

## بررسی بیان مارکرهای سیکلو اکسیژناز II و p-53 و ارتباط آن ها با بقاء ۵ ساله در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین

دکتر عفت عبدلی\*، دکتر علیرضا راستگوی حقی\*\*، دکتر سعادت ترابیان\*\*\*

دریافت: ۹۰/۹/۶ ، پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۶

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** لنفوم هوچکین حدوداً یک درصد همه کانسرها را شامل می شود. سیکلو اکسیژناز ۲ (COX2) آنزیم سیتوپلاسمی است. انکوژن ها و فاکتور رشد باعث بیان بیش از حد COX2 می شوند. COX2 مهار کننده آپوپتوز است. جهش در ژن سرکوب کننده تومور p53 شایعترین تغییر ژنتیکی در بین تومورهای انسانی است. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی COX2 و p53 و مقایسه بیان آن در بین انواع مختلف زیرگروههای لنفوم هوچکین و بررسی بقاء ۵ ساله انجام شده است.

**روش کار:** در این مطالعه توصیفی مقطعی ۶۲ مورد لنفوم هوچکین از انواع مختلف نمونه های سنجش آسیب شناسی بیمارستانهای همدان قبل از سال ۱۳۸۴ مورد بررسی قرار گرفتند ، در مورد هر نمونه سن، جنس و زیر گروه تومور ثبت شد. بیان p53 و COX2 به روش ایمونوهیستوشیمی ارزیابی گردید و شدت درجه بیان در موارد مثبت بررسی شد.

**نتایج:** میانگین سنی بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین  $41 \pm 16$  سال بود. ۷۹٪ بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین برای p53 ایمونوراکتیو بودند. در این مطالعه میانگین سنی افرادی که فوت کرده اند بیشتر از میانگین سنی افراد پست که زنده بوده اند که این تفاوت از نظر آماری معنی دار بوده است. سیکلو اکسیژناز ۲ در ۲۴٪ افراد مبتلا به لنفوم هوچکین کلاسیک ایمونوراکتیو بوده است.

**نتیجه نهایی:** با توجه به بیان p53 و COX2 در انواع مختلف لنفوم هوچکین و عدم تفاوت معنی دار در بیان مارکر p53 و COX2 بین انواع مختلف آن، چنین برداشت می شود که نقش مهمی در پیش آگهی لنفوم هوچکین ندارند.

**کلید واژه ها:** بیماری هوچکین / ژن p53 / سیکلو اکسیژناز

### مقدمه:

است. سلول بدخیم در لنفوم هوچکین فرم کلاسیک یعنی سلول رید- اشتنبرگ و واریان های تک هسته ای آن از سلول های مراکز زایا منشا گرفته اند. سلولهای رید- اشتنبرگ ۳-۱٪ کل توده تومورال را تشکیل می دهند. مطالعات واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) نشان داده اند که سلول های رید- اشتنبرگ از سلول های مراکز زایا منشأ می گیرند که جهش های سوماتیک در بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین دارند (۵-۲). نماهای بافت شناسی انواع مختلف لنفوم هوچکین به شرح زیر می باشد:

۱- ندولاراسکروزیس: شایع ترین فرم لنفوم هوچکین در کشورهای پیشرفته است این نوع ۷۰-۴۰٪ تمام لنفوم ها را

لنفوم هوچکین بروز جغرافیایی وسیعی دارد و یک کانسر شایع در بالغین جوان بوده و از هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت بین سنین ۳۵-۱۵ ساله ، ۵-۳/۵ نفر به لنفوم هوچکین مبتلا می شوند. لنفوم هوچکین دارای دو پیک سنی می باشد که پیک اول آن ۳۴-۱۵ سال و پیک دوم آن ۵۴ سال می باشد (۱). تحقیقات زیادی در مورد اتیولوژی لنفوم هوچکین انجام شده است. برخی از گزارشات حاکی از بروز بیش از حد لنفوم هوچکین در بعضی خانواده ها و جوامع است مطالعات اپیدمیولوژیک زیادی بیان کننده نقش ویروس EBV در لنفوم هوچکین

\* دستیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (e\_abdoli90@yahoo.com)

\*\* استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\* استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

بیمارستانهای مربوطه جمع آوری گردید و با مراجعه به دفاتر بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستانهای همدان بر اساس فرمول حجم نمونه تعداد ۶۲ مورد نمونه بافتی لنفوم هوچکین تشخیص داده شده استخراج شد. همه نمونه ها جهت تأیید تشخیص با میکروسکوپ نوری بررسی شدند و پس از تأیید تشخیص توسط پاتولوژیست از بلوک های پارافینی مربوط به هر نمونه توسط میکروتوم برشهای نازک ۳ میکرونی تهیه شد و سپس روی لامهای مربوطه ایمونوهیستوشیمی (IHC) مربوط به p53 و COX2 انجام شد.

روش انجام ایمونوهیستوشیمی: ابتدا از بلوک ها برش های سه میکرونی تهیه شده و برای تهیه لام از چسب TES استفاده گردید لامها را شماره زده و حدود نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد و بعد تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در روز بعد لامها را در سه ظرف گریلول هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم سپس شستشو در آب به اندازه یک دیپ انجام گرفت و پس از آن بافر سیترات را تهیه کردیم (۴۴ گرم سیترات + ۷ لیتر آب) جار حاوی بافر سیترات را به همراه لامها ۵ دقیقه در داخل ماکروفر گذاشته تا به حالت جوش بماند سپس لامها را به اندازه یک دیپ در داخل بافر PBS گذاشته تا خیس شود.

اقدام بعدی استفاده از ویال زرد رنگ پراکسیداز (یک قطره) سپس ویال سبز رنگ پروتئین بلوک یک قطره تا زمان ۵ دقیقه بود. مرحله بعد اضافه کردن آنتی بادی موردنظر بود که گذاشتیم نیم ساعت در محیط مربوطه بماند. مرحله بعد شستشو در بافر PBS تا حدود سه مرتبه و سپس استفاده از primary block vial بود که به مدت نیم ساعت انجام شد.

قدم بعدی استفاده از رنگ زا بود که با استفاده از بافر سوبسترا تهیه می شود. مرحله بعدی استفاده از ویال هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه بعد از شستشو در آب مقطر، الکل ۷۰ درجه یک دیپ، الکل ۹۰ درجه یک دیپ، الکل ۱۰۰ درجه یک دیپ، گزیلول، سپس مونتاژ و شماره گذاری لامها بود. نمونه های رنگ شده از نظر بیان COX2 و p53 به دقت زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

با مراجعه به پرونده بیماران شماره تلفن و آدرس کلیه بیماران بدست آمد با آنان و یا خانواده ایشان تماس گرفته

تشکیل داده است و به صورت توده مدیاستینال با گرفتاری غده لنفاوی گردن در زنان جوان مشاهده می شود (۱) ۲- لنفوم هوچکین غنی از لنفوسیت های ۵٪ که احتمال درگیری غده لنفاوی محیطی در آن زیاد است (۶) ۳- سلولاریته مختلط ۲۵-۲۰٪ لنفوم هوچکین را تشکیل داده است و شایع ترین فرم لنفوم هوچکین در کشورهای درحال توسعه است، بیشتر بیماران با درجات III و IV مراجعه می کند. ۴- لنفوم هوچکین فاقد لنفوسیت که سن ابتلا به این زیرگروه از لنفوم هوچکین از بقیه بالاتر است و بدترین پیش آگهی را دارد (۱).

سیکلواکسیژناز ۲ آنزیمی است که تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین را کاتالیز می کند. COX دو نوع ایزوفرم دارد. ایزوفرم یک به طور معمول در غشای سلولهای بدن وجود دارد و نقش های مختلفی در سلولها دارد. این ایزوفرم در معده اثر محافظتی دارد و منجر به کنترل پلاکتی می شوند. COX2 آنزیم سیتوپلاسی است. آنکوژنها، فاکتور رشد، سیتوکینها و پیش برنده های تومور باعث بیان بیش از حد آن میشود (۶). COX2 مهار کننده آپوپتوز است (۸، ۷).

ژن p53 روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ قرار دارد و پروتئینی با وزن ملکولی ۵۳ کیلو دالتون که به پروتئین های هسته ای وصل می شود را تولید می کند (۱۰، ۹). p53 نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی نرمال، آپوپتوز و پاسخ به DNA بازی می کند (۱۰) اختلال در p53 منجر به عدم تنظیم چرخه سلولی و رشد انتخابی و تشکیل تومور می شود. اخیراً مطالعاتی انجام شده که نشان داده اند در جوامعی که مصرف داروی ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAID) بالا می باشد شیوع لنفوم هوچکین کم شده است (۱۳-۱۱).

در این مطالعه با توجه به شیوع بالای مصرف NSAID در کشور ما بر آن شدیم تا میزان بیان COX2 را در انواع لنفوم هوچکین بررسی نماییم تا در صورت وجود ارتباط بین بروز بالای COX2 و بیماری لنفوم هوچکین، مصرف NSAID را در درمان این بیماری پیشنهاد نماییم.

### روش کار:

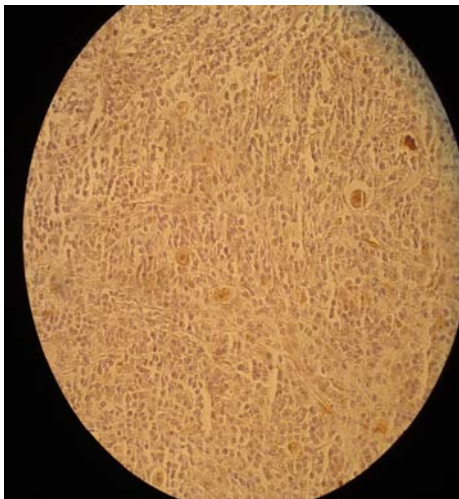
این مطالعه از نوع توصیفی مقطعی و جامعه آماری آن افراد مراجعه کننده به بیمارستان های همدان قبل از سال ۱۳۸۴ با تشخیص لنفوم هوچکین از انواع مختلف بودند. در این مطالعه نمونه های بافتی در بخش آسیب شناسی

جدول ۲: توزیع فراوانی شدت بیان COX2 به تفکیک نوع تومور

نوع تومور	درجه بیان	
	مثبت	منفی
Nodular Sclerosis	۷ (۲۰)*	۲۸ (۸۰)
Mix Cellularity	۸ (۳۸/۱)	۱۳ (۶۱/۹)
Lymphocyte predominant	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)
Lymphocyte depletion	۰ (۰)	۱ (۱۰۰)
Nodular Lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma	۳ (۱۰۰)	۰ (۰)

\* اعداد داخل پرانتز درصد می باشند.

COX2 در ۳۵٪ افراد مبتلا به لنفوم هوچکین بیان شده است (تصویر ۲) و بیان آن در جدول ۱ آورده شده است.



تصویر ۲: بیان COX2 توسط لنفوم هوچکین رید اشتنبرگ

با استفاده از آزمون آماری متوسط سن افرادی که فوت کرده اند ( $54 \pm 6/2$ ) از متوسط سن افرادی که زنده مانده اند ( $39/3 \pm 16$ ) بیشتر بوده است که از نظر آماری معنی دار بود ( $P=0/003$ ).

در بررسی مقایسه میزان بقاء ۵ ساله در زیر گروههای مختلف لنفوم هوچکین بیشترین میزان بقاء مربوط به گروه لنفوم هوچکین ندولر با ارجحیت لنفوسیت (NLPHL) بود کمترین میزان بقاء مربوط به گروه LD بود. ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ( $P=0/1$ ).

مقایسه بقاء ۵ساله در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین نشان داد که میزان مرگ در آندسته از مبتلایانی که COX2

شد و در مورد تاریخ فوت بیماران تا ۵ سال بعد از تاریخ تشخیص پاتولوژی سؤال شد. داده های حاصل از مشاهدات و یافته های ثبت شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت توصیف داده ها از جداول فراوانی، نمودار، شاخصهای میانگین و انحراف معیار و جهت تحلیل داده ها از آزمون های آماری  $X^2$  و آزمون Student's t-test استفاده شد.

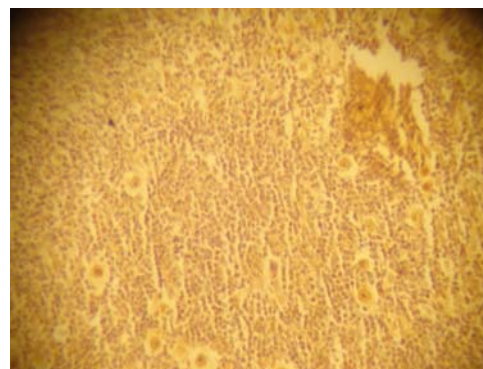
نتایج:

در بررسی انجام شده از ۶۲ بیمار مبتلا به لنفوم هوچکین ۳۲ نفر (۵۱/۶٪) مرد و ۳۰ نفر (۴۸/۴٪) زن بودند. میانگین سنی بیماران مبتلا  $41 \pm 16$  سال و محدود سنی آنان بین ۸۰-۱۴ سال بود. فراوانی انواع لنفوم هوچکین در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: فراوانی انواع لنفوم هوچکین و شدت بیان COX2

نوع تومور	فراوانی		بیان COX2 (%)		بیان p53 (%)	
	تعداد	درصد	مثبت	منفی	مثبت	منفی
Nodular Sclerosis	۳۵	۵۶	۲۰	۸۰	۲۰	۸۰
Mix Cellularity	۲۱	۳۴	۳۸/۱	۶۱/۹	۳۸/۱	۶۱/۹
Lymphocyte predominant	۲	۵	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
Lymphocyte depletion	۱	۲	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
Nodular Lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma	۳	۳	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰

از ۶۲ بیمار مبتلا به لنفوم هوچکین ۴۹ مورد (۷۹٪) برای p53 ایمونوراکتیو و ۱۳ مورد (۲۱٪) از نظر بیان p53 منفی بودند (تصویر ۱).



تصویر ۱: بیان نسبتاً شدید p53 در یک بیمار مبتلا به لنفوم هوچکین NS

بیان p53 در مبتلایان به انواع مختلف لنفوم هوچکین اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت ( $P=0/3$ ) (جدول ۲)

بررسی قرار گرفت و آنها به این نتیجه رسیدند که بیان سیکلواکسیژناز ۲ منجر به پاسخ کمتر به درمان و پروگنوز بدتر می شود (۱۸).

### نتیجه نهایی:

با توجه به بیان p53 و COX2 در انواع مختلف لنفوم هوچکین و عدم تفاوت معنی دار در بیان مارکر p53 و COX2 بین انواع مختلف آن، چنین برداشت می شود که نقش مهمی در پیش آگهی لنفوم هوچکین ندارند. مطالعات جامع در سطح ایمونوهیستوشیمی برای p53 و COX2 جهت به دست آوردن نتیجه قطعی با تعداد بیماران بیشتر توصیه می گردد. بیان کم COX2 در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات دیگر می تواند بیانگر مصرف بی رویه NSAID در کشور ما باشد.

### سپاسگزاری:

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره دستیاری پاتولوژی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد. نویسندگان از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه که این طرح را از نظر مالی حمایت کردند و سرکار خانم مژگان شهبازی که در تهیه این مقاله کمک نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

### منابع:

1. Ioachim's HL. Medeiros lymph node pathology. In: Murphy J, Mc Gough J (eds). Classical Hodgkin lymphoma. 4th ed. New York : McGraw-Hill, 2009: 306-324.
2. Aktas S, Kargtulogun A, Diniz G, Erbay A, Vergin C. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 expression on pediatric Hodgkin and non Hodgkin lymphomas with or without Epstein-Barr. *Virus Latent infection. Comp Clin Pathol* 2008; 17: 125-131.
3. Xerri L, Bouabdallah R, Camerlo J, Hassoun J. Expression of the P53 gene in hodgkin,s disease. Dissociation between immunohistochemistry and clinicopathologic data. *Hum Pathol* 1994; 25(5):449-54.
4. Chang ET, Zheng T, Weir EG, Borowitz M, Mann RB, Spiegelman D, et al. Aspirin and the risk of Hodgkin's lymphoma in a population- based case control study. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 305-315.
5. Wang J, Taylor CR. Apoptosis and cell cycle related genes and proteins in classical Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol* 2003;11(3): 206-213.
6. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Shiroyama Y, Naga N, Ohama K. Expression of cylooxygenase-2 and its relationship to p-53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2003; 22: 99-105.
7. Ohsawa M , Fukushima H , Ikura Y , Inone T ,

را بیان کرده اند (۲۰٪) بیشتر از آندسته از مبتلایان به لنفوم هوچکین است که COX2 را بیان نکرده اند (۱۰/۶٪).

### بحث:

هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان p53 و COX2 بود که بر اساس این یافته ها بتوان تصمیمات مناسب برای انتخاب نوع روش درمانی و پیگیری های لازم را انجام داد. از نظر توزیع جنسی فراوانی لنفوم هوچکین در مردان شایعتر از زنان بوده که مشابه با سایر مطالعات و مراجع می باشد (۱۴) همچنین میانگین سنی بیماران ۴۱/۷۱ سال بود که مطابق با سایر مطالعات می باشد (۱۵). در این مطالعه شایعترین زیرگروه لنفوم هوچکین NS (۵/۵۶٪) و نادرترین آن LD (۱/۶٪) بود که مشابه با سایر مراجع می باشد (۱۶).

در مطالعه ما میزان بیان p53 در میان زیرگروههای مختلف لنفوم هوچکین تفاوت آماری معنی داری نداشت که مشابه با مطالعه ونگ می باشد (۵). در مطالعه ای که توسط اوساوا و همکاران در سال ۲۰۰۴ در خصوص بیان سیکلواکسیژناز ۲ در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین انجام شد ، به بررسی بیان این مارکر در لنفوم هوچکین کلاسیک پرداختند و به این نتیجه رسیدند که بیان سیکلواکسیژناز ۲ در ۷۰٪ بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین کلاسیک افزایش یافته است (۷) درحالیکه در مطالعه ما بیان COX2 در ۲۴٪ افراد افزایش یافته بود. در مطالعه ما همانند مطالعه پین هریو تفاوت آماری معنی در انواع مختلف لنفوم هوچکین دیده نشد (۱۶).

در مطالعه حاضر متوسط سن افرادی که فوت کرده اند (۵۴±۶/۲۰) از متوسط سن افرادی که زنده مانده اند (۳۹/۳±۱۶) بیشتر بوده است که از نظر آماری معنی دار بود و این یافته مطابق با سایر رفرنسها می باشد (۱۷). در مطالعه اخیر همانند مطالعه ژری هیچ گونه تفاوت معنی داری میان بقای ۵ ساله و میزان بقای COX2 و p53 پیدا نشد (۳).

در مطالعه ای پژوهشگران به بررسی بروز COX2 در بیماران مبتلا به لنفوم هوچکین و غیر هوچکین پرداختند و به این نتیجه رسیدند که هیچ ارتباطی بین سن، جنس، نوع بافت شناسی و مراحل لنفوم هوچکین و COX2 وجود ندارد (۲) ولی در مطالعه ای که توسط هزار و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شد، همراهی سیکلواکسیژناز ۲ و زیرگروههای لنفوم هوچکین و پاسخ به درمان مورد

- Shira N, Sugama Y, et al. Expression of cyclooxygenase- 2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk lymphoma* 2006; 47(9) : 1863-1871.
8. Tilley S, Coffman TM, Koller BH. Mixeded message : modulation of inflamtion and om-mune responses by prostaglangins and trombox-anes. *J Clin Invest* 2001; 108: 15-23.
  9. Hussain PS, Haris CC. P-53 mutation spectrum and load: the generation or hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res* 1999; 428: 23-32.
  10. Gupta RK, Norton AJ, Thompson IW, Lister TA, Bodmer JG. P-53 expression in Reedstern-berg cells of Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1992; 66: 649-652.
  11. Gallo O, Schiavone N, Papucci L, Sardi I, Magnelli L, Franchi A, et al. Down- regulation of nitric oxide synthase -2 and cyclooxygenase- 2 pathways by p-53 in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 723-732.
  12. Rongen MM, Roers A, Kuppers R, Rajewsky K, Hansman ML. Mutation of the p-53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-sternberg cells in Hodgkin's disease. *Neoplasia* 1999; 94(5): 1755-1760
  13. Yao M, Zhou W, Sangha S. Effect of non cyclooxygenase inhibition with low dose ibu- profen on tumor growth, angiogenesis, metastasis and survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1618-1628
  14. Correa P. Epidemiology of Hodgkin disease. *Int J cancer* 1971;8:192-201
  15. Mac Mahon B. Epidemiology of Hodgkin disease. *Cancer Res* 1966;26:1189-1200
  16. Pinheiro GS. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), P53 and MDM2 expression in hodg- kins disease. *Sao Paulo Med J* 2007; 125(2):77- 84.
  17. Desforjes JF, RutherfordcJ, Piro A. Hodgkin disease. *N England Med* 1979; 9301:1212-1222.
  18. Hazar B, Ergin M, Seyrek E , Erdogan S, Tuncer I, Hakverdi S. Cyclooxygenase-2(cox-2) expression in lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1395-1399.