

سنجش فراوانی بیان پروتیین‌های p53، Ki67، CD99 و Fli-1 در بلوک‌های پاتولوژی یوونینگ سارکوما

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: یوونینگ سارکوما یکی از بدخیم‌ترین تومورهای کودکان و نوجوانان است. خانواده این نوع تومور از سه گروه یوونینگ سارکوما استخوانی، یوونینگ سارکوما خارج استخوانی و تومورهای نورواکتودرمال اولیه محیطی (pPNET) تشکیل شده است. مطالعات اندکی، بیولوژی مولکولی این گروه از تومورها را بررسی نموده‌اند. بنابراین جهت بسط مطالعات قبل بیان پروتیین‌های p53، Ki67، Fli-1 و CD99 در بلوک‌های پارافینی ۱۵ بیمار ایرانی یوونینگ سارکوما بررسی شد. همبستگی بین بیان پروتیین‌ها Fli-1، Ki67 و p53 با یکدیگر و هم‌چنین با سن، جنس و طول عمر بیماران بررسی شد. **روش بررسی:** بیان پروتیین‌های مورد نظر در ۱۵ نمونه توموری از تومورهای خانواده یوونینگ سارکوما فیکس شده در فرمالین و قالب‌گیری شده در پارافین با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. برش‌های رنگ‌آمیزی شده با توجه به درصد سلول‌های توموری رنگ‌شده طبقه‌بندی شدند. **یافته‌ها:** نتایج بیان غشایی پروتیین CD99 را در ۱۰۰ درصد بافت‌های توموری نشان داد. بیان پروتیین Fli-1 در هسته سلول‌های توموری در ۸۶/۷ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد. بیان افزایش یافته پروتیین p53 در هسته سلول‌های توموری در ۵۳/۳ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد. بیان افزایش یافته پروتیین Ki67 در ۶۰ درصد از بافت‌های توموری دیده شد. همبستگی آماری معنی‌دار بین بیان پروتیین‌های p53، Ki67 و Fli-1 با سن، جنس و طول عمر بیماران اثبات نشد. همبستگی آماری معنی‌دار بین بیان پروتیین‌های p53 و Ki67 مشاهده شد ($P=0/003$). **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه بر نقش پروتیین‌های p53 و Ki67 در ایجاد و پیشرفت این گروه از تومورها تاکید می‌کند. هم‌چنین نتایج رنگ‌آمیزی هم‌زمان ایمونوهیستوشیمی پروتیین‌های Fli-1 و CD99 را جهت تشخیص یوونینگ سارکوما پیشنهاد می‌کند.

کلمات کلیدی: یوونینگ سارکوما، p53، Ki67، CD99، Fli-1، ایمونوهیستوشیمی.

زهرا باقری حسین آبادی^۱
سعید رجبعلیان^{۲*}
بهجت کلانتری خاندانی^۳
فاطمه پویا^۴، مسعود صالح مقدم^۱
بتول معتمدی^۴

۱- گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد، مشهد، ایران.
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
۳- گروه آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
۴- گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

* نویسنده مسئول: کرمان، چهار راه سمیه، خیابان ابن سینا، مرکز تحقیقات علوم اعصاب
تلفن: ۰۳۴۱-۲۲۶۴۱۹۶

email: srajabalian@yahoo.com

مقدمه

معرفی می‌کند. منشا تومورهای یوونینگ سارکوما، بقایای سلولی ستیغ عصبی جنینی عنوان شده است. رشد سریع و توانایی متاستاز به دیگر نواحی از جمله ریه، مغز استخوان و استخوان از مشخصات بارز این تومورهاست. حدود ۸۵ درصد از تومورهای خانواده یوونینگ سارکوما از استخوان و ۱۵ درصد از بافت نرم منشا می‌گیرند.^{۱-۴} امروزه ترکیبی از جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی برای درمان یوونینگ سارکوما تجویز می‌شود. علی‌رغم به‌کارگیری روش‌های فوق، شانس زنده ماندن افراد مبتلا کمتر از سه سال گزارش شده است.^۵ اطلاعات اندک از عوامل سلولی و مولکولی درگیر در ایجاد، پیشرفت، پاسخ به درمان‌های رایج یکی از دلایل اساسی عدم درمان مناسب بیماری است. پروتیین هسته‌ای p53 القاء‌کننده آپوپتوز و مهار

یوونینگ سارکوما (Ewing sarcoma) توده‌های بسیار بدخیم هستند که اغلب در کودکان و جوانان مشاهده می‌شوند. درصد شیوع این تومورها، سالانه دو تا سه مورد در یک میلیون نفر گزارش شده است. خانواده تومورهای یوونینگ سارکوما به سه گروه، یوونینگ سارکوما استخوانی، خارج استخوانی و تومورهای نورواکتودرمال اولیه محیطی (Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor (pPNET) تقسیم می‌شوند. تومورهای این خانواده تنها از نظر درجه تمایز نورونی از یکدیگر متمایز می‌شوند و ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی آن‌ها یکسان می‌باشد. بررسی پاتولوژیکی یوونینگ سارکوما را تومورهای با سلول‌های گرد، کوچک و تمایز نیافته

کننده تکثیر سلول در حالت طبیعی است. موتاسیون ژن p53 در بسیاری از تومورها گزارش شده است. تغییرات پروتیین p53 از دلایل پیشرفت و مقاومت تومور به شیمی‌درمانی محسوب می‌شود.^{۷-۱۰} پروتیین هسته‌ای Ki67 با وزن مولکولی ۳۴۵ تا ۳۹۵ کیلو دالتون به‌عنوان نمادی از توانایی تکثیر سلول شناخته شده است. افزایش Ki67 در انواع تومورها گزارش شده است.^{۱۱} پروتیین فیوژن EWS/FLI-1 از الحاق ژن EWS، مستقر بر روی کروموزوم ۲۲ و ژن FLI-1، مستقر بر روی کروموزوم ۱۱ ایجاد می‌شود و نقش مهمی در تومورزایی و تشخیص یوئینگ سارکوما ایفا می‌کند. جابه‌جایی در کروموزوم‌های شماره ۱۱ و ۲۲ به‌صورت (q24, q12) (t(11,22) در بیش از ۸۵٪ موارد تومورهای یوئینگ سارکوما مشاهده شده است.^{۱۲} حضور گلیکوپروتیین غشایی CD99 در ۹۰-۸۵٪ تومورهای یوئینگ سارکوما گزارش شده است که در حال حاضر شاخص اصلی تشخیص پاتولوژیک این تومورها محسوب می‌شود.^{۱۳، ۱۴} مطالعات اندکی پیرامون بررسی بیولوژی تومورهای یوئینگ سارکوما انجام شده است. هم‌چنین بیولوژی یوئینگ سارکوما در ایران تاکنون مطالعه و مقایسه نشده است. مطالعه حاضر به بررسی الگوی بیان پروتیین‌های p53، Ki67، Fli-1 و CD99 در ۱۵ عدد بلوک پارافینی یوئینگ سارکوما با روش ایمونوهیستوشیمی می‌پردازد. هم‌چنین آنالیز آماری همبستگی بیان پروتیین‌های Fli-1، p53، Ki67 با یکدیگر و هم‌چنین با طول عمر، سن و جنس بیمار انجام خواهد شد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی، ۱۵ بلوک یوئینگ سارکوما مربوط به سال‌های ۸۸-۱۳۸۰ از بخش‌های آسیب‌شناسی بیمارستان‌های سطح شهر کرمان جمع‌آوری شد. از مجموع ۱۵ بیمار، ۱۱ بیمار مرد (۷۳٪) و چهار بیمار زن (۲۷٪) بودند. محدوده سنی بیماران ۵۸-۱۳ سال و میانگین سنی آن‌ها ۲۵ سال بود. شیمی‌درمانی سه بیمار با رژیم استاندارد VAC-IME (وین‌کریستین، آدریامایسین، سیکلوفسفامید، ای‌فسفامید، مسنا و اتوپوزاید) و ۱۰ بیمار با رژیم EVAIA (اتوپوزاید، وین‌کریستین، دوکسوروبیسین، ای‌فسفامید و اکتینومایسین) انجام شده است. در مورد دو بیمار نیز اطلاعات شیمی‌درمانی ناقص است. اطلاعات بالینی بیماران در جدول ۱ درج شده است. آزمون ایمونوهیستوشیمی (IHC): حضور پروتیین‌های Ki67، p53

Fli-1 و CD99 در بلوک‌های پارافینی با روش IHC بررسی شد. IHC با روش برش‌های شناور شده در محیط (Free-floating section method) که اخیراً توضیح شده است انجام شد.^{۱۴} این روش در مقایسه با روش متداول IHC (چسباندن برش‌های بافتی بر روی لام) دارای مزایای مصرف کم‌تر مواد و نفوذ بهتر آنتی‌بادی به درون بافت (به‌دلیل شناور بودن برش‌ها) است. ابتدا از بلوک‌های پارافینی برش‌هایی به ضخامت ۱۰ میکرون تهیه (از هر نمونه ۲۰-۱۵ برش) شد و به لوله‌های شیشه‌ای منتقل گردید. سپس برش‌ها سه مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه توسط زایلین پارافین‌زدایی شدند. در مرحله بعد برش‌ها دو مرتبه و هر بار به‌مدت پنج دقیقه به‌وسیله اتانول مطلق آب‌گیری شدند. پس از تخلیه اتانول، به لوله‌ها بافر EDTA (یک میلی‌مولار) / TRIS (۱۰ میلی‌مولار) با pH=۸، با دمای °C ۸۵ اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت نیم ساعت در حمام آب گرم با درجه حرارت °C ۸۵ قرار داده شدند. پس از تخلیه بافر به‌منظور از بین بردن فعالیت پراکسیداز آندوژن برش‌ها با محلول متانول / استون (۵۰٪/۵۰٪) سرد حاوی سه درصد پراکسید هیدروژن به‌مدت ۳۰ دقیقه مجاور شدند. در مرحله بعد برش‌ها با اتانول مطلق، اتانول ۹۶ درصد، و آب مقطر آب‌دهی شدند. سپس با توجه به اندازه بافت قالب‌گیری شده (بافت حاصل از بیوپسی یا جراحی) تعداد پنج تا ۱۵ برش به هر حفره از پلیت ۲۴ حفره‌ای انتقال داده شد. (برای هر آنتی‌بادی یک حفره در نظر گرفته شد). در ادامه برش‌ها با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (DAKO) p53 (1-50 Ki67 (DAKO, 1-75)، CD99 (1-100) (DAKO) و آنتی‌بادی پلی‌کلونال Fli-1 (Santa Cruse, 1-50) به‌مدت یک شب در دمای °C ۴ انکوبه شدند. آنتی‌بادی IgG1 آنزیم گلوکز اکسیداز اسپرژیلوس نیجر (DAKO, 1-50) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمون IHC با استفاده از کیت Envision+ Dual link System Peroxidase Kit (DAKO) با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. بدین ترتیب که در ادامه برش‌ها با ۱۵۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز به‌مدت نیم ساعت در دمای اتاق پوشانده شدند. پس از سه بار شستشو با PBS برش‌ها با کروموزن DAB به‌مدت ده دقیقه انکوبه شدند. در ادامه برش‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین انجام شد. سپس بافت‌ها بر روی لام انتقال یافتند و با چسب و لامل پوشانده شدند. لام‌ها جهت تصویربرداری و جمع‌آوری نتایج نگاه‌داری شدند.

ایمونوهیستوشیمی p53 در هسته سلول‌های توموری ۵۳/۳ درصد از بیماران مشاهده گردید (شکل ۴). رنگ‌آمیزی مثبت ایمونوهیستو-شیمی Ki67 در ۶۰ درصد از بیماران مشاهده شد (شکل ۵). نتایج آزمون‌های آماری: همبستگی معنی‌دار آماری بین بیان پروتئین‌های p53, Ki67 و Fli-1 با سن و طول عمر بیماران اثبات نشد ($P > 0.05$, t-test). همبستگی معنی‌دار آماری بین بیان پروتئین‌های p53, Ki67 و Fli-1 با جنس بیماران اثبات نشد ($P > 0.05$, χ^2). همبستگی معنی‌دار آماری بین بیان پروتئین‌های p53 و Ki67 اثبات شد ($P = 0.003$, χ^2). ما بیماران را از نظر سنی به دو گروه سنی زیر بیست سال و بالای بیست سال تقسیم کردیم.

اختلاف آماری معنی‌دار بین طول عمر بیماران در گروه سنی زیر و بالای بیست سال مشاهده نشد (Student's t-test, $P = 0.07$). با توجه به این‌که اختلاف آماری فوق به مرز معنی‌دار شدن نزدیک است، و همچنین با توجه به تعداد پنج بیمار زنده در گروه سنی بالای بیست سال نسبت به دو بیمار زنده در گروه سنی زیر بیست سال، احتمال معنی‌دار شدن آماری اختلاف طول عمر بین دو گروه پس از فوت تمام بیماران وجود دارد.

نتایج آزمون به صورت مخفی (Blind) توسط دو نفر از همکاران به صورت مجزا جمع‌آوری شد. حداقل ۳۰۰ سلول توموری با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر میکروسکوپ در میدان‌های مختلف به وسیله نرم‌افزار NIS Elements imaging software (Nikon Instruments, Inc, Melville, NY) بررسی شدند. لام‌هایی که بیش از ۱۰٪ از سلول‌های توموری رنگ اختصاصی ایمونوهیستوشیمی را نشان دادند، مثبت و لام‌هایی که کمتر از ۱۰٪ از سلول‌های توموری رنگ اختصاصی ایمونوهیستوشیمی را نشان دادند، منفی گزارش شدند.^{۱۵} در جدول ۱ درصد مثبت بودن Ki67 در هر نمونه ذکر شده است.

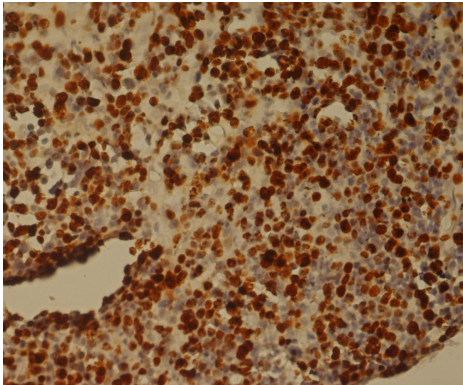
یافته‌ها

نتایج ایمونوهیستوشیمی: نتایج ایمونوهیستوشیمی در جدول ۱ درج شده است. در تمامی رنگ‌آمیزی‌ها هیچ رنگ اختصاصی ایمونوهیستوشیمی در کنترل منفی ایزوتاوپ IgG1 مشاهده نشد (شکل ۱). پروتئین CD99 در غشاء سلول‌های توموری صد درصد بیماران مشاهده شد (شکل ۲). پروتئین Fli-1 در هسته سلول‌های توموری، ۸۶/۷ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۳). رنگ‌آمیزی مثبت

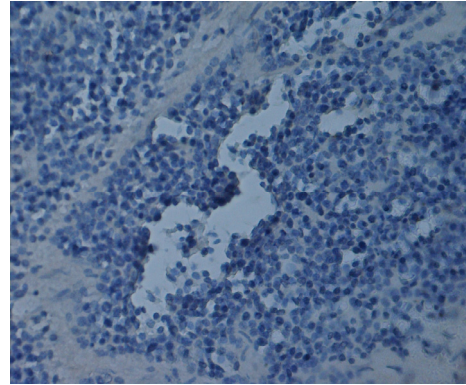
جدول-۱: اطلاعات بالینی و نتایج آزمون ایمونوهیستوشیمی

بیمار	سن	جنس	محل تومور	بیان CD99	بیان Fli-1	بیان p53	درصد بیان Ki67	پروتو درمانی	رژیم شیمی‌درمانی	تعداد دفعات شیمی‌درمانی	زنده /مرده	طول عمر (روز)***
P ₁	۲۸	مرد	قفسه سینه	+	** +	** -	۹	دریافت کرد	EVAIA	۸	زنده	۴۸۵
P ₂	۴۲	مرد	گلوتال	+	+	+	۵۸	دریافت کرد	VAC-IME	۸	زنده	۳۷۶
P ₃	۱۳	مرد	لگن	+	+	-	۲	دریافت کرد	EVAIA	۸	مرده	۴۲۰
P ₄	۴۷	مرد	استخوان	+	+	+	۴۳	دریافت کرد	EVAIA	۱۱	زنده	۱۰۹۵
P ₅	۲۷	مرد	ستون فقرات	+	+	+	۱۸	دریافت کرد	EVAIA	۸	زنده	۸۱۲
P ₆	۵۸	مرد	ستون فقرات	+	-	+	۱۲	دریافت کرد	EVAIA	۵	زنده	۸۹۲
P ₇	۲۷	مرد	استخوان	+	+	-	۶	دریافت کرد	EVAIA	۶	مرده	۱۱۷۰
P ₈	۱۶	زن	قفسه سینه	+	+	+	۴۱	دریافت کرد	-	۸	مرده	۱۲۰
P ₉	۱۹	زن	شانه	+	+	-	۹	دریافت کرد	EVAIA	۴	مرده	۳۷۰
P ₁₀	۱۳	زن	تیبیا	+	+	-	۳۵	دریافت کرد	EVAIA	۴	زنده	۱۰۲۸
P ₁₁	۲۵	مرد	تیبیا	+	-	+	۲۹	دریافت کرد	EVAIA	۱۰	مرده	۵۱۰
P ₁₂	۱۵	مرد	اسپینال	+	+	+	۵۳	دریافت کرد	-	۳	مرده	۱۸۰
P ₁₃	۱۴	مرد	ستون فقرات	+	+	+	۶۰	دریافت کرد	VAC-IME	۸	مرده	۴۸۰
P ₁₄	۱۶	زن	لگن	+	+	-	۹	دریافت کرد	VAC-IME	۸	مرده	۶۱۰
P ₁₅	۱۶	مرد	شانه	+	+	-	۵	دریافت کرد	EVAIA	۸	زنده	۴۸۱

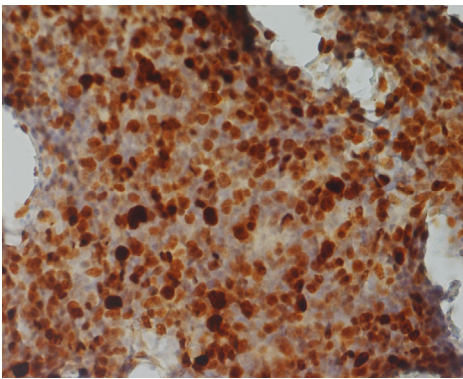
* بیش از ۱۰٪ سلول‌های توموری رنگ اختصاصی IHC را نشان دادند، ** کمتر از ۱۰٪ سلول‌های توموری رنگ اختصاصی IHC را نشان دادند، *** از زمان تشخیص تا اتمام زمان پی‌گیری (روز).



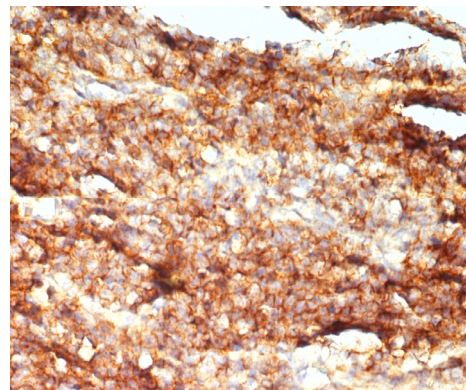
شکل-۴: بیان پروتئین p53 در بافت تومور یووینگ سارکوما. تصویر حضور برجسته پروتئین p53 را در هسته اکثر سلول‌های توموری نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین، $\times 400$.



شکل-۱: رنگ‌آمیزی بافت توموری با ایزوتایپ IgG1 آنزیم گلوکز اکسیداز اسپرژیلوس نیچر (کنترل منفی). تصویر رنگ‌آمیزی منفی ایزوتایپ IgG1 را در بافت توموری نشان می‌دهد. در تمام نمونه‌های رنگ‌شده هیچ رنگ اختصاصی ایمونوهیستوشیمی دیده نشد. رنگ‌آمیزی زمینه: هماتوکسیلین، $\times 400$.



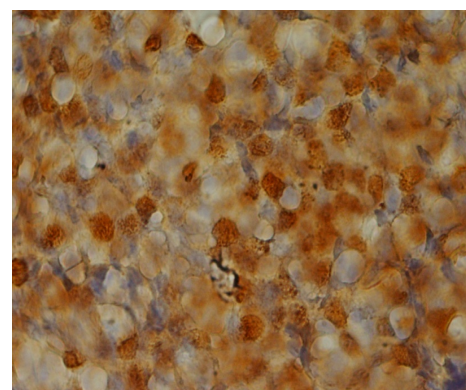
شکل-۵: بیان پروتئین Ki67 در بافت تومور یووینگ سارکوما. تصویر حضور برجسته پروتئین Ki67 را در هسته اکثر سلول‌های توموری نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین، $\times 400$.



شکل-۲: بیان پروتئین CD99 در بافت توموری یووینگ سارکوما. وجود پروتئین CD99 در غشاء سلول‌های توموری دیده می‌شود. رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین، $\times 400$.

بحث

در مطالعه حاضر، الگوی بیان پروتئین‌های CD99، Ki67، p53 و Fli-1 در ۱۵ بلوک پارافینی یووینگ سارکوما با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. پروتئین غشایی CD99 شاخص مولکولی جهت تشخیص روتین یووینگ سارکوما است.^{۱۲،۱۳،۱۴} نتایج ما نیز حضور CD99 را در صد درصد بافت‌های توموری نشان داد. پروتئین CD99 در درصد قابل توجه‌ای از تومورهای دیگر نظیر lymphoblastic lymphoma، poorly differentiated synovial sarcoma، rhabdomyosarcoma، mesenchymal chondrosarcoma که مورفولوژی شبیه به یووینگ سارکوما دارند نیز بیان می‌شود.^{۱۷-۱۹} پروتئین Fli-1 در غالب فیوژن EWS/Fli-1 در بیش از ۸۰ درصد تومورهای یووینگ سارکوما حضور



شکل-۳: بیان پروتئین Fli-1 در بافت توموری یووینگ سارکوما. وجود پروتئین Fli-1 در هسته سلول‌های توموری نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین، $\times 1000$.

معنی دار شدن آماری اختلاف طول عمر بین دو گروه پس از فوت تمام بیماران وجود دارد. بنابراین احتمال این که سن بیمار میزان بدخیمی تومور و طول عمر را در یووینگ سارکوما تغییر دهد مطرح می شود. در مطالعه ما از هشت بیمار زیر ۲۰ سال رنگ آمیزی p53 شش بیمار منفی و دو بیمار مثبت بود. در حالی که در گروه سنی بالای بیست سال رنگ آمیزی p53 پنج بیمار مثبت و دو بیمار منفی بود. علی رغم کمترین موارد افزایش بیان p53 در گروه سنی زیر بیست سال، کمترین طول عمر در این گروه سنی وجود داشت. علی رغم بیشترین موارد افزایش بیان p53 در گروه سنی بالای بیست سال، بیشترین طول عمر در این گروه سنی دیده شد. بنابراین فرضیه این که همبستگی بین بیان بالای p53 و عدم پاسخ به درمان و کاهش طول عمر تحت تاثیر سن تغییر می کند، مطرح می شود. جهت اثبات این فرضیه انجام مطالعات با حجم نمونه بالا لازم است. پروتیین ناپایدار هسته ای Ki67 غیرهستونی است و بیان آن با چرخه سلولی در ارتباط است. پروتیین Ki67 در سلول هایی که وارد مرحله تکثیر می شوند در اواسط فاز G₁ سیکل سلولی ظاهر می شود و در فازهای G₂, S بیان آن افزایش یافته و در فاز M به حد اکثر می رسد.^{۲۶} ویژگی های فوق پروتیین Ki67 را به شاخصی مهم برای ارزیابی قابلیت رشد و تکثیر سلولی تبدیل کرده است. در مطالعه ما بیان افزایش یافته پروتیین Ki67 در هسته سلول های توموری نه تومور از پانزده تومور مشاهده شد. گروه های دیگر بیان پروتیین Ki67 را در تومورهای یووینگ سارکوما گزارش کرده اند.^{۱۰،۱۱،۲۷،۲۸} همچنین هماهنگ با مطالعه Amir، ما نیز همبستگی معنی داری بین بیان p53 و Ki67 مشاهده کردیم.^{۱۱} در این مطالعه الگوی بیان پروتیین های p53، Ki67، Fli-1 و CD99 در تومورهای یووینگ سارکوما در ایران برای اولین بار انجام شد. نتایج نقش برجسته تغییرات پروتیین های p53 و Ki67 را در ایجاد و پیشرفت این گروه از تومورها مطرح کرد. نتایج این مطالعه بررسی ایمونوهیستوشیمی همزمان پروتیین های Fli-1 و CD99 را جهت تشخیص بهتر تومورهای یووینگ سارکوما پیشنهاد می کند.

دارد.^{۱۲} بنابراین Fli-1 به عنوان یک مارکر جهت تشخیص افتراقی EWS/PNET از سایر انواع بدخیمی ها ارزشمند است.^{۱۶} بنابراین در مطالعه حاضر حضور پروتیین Fli-1 نیز جهت تایید تشخیص یووینگ سارکوما بیماران بررسی شد. نتایج ما با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال که مستقیماً ناحیه c ترمینال پروتیین Fli-1 را شناسایی می کند، حضور برجسته این پروتیین را در هسته های سلول های توموری در سیزده نمونه از پانزده نمونه توموری نشان داد. هماهنگ با نتایج ما محققین دیگر بیان Fli-1 را در ۷۱ تا ۸۴ درصد از بلوک های پارافینی یووینگ سارکوما گزارش کرده اند.^{۱۶،۲۰-۲۲} عدم حضور پروتیین Fli-1 در درصدی از EWS/PNET ها را می توان به دلیل حضور انواع نادر فیوژن از جمله EWS/ETV1 و EWS/ERG دانست.^{۲۳،۲۴} هماهنگ با نتایج ما محققین با استفاده از آنتی بادی DO₇ بیان افزایش یافته p53 را در ۴۳ درصد (۱۱) و ۶۶/۶ درصد (۲۵) تومور یووینگ سارکوما نشان دادند. همچنین محققین دیگر بیان افزایش یافته p53 را در ۱۴ درصد (۹) و ۱۱ درصد (۱۰) و ۱۳ درصد (۱۵) تومور یووینگ سارکوما نشان دادند. در برخی مطالعات بیان افزایش یافته پروتیین p53 با عدم پاسخ مناسب به درمان و کاهش طول عمر بیمار همراه بوده است.^{۹-۱۱،۱۵} نتایج ما هماهنگ با مطالعاتی است که همبستگی معنی دار آماری بین بیان افزایش یافته پروتیین p53 و طول عمر بیماران مشاهده نکردند.^{۲۵} کسب نتایج متفاوت در مطالعات مختلف می تواند به دلیل وضعیت متفاوت بیماران از نظر میزان پیشرفت تومور، زمان مراجعه و نحوه درمان باشد. در مطالعه حاضر هشت بیمار در گروه سنی زیر بیست سال و هفت بیمار در گروه سنی بالای بیست سال قرار داشتند. بیماران گروه سنی بالای بیست سال، نسبت به گروه سنی زیر بیست سال طول عمری نزدیک به دو برابر داشته اند. با توجه به این که اختلاف آماری طول عمر بین دو گروه سنی قابل توجه بوده و به مرز معنی دار شدن نزدیک است، و همچنین با توجه به تعداد پنج بیمار زنده در گروه سنی بالای بیست سال نسبت به دو بیمار در گروه سنی زیر بیست سال، احتمال

References

1. Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 2007;254(1):1-10. Epub 2007 Jan 23.
2. de Alava E, Gerald WL. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000;18(1):204-13.
3. Carvajal R, Meyers P. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal family of tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;19(3):501-25, vi-vii.
4. Carpentieri DF, Qualman SJ, Bowen J, Krausz T, Marchevsky A, Dickman PS; Cancer Committee, College of American

- Pathologists. Protocol for the examination of specimens from pediatric and adult patients with osseous and extraosseous ewing sarcoma family of tumors, including peripheral primitive neuroectodermal tumor and ewing sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129(7):866-73.
5. Bacci G, Longhi A, Briccoli A, Bertoni F, Versari M, Picci P. The role of surgical margins in treatment of Ewing's sarcoma family tumors: experience of a single institution with 512 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65(3):766-72. Epub 2006 Apr 19.
 6. Christie L, Lang S. Pathology of common childhood tumours. *Surgery (Oxford)* 2005;23:310-31.
 7. Kusafuka T, Fukuzawa M, Oue T, Komoto Y, Yoneda A, Okada A. Mutation analysis of p53 gene in childhood malignant solid tumors. *J Pediatr Surg* 1997;32(8):1175-80.
 8. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003;10(4):431-42.
 9. Abudu A, Mangham DC, Reynolds GM, Pynsent PB, Tillman RM, Carter SR, et al. Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis. *Br J Cancer* 1999;79(7-8):1185-9.
 10. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, et al. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;89(4):783-92.
 11. Amir G, Issakov J, Meller I, Sucher E, Peyser A, Cohen IJ, et al. Expression of p53 gene product and cell proliferation marker Ki-67 in Ewing's sarcoma: correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2002;33(2):170-4.
 12. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991;67(7):1886-93.
 13. Perlman EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, Link MP. Ewing's sarcoma: routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol.* 1994 Mar;25(3):304-7.
 14. Rajabalian S, Hajializadeh Z, Pooraboli I, Jangi-Aghdam H, Badinloo M. Establishment, characterization, and drug sensitivity of a new Ewing sarcoma cell line (SS-ES-1). *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010 Nov;32(8):e331-7.
 15. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005;23(3):548-58.
 16. Llombart-Bosch A, Navarro S. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteins in Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9(3):255-60.
 17. Riopel M, Dickman PS, Link MP, Perlman EJ. MIC2 analysis in pediatric lymphomas and leukemias. *Hum Pathol* 1994;25(4):396-9.
 18. Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CD, Bhan AK, Rosenberg AE. CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma. *Hum Pathol* 1996;27(12):1273-6.
 19. Devoe K, Weidner N. Immunohistochemistry of small round-cell tumors. *Semin Diagn Pathol* 2000;17(3):216-24. Review.
 20. Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 2000;24(12):1657-62.
 21. Mhaweche-Fauceglia P, Herrmann FR, Bshara W, Odunsi K, Terracciano L, Sauter G, et al. Friend leukaemia integration-1 expression in malignant and benign tumours: a multiple tumour tissue microarray analysis using polyclonal antibody. *J Clin Pathol* 2007;60(6):694-700. Epub 2006 Aug 17.
 22. Nilsson G, Wang M, Wejde J, Kreicbergs A, Larsson O. Detection of EWS/FLI-1 by Immunostaining. An Adjunctive Tool in Diagnosis of Ewing's Sarcoma and Primitive Neuroectodermal Tumour on Cytological Samples and Paraffin-Embedded Archival Material. *Sarcoma* 1999;3(1):25-32.
 23. Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 1994;6(2):146-51.
 24. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, et al. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995;10(6):1229-34.
 25. Kavalar R, Pohar Marinsek Z, Jereb B, Cagran B, Golouh R. Prognostic value of immunohistochemistry in the Ewing's sarcoma family of tumors. *Med Sci Monit* 2009;15(8):CR442-52.
 26. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710-5.
 27. López-Guerrero JA, Machado I, Scotlandi K, Noguera R, Pellin A, Navarro S, et al. Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large series of genetically confirmed Ewing's sarcoma family of tumors. *Int J Cancer* 2011;128(5):1139-50. doi: 10.1002/ijc.25424.
 28. Pitak-Arnop P, Bellefjhih S, Bertolus C, Chaîne A, Dhanuthai K, Gruffaz F, et al. Ewing's sarcoma of jaw bones in adult patients: 10-year experiences in a Paris university hospital. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36(8):450-5. Epub 2008 Jul 31.

The frequency of p53, Ki67, CD99 and Fli-1 protein expression in paraffin-embedded tissue blocks in Ewing's sarcoma

Received: February 21, 2011 Accepted: March 16, 2011

Abstract

Zahra Bagheri Hossein-Abadi
MSc.¹

Saeed Rajabalian MSc.^{2*}

Behjat Kalantari-Khandani
MD.³

Fateme Poya MSc.⁴

Masoud Saleh Moghaddam
PhD.¹

Batool Motamedi MSc.⁴

1- Department of Biochemistry,
Payame Noor University, Mashhad,
Iran.

2- Medical Science University of
Kerman, Kerman Neuroscience
Research Center, Kerman, Iran.

3- Department of Oncology, Medical
Science University of Kerman,
Kerman, Iran.

4- Department of Anatomy, Medical
Science University of Kerman,
Kerman, Iran.

Background: Ewing sarcoma family tumors (ESFTs) are among the most malignant tumors in children and young adults. ESFTs include Ewing sarcoma (ES) and peripheral primitive neuroectodermal tumors (pPNETs). As there seemed to be few studies on the molecular biology of ESFTs, we investigated the frequency of CD99, Ki67, p53 and Fli-1 protein expression in 15 Iranian patients with ESFTs. In addition, the correlation between expression rate of these proteins and various clinical factors, including age, sex and survival was computed.

Methods: The expression of the aforesaid proteins was studied by immunohistochemistry in formalin-fixed and paraffin-embedded blocks of 15 ESFTs specimens. Stained sections were classified according to the percentage of stained tumor cells.

Results: The results showed the membrane expression of CD99 protein in all of the specimens. The nuclear expression of Fli-1 protein was observed in 86.7% and the over-expression of p53 nuclear protein was seen in 53.3% of the specimens. The expression rate of Ki67 protein was 60%. Although a significant correlation was not shown between the expression levels of Ki67, p53 or Fli-1 proteins with age, sex or survival of the patients, there was a significant correlation between expression levels of p53 and Ki67 proteins ($P=0.003$).

Conclusion: The results underline the role of p53 and Ki67 proteins in the development and progression of ESFTs and suggest the simultaneous immunohistochemical staining of Fli-1 and CD99 proteins for the diagnosis of ESFTs.

Keywords: CD99, Ewing sarcoma, Fli-1, immunohistochemistry, Ki67, p53.

* Corresponding author: Kerman
Neuroscience Research Center, Jahad
Blvd., Ebn Sina Ave., Kerman, Iran.
Tel: +98-341-2264196
email: Srajabalian@yahoo.com