in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000; 88: 77-81.
14. Liang Z, Liu F, Luo Y. Detection of the expression of p21, p53, p185 proteins and the mutation of ras, p53 genes in colorectal adenoma and carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1995; 24: 352-5.
15. Diez M, Medrano M, Muguerza JM, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, *et al.* Influence of tumor localization on the prognostic value of p53 protein in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2000; 20: 3907-12.
16. Shu M, Liu S, Yu P. Expression and significance of p53, C-erb B2, CEA proteins in colorectal adenoma and carcinoma. *Hunan Yi ke Da Xue Bao* 1998; 23: 129-32.
17. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, *et al.* Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchow Arch* 2003; 443: 115-21.
18. Valassiadou KE, Stefanaki K, Tzardi M, Datsaris G, Geosgoulias V, Melissas J, *et al.* Immunohistochemical expression of p53, Bcl2, mdm2 and Waf1/p21 proteins in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 1997; 17: 2571-6.
19. Goussia AC, Ioachim E, Agnantis NJ, Mahera M, Tsanos EV. Bcl2 expression in colorectal tumours Correlation with p53, mdm2, Rb, proteins and proliferation indices. *Histol Hisopathol* 2000; 15: 667-72.
20. Hirvikoski P, Auvinen A, Servomma K, Kiuru A, Rytomma T, Makkonen K, *et al.* K-ras and p53 mutations and overexpression as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 685-91.
21. Colin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, P53 and APC mutations in Colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54: 1283-6.
22. Diez M, Pollan M, Ramos P, Villeta R, Ratia T, Hernandez P, *et al.* Variation in the prognostic value of P53 protein in relation to tumoral stage in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cir Esp* 2005; 77: 213-20.
23. Mitomi H, Mori A, Kanazawa H, Nishiyama Y, Ihara A, Otani Y, *et al.* Venous invasion and down-regulation of P21 (WAF1/CIP) are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1421-6.
24. Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, Semba S, Kudo Y, Shimamoto F, *et al.* Expression of p21 Waf1/Cip1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression. *Pathol Int* 1997; 47: 470-7.
25. Tada T, Watanabe T, Kazana S, Kanazawa T, Hata K, Komuro Y, *et al.* Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1756-60.
26. Herter P, Kuhnen C, Muller KM, Wittinghofer A, Muller O. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and peutz-jeghers polyps. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 125: 297-304.
27. Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, Shiozaki H, Yano M, Sekimoto M, *et al.* Correlation of beta-catenin and Cyclin D1 expression in colon cancers. *Oncology* 2001; 61: 226-33.
28. Declektorskava VV, Perevoshchikov AG, Golovkov DA, Kushlinskii NE. Expression of E-cadherin, beta-catenin, and CD-44V6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139: 706-10.
29. Sloncova E, Fric P, Kucerova D, Lojda Z, Tuhackova Z, Sovova V. Changes of E-Cadherin and beta-catenin in human and mouse intestinal tumours. *Histochem J* 2001; 33: 13-7.
30. Jesus EC, Matos D, Artigiani R, Watzberg AF, Goldenberg A, Saad SS. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and adherins. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 422-7.

Comparison of the Expression of P53, P21, P16, E-Cadherin and β -Catenin Proteins in Colorectal Adenocarcinoma and the Non-tumoral Colonic Mucosa by Immunohistochemistry and Tissue Array Techniques

ABSTRACT

Background: Colorectal adenocarcinoma is one of the most prevalent and treatable malignancies of the gastrointestinal tract. Pattern of expression of the P53, P21, P16, E-cadherin and β -Catenin proteins are shown to be related to the prognosis of this malignancy. We aimed to compare the pattern of expression of these proteins in tumoral and non-tumoral mucosal cells of cancer and on-cancer patients in relation to the histological prognostic factors.

Materials and Methods: 2.5 millimeter cylindrical cores were punched out from selected tumoral and non-tumoral areas of the paraffin blocks of 58 colorectal cancer patients and colonic mucosa of 50 colons removed for other reasons. The samples were arrayed in paraffin blocks in groups of 30. Histological sections were evaluated for the expression of the target proteins by immunohistochemical techniques.

Results: P53 was expressed more in tumoral than non-tumoral mucosal cells of the cancer and non-cancer patients ($p < 0.001$) and was related to vascular invasion ($p = 0.017$). Expression of E-Cadherin was related to poor differentiation ($p = 0.023$) and inversely to vascular invasion ($p = 0.025$). Membranous expression of β -Catenin was inversely related to vascular invasion ($p = 0.049$). Cytoplasmic and nuclear expression of this protein was more in tumor cells ($p < 0.001$). Also, the cytoplasmic expression of β -Catenin was inversely related to the stage ($p = 0.013$) whereas nuclear expression was related to poor differentiation. ($p = 0.012$). The pattern of expression of P21 and P16 were not found to have any relation with the histological prognostic factors.

Conclusion: It seems that the determination of the pattern of expression of P53, E-Cadherin and β -Catenin in colorectal adenocarcinoma, which is applicable on colonoscopic biopsies, could predict the biological aggressiveness of the tumor which might have therapeutic implications. *Govaresh/* Vol. 12, No. 1, Spring 2007; 20-26

Keywords: Colorectal adenocarcinoma, Immunohistochemistry, P53, E-Cadherin, β -catenin

Sodeifi N

Jahad Daneshgahi, Iran
University of Medical Sciences

Sotoudeh M

Department of Pathology,
Shariati Hospital, Tehran
University of Medical Sciences

Foroheshe Tehrani Z

Department of Pathology,
Shariati Hospital, Tehran
University of Medical Sciences

Nasrollahzadeh D

Digestive Diseases Research
Center, Tehran University of
Medical Sciences

Corresponding Author:

Masoud Sotoudeh M.D.,
Department of Pathology,
Shariati Hospital, Karger-e-
Shomali Ave., Tehran, 14114,
Iran.

Telefax: +98 21 88012992
E-mail: sotoudeh@ams.ac.ir