

# بررسی ارتباط فعالیت مارکرهای پروليفراسيون سلولي PCNA و ki67 با اجزای هیستولوژیک تومور ویلمز مرکز طبی کودکان، ۷۸-۱۳۶۹

دکتر فاطمه محبوب (استادیار)\*، دکتر محمود یآوری (دستیار)\*، دکتر عیسی جهانزاد (استادیار)\*

\* گروه پاتولوژی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## چکیده

مقدمه: تومور ویلمز وافرترین تومور اولیه کلیه در اطفال می‌باشد و از سه جز هیستولوژیک بلاستمال، اپی‌تلیال و استرومال تشکیل شده است. فاکتورهای متعددی در پیش‌آگهی تومور دخیل هستند. اخیراً تعیین فعالیت پروليفراسيون سلولي اطلاعات بیشتری در مورد رفتار بیولوژیک نئوپلاسم‌های مختلف ارائه داده است. هدف از این مطالعه تعیین فعالیت پروليفراسيون سلولي در بین اجزای مختلف هیستولوژیک تومور ویلمز و ارتباط آنها با یکدیگر و همچنین ارتباط آنها با میزان و زمان عود می‌باشد.

مواد و روشها: بدین منظور ۲۲ مورد تومور ویلمز که از پیگیری مناسبی برخوردار بودند انتخاب شدند. بلوک‌های پارافینه مناسب انتخاب شده پس از برش نحت رنگ‌آمیزی با Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) و ki67 قرار گرفتند سپس درصد رنگ‌آمیزی PCNA و ki67 برای هر یک از اجزای بلاستمال، اپی‌تلیال و استرومال تعیین شد و با یکدیگر مقایسه شد.

یافته‌ها: نتیجه اینکه فعالیت پروليفراتیو برای اجزای بلاستمال و اپی‌تلیال به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از جزء استرومال بود ( $P < 0.0002$ ). سپس بیماران براساس وضعیت عود به دو گروه عود کرده و بدون عود تقسیم شدند و میزان پروليفراسيون سلولي بین این دو گروه مقایسه شد. نتیجه اینکه نمونه‌های با پروليفراسيون سلولي بالا به میزان بیشتر در گروه عود کرده نسبت به گروه بدون عود مشاهده شدند ( $PCNA = 92/3\%$  در مقابل  $22/3\%$  و  $P < 0.0015$ ).

نتیجه گیری و توصیه ها: نتیجه کلی اینکه استفاده از مارکرهای پروليفراسيون سلولي در تومور ویلمز می‌تواند به عنوان یک فاکتور در پیش‌آگهی تومور ویلمز مطرح باشد.

همچنین هر یک از اجزای هیستولوژیک تومور ویلمز بطور جداگانه بدست آمد، بدین صورت که پس از تعیین محدوده هیستولوژیک هر جزء نسبت هسته‌های مثبت به کل هسته‌ها بدست آمد که این آنالیز بطور متوسط در ده فیلد مختلف انجام شد و نتایج بدست آمده با هم جمع شدند.

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار Epi Info 6 و با بکارگیری از آزمون Fisher's Exact test هم برای ارتباط فعالیت پرولیفراسیون سلولی بین اجزای مختلف تومور و هم برای ارتباط فعالیت پرولیفراسیون سلولی با میزان و زمان عود تومور انجام گرفت. از نظر آماری  $P < 0/05$  ارزشمند تلقی شد.

## یافته‌ها

بر اساس نتایج بدست آمده ترکیب جنسی بیماران در این مطالعه برابر و محدوده سنی بیماران بین ۴/۵ ماهگی تا ۱۱ سالگی بود. افراد جنس مؤنث به میزان کمی از عود بیشتری (۷/۷۲٪) نسبت به جنس مذکر (۴۵/۵٪) برخوردار بودند. با این وجود از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بدست نیامد.

برای تفکیک دو گروه پرولیفراسیون بالا و پایین از میانگین درصد رنگ‌پذیری برای کل تومور استفاده شد که این میزان برای PCNA میانگین ۶۰٪ و برای ki67 میانگین ۱۰٪ بدست آمد که به تفکیک درصد رنگ‌پذیری اجزای مختلف تومور در جدول ۱ آورده شده است.

موارد پرولیفراسیون بالا در اجزای بلاستمال  $PCNA = 78/9\%$  و  $ki67 = 84/2\%$  و اپیتلیال  $PCNA = 70/6\%$  و  $ki67 = 58/8\%$  نسبت به جزء استرومال  $PCNA = 0\%$  و  $ki67 = 5\%$  دیده می‌شود ( $P < 0/0001$ )، بیشتر بود. برای مقایسه پرولیفراسیون سلولی در گروه‌های عود کرده و جدول شماره ۱ میانگین شاخص‌های آنتی‌ژنی PCNA و ki67 در انواع هیستولوژیک تومور ویلمز بیماران شرکت کننده نشان داده شده است.

## مقدمه

تومور ویلمز تقریباً یک سوم توده‌های بدخیم شکمی اطفال را تشکیل می‌دهد (۱،۲) و معمولاً اولین تظاهر آن به شکل توده شکمی می‌باشد (۳). از نظر مرفولوژی از سه جزء هیستولوژیک بلاستمال، اپیتلیال و استرومال تشکیل شده است (۴،۵). فاکتورهای متعددی در پیش‌آگهی تومور ویلمز دخالت دارند که از جمله می‌توان به سن بیمار، اندازه تومور، stage، وجود آناپلازی، محل و زمان عود و ... اشاره کرد (۶،۷). امروزه از میزان فعالیت پرولیفراسیون سلولی برای بررسی رفتار بیولوژیک بسیاری از تومورها کمک گرفته شده است (۸،۹). به علت ماهیت هتروژن تومور ویلمز به نظر می‌رسد میزان فعالیت پرولیفراسیون سلولی در بین اجزای هیستولوژیک تومور ویلمز متفاوت باشد. این مسئله در مطالعات چندی مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه ارتباط فعالیت پرولیفراسیون سلولی با اجزای مختلف هیستولوژیک تومور ویلمز و همچنین ارتباط آنها با میزان و زمان عود می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۲۲ بیمار مبتلا به تومور ویلمز انجام گرفته است. ۱۱ نفر مذکر و ۱۱ نفر بقیه مؤنث بودند. از این ۲۲ بیمار ۱۳ نفر همراه با عود بوده‌اند. معیار انتخاب بیماران، پیگیری مستمر و کافی (حداقل ۱/۵ سال) و وجود نمونه بافتی مناسب بود.

در مرحله بعد بلوک‌های پارافینه مربوط به هر مورد بیرون آورده شده، آنهایی که حاوی بافت سالم بوده (نکروتیک نبودند) و هر ۳ جزء تومور را داشتند انتخاب شدند. سپس بلوک‌ها برش داده شده هم به روش هماتوکسیلین و اتوزین و هم برای مارکرهای ki67 و PCNA تحت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از پروتکل استرپتاویدین-بیوتین ترانسفرین قرار گرفتند. پس از این به کمک آنالیز تصویری (Image analysis) میزان فعالیت سلولی برای کل تومور و

جدول شماره ۱- میانگین شاخص‌های آنتی‌ژنی PCNA و ki67  
بین در سه جز هیستولوژیک تفاوت معنی‌داری موجود دارد  
( $P < 0.05$ )

	اپی‌تلیال (%)	بلاستمال (%)	استرومال (%)
درصد رنگ‌پذیری PCNA			
میانگین	۶۲	۷۵/۷۵	۲۲/۳
انحراف معیار	۲۶/۴	۱۴/۹	۱۲/۷
درصد رنگ‌پذیری ki67			
میانگین	۱۴/۷	۲۵/۳۵	۱۲/۷
انحراف معیار	۱۴/۲	۱۹/۵۸	۲/۷

برای اثبات هرگونه ارتباطی بین عود تومور و میزان پرولیفراسیون سلولی اجزای مختلف تومور ویلمز، میزان درصد رنگ‌پذیری PCNA و ki67 برای هر جزء بطور جداگانه اندازه‌گیری شد و تحت بررسی آماری قرار گرفت که هیچکدام از نظر آماری ارزشمند نبودند.

برای اثبات بین میزان فعالیت پرولیفراسیون سلولی و زمان عود تومور ویلمز در ابتدا موارد عود تومور از نظر زمان عود به دو دسته: الف) عود زودرس (کمتر از یکسال) و ب) عود دیررس (بیشتر از یکسال) تقسیم شدند. سپس میزان درصد رنگ‌پذیری PCNA و ki67 برای هر یک بدست آمده به دو گروه پرولیفراسیون بالا و پایین تقسیم شدند و سپس با همدیگر مقایسه شدند. میانگین بدست آمده در مورد PCNA عدد ۷۰ و در مورد ki67 عدد ۱۵ می‌باشد. تعداد موارد عدد زودرس ۷ عدد و تعداد موارد عدد دیررس ۶ عدد می‌باشد. در رنگ‌آمیزی PCNA تعداد موارد پرولیفراسیون بالا و پایین برای هر یک از موارد گروه الف و ب تقریباً به یک میزان بدست آمد ( $P = 1$ ).

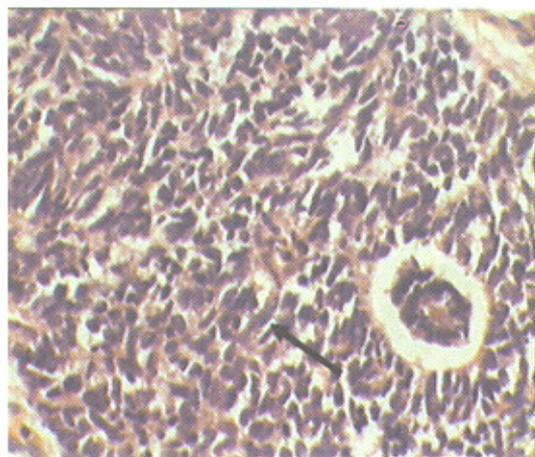
در رنگ‌آمیزی انجام گرفته با ki67 تنها ۱/۵۷٪ از موارد گروه الف از میزان پرولیفراسیون بالایی برخوردار بودند که این میزان در مورد گروه ۱۶/۷٪ بود ( $P = 0/۲۶$ ).  
در تصاویر ۱ الی ۱۰ نمای هیستولوژیک تومور ویلمز به تفکیک اجزای تشکیل دهنده آن، اپی‌تلیال، بلاستمال و استرومال، در رنگ‌آمیزی‌های مختلف هماتوکسیلین و اتوزین، PCNA و ki67 نشان داده شده است.

از میانگین درصد رنگ‌پذیری ki67 PCNA برای کل تومور استفاده شد (جدول ۲). در رنگ‌آمیزی انجام گرفته با PCNA گروه عود کرده نسبت به گروه بدون عود

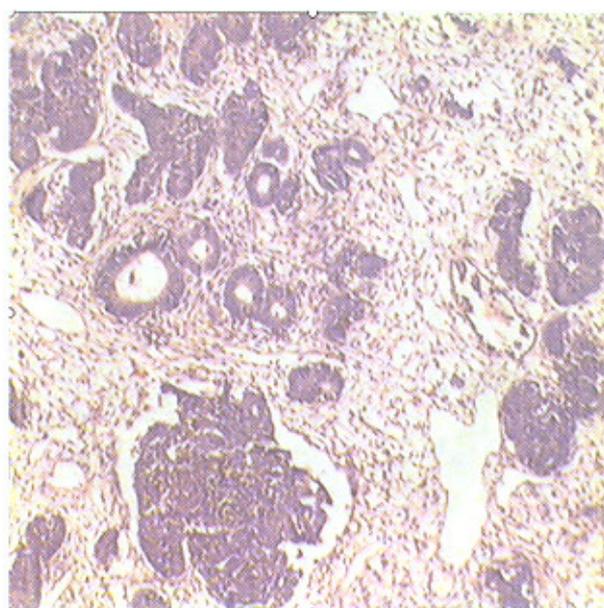
جدول شماره ۲- توزیع فراوانی تحت مطالعه براساس وضعیت عود تومور ویلمز و درصد رنگ‌پذیری شاخص‌های آنتی‌ژنی PCNA و ki67 بیماران شرکت کننده نشان داده شده است. از لحاظ آماری تنها در توزیع رنگ‌پذیری PCNA براساس وضعیت عود بیماران تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ )

	موارد بدون عود (n=۹)	موارد عود (n=۱۳)	P Value
درصد رنگ‌پذیری PCNA	۲۲/۲ (n=۲)	۹۲/۳ (n=۱۲)	*۰/۰۰۱۵
high > ۶۰	۷/۷ (n=۷)	۷/۷ (n=۱)	
low < ۶۰			
درصد رنگ‌پذیری ki67	۲۳/۳ (n=۳)	۷۶/۹ (n=۱۰)	۰/۰۷۸۹
high > ۱۰	۶/۶ (n=۶)	۲۳/۱ (n=۳)	
low < ۱۰			

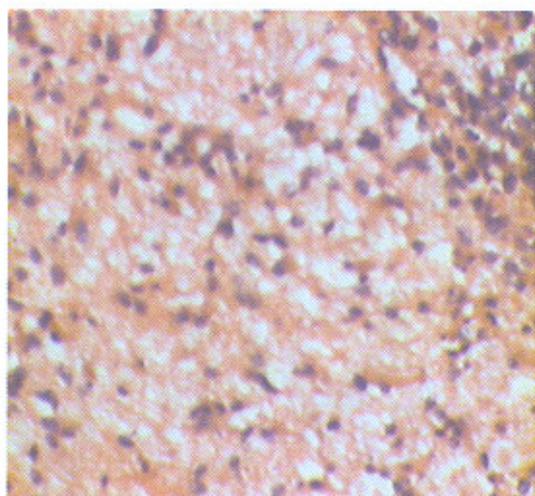
از میزان پرولیفراسیون بالاتری برخوردار بود  
(۹۲/۳٪ در گروه عود در مقابل ۲۲/۲٪ در گروه بدون عود)



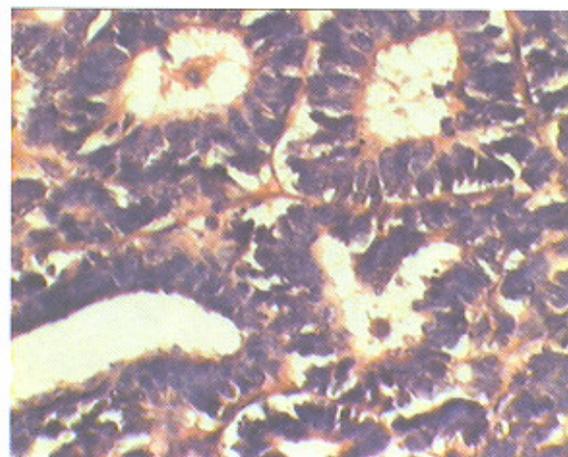
تصوير شماره ۳- نماي هيستولوژيک تومور ويلمز جزء بلاستمال  
(رنگ آميزی H&E)



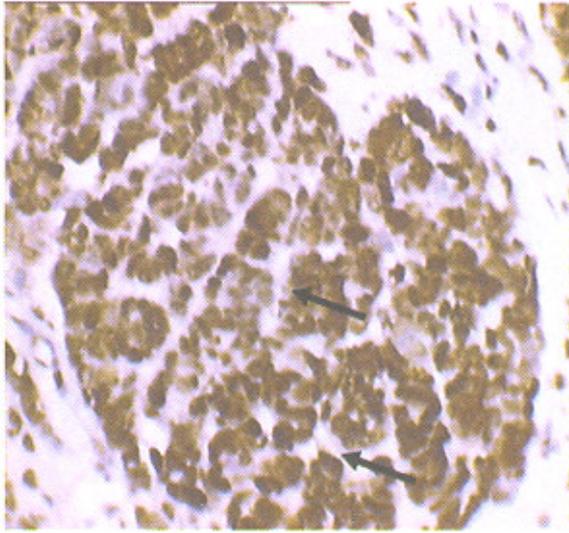
تصوير شماره ۱- نماي هيستولوژيک تومور ويلمز  
(رنگ آميزی H&E)



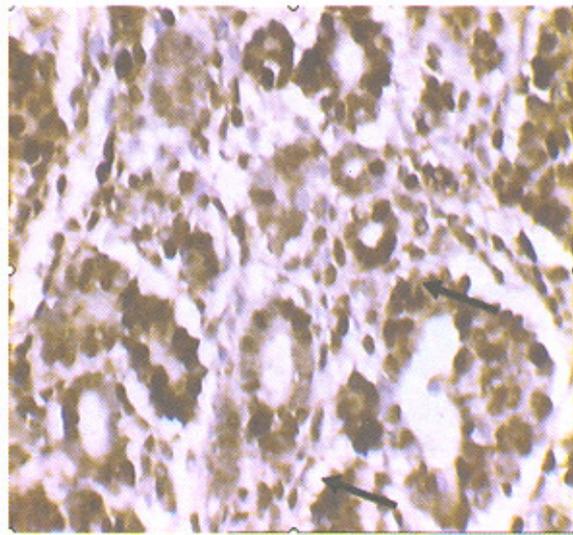
تصوير شماره ۴- نماي هيستولوژيک تومور ويلمز جزء استرومال  
(رنگ آميزی H&E)



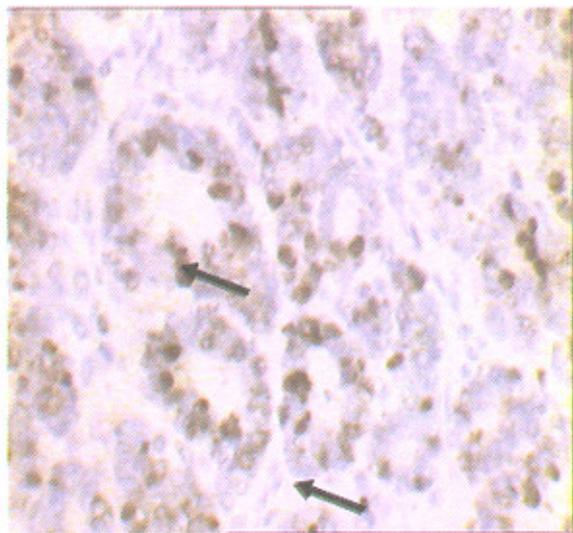
تصوير شماره ۲- نماي هيستولوژيک تومور ويلمز جزء ابي تليال  
(رنگ آميزی H&E)



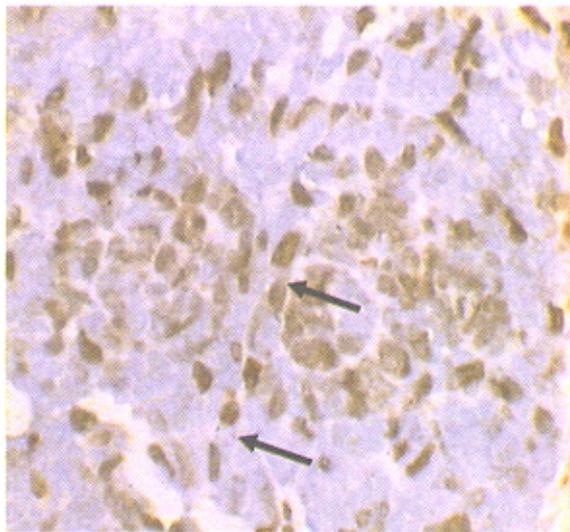
تصویر شماره ۷- نمای هیستولوژیک تومور ویلمز جزء بلاستمال  
(رنگ آمیزی PCNA)



تصویر شماره ۵- نمای هیستولوژیک تومور ویلمز جزء اپی تلیال  
(رنگ آمیزی PCNA)



تصویر شماره ۶- نمای هیستولوژیک تومور ویلمز جزء اپی تلیال  
(رنگ آمیزی Ki67)

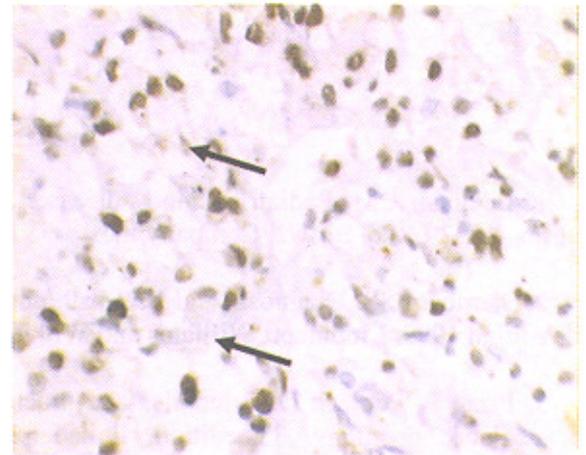


تصویر شماره ۸- نمای هیستولوژیک تومور ویلمز جزء بلاستمال  
(رنگ آمیزی Ki67)

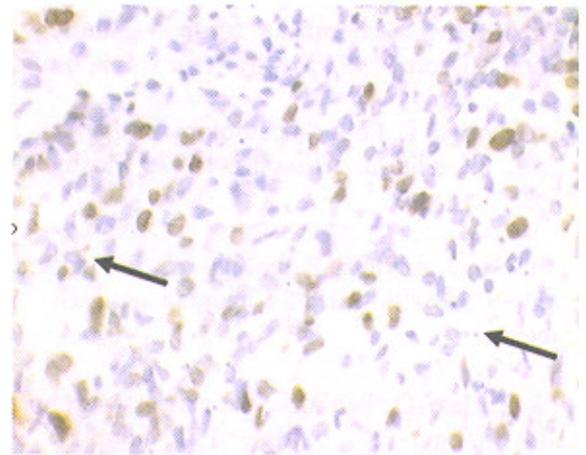
طولانی دارد در بیشتر سلول‌هایی که در فاز استراحت هستند نیز قابل تعیین است. در مقابل ki67 در فاز استراحت وجود ندارد، نیمه عمر کوتاه‌تری دارد و بیشتر در فاز G2/m مشاهده می‌شود (۹،۱۰). توزیع سنی و جنسی بیماران در این مطالعه با آمار موجود در مراجع مختلف مطابقت دارد.

هدف اصلی این مطالعه ارزیابی فعالیت پرولیفراسیون سلولی بین اجزای مختلف تومور ویلمز بوده است. بر این اساس اجزای بلاستمال با بیشترین میزان پرولیفراسیون سلولی و اجزای استرومال با کمترین میزان پرولیفراسیون نسبتاً بالایی قرار گرفت. این نتایج با مطالعه مشابهی که توسط Delahunt بر روی ۲۶ مورد تومور ویلمز انجام شده کاملاً مطابقت دارد (۱۱). بهر حال انتظار می‌رود اجزای بلاستمال و اپی‌تلیال تومور ویلمز که به عنوان اجزای اصلی تومور ویلمز بوده، به نوعی مشخص کننده این تومور می‌باشند از فعالیت پرولیفراسیون بالایی برخوردار باشند.

در مقابل اجزای استرومال همانند سایر استروماهای تومورهای دیگر بیشتر نقش حمایت کننده برای تومور داشته انتظار فعالیت پرولیفراسیون بالایی از آنها نمی‌رود. در مجموع نتایج بدست آمده در مورد اجزای بلاستمال، اپی‌تلیال و استرومال قابل توجیه می‌باشد. از نتایج دیگر بدست آمده ارتباط واضح بین میزان پرولیفراسیون سلولی و وضعیت عود تومور می‌باشد که این نتایج بدست آمده از مطالعات مشابه مطابقت دارد (۱۳،۱۴،۱۵). این مسئله در مورد سایر تومورهای بدخیم نیز صدق می‌کند بطوری که افزایش میزان پرولیفراسیون سلولی با افزایش میزان عود و متاستاز در تومورهای بدخیم مغز، پانکراس، کبد و ... مشاهده شده است (۹). در بسیاری از تومورها یکی از فاکتورهای مؤثر در پیش‌آگهی زمان عود تومور پس از درمان می‌باشد بطوری که تومورهای با عود زود هنگام پیش‌آگهی بدتری نسبت به تومورهای با عود دیگر هنگام دارند. ما با این فرض که تومورهای با پرولیفراسیون سلولی بالا از زمان عود کمتری برخوردار هستند میزان پرولیفراسیون سلولی را در بین دو گروه با عود زودرس و دیررس مقایسه کردیم ولی آنالیز آماری انجام گرفته هیچگونه ارتباط منطقی را بین دو گروه نشان نداد. علت این مسئله می‌تواند حجم کم نمونه در این مورد باشد.



تصویر شماره ۹- نمای هیستولوژیک تومور ویلمز جزء استرومال (رنگ آمیزی PCNA)



تصویر شماره ۱۰- نمای هیستولوژیک تومور ویلمز جزء استرومال (رنگ آمیزی ki67)

## بحث

پرولیفراسیون سلولی کنترل نشده شامل علامت تومورهای بدخیم است. بنابراین پتانسیل پرولیفراسیون سلول‌های تومورال یک فاکتور پروگنوستیک خیلی مهم است.

همچنین ارتباط فعالیت پرولیفراسیون سلولی با میزان عود در تومورهای مختلفی بحث شده که از آن جمله می‌توان به تومورهای بدخیم مغز، پانکراس و کبد اشاره کرد. برای بررسی فعالیت پرولیفراسیون سلولی امروز بیشتر از دو مارکر ایمنو‌هیستوشیمی به نام‌های PCNA و ki67 استفاده می‌شود. PCNA در اواخر فاز G1 سلولی شروع به افزایش می‌کند و در فاز G1/s به حداکثر میزان خود می‌رسد ولی چون نیمه عمر

## منابع

1. Edelman CM. Pediatric kidney disease. 2<sup>nd</sup> edition 1992 Little, Brown Company Inc.
2. Sternberg SS. Diagnostic surgical pathology. 3<sup>rd</sup> edition 1999. Lippincott Williams and Wilkins.
3. Pizzo P, Poplack D. Principles and practice of pediatric oncology. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia 1997; Lippincott Raven Publishers.
4. Lanzkowsky P. Manual of pediatric hematology and oncology. 2<sup>nd</sup> edition New York 1995 Churchill Living Stone Inc.
5. Rosai J. Acherman's surgical pathology 8<sup>th</sup> edition Missouri 1995 Mosby- year Book, Inc.
6. Barnes E. Potter's pathology of the fetus and infant. 3<sup>rd</sup> edition, Missouri 1997; Mosby Year Book, Inc.
7. Stocker J, Askin F. Pathology of solid tumors in children. 1<sup>st</sup> edition. 1998 Chapman and Hall Publisher.
8. Parlam D. Pediatric neoplasia: Morphology and Biology. 1<sup>st</sup> edition Philadelphia 1996, Lippincott Raven Publishers.
9. Eissa S. Tumor markers. 1<sup>st</sup> edition, Chapman of Hall Publisher 1992.
10. Khine M. Analysis of relative proliferation of wilms tumor components using PCNA and MIB-1 (ki-67 equivalent antigen) immunostaining and assessment of mitotic index. Annal Cell Pathol 1994; 17: 127-138.
11. Delahunt B. Assessment of proliferative activity in wilms tumor. Pediatric pathol Lab Med 1995; 15: 223-244.
12. Nagoshi M, Tsuneyoshi M. Expression of PCNA in Wilm's tumors and other pediatric renal tumors. The correlation between histological classification and proliferative activity. J Surg Onco 1994; 55(2): 114-121.
13. Klonowicz G. ki67 and PCNA in wilms tumor in children clinical implication. Adv Clin Exp Med 2001; 10(4): 355-364.
14. Klonowicz G. Prognostic value of PCNA in Wilm's tumor in children. Eur J Surg Oncol 2002; 25(1): 67-71.
15. Chen F. Expression of PCNA in wilms tumor. Chin Med J 1997; 110(5): 352-353.
16. Bove K, Lewis C, Debrosse K. Proliferation and maturation indexes in nephrogenic rests and wilms tumor the emergence of heterogeneity from dormant nodular renal blastema. Pediatric Pathol Lab Medicine 1995.