

مارکر P504S در تشخیص پرولیفراسیون غددی آتیپیک پروستات

چکیده

زمینه و هدف: تاکید بر کشف زود هنگام سرطان پروستات به کمک اولتراسونوگرافی ترانس رکتال و بیوپسی سوزنی، پاتولوژیست‌ها را با معضل تشخیص سرطان‌های کوچک مواجه نموده است. اخیراً از مارکر P504S جهت تشخیص قطعی سرطان در بیوپسی‌های کوچک استفاده شده است. روش بررسی: رنگ‌آمیزی مارکر P504S برای ۷۰ نمونه بیوپسی سوزنی پروستات و شش نمونه رزکسیون از طریق مجرا که همگی حاوی کانون‌های مشکوک (آتیپیک) بودند و نیز ۴۰ نمونه سرطان قطعی پروستات، شامل هشت نمونه دارای سلول‌های کف‌آلود (foamy) به عمل آمد. یافته‌ها: ۳۶ نمونه از ۴۰ بیوپسی سرطان قطعی، درجاتی از رنگ‌پذیری برای P504S نشان دادند (حساسیت ۹۰٪)؛ دو سرطان کوچک و دو سرطان با سلول‌های کف‌آلود فاقد رنگ‌پذیری بودند. از مجموع ۷۶ مورد مشکوک، ۱۸ مورد به‌عنوان نئوپلازی داخل اپی‌تلیالی درجه بالا (HGPIN) شناخته شدند که ۱۶ مورد آنها رنگ‌پذیری متوسط منتشر نشان دادند. از ۵۸ مورد باقیمانده دارای پرولیفراسیون غدد کوچک آتیپیک ۱۴ مورد قویاً به نفع سرطان بود که چهار مورد آنها فاقد رنگ‌پذیری P504S بودند. در بین ۴۴ مورد آتیپیک به نفع خوش‌خیمی، ۱۴ مورد هیپرپلازی آدنومی آتیپیک با دو مورد رنگ‌پذیری ضعیف موضعی و دو مورد آتیپیک به دنبال پرتوتابی با یک مورد رنگ‌پذیری موضعی مشاهده شد و ۲۸ نمونه دیگر P504S منفی بودند. نتیجه‌گیری: حساسیت P504S برای کشف سرطان پروستات از آنچه قبلاً تصور می‌شد پایین‌تر است. منفی تلقی شدن سرطان‌های کوچک ممکن است به دلیل ناهمگونی رنگ‌پذیری باشد. در پرولیفراسیون غدد کوچک آتیپیک، رنگ‌پذیری مثبت و منتشر P504S قویاً گویای تشخیص سرطان است ولی عدم رنگ‌پذیری آنرا رد نمی‌کند. حساسیت P504S برای کشف سلول‌های سرطانی کف‌آلود و کانون‌های کوچک سرطانی کمتر است. HGPIN غالباً رنگ‌پذیری متوسط منتشر نشان می‌دهد. رنگ‌پذیری ضعیف کانونی ممکن است در غدد خوش‌خیم نیز مشاهده شود. ما استفاده از P504S را فقط در همراهی با بررسی مورفولوژیک و مارکرهای سلول‌های بازال توصیه می‌کنیم.

کلمات کلیدی: نئوپلاسم، پروستات، ایمنوهیستوشیمی، P504S

احمد م. رجب شلیبی^۱
اسامه عبدالله کریم^۲
سید علی احمدی^{۳*}

۱-گروه پاتولوژی سرطان، موسسه پزشکی ملی دمنهور، مصر

۲-گروه اورولوژی، موسسه پزشکی ملی دمنهور، مصر

۳-گروه پاتولوژی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، میدان حسن‌آباد، بیمارستان سینا، بخش پاتولوژی
تلفن: ۹-۶۶۷۰۱۰۴۱
email: ahmadise@tums.ac.ir

مقدمه

اگر چه معاینه دقیق رکتال (Rectal examination) هنوز یک روش کارا و عملی برای کشف کارسینوم پروستات به‌شمار می‌رود، تأیید پاتولوژیک همیشه ضروری است چرا که در معاینه بالینی نمی‌توان سرطان‌های زودرس را با اطمینان از کانون‌های هیپرپلازی ندولار، پروستاتیت گرانولومی، سل، انفارکت یا سنگ پروستات افتراق داد. اولتراسونوگرافی ترانس رکتال (TRUS) می‌تواند سرطان‌های به کوچکی پنج میلی‌متر را کشف کند ولی از تشخیص حدود ۳۰٪ تومورهای پروستات که ایزواکو هستند عاجز است و لذا

کارایی آن به‌عنوان ابزاری برای غربالگری ثابت نشده است.^{۱-۶} در عصر حاضر که غربالگری با آنتی‌ژن اختصاصی پروستات Prostatic Specific Antigen (PSA) رایج است پاتولوژیست‌ها به‌طور روزافزون با نمونه‌های بیوپسی سوزنی پروستات حاوی مناطق بسیار کوچک سرطان پروستات مواجه می‌شوند.^{۱،۲} تشخیص قطعی یک سرطان محدود پروستات می‌تواند یک چالش عمده تشخیص باشد. مارکرهای سلول‌های بازال مانند 34βE12 و P63 در شناسایی کانون‌های کوچک دارای غدد آتیپیک مفید هستند.^{۳-۶} اگر هر دو مارکر سلول‌های بازال گویای فقدان لایه سلول‌های بازال در غدد

نمونه بیوپسی سوزنی و شش نمونه TURP که همگی دارای کانون‌های آتیپیک مشکوک به سرطان بودند انتخاب شدند. چهار نمونه بیوپسی سوزنی به‌علت از دست رفتن کانون‌های آتیپیک در برش‌های عمقی حذف شدند. در ۷۶ مورد باقیمانده، در بررسی معمولی میکروسکوپی ۱۴ نمونه بسیار مشکوک به سرطان پروستات و ۶۲ نمونه تا حدی مشکوک با تشخیص‌های افتراقی AAH، PAH، HGPIN و آتیپی ناشی از پرتوتابی قرار داشتند. علاوه بر موارد فوق ۴۰ نمونه بیوپسی سوزنی سرطان قطعی پروستات نیز به‌عنوان کنترل انتخاب شدند. این موارد شامل هشت تومور با ویژگی غالب غدد کف‌آلود و ۱۲ مورد دارای یک کانون کوچک تومورال (کمتر از پنج درصد سطح نمونه بیوپسی) بودند.^{۱۷}

ارزیابی و تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمیایی: از هر نمونه بیوپسی سوزنی چهار برش پنج میکرومتری در دو سطح جهت اسلاید میکروسکوپی تهیه شد. اسلایدهای اول و چهارم برای رنگ‌آمیزی H&E و اسلایدهای دوم و سوم جهت ایمونوهیستوشیمی استفاده شدند. رنگ‌آمیزی استاندارد ایمونوهیستوشیمیایی به‌کمک Avidin-Biotin Complex (ABC) به‌کار رفت. غلظت آنتی‌بادی در بهترین حدی تنظیم شد که بتواند قویترین رنگ‌آمیزی سلول‌های هدف بدون رنگ‌آمیزی زمینه را ایجاد کند. به‌دنبال پارافین‌زدایی و آب‌دهی، به‌منظور بهترین بازبایی آنتی‌ژنی قبل از رنگ‌آمیزی ایمونولوژیک لام‌های بافتی در PH=۶/۰ و بافرسیترات ۰/۱ مولار درون بخار پز قرار داده شده و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با درجه بالا در معرض میکروویو قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی با دستگاه خودکار در معرض میکروویو قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی انجام گرفت برش‌های بافتی با آنتی‌بادی مونوکلونال خرگوشی P504S با رقت ۱:۲۰ و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. برای مشخص کردن جایگزینی آنتی‌بادی از روش شناسایی DAKO Envision plus و طبق دستورالعمل مربوطه استفاده شد. برش‌ها پس از شستشو در معرض دی‌آمینوبنزیدین و آب اکسیژنه به‌مدت پنج دقیقه قرار گرفته و سپس زمینه با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شد. رنگ‌پذیری سیتوپلاسم یا لبه لومینال سلول‌های اپی‌تلیالی به‌عنوان مثبت تلقی شد.^{۱۲،۱۸،۱۹}

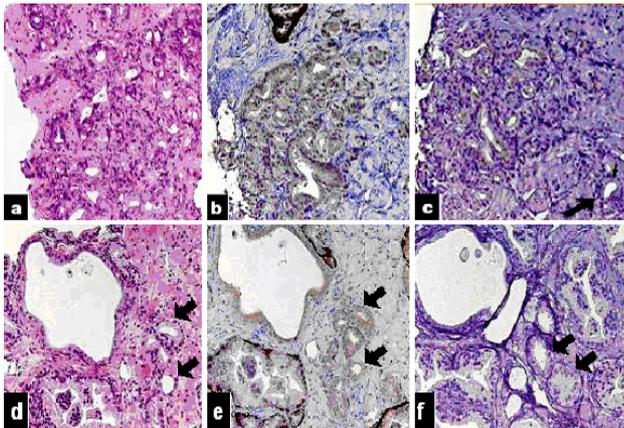
نحوه بیان P504S در ضایعات خوش‌خیم، آتیپیک و کاملاً بدخیم بر اساس وسعت و شدت رنگ‌پذیری ارزیابی شد. وسعت رنگ‌پذیری به‌صورت منتشر (>۵۰٪)، موضعی (۵۰٪-۵۰٪)، بسیار کم (<۵٪) منفی

آتیپیک باشند گواه سرطان پروستات است ولی تشخیص سرطان پروستات با استفاده از مارکرهای سلول‌های بازال ممکن است همیشه قطعی نباشد. برخی ضایعات خوش‌خیم مانند هیپرپلازی آدنومی آتیپیک (Atypical Adenomatous Hyperplasia (AAH)، هیپرپلازی متعاقب آتروفی (Post-Atrophic Hyperplasia (PAH) و نیز نئوپلازی داخل اپی‌تلیالی با درجه بالا (High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN) ممکن است رنگ‌پذیری موضعی یا غیر یکنواخت نشان داده و موجب گمراهی در تشخیص شوند.^{۹-۱۱} لذا فقدان یک مارکر اختصاصی سرطان پروستات همواره یک محدودیت تشخیصی در آزمایش بافت‌شناسی معمول به‌شمار میرفته است. اخیراً در تجربیات مختلف و به‌کمک تجزیه و تحلیل میکروآرایه DNA مکمل، آلفا-متیل استیل - کوانزیم A راسماز (AMACR) به‌عنوان یک ژن که به‌طور ثابت در سرطان پروستات فعال شده ولی در بافت خوش‌خیم پروستات بیان نمی‌شود در کانون توجهات قرار گرفته است.^{۱۱-۱۲} این ژن یک پروتئین سیتوپلاسمی را که در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب شاخه‌دار نقش دارد کد می‌کند. یک آنتی‌بادی تک دودمانی برای AMACR تهیه شده است که به‌نام P504S شناخته می‌شود (Zeta, Sierra Madre, CA) و به‌صورت تجاری در دسترس است و آنرا می‌توان روی نمونه‌های بافتی که به‌طور معمول توسط فرمالین فیکس شده و پارافین اندود شده‌اند به‌کار برد. بررسی‌های اولیه نشان‌دهنده مفید بودن AMACR در کشف سرطان پروستات بوده و الگوهای نحوه بیان آن نیز در تشخیص ضایعات احتمالی زمینه‌ساز سرطان مانند HGPIN کمک‌کننده بوده‌اند.^{۱۶-۱۱} با این حال هنوز ارزیابی‌های بیشتری از کارایی بالینی AMACR در موارد آتیپیکال که از عمده‌ترین مشکلات تشخیصی پاتولوژیک سرطان پروستات می‌باشند مورد نیاز است. هدف از این مطالعه ارزیابی کاربرد تشخیصی P504S در کشف سرطان پروستات در موارد آتیپیک و مشکل در نمونه‌های بیوپسی سوزنی و (TURP) Transurethral resection of prostate از جمله در زیر گروه نادر غدد کف‌آلود و یا در مواردی می‌باشد که با کانون‌های کوچک مشکوک در بیوپسی سوزنی مواجه می‌شویم.

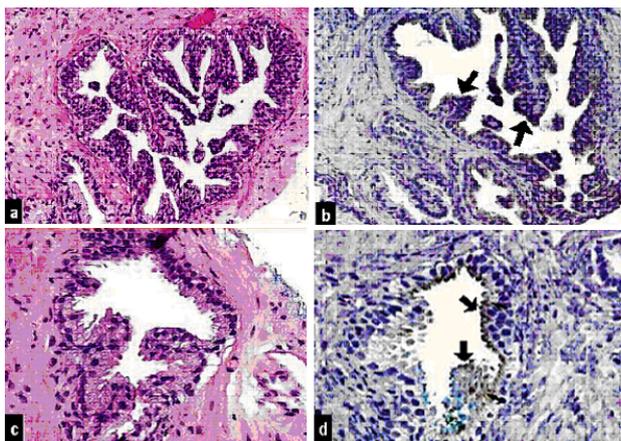
روش بررسی

از بین نمونه‌هایی که ظرف مدت دو سال در بخش پاتولوژی بیمارستان سازمان پزشکی ملی دمنهور مصر آزمایش شده بودند ۷۴

گذاشته شدند. از ۵۸ مورد باقیمانده در ۱۴ بیوپسی سوزنی یافته‌های مورفولوژیک بسیار به نفع سرطان بود (در شش نمونه از اینها یک کانون HGPIN نیز در کنار غدد کوچک آتیپیک دیده شد) و در ۴۴ مورد بقیه شواهد مورفولوژیک به نفع ضایعه خوش خیم بودند (جدول‌های ۱ و ۲). از بین ۱۴ بیوپسی سوزنی مشکوک به بدخیمی



شکل- ۱: بیوپسی سوزنی پروستات. a، یک کانون کوچک سرطان (H&E، $\times 200$). b، منفی شدن غدد آتیپیک با مارکر سلول بازال: سرطان ($\times 200$). c، رنگ‌پذیری متوسط منتشر با P504S در اکثر غدد سرطانی (پیکان: رنگ‌پذیری منفی، $\times 200$). d، غدد کوچک آتیپیک (پیکان‌ها) مشکوک به بدخیمی (H&E، $\times 200$). e، منفی شدن غدد کوچک (پیکان‌ها) با مارکر سلول بازال: سرطان ($\times 200$). f، فقدان رنگ‌پذیری غدد آتیپیک (پیکان‌ها) با P504S ($\times 200$). عدم تشخیص قطعی با P504S.



شکل- ۲: a، نمای HGPIN در بیوپسی سوزنی پروستات (H&E، $\times 400$). b، رنگ‌پذیری متوسط، منتشر و پیرامونی لبه غدد (پیکان‌ها) با P504S در HGPIN (H&E، $\times 400$). c، غدد خوش خیم پروستات در بیوپسی سوزنی (H&E، $\times 400$). d، رنگ‌پذیری موضعی و غیر پیرامونی لبه غدد خوش خیم (پیکان‌ها) با P504S ($\times 400$).

و شدت رنگ‌پذیری نیز به درجات ۱ (منفی)، ۲ (ضعیف)، ۳ (متوسط) و ۴ (قوی) درجه‌بندی شدند.^{۱۹،۱۸،۱۲} جهت ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی سلول بازال، همه نمونه‌های آتیپیک با مارکر سلول بازال 34BE12 یا 4A4 anti-P63 یا هر دو و به روش ABC رنگ‌آمیزی شدند. به دنبال پارافین‌زدایی و آب‌دهی، برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول بافر ۱۰ میلی‌مولار سیترات (PH=۶/۰) درون میکروویو قرار گرفته و سپس به ترتیب در معرض آنتی‌بادی اولیه، آنتی‌بادی بیوتینه ثانویه، ABC و سوبسترای کروموزنیک دی‌آمینو بنزیدین قرار گرفتند. آنتی‌بادی‌های اولیه و غلظت آنها عبارت بودند از (DAKO) 34BE12، 1:100 و همچنین P63، 1:100 4A4 سپس رنگ‌آمیزی زمینه با همتاکسیلین انجام شد. مارکر 34BE12 سیتوپلاسم سلول‌های بازال و مارکر P63 هسته این سلول‌ها را رنگ می‌کند. تفسیر هر دو رنگ سلول‌های بازال با استفاده از معیارهای از پیش تعیین شده انجام گرفت.^{۲۰} به‌طور خلاصه رنگ‌پذیری مثبت در مناطق مشکوک به عنوان خوش خیم تلقی شد به شرط آنکه غدد رنگ‌پذیر بخشی از ناحیه مشکوک بوده و غدد سالم به دام افتاده نباشند عدم رنگ‌پذیری غدد مشکوک نیز گویای سرطان تلقی شد به شرطی که شواهد مورفولوژیک آن‌را تأیید نمایند.

یافته‌ها

نحوه بروز P504S در سرطان پروستات: در ۳۶ نمونه (۹۰٪) از ۴۰ بیوپسی سوزنی سرطان پروستات درجاتی از رنگ‌پذیری P504S دیده شد (جدول ۱) ولی چهار نمونه فاقد رنگ‌پذیری بودند که دو نمونه آن مربوط به سرطان با سلول‌های کف‌آلود و دو نمونه دیگر مربوط به سرطان‌های کوچکی بود که کمتر از ۵٪ نمونه را تشکیل می‌داد. شدت رنگ‌پذیری در ۲۴ مورد (۶۷٪) متوسط تا قوی و در ۱۲ مورد (۳۳٪) ضعیف بود. وسعت رنگ‌پذیری در ۱۰ مورد (۲۵٪) موضعی یا ناهمگون بود. در نمونه‌هایی که دارای غدد کف‌آلود بوده یا دارای کانون‌های کوچک سرطانی بودند، فقدان رنگ‌پذیری برای مارکرهای سلول بازال موید تشخیص سرطان بود (شکل ۱، a تا c).

نحوه بروز P504S در ضایعات آتیپیک: از مجموع ۶۲ مورد شامل ۵۶ بیوپسی سوزنی و شش TURP که پرولیفراسیون آسینی‌های کوچک آتیپیک نشان می‌دادند چهار نمونه بیوپسی سوزنی به دلیل فقدان مناطق مورد نظر در برش‌های عمقی ایمونوهیستوشیمی کنار

جدول- ۱: وضعیت رنگ‌پذیری غدد آتیپیک احتمالاً خوش‌خیم و سرطان‌های قطعی پروستات با مارکر P504S

وضعیت رنگ‌پذیری سلول‌ها با مارکر P504S					تعداد	تشخیص مرفولوژیک میکروسکوپی
وسعت رنگ‌پذیری		شدت رنگ‌پذیری		منفی		
ممتشر	موضعی	متوسط تا قوی	ضعیف			
غدد کوچک آتیپیک احتمالاً خوش‌خیم						
۰	۲	۰	۲(۱۴٪)	۱۲(۸۶٪)	۱۴	هیپرپلازی آدنومی آتیپیک (AAH)
۰	۰	۰	۰	۲۲(۱۰۰٪)	۲۲	هیپرپلازی به‌دنبال آتروفی (AAH)
۰	۰	۰	۰	۴(۱۰۰٪)	۴	پرولیفراسیون غددی خوش‌خیم
۰	۰	۰	۰	۲(۱۰۰٪)	۲	هیپرپلازی سلول بازال
۰	۲	۰	۱(۵۰٪)	۱(۵۰٪)	۲	آتیپی به‌دنبال پرتوتابی
۰	۴	۰	۴(۹٪)	۴۰(۹۱٪)	۴۴	مجموع
سرطان قطعی پروستات						
۶	۴	۲(۱۷٪)	۸(۶۷٪)	۲(۱۷٪)	۱۲	کانون سرطانی کوچک (</5)
۰	۶	۲(۲۵٪)	۴(۵۰٪)	۲(۲۵٪)	۸	سرطان با سلول‌های کف آلود
۲۰	۰	۲۰(۱۰۰٪)	۰	۰	۲۰	سایر موارد سرطان پروستات
۲۶	۱۰	۲۴(۶۰٪)	۱۲(۳۰٪)	۴(۱۰٪)	۴۰	مجموع

جدول- ۲: مقایسه ارزش تشخیصی مارکر P504S و مارک‌های سلول بازال در پرولیفراسیون غدد کوچک آتیپیک پروستات

تشخیص بر اساس مارکر سلول بازال			تشخیص بر اساس مارکر P504S			تعداد	تشخیص مرفولوژیک میکروسکوپی
خوش‌خیم	نامعین	سرطان	خوش‌خیم	نامعین	سرطان		
۴۴(۱۰۰٪)	۰	-	۴۰(۹۱٪)	۴(۹٪)	-	۴۴	غدد آتیپیک احتمالاً خوش‌خیم
-	۴(۲۸/۶٪)	۱۰(۷۱/۴٪)	-	۸(۵۷٪)	۶(۴۳٪)	۱۴	غدد آتیپیک احتمالاً سرطان

در شش نمونه (۴۲/۸٪) رنگ‌پذیری ممتشر P504S و عدم رنگ‌پذیری مارکر بازال تشخیص بدخیمی را تأیید کردند. در چهار نمونه (۲۸/۶٪) غدد آتیپیک برای P504S منفی بودند که منفی بودن توام مارکر سلول‌های بازال موید تشخیص سرطان بود (شکل ۱، d تا f) و در چهار نمونه (۲۸/۶٪) که با HGPIN نیز همراهی داشتند رنگ‌پذیری ضعیف و کانونی P504S در غدد کوچک آتیپیک و همچنین رنگ‌پذیری غیریک‌نواخت و ناموزون مارکر بازال هم در غدد کوچک و هم در غدد HGPIN مانع رسیدن به تشخیص قطعی سرطان بود و لذا هیچیک از مارکرها کمکی به تشخیص نکردند (جدول ۲). از ۴۴ مورد که شواهد مورفولوژیک گویای ضایعه خوش‌خیم بودند در ۲۲ بیوپسی سوزنی (۵۰٪) تشخیص PAH داده شده بود در ۱۴ مورد (۳۱/۸٪) که شامل شش TURP بود تشخیص AAH مطرح گردیده بود و چهار نمونه (۹/۱٪) تحت عنوان پرولیفراسیون غدد آتیپیک خوش‌خیم مشخص شده بودند. دو نمونه (۴/۵٪) تحت عنوان هیپرپلازی سلول بازال و دو نمونه دیگر (۴/۵٪) به‌عنوان آتیپی ناشی

از پرتوتابی نیز در این گروه جای داشتند (جدول ۱). در تمامی این موارد رنگ‌پذیری سلول‌های بازال دیده شد که گویای خوش‌خیمی آنها بود. تمامی موارد PAH و ۱۲ مورد AAH از نظر مارکر P504S منفی بودند ولی در دو نمونه از موارد AAH (۱۴٪) رنگ‌پذیری ضعیف کانونی دیده شد. در یک بیوپسی سوزنی به‌دست آمده از بیماری که تحت رادیوتراپی قرار گرفته بود رنگ‌پذیری کانونی P504S دیده شد ولی در عین حال رنگ‌پذیری همین غدد کوچک با مارکر بازال به‌نفع خوش‌خیمی و تغییرات ناشی از پرتوتابی بود.

نحوه بروز P504S در HGPIN: از مجموع ۸۰ مورد آتیپیک، ۱۸ بیوپسی سوزنی HGPIN مشاهده شد که از این بین ۱۶ مورد آنها (۸۹٪) درجاتی از رنگ‌پذیری P504S نشان می‌دادند. در ۱۲ نمونه (۷۵٪) رنگ‌پذیری به‌صورت ممتشر، متوسط، پیرامونی و یا قطعه‌ای در لبه درون مجرای سلول‌ها مشاهده شد و در چهار نمونه (۲۵٪) رنگ‌آمیزی P504S به‌صورت کانونی و ضعیف بود (شکل ۲، a و b). نحوه بروز P504S در غدد خوش‌خیم پروستات: در مجموع ۷۶ نمونه

پروستات رنگ‌پذیری قوی گرانولار سیتوپلاسمی P504S دیدند که در ۷۵٪ آنها صرف‌نظر از درجه‌بندی گلیسون وسعت رنگ‌پذیری به‌صورت منتشر بود.^{۱۳} این گروه همچنین بروز P504S را در HGPIIN و در ۱۲٪ غدد خوش‌خیم که فقط به‌صورت موضعی یا ضعیف بود گزارش کردند. Jiang بعدها پی برد که حساسیت P504S برای کشف کانون‌های کوچک سرطان در بیوپسی‌های سوزنی کمتر (۹۴/۵٪) بوده و در هیچ‌یک از ۶۹ غده خوش‌خیم پروستات دیده نشد.^{۱۶} همچنین روبین^{۱۲} با آزمایش روی تعداد زیادی نمونه نشان دادند که در سرطان پروستات کپی برداری و پروتئین‌سازی از روی ژن AMACR افزایش می‌یابد. آنها با استفاده از یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال در ۶۸ مورد از ۷۰ نمونه بیوپسی سوزنی پروستات فعالیت شدید AMACR را مشاهده کرده و حساسیت ۹۷٪ و ویژگی ۱۰۰٪ را برای این روش بیان کردند.^{۱۲} بعدها Zhou و همکاران^{۱۹} گزارش دادند که بیان AMACR برای پروستات اختصاصی نبوده و در تعدادی از سرطان‌ها شامل کولورکتال، پستان، تخمدان و ملانوما نیز افزایش می‌یابد.^{۱۹} LUO و همکاران^{۱۱} نیز با استفاده از یک کوکتل آنتی‌بادی شامل AMACR و P63 مفید بودن AMACR را خاطر نشان کردند. آنها با استفاده از یک معیار بسیار دقیق درجه‌بندی، رنگ‌پذیری قوی AMACR را در ۸۸٪ سرطان‌های پروستات نشان دادند.^{۱۱} مطالعه آنها همچنین گویای رنگ‌پذیری اکثریت موارد HGPIIN با AMACR بود. آنها توصیه کردند جهت افتراق HGPIIN از سرطان پروستات از کوکتل آنتی‌بادی AMACR و مارکر بازال P63 استفاده شود چرا که در HGPIIN رنگ‌پذیری متغیر و نقطه‌ای سیتوپلاسمی AMACR در همراهی با رنگ‌پذیری قوی و یکنواخت هسته سلول‌های بازال مشاهده می‌گردد.^{۱۱} طبق مشاهدات ما حساسیت کلی P504S برای کشف سرطان قطعی پروستات ۹۰٪ بود. دو مورد از هشت سرطان پروستات با سلول‌های کف‌آلود و دو نمونه از ۱۲ کانون کوچک سرطانی فاقد رنگ‌پذیری بودند که در همگی در این موارد منفی بودن مارکرهای سلول بازال برفع تشخیص سرطان بود. همچنانکه Beach و همکارانش^{۱۴} در ۴۰٪ موارد مشاهده کردند بروز P504S در ۱۰ مورد از ۴۰ مورد سرطان پروستات ما (۲۵٪) به‌صورت کانونی بود. یافته‌های ما در خصوص مثبت بودن P504S در سرطان پروستات با مطالعات اخیر در این باره مطابقت دارد.^{۱۴، ۱۶} مشاهدات اخیر همچنین بیان‌کننده این هستند که سرطان پروستات با غدد کف‌آلود

مشکوک به بدخیمی که برای مارکر P504S رنگ‌آمیزی شده بودند نحوه رنگ‌پذیری غدد خوش‌خیم نیز بررسی شد که در ۲۰ مورد (۲۶٪) رنگ‌پذیری ضعیف و به‌ندرت متوسط و غیر پیرامونی در لبه غدد مشاهده شد. این الگوی رنگ‌آمیزی به‌عنوان غیر اختصاصی در نظر گرفته شد و مشکل تشخیص ایجاد نکرد (شکل ۲، c و d).

بحث

تشخیص سرطان پروستات در نمونه‌های بیوپسی سوزنی بر پایه مجموعه‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیک داده می‌شود و اگر فقط یک کانون کوچک مشکوک به سرطان در نمونه وجود داشته باشد تشخیص با مشکل مواجه می‌گردد.^{۲۰} در این گونه موارد به‌طور گسترده‌ای از مارکرهای سلول بازال مانند 34BE12 و اخیراً پروتئین هسته‌ای P63 به‌عنوان ابزار کمک تشخیصی مورفولوژیک استفاده شده است.^{۳-۶} این ابزارهای مفید محدودیت‌هایی نیز دارند. بسیاری از ضایعات آتیپیک خوش‌خیم مانند AAH، PAH و HGPIIN رنگ‌پذیری پراکنده یا متقطع نشان می‌دهند که تفسیر آنها را مشکل می‌سازد.^{۹-۷} به‌علاوه کاملاً ثابت شده است که رنگ‌پذیری 34BE12 به‌نحوه فیکساسیون با فرمالین و روش‌های ایمونوهیستوشیمیایی مانند نحوه بازایی آنتی‌ژن بسیار حساس بوده و تغییرات حاصله مانند از دست رفتن رنگ‌پذیری غدد خوش‌خیم یا رنگ‌پذیری قطعه‌ای آنها گاهی منجر به تشخیص اشتباهی سرطان پروستات در ضایعات خوش‌خیم می‌گردد.^{۱۱} لذا بسیاری از پاتولوژیست‌ها اکراه دارند که یک تشخیص مثبت سرطان را بر پایه یک واکنش منفی ایمونوهیستوشیمی مطرح سازند. در جستجو برای یافتن یک بیومارکر قابل اعتماد و اختصاصی برای سرطان پروستات، AMACR توجه فراوانی را برانگیخته و دورنمای یک بیومارکر بافتی عالی را به نمایش می‌گذارد. تجزیه و تحلیل آماری دیفرانسیل به‌دست آمده از نحوه بروز چهار ژن در سرطان پروستات نشان‌دهنده این است که ژن AMACR که در بافت خوش‌خیم پروستات بیان نمی‌شود در سرطان به‌طور ثابت بروز می‌یابد.^{۱۱-۱۲} Jiang و همکاران^{۱۳} نشان دادند P504S که یک آنتی‌بادی مونوکلونال برای AMACR است یک مارکر حساس و اختصاصی برای سرطان پروستات بوده و می‌توان آن‌را به روش‌های معمول ایمونوهیستوشیمی بر روی برش‌های بافتی فیکس شده با فرمالین و پارافین اندود به‌کار برد. این گروه در تمامی موارد قطعی سرطان

نشان دادند. Yang و همکاران^{۱۵} در بررسی ۴۰ مورد AAH دریافتند که رنگ‌پذیری P504S در ۷/۵٪ موارد به صورت منتشر و در ۱۰٪ موارد به صورت موضعی وجود دارد. Jiang و همکاران^{۱۳} نیز بروز ضعیف P504S را در ۲۷٪ موارد AAH گزارش کردند. در مطالعه حاضر دو مورد از ۱۴ نمونه AAH (۱۴٪) بروز موضعی P504S را نشان دادند که با این اعتقاد که بخش کوچکی از موارد AAH ممکن است P504S را بروز دهند توافق دارد. همگی موارد PAH و هیپریلازی سلول بازال برای P504S منفی بودند. از ۱۸ مورد HGPIN ۱۶ مورد (۸۹٪) رنگ‌پذیری P504S را به صورت منتشر، متوسط، پیرامونی یا بخشی از لبه داخل مجرای نشان دادند. محققین دیگر بیان بیشتر AMACR را در HGPIN یافته‌اند.^{۱۱-۱۴، ۲۴} ما در ۲۶٪ غدد خوش خیم پروستات (۲۰ مورد از ۷۶ نمونه) رنگ‌پذیری غیرپیرامونی و موضعی لبه داخلی مجرای را با P504S مشاهده کردیم. بیان P504S توسط غدد خوش خیم در همگی مشاهدات اخیر^{۱۱، ۱۳، ۱۴} تقریباً همیشه به صورت موضعی و ضعیف بوده است که هیچ مشکل تشخیصی پدید نمی‌آورد. ما بر این باوریم که نیاز به یک مارکر بسیار حساس و اختصاصی برای سرطان پروستات هنوز پایان نیافته است. این مطالعه نشان داد که در صورت استفاده از P504S به تنهایی در ۱۰٪ بیوپسی‌های سوزنی که حاوی سرطان قطعی پروستات بودند (چهار مورد از ۴۰ مورد) و همچنین در ۲۹٪ موارد پرولیفراسیون غدد کوچک آتیپیک مشکوک به بدخیمی (چهار مورد از ۱۴ مورد) وجود سرطان پروستات نادیده گرفته می‌شود. این پدیده تاحدی با بروز ناهمگون P504S که به کرات در سرطان پروستات مشاهده می‌گردد قابل توجه است. انتخاب نوع آنتی‌بادی مصرفی نیز می‌تواند عامل مهمی باشد. در برخی مطالعات که به مقایسه P504S مونوکلونال با AMACR پلی‌کلونال پرداخته‌اند مشاهده شده که آنتی‌بادی پلی‌کلونال حساسیت کشف سرطان پروستات را بهبود می‌بخشد.^{۲۵، ۲۶} ولی افزایش حساسیت با افزایش نسبی رنگ‌پذیری در غدد خوش خیم نیز همراه است. این مطالعه همچنین بر این واقعیت تاکید دارد که بروز P504S بایستی با نتایج مورفولوژیک نیز همخوانی داشته و در همراهی با مارکرهای سلول بازال تفسیر گردد. تفسیر رنگ‌پذیری P504S در همراهی با مارکرهای سلول بازال مانند پروتئین هسته‌ای P63 همچنانکه Luo و همکارانش^{۱۱} نیز اظهار داشتند می‌تواند ویژگی و اطمینان تشخیصی سرطان پروستات را افزایش دهد. در بیوپسی‌های

احتمالاً P504S را به مقدار بسیار کمتری بروز می‌دهد.^{۲۲-۲۳} در این مطالعه دو نمونه از هشت سرطان با غدد کف‌آلود (۲۵٪) برای P504S منفی بودند، چهار نمونه (۵۰٪) رنگ‌پذیری ضعیف نشان دادند و در دو نمونه دیگر (۲۵٪) رنگ‌پذیری متوسط تا قوی مشاهده شد. همچنین در سرطان‌های بد متمایز شده مانند سرطان‌های مقاوم به هورمون درمانی یا گروه کوچکی از سرطان‌های با گرید بالا و محدود به پروستات بروز ژن AMACR کاهش نشان می‌دهد.^{۱۲، ۱۸} این موضوع در بررسی پروتئین P504S به کمک ایمونوهیستوشیمی تأیید شده است.^{۱۲، ۱۸} این یافته‌ها گویای این هستند که صرف نظر از کیفیت آنتی‌بادی، کاهش بروز پروتئین در گروهی از سرطان‌های پروستات ممکن است کاربرد P504S یا سایر آنتی‌بادی‌ها بر علیه AMACR را محدود سازد. توانایی حل کردن معضل تشخیصی سرطان پروستات در موارد پرولیفراسیون غدد کوچک آتیپیک بیشترین ارزش یک مارکر به‌شمار می‌رود. در این مطالعه چهار نمونه از ۱۴ بیوپسی سوزنی آتیپیک (۲۹٪) فاقد رنگ‌پذیری P504S بودند یعنی این مارکر نتوانست مشکل تشخیصی را حل کند ولی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و همچنین فقدان رنگ‌پذیری سلول بازال، این غدد به‌عنوان سرطان پروستات طبقه‌بندی شدند و تشخیص سرطان متعاقب رادیکال پروستاتکتومی تأیید شد. این امر گویای محدودیت کاربرد بیومارکر P504S به تنهایی در ضایعات آتیپیک پروستات است. به رغم استفاده از هر دو مارکر سلول بازال و P504S در شش مورد دارای غدد کوچک در مجاورت HGPIN، فقط در دو مورد تشخیص قطعی داده شد. در هر دو این موارد رنگ‌پذیری منتشر P504S هم در غدد کوچک و هم در HGPIN دیده شد و مارکر بازال P63 در غدد کوچک منفی بود و لذا تشخیص سرطان در غدد کوچک را مسجل ساخت. واقعیت این است که در چنین مواردی P504S به تنهایی نمی‌تواند به این سؤال پاسخ گوید که آیا غدد کوچک در حاشیه HGPIN حاصل جوانه‌های کناری HGPIN و احیاناً "برش خوردن مایل غدد هستند و یا واقعاً سرطانی‌اند چرا که در هر دو مورد P504S مثبت است. در چنین مواردی توأم بودن رنگ‌پذیری منتشر P504S با فقدان رنگ‌پذیری مارکر بازال P63 در غدد کوچک تشخیص سرطان پروستات را قطعی می‌سازد. از بین ۴۴ نمونه آتیپیک که مورفولوژی به نفع خوش خیمی داشتند یک بیوپسی سوزنی متعاقب رادیوتراپی و دو بیوپسی سوزنی دارای AAH رنگ‌پذیری ضعیف موضعی P504S

AAH و به‌ندرت غدد آتیپیک ناشی از پرتوتایی ممکن است رنگ‌پذیری P504S نشان بدهند. از آنجایی که آنتی‌بادی مونوکلونال P504S در دسترس بوده، اعتبارسنجی کاربرد تشخیصی آن در پاتولوژی عملی توسط مراکز مختلف از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. ما استفاده از P504S را در کنار آزمایش مرفولوژیک و مارکرهای سلول بازال توصیه می‌کنیم. از راهنمایی‌های ارزنده اساتید انکولوژیک پاتولوژی انستیتوی ملی سرطان مصر دکتر نایرا انور عبدالحمید و دکتر نادیا محمودمختار سپاسگزاری نمایم.

References

- Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstralh EJ, Oesterling JE, Ohrt D, Klee GG, et al. Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *JAMA* 1995; 274: 1445-9.
- Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994; 151: 1283-90.
- Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res* 1985; 45: 3663-7.
- O'Malley FP, Grignon DJ, Shum DT. Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 417: 191-6.
- Shah RB, Zhou M, LeBlanc M, Snyder M, Rubin MA. Comparison of the basal cell-specific markers, 34betaE12 and p63, in the diagnosis of prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1161-8.
- Wojno KJ, Epstein JI. The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 beta E12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 251-60.
- Bostwick DG, Srigley J, Grignon D, Maksem J, Humphrey P, van der Kwast TH, et al. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma. *Hum Pathol* 1993; 24: 819-32.
- Bostwick DG, Algaba F, Amin MB, Ayala A, Eble J, Goldstein N, et al. Consensus statement on terminology: recommendation to use atypical adenomatous hyperplasia in place of adenosis of the prostate. *Hum Pathol* 1994; 25: 840.
- Gaudin PB, Reuter VE. Benign mimics of prostatic adenocarcinoma on needle biopsy. *Anat Pathol* 1997; 2: 111-34.
- Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, et al. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res* 2000; 60: 1677-82.
- Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 2220-6.
- Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287: 1662-70.
- Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, et al. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1397-404.
- Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG, et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1588-96.
- Yang XJ, Wu CL, Woda BA, Dresser K, Tretiakova M, Fanger GR, et al. Expression of alpha-Methylacyl-CoA racemase (P504S) in atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 921-5.
- Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Dresser K, Xu J, Fanger GR, et al. P504S/alpha-methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1169-74.
- Rubin MA, Dunn R, Kambham N, Misick CP, O'Toole KM. Should a Gleason score be assigned to a minute focus of carcinoma on prostate biopsy? *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1634-40.
- Kuefer R, Varambally S, Zhou M, Lucas PC, Loeffler M, Wolter H, et al. alpha-Methylacyl-CoA racemase: expression levels of this novel cancer biomarker depend on tumor differentiation. *Am J Pathol* 2002; 161: 841-8.
- Zhou M, Chinnaiyan AM, Kleer CG, Lucas PC, Rubin MA. Alpha-Methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 926-31.
- Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Hum Pathol* 1995; 26: 223-9.
- Varma M, Morgan M, Amin MB, Wozniak S, Jasani B. High molecular weight cytokeratin antibody (clone 34betaE12): a sensitive marker for differentiation of high-grade invasive urothelial carcinoma from prostate cancer. *Histopathology* 2003; 42: 167-72.
- Chen L, Jiang Z, Woda BA. Decreased expression of alpha-Methylacyl-CoA-racemase in foamy gland carcinoma of prostate. *Mod Pathol* 2003; 16: 145.
- Zhou M, Jiang Z, Epstein JI. Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 772-8.
- Gupta N, Peralta-Venturina M, Gown A. P504S antibody expression in putative precursor lesions of prostate carcinoma: high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Mod Pathol* 2003; 16: 152.
- Kunju LP, Rubin MA, Shen R. Comparison of monoclonal antibody (P504S) and polyclonal antibody to alpha-Methylacyl-CoA racemase in benign, atypical and malignant prostate tissues. *Mod Pathol* 2003; 16: 718.
- Kunju LP, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Shah RB. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody P504S in the workup of atypical prostatic glandular proliferations. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 737-45.

P504S marker for diagnosis of prostatic atypical glandular proliferation

Abstract

Shalaby A. M. R.¹
AbdAllah Koreim U.²
Ahmadi S.A.^{*3}

1- Department of Oncologic
Pathology Damanhour
National Medical Institute,
Ejypt

2- Department of Urology
Damanhour National Medical
Institute, Ejypt

3- Department of Pathology
Tehran University of Medical
Sciences

Background: Transrectal ultrasonography guided needle biopsy of prostate frequently used for early detection of cancer has faced the pathologists with a major diagnostic challenge. In recent years P504S has been used as a tumor cell marker for definitive diagnosis of prostatic cancer in small biopsy specimens.

Methods: 70 prostate needle biopsies and 6 transurethral resections (TURP) containing atypical foci as well as 40 morphologically unequivocal prostate cancer biopsies, including 8 with foamy features, were stained with P504S.

Results: 36 specimen out of 40 biopsies with unequivocal cancer, showed variable P504S staining (sensitivity, 90%); 2 minute cancer and 2 foamy cancer lacked P504S staining. of 76 cases with atypical foci (70 biopsies, 6 TURP), 18 were diagnosed as high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) - 16 of them showing diffuse moderate P504S staining - and 58 had foci of atypical small acinar proliferation. 14 of the latter cases were highly suggestive of cancer, 4 of which lacked P504S staining. In 44 cases with benign atypical foci, 2 out of 14 cases with atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and 1 of 2 post-radiation atypias showed focal weak P504S staining with remaining 28 cases being negative.

Conclusions: P504S has slightly lower sensitivity for detection of prostate cancer than that found previously. Heterogeneous expression patterns may explain negativity in some biopsy specimens with minute cancer. In atypical small acinar proliferations, diffuse positive P504S staining in atypical glands strongly supports cancer diagnosis, but negative staining does not exclude it. P504S seems to have low sensitivity for detecting minute and foamy prostate cancers. Most HGPINs show diffuse moderate P504S staining. AAH and benign glands may show focal P504S staining. We recommend using P504S along with morphologic examination and conventional basal cell markers.

Keywords: Prostatic neoplasms, immunohistochemistry, P504S

*Corresponding author: Sina
hospital, Hassan Abad square,
Tehran 11367, Iran
Tel: +98-21-66701041-9
email: ahmadise@tums.ac.ir