

بررسی پاتولوژیک منژریوم با مارکرهای *ki 67* و *p53* در مراجعین به بیمارستان شهدای تجریش

مصطفی شیروی خوزانی^{*}، افشین مرادی^۲، سید فرید صولت یکانی^۱، زهرا مجید^۳

^۱ دپارتمان پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۳ مرکز تحقیقات ایمونوپاتولوژی، واحد پردیس، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: منژریوم شایع‌ترین تومور سیستم عصبی مرکزی است و با توجه به اهمیت بیماری و گزارشی از همراه بودن آن با مارکرهای *ki 67* و *p53* و گزارش تنها یک مورد از وضعیت آن در کشور و به منظور تعیین پروگنوز بهتر منژریوم با استفاده از مارکرهای *ki 67* و *p53* این تحقیق روی مراجعین بیمارستان شهدای تجریش در سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۵ انجام شد.

روش برسی: تحقیق با روش مقطعی روی کلیه نمونه‌های با تشخیص قطعی منژریوم انجام گرفت. تشخیص قطعی با پاتولوژی بوده و طبقه‌بندی منژریوم بر حسب گرید آنها و مطابق با معیار گریدینگ سال ۲۰۰۷ سازمان بهداشت جهانی با روش ریزآرایه بافتی بر روی بلوک‌های پارافینی انجام گرفت، به این ترتیب که روی تنها یک اسلاید شیشه‌ای تعداد زیادی از قطعات سوزنی تومورهای با گریدهای مختلف از روی بلوک‌های پارافینی قرار گرفت و مارکرهای *ki 67* و *p53* با روش ایمونوھیستوشیمی بررسی گردید. میزان رنگ‌آمیزی دو مارکر بر اساس تعیین درصد سلول‌های رنگ شده و شدت رنگ آمیزی با مارکر توصیفی بررسی گردید.

یافته‌ها: از ۱۹ تومور واجد شرایط، ۴۳٪ گرید یک، ۴۶٪ گرید سه، ۳٪ گرید دو، ۳٪ گروه منژریوم با نمای آتیپیک و ۳٪ منژریوم با تهاجم به مغز بودند. میانگین *p53* در گرید یک، ۳۱٪ در گرید دو، ۵۷٪ در گرید سه، ۶۰٪ در منژریوم با نمای آتیپیک ۴۷٪ و در منژریوم با تهاجم به مغز ۶۵ بود ($P=0.017$). در مورد شاخص *ki 67* میانگین آن در گرید یک در گرید دو ۳۳٪، در گرید سه ۲۲٪، در منژریوم با نمای آتیپیک ۱۰٪ و در موارد با تهاجم به مغز ۲۰ بود ($P=0.032$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ارتباطی بین *ki 67* و گرید منژریوم وجود داشته باشد. انجام مطالعات تحلیلی و متعاقب آن بررسی‌های تجربی را توصیه می‌نماییم.

واژگان کلیدی: منژریوم، *ki 67*، *p53*، تکنیک ریزآرایه بافتی.

مقدمه

وفور در ایران دیده می‌شود. ۹۳٪ موارد گرید I (خوش خیم)، ۵٪ گرید II (آتیپیک) و ۲٪ گرید III (آنالپاستیک) می‌باشند (۲). طبقه‌بندی گرید منژریوم طبق ۲۰۰۷ WHO براساس یافته‌های هیستولوژیک تومور می‌باشد. یافته‌های هیستولوژیک ماهیت رفتار تومور را مشخص می‌کنند، ولی همیشه ارتباط قطعی با پروگنوز بیماری ندارند. تعدادی از منژریوم‌های گرید I با وجود خارج سازی کامل تومور به وسیله جراحی، عود

منژریوم تومور برخاسته از سلول‌های مننگوتیال منژر، اغلب خوش خیم، با رشد آهسته و حدود مشخص است (۱،۲). منژریوم از شایع‌ترین تومورهای سیستم عصبی است که به

آدرس نویسنده مسئول: تهران، سعادت آباد. خ سرو شرقی. خ ۸، پ. ۱۵، واحد، مصطفی شیروی خوزانی (masy_shiravi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۵/۱۲

مواد و روشها

تحقیق به روش مقطعی بر روی کلیه بلوک‌های پارافینی مبتلایان به منژیوم انجام گرفت. لیست ۱۵ سال اخیر بیماران مبتلا به منژیوم داخل جمجمه‌ای با مراجعه به دفاتر ثبت موجود در مرکز پزشکی شهرداری تجریش استخراج و سپس اطلاعات مربوط به مشخصات بیماران، موقعیت آناتومیک ضایعه و نتیجه پاتولوژی بررسی شد. ۳۹ عدد گرید ۴۰، ۲ عدد گرید ۳، ۴ عدد منژیوم خوش خیم با نمای آتیپیک و ۳ عدد منژیوم با تهاجم به مغز بودند. تمامی اسلایدهای شیشه‌ای (لام) مورد بازبینی قرار گرفته و پس از تأیید تشخیص آنها، مناسب‌ترین محل تومور جهت بررسی بر روی اسلاید شیشه‌ای علامت گذاری شده و پس از مطابقت همان نقطه بر روی بلوک پارافینی، با استفاده از دستگاه ریز‌آرایه بافتی (TMA) قطعه سوزنی کوچکی از تومور را از بلوک پارافینی برداشت و روی بلوک پارافینی خالی قرار دادیم. جهت صحت بیشتر از هر تومور سه نقطه تهیه شد. بدین ترتیب دهها تا صدها نمونه ریز از تومورهای مختلف تنها بر روی یک بلوک پارافینی خالی قرار گرفت و از آنها تعداد محدودی لام جهت رنگ آمیزی هر مارک ایمونوهیستوکمیکال (IHC) مورد نظر، مطابق دستور کیت، تهیه شد. در نتیجه علاوه بر صرفه جویی در مواد IHC امکان مقایسه همزمان ساب‌تاپ‌ها و گریدهای مختلف تومور میسر شد. در نهایت با مشاهده زیر میکروسکوپ نوری میزان شدت و وسعت رنگ پذیری هر یک از مارک‌ها بر روی نمونه‌های مختلف توموری ثبت و با هم مقایسه شد (شکل ۱).

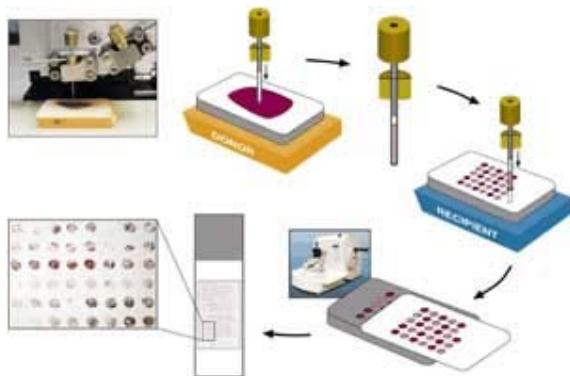


Figure 1

شکل ۱- نمای کلی از نحوه تهیه TMA. نمونه‌های ریز بافتی از بلوک پارافینی بافت دهنده برداشته شده و در یک بلوک پارافینی گیرنده به

کرده‌اند. تلاش‌های بسیاری بر روی بررسی نقش مارک‌های ایمنوهیستوشنیمیایی مختلف جهت پیش‌بینی رفتار واقعی این تومورها انجام گرفته است (۲). تاکنون مطالعات اندکی بر روی P₅₃ و Ki₆₇ بر روی گریدهای مختلف تومور منژیوم (بر اساس WHO) انجام گرفته است. از آنجا که هر یک از این مارک‌ها در تعدادی از انواع دیگر سرطان‌های انسانی نقش پروگنوستیک اثبات شده داشته‌اند، در صورت معنی‌دار بودن تغییرات بروز و شدت این مارک‌ها با تغییر گرید تومور می‌توان رفتار واقعی تومور را پیش‌بینی کرد و حتی از آنها به عنوان یکی از کرایتریاًی گریدینگ تومور و همچنین معیاری جهت ارزیابی تهاجم مغزی تومور، فاکتور پروگنوستیک استفاده کرد.

(MIB-1)Ki-67 شاخص تکثیر سلولی سلول‌های تومورال است که افزایش میزان آن ارتباط واضحی با سیر تهاجمی تومور در بسیاری از تومورهای انسانی دارد. در منژیوم‌های گرید بالا، اندکس Ki₆₇ بالاتری دیده شده است (۲)، که این خود می‌تواند به عنوان یکی از معیارهای گریدینگ منژیوم علاوه بر معیارهای WHO 2007 مدنظر قرار گیرد. افزایش بروز موتاسیون P₅₃ (زن سرکوب کننده تومور) نیز در بسیاری از تومورهای انسانی حاکی از رفتار تهاجمی تومور و پروگنوز بدتر برای بیمار است (۲).

در ایران تنها یک مطالعه بر روی گریدهای یک تا سه منژیوم و مارک 67 ki توسط نسرین شایانفر در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت (۱) که با توجه به عدم کفايت اطلاعات و به منظور بررسی وضعیت گریدهای مختلف منژیوم و همچنین موارد با تهاجم به مغز این مطالعه انجام گرفت.

با توجه به اینکه تکنیک ایمونوهیستوکمیکال (IHC) که در حال حاضر به طور روتین در بخش‌های پاتولوژی بر روی تومور انجام می‌گیرد، برای هر مارک به طور جداگانه احتیاج به تهیه یک اسلاید شیشه‌ای (لام) از هر تومور دارد، می‌توان با استفاده از روش ریز‌آرایه بافتی یا Tissue Micro Array (TMA) زیادی (دهها تا صدها) نمونه ریزبافتی از تومورهای مختلف را بر روی یک اسلاید شیشه‌ای جهت آنالیز همزمان آنها استفاده کرد. از مزایای TMA در مقایسه با بلوک‌های مرسوم، امکان استفاده بیشتر بافت در مطالعات مختلف، همگونی، تکرارپذیر بودن (Reproducibility) نتایج آزمایشات، همچنین صرفه جویی در مواد مصرفی و آنالیز سریع‌تر و صحیح بافت‌ها می‌باشد.

بررسی پاتولوژیک منژیوم با مارکرهاي ki 67 و p53

منژیوم با نمای آتیپیک ۱۰/۷۸ و در موارد با تهاجم به مغز بود (p=۰/۰۳۲) (جدول ۲).

طور منظم چیده شد. بلوك پارافیني جديد با ميكروتون برش نازك به قطر ۵ ميكرومتر زده شده و روی لام قرار گرفت.

جدول ۱- ميانگين و انحراف معيار p53 در گريدهاies مختلف

ميانگين \pm انحراف معiar	تعداد	GRADE
۳۱/۲۸ \pm ۴۳/۸۸	۳۹	I
۵۷/۷۷ \pm ۶۰/۰۷	۴۰	II
۶۰ \pm ۳۴/۶۴	۳	III
۴۷/۵ \pm ۳۲/۲۷	۴	1/A
۶۵ \pm ۳۵	۳	I+INV
۴۶/۰۲ \pm ۵۱/۹۵	۸۹	Total

جدول ۲- ميانگين و انحراف معيار ki 67 در گريدهاies مختلف

ميانگين \pm انحراف معiar	تعداد	GRADE
۷/۴۷ \pm ۱۲/۲۲	۳۹	I
۲۳/۵۱ \pm ۴۶/۶۸	۴۰	II
۲۲/۵ \pm ۳۲/۶۹	۳	III
۱۰/۷۸ \pm ۱۵/۱۵	۴	1/A
۲۰ \pm ۳۰/۴۱	۳	I+INV
۲۰/۲۵ \pm ۳۵/۲۲	۸۹	Total

بحث

این تحقیق نشان داد که بین گريدهاies تومور با مارکر ki 67 ارتباطی وجود دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ توسط JeetVishwa انجام گرفت نشان داده شد که اغلب منژیوم‌های خوش‌خیم (گرید یک) ki 67 پایینی (۱/۵) داشتند و آناپلاستیک منژیوم‌ها (گرید سه) شاخص ki 67 بالا (۱۹/۵) داشتند (۴). البته در این مطالعه تومورهای با نمای آتیپیک و موارد با تهاجم به مغز مورد بررسی قرار نگرفتند. در مطالعه ما نیز ميانگين بيان ki 67 در تومورهای گرید يك در مقاييسه با گريدهاies دو و سه دارای کاهش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۳۲)، ولی تفاوتی بین گريدهاies دو، سه و با نمای آتیپیک و با تهاجم به مغز مشاهده نشد که می‌تواند ناشی از حجم کم نمونه مطالعه ما باشد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط نسرين شايانيفر در سال ۲۰۰۹ در تهران بر روی ۷۰ مورد تومور منژیوم گريدهاies يك تا سه انجام گرفت، ميزان بيان ki 67 در گرید سه به طور معنی‌داری بالاتر بود و ارتباط معکوس بين تغييرات ki 67 با

رنگ آميزی P53 و Ki-67 به صورت هسته‌ای در سلول‌های تومورال می‌باشد. تخمين درصد سلولهایی که هسته آنها رنگ شده نسبت به کل سلول‌های تومورال در ۱/HPF ۱ که معادل با کل مساحت نقطه مربوط به تومور در بلوك پارافیني TMA می‌باشد به عنوان درصد (Percentage) (۰-۱۰۰) و تخمين شدت رنگ پذيری هر هسته به عنوان شدت (Intensity) (۱-۳) برای هر چهار مارکر گفته شده است. در نهايیت از حاصل ضرب percentage H.score به دست آمد (۳) و ميانگين H.score intensity هر سه نقطه از يك تومور (در ۳ بلوك پارافیني TMA) به عنوان H.score نهايی اين مارکر در يك مورد توموري گزارش شد. H.score نسبت به intensity يا H.score به عندهنهایي از نظر ايمونوپاتولوژيست‌ها معيار بهتری از بيان مارکر در سلول‌های توموري می‌باشد. زيرا در ۳ ناحيه بررسی شده از هر تومور، ممکن است شدت یا درصد هسته‌های رنگ گرفته متفاوت باشد. اين روش از نظر حساسیت و اختصاصیت مشابه روش قبل می‌باشد و مزیت آن صرفه‌جویی در هزینه‌ها و امكان مقایسه همزمان گريدهاies تومور است (۳). سه پاتولوژيست به صورت جداگانه گرید تومور را مورد بازبینی قرار داده و همچنین شدت بيان دو مارکر را گزارش کردند و جهت پایاپی اين عمل پس از يك هفته مجدد تکرار شد. روايی گريدينگ تومور مطابق معيار WHO ۲۰۰۷ انجام شد. پس از تائيد کردن گرید بيماري و مشخص کردن شدت و وسعت بيان مارکرها (H.score)، ميزان H.score در گريدهاies مختلف منژیوم و همچنین موارد با تهاجم به مغز تومور با آزمون kruskal wallis مورد قضاوت باليني قرار گرفت.

يافته‌ها

از ۸۹ تومور، ۳۹ عدد آنها در گرید يك، ۴۰ عدد در گرید دو، سه عدد در گرید سه، ۴ عدد آنها با نمای آتیپیک و ۳ عدد آنها دارای تهاجم به مغز بودند. ميانگين p53 در گريدهاies ۳۱/۲۸، در گرید دو ۵۷/۷۷، در گرید سه ۶۰، در منژیوم با نمای آتیپیک ۴۷/۵ و در منژیوم با تهاجم به مغز ۶۵ بود (p=۰/۰۸۷) (جدول ۱). در مورد شاخص ki 67، ميانگين آن در گرید يك ۷/۴۶، در گرید دو ۳۳/۵، در گرید سه ۲۲/۵، در

امید است با انجام مطالعات تحلیلی از نوع کوهورت یا کارآزمایی بالینی و همچنین حجم بیشتری از گریدهای مختلف منژیوم نتایج بهتری حاصل گردد.

در مورد مارکر p53، این تحقیق نشان داد که گریدهای تومور با مارکر p53 ارتباطی ندارند. در بین مطالعات انجام شده بر روی بیان p53 در منژیوم تاکنون نتیجه مشابه با مطالعه ما حاصل نشده که احتمالاً ناشی از حجم کم نمونه این مطالعه است.

در بررسی که توسط M Johnson و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ۹۶ مورد منژیوم با گریدهای مختلف انجام شد، حدود ۱۰٪ از گریدهای یک و دو به صورت ضعیف برای P53 رنگ گرفتند، ولی تومورهای گرید سه به شدت با این مارکر رنگ شدند (۶). البته در این مطالعه، تنها از معیار شدت رنگ برای بیان مارکر استفاده شده بود، نه H.score.

سلول‌های تومورال رنگ شده را لاحظ نکرده بود.

در مطالعه Vishwa Jeet در سال ۲۰۰۱ که بر روی ۱۰۰ مورد منژیوم گرید یک تا سه انجام شد، ۱۵٪ از تومورهای گرید یک p53 را نمایان کردند، در حالی که تمام آنپلاستیک p53 منژیوم‌ها از نظر p53 مثبت بودند (۴). در این مطالعه

تنها به صورت وجود یا عدم وجود بررسی شد.

در تحقیق ما ارتباط آماری معنی‌داری بین بیان p53 و گرید تومور مشاهده نشد ($P=0.04$)، با این حال میانگین بیان p53 همچنان در تومورهای با تهاجم به مغز و گریدهای دو و سه بیشتر از گرید یک بود. حجم کم نمونه به ویژه در گریدهای بالای تومور و با تهاجم به مغز در این مطالعه از نقاط ضعف آن و بررسی کمی مارکر به صورت H.score که امکان مقایسه بین تومورهای p53 مثبت را ممکن می‌سازد از نقاط قوت آن است.

P53 مارکر سرکوب کننده تومور است که نقش آن در تعدادی از سرطان‌های انسانی به ویژه پستان اثبات شده است که جهش در زن آن باعث مهار سرکوب تومور و در نتیجه رشد و تکثیر بیشتر آن می‌شود (۲).

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که به نظر می‌آید، برخلاف سرطان پستان، در منژیوم ارتباطی بین p53 و گرید تومور وجود ندارد.

پیشنهاد می‌شود با توجه به حجم کم تومورهای با گرید بالا در مطالعه ما، مطالعات گسترده و ترجیحاً تحلیلی جهت دستیابی به نتایج صحیح‌تر انجام می‌شود.

افزایش گرید تومور دیده شد (۱). ولی متساقنده در این مطالعه موارد با تهاجم به مغز و نمای آتیپیک تومور مورد بررسی قرار نگرفت.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط L-Hardell و همکاران طی سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۸ بر روی ۸۰ مورد منژیوم با گریدهای مختلف و نمای آتیپیک و تهاجم به مغز انجام شد مشاهده شد که میزان KI 67 با افزایش گرید تومور افزایش می‌یابد و این تفاوت بین گرید یک تومور با گریدهای دو و سه واضح است، در حالی که تفاوت آماری معنی‌داری از نظر بیان آن بین گریدهای دو و سه دیده نشد. همچنین موارد با تهاجم به مغز دارای KI 67 بالاتری بودند (۵). مزیت این مطالعه وسیع، انجام آن روی همه موارد تومور بود. در مطالعه ما نیز بیان KI 67 در گرید یک با میانگین ۷/۴۶ کمتر از گریدهای دو با میانگین ۳۳/۵ و سه با میانگین ۲۲/۵ بود ($P=0.032$).

در مطالعاتی که توسط نسرین شایانفر و Vishwa Jeet انجام شد، شاخص KI در منژیوم‌های گرید سه بالاتر از گرید دو بود (۱،۴)، ولی در مطالعه ما بین گریدهای دو و سه در بیان این مارکر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که احتمالاً ناشی از حجم کم نمونه گریدهای دو و سه ما و همچنین موارد با نمای آتیپیک و تهاجم به مغز است.

با توجه به شیوع زیاد تومور منژیوم، عدم کفایت حجم نمونه بررسی شده، به ویژه گرید تومور، در مطالعه ما و همچنین استفاده از نمونه‌های تنها یک بیمارستان از نقاط ضعف این مطالعه می‌باشد.

در این مطالعه سعی به فراهم سازی تمهدیاتی جهت مقایسه بیان مارکر بین گریدهای مختلف منژیوم و همچنین موارد با تهاجم به مغز شد تا شاید بتوان از این مارکر علاوه بر معیارهای گریدینگ WHO جهت بررسی رفتار واقعی تومور در پیشرفت به سمت گرید بالاتر، عود و یا تهاجم به مغز استفاده کرد.

KI 67 یک معیار پرولیفراسیون سلولی است که نشانه‌ای از تکثیر سلول‌های تومورال است. هر چه گرید تومور بالاتر باشد، سرعت رشد تومور و امکان عود آن بیشتر است. زیرا درصد بیشتری از سلول‌های تومور در حال میتوуз و در فاز تکثیر هستند (۲).

در نتیجه به نظر می‌رسد که بیان پایین مارکر KI 67 در منژیوم حاکی از رفتار بهتر تومور می‌باشد و میزان بیان بالای آن در گریدهای بالاتر تومور یا تهاجم به مغز بوده و می‌تواند به عنوان یک فاکتور پروگنوستیک منفی رفتار کند که در این موارد نیاز به پیگیری دقیق‌تر تومور توسط پزشک معالج است.

دانشگاه علوم پزشکی ایران واحد پرديس و همچنین جناب آقای مهندس ولایي، مشاور آمار، تشکر و قدردانی می شود.
اين مطالعه برگرفته از پایان نامه است.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه استاد گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، همکاران مرکز تحقیقات ایمونوپاتولوژی

REFERENCES

- 1.de Robles P, McIntyre J, Kalra S, Roldán G, Cairncross G, Forsyth P, et al. Methylation status of MGMT gene promoter in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 187:25-27.
- 2.Robinson JC, Challa VR, Jones DS, Kelly DL Jr. Pericytosis and edema generation: a unique clinicopathological variant of meningioma. *Neurosurgery* 1996; 39:700-706.
- 3.Thompson J A. Semi quantitative IHC, Techniques and the value in pathology. *Med Pathol* 1992;31:611-27
- 4.Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Nishisaka T, Fukuvara T, et al. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 2001; 32:970-75.
5. Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K. Pooled analysis of two case-control studies on the use of cellular and cordless telephones and the risk of benign brain tumours diagnosed during 1997-2003. *Int J Oncol* 2006; 28:509-18.
- 6.Jääskeläinen J, Haltia M, Laasonen E, Wahlström T, Valtonen S. The growth rate of intracranial meningiomas and its relation to histology. An analysis of 43 patients. *Surg Neurol* 1985; 24:165-72.