

(مقاله پژوهشی)

ارزیابی ارتباط بیان ایمنو هیستوشیمیایی گیرنده ی استروژن با نمره ی گلیسون در کارسینوم پروستات

ساناز محسنی زاده^۱، پروین خردمند^{۲*}

چکیده

زمینه و هدف: مطالعه ی حاضر به منظور بررسی فراوانی گیرنده های هورمون استروژن در سلول های کارسینوم پروستات به منظور درکی بهتر از ارتباط گیرنده های استروژنی موجود در سلول های بدخیم و پاتولوژی ایجاد شده صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه ی توصیفی مقطعی بلوک های پارافینی نمونه بافتی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی اهواز، با تشخیص پاتولوژی آدنوکارسینوم پروستات و هیپرپلازی خوش خیم پروستات استفاده شد. اطلاعات بالینی و دموگرافیک بیماران از پرونده ی بیمارستانی استخراج شد. جهت رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی منوکلونال Anti ER استفاده شد.

یافته ها: در مطالعه ی حاضر ۳۰ نمونه ی مربوط به بافت پروستات شامل ۲۰ نمونه ی مبتلا به سرطان و ۱۰ نمونه با تشخیص هایپرپلازی خوش خیم به عنوان نمونه ی کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران برابر با ۶۹٫۶۵ سال بود. مارکر استروژن رسپتور در نمونه های بدخیم تنها در ۲۵٪ موارد بیان شده است. با این حال ۱۰٪ نمونه های خوش خیم بیان مارکر را نشان دادند. بیان مارکر ER ارتباط معنی داری با نمره ی گلیسون داشت (p=0.039).

نتیجه گیری: به طور کلی یافته های این مطالعه نشان می دهد که گیرنده ی استروژن در بدخیمی های پروستات کاهش یافته و این کاهش در تومور های با درجه ی بالاتر بیشتر است.

واژگان کلیدی: گیرنده ی استروژن، کارسینوم پروستات، درجه ی تومور.

۱-رزیدنت پاتولوژی.

۲-استادیار گروه پاتولوژی.

۱-گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول:

پروین خردمند؛ گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تلفن: ۰۰۹۸۹۳۸۶۱۱۶۳۰۷

Email: parvinkheradmand@mail.com

اعلام قبولی: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶

مقدمه

تعیین نشانه های تشخیصی برای شناسایی بیماری، پیش بینی بقا، پاسخ به درمان و همچنین ارزیابی رفتار تومور بسیار حائز اهمیت است (۳).

نشان داده شده است که کمپلکس هورمونهای استروئیدی- گیرنده به عنوان فاکتورهای رونویسی عمل میکنند و در نتیجه در تقسیم و تمایز سلول ها نقش موثری دارند، بنابراین میتوان گفت هورمون های استروئیدی مانند استروژن و پروسترژون نقش بسزایی در پیشرفت روند سرطان دارند تاثیرات عمیق هورمونهای استروئیدی بر پیشرفت روند سرطان از طریق گیرنده های این هورمونها در بافت پروستات اعمال میگردد (۴-۶). بنابراین این مارکر می تواند به عنوان یک پتانسیل تشخیصی در ارزیابی رفتار توموری به کار گرفته شود. مطالعه ی حاضر به منظور بررسی فراوانی گیرنده های هورمون استروژن در سلول های کارسینوم پروستات به منظور درکی بهتر از ارتباط گیرنده های استروژنی موجود در سلول های بدخیم و پاتولوژی ایجاد شده صورت گرفت.

روش بررسی

طراحی مطالعه

در این مطالعه ی توصیفی مقطعی بلوک های پارافینی نمونه بافتی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی امام خمینی (ره)، شهید بقایی و گلستان اهواز، با تشخیص پاتولوژی آدنوکارسینوم پروستات و هیپرپلازی خوش خیم پروستات استفاده شد. لام های رنگ آمیزی شده با H&E نمونه های بافتی بیماران مشاهده و همزمان اطلاعات بالینی و پاراکلینیک بررسی و ثبت شده، بهترین لام و بلوک بافتی انتخاب و رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی انجام شد. بیماران با اطلاعات مخدوش از مطالعه حذف شدند. مطالعه ی حاضر به تایید کمیته ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اهواز رسید.

ارزیابی ایمنو هیستوشیمی

پروستات در مردان سال خورده به طور بالایی مستعد تغییرات تکثیری خوش خیم و یا بدخیم می باشد. سرطان پروستات (PC) متداولترین نئوپلاسم تشخیص داده شده در مردان است که افزایش سریع میزان شیوع در دو دهه گذشته بخصوص در مردان بالای ۵۰ سال به موازات افزایش طول عمر سبب نگرانی شده است. سرطان پروستات دومین مورد سرطان های منجر شونده به مرگ در مردان است که با احتمال ۱۶٪ در مردان آمریکایی رخ می دهد. در مان های سودمند در بیماری موضعی و در مراحل اولیه شامل تحت نظر گرفتن فعال بیمار، جراحی (پروستاتکتومی رادیکال) و یا رادیوتراپی می باشد. اما عود و یا بیماری متاستاتیک در مورد بسیاری از بیماران اجتناب ناپذیر است (۱). فاکتورهای مرتبط با افزایش خطر سرطان پروستات از نظر بالینی شامل بالا رفتن سن، سابقه ی خانوادگی مثبت، نژاد، ژنتیک و سطح سرمی افزایش یافته ی PSA سرمی می باشند. افزایش شیوع آن در ده سال گذشته به نظر می رسد با رشد جمعیت سالخوردهگان، تغییر رژیم غذایی، گستردگی محیطی آلودگی های کارسینوژنز و اجرای تکنیک های غربالگری PSA مرتبط با شد. آشکارترین فاکتور خطر کارسینوم پروستات سن است (۲).

به دلیل گستردگی شیوع، میزان مرگ و میر در مردان بعد از سرطان شش مرتبه ی دوم را دارد، بنابراین شناسایی دقیق خطر پیشروی بیماری و نیز انتخاب گزینه های درمانی مناسب نیاز است. پارامترهای بالینی مختلف شامل مرحله ی تومور، درجه ی تومور اندازه گیری شده با امتیاز گلیسون و سطح سرمی PSA برای تعیین خطر پیشرفت در بیماران به کار برده می شود. با گزینش غربالگری جمعیت بر اساس PSA اکثر مردانی که با سرطان پروستات تشخیص داده می شوند، کسانی هست که به واقع احتمالی کمتر از متوسط برای مرگ ناشی از سرطان پروستات دارند. ثابت شده است که غربالگری PSA منجر به تشخیص اضافی و درمان غیر ضروری برای بیماران می شود. بنابراین تحقیق در جهت

منظور بررسی میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری و به کارگیری نرم افزار plus advance Motoc ۲ در ۱۰ محدوده ی متفاوت تصویربرداری و جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده شد. در این بررسی، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش گردیده و درصد سلول های رنگ آمیزی شده، تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS (IL, Chicago, Inc SPSS) و به کارگیری آزمون χ^2 و t-Student انجام گرفت. از نظر آماری یافته های با مقدار $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

در مطالعه ی حاضر ۳۰ نمونه ی مربوط به بافت پروستات شامل ۲۰ نمونه ی مبتلا به سرطان و ۱۰ نمونه با تشخیص هایپرپلازی خوش خیم به عنوان نمونه ی کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران برابر با ۶۹٫۶۵ سال بود. مرحله ی سرطان در ۸۰٪ موارد pt2 بود. یافته های توصیفی بیماران در جدول ۱ نشان داده شده است (جدول ۱).

مارکر استروژن رسپتور در نمونه های بدخیم تنها در ۲۵٪ موارد بیان شده است. با این حال ۱۰۰٪ نمونه های خوش خیم بیان مارکر را نشان دادند (تصویر ۱، تصویر ۲). در جدول ۲ متغیر های مورد بررسی بین نمونه های منفی و مثبت از نظر ER مقایسه شدند. میانگین سنی بیماران با و بدون بیان ER به ترتیب برابر با ۶۱٫۸ و ۷۰٫۴ بود. این اختلاف از نظر آماری معنی داری بود ($p=0.04$).

بیان مارکر ER ارتباط معنی داری با نمره ی گلیسون داشت ($p=0.039$)، به طوری که نمره های بالاتر گلیسون با نسبت کمتری مارکر ER را بیان می کردند (تصویر ۳). با این حال مرحله ی بیماری هیچ ارتباط معنی داری با سطح بیان ER نداشت ($p=0.5$) (جدول ۲).

آماده سازی بافت: ابتدا آبیگری نمونه ها توسط اتانول های صعودی (۷۰، ۹۵ و ۹۹ درصد) انجام شد. سپس شفاف سازی نمونه ها توسط گزین و قالبگیری نمونه ها به وسیله ی پارافین صورت گرفت. برش گیری: در این مرحله برشهای بافتی به ضخامت ۴ تا ۵ میکرون تهیه شد.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی: ابتدا پارافین زدایی توسط غوطه ورسازی نمونه ها در گزین انجام گرفت. سپس توسط اتانولهای نزولی (۹۵، ۹۹ و ۷۰ درصد) آبدهی صورت گرفت. در مرحله ی بعد به منظور توقف فعالیت Peroxide Endogenous برشها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۵ درصد انکوبه و پس از آن در آب جاری شستشو داده شد. پس از آن نمونه ها برای انجام Antigen retrieval به مدت یک دقیقه در دمای ۹۸ درجه ی سانتیگراد در بافر ۰٫۰۱ مولار سترات سدیم در یک میکروویو قرار گرفت. در مرحله ی بعد، برشها به مدت ۵ دقیقه به Tris بافر سالین یا TBS انتقال داده شد. توقف فعالیت peroxide Endogenous توسط سرم طبیعی ۱۰ درصد (Goat) در به مدت پنج دقیقه انجام گرفت و سرم اضافی برداشته شد.

آنتی بادی اولیه با رقت ۱:۲۰۰ اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه ی سانتیگراد قرار داده شد. سپس شستشو با TBS دوبار و هر بار پنج دقیقه انجام گرفت. بعد از آن نمونه ها با آنتی بادی ثانویه با رقت ۱:۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شد و به طور مجدد دوبار با TBS هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. واکنش کروموزنیک توسط Diaminobezidine و رنگ آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin انجام گردید. در نهایت نمونه ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در گروه های شاهد منفی از PBS به جای آنتی بادی های اختصاصی استفاده شد.

پس از تهیه ی لام ایمونوهیستوشیمی، بررسی میکروسکوپی مقاطع نشاندار شده با آنتی بادی انجام گردید. برای این کار مقاطع نشاندار شده با آنتی بادی به

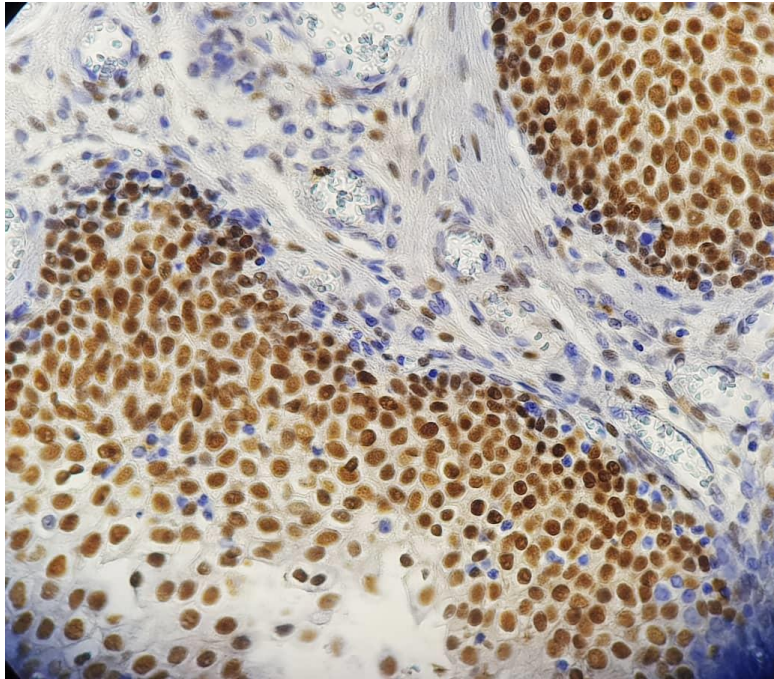
جدول ۱: یافته های توصیفی بیماران

Characteristics	Mean(range) ± SD – Frequency(%)
Age	69.65(49-90)±11.7
Gleason Score	
6	4(20%)
7	7(35%)
8	2(10%)
9	7(35%)
Stage	
<i>Organ Confined(pt2)</i>	16(80%)
<i>Extracapsular(Pt3)</i>	4(20%)

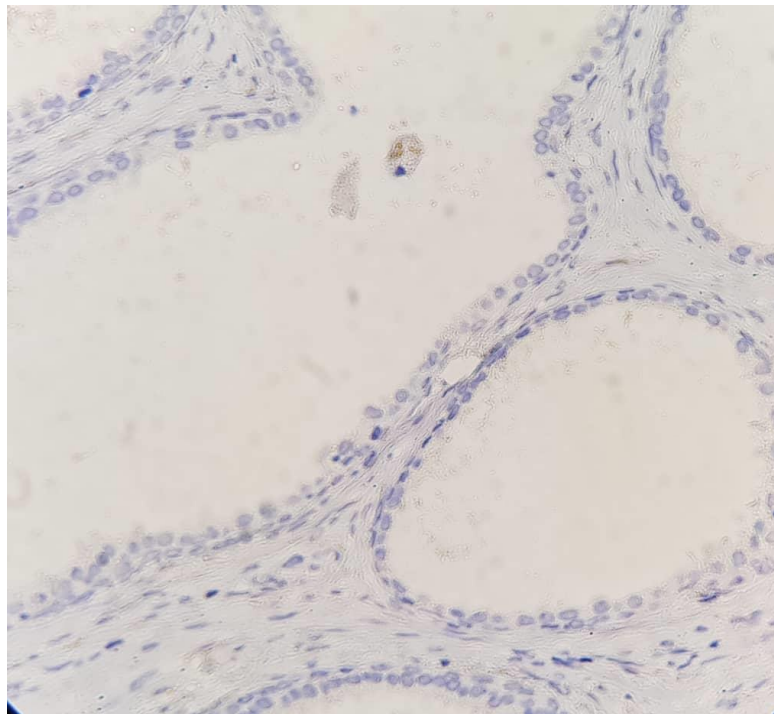
Abbreviations: ER: Estrogen Receptor

جدول ۲: مقایسه ی متغیر های مورد بررسی بین بیماران با و بدون بیان ER

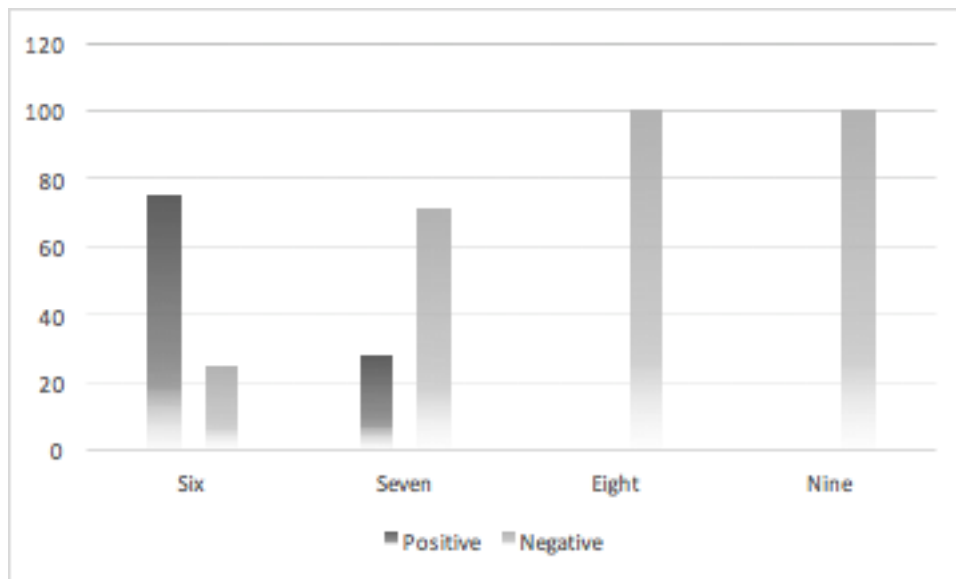
Variable	ER Expression		P value
	Positive n=15	Negative n=15	
Age	61.8±9.8	70.4±12.3	0.046
Gleason Score			0.039
6	3(75%)	1(25%)	
7	2(28.6%)	5(71.4%)	
8	0	2(100%)	
9	0	7(100%)	
Stage			
<i>Organ Confined(pt2)</i>	5(31.3%)	11(68.8%)	0.53
<i>Extracapsular(Pt3)</i>	0	4(100%)	
Malignancy			
Benign	10(100%)	0	P<0.0001
Malignant	5(25%)	15(75%)	



تصویر ۱: بیان بالای مارکر ER در سلول های پروستات (بزرگنمایی ۴۰)



تصویر ۲: عدم بیان مارکر ER در سلول های پروستات (بزرگنمایی ۴۰)



تصویر ۳. مقایسه ی میزان نمره ی گلیسون در بیماران با و بدون بیان ER

بحث

یافته های مطالعه ی ما در تایید یافته های گذشته نشان دادند که بیان ER در بدخیمی های پروستات به طور معنی داری کاهش می یابد. به طور مشابه در مطالعه ای که توسط Konishi و همکاران در سال ۱۹۹۳ در ژاپن در بین بیماران مبتلا به هایپرپلازی خوش خیم پروستات و رده های مختلف کارسینوم پروستات انجام شد نشان داد که تمامی بیماران مبتلا به هایپرپلازی خوش خیم پروستات سطح افزایش یافته ای از گیرنده های استروژنی را نشان میدهند در حالی که تنها در ۴۸٪ از کارسینوم ها، این گیرنده ها شناسایی شدند که ارتباطی منفی بین وضعیت این گیرنده ها و بدخیمی را نشان میدهد (۱۳). علاوه بر این Horvath و همکارانش نیز در مطالعه ای دیگر اذعان کردند که بیان مارکر ER در بیماران مبتلا به کارسینوم پروستات به شدت کاهش یافته یا از دست می رود (۱۴).

همچنین یافته های ما نشان دادند که ارتباط معنی داری بین نمره ی گلیسون و بیان مارکر همچنین یافته های ما نشان

بیش از نیم قرن پیش، شواهد بالینی مطرح کننده ی نقش هرمون ها در توسعه ی تومور های پروستات، نشان داد که آندروژن ها سبب رشد تومور و بالعکس استروژن سبب مهار آن می گردد (۷). به سبب همین یافته ها، عقیم ساختن مردان با آنتی استروژن ها تبدیل به اساس درمان برای تومور های پیشرفته ی سرطان شد. استروژن نقش درمانی خود را از طریق توانایی آن در کاهش تحرک هیپوفیز برای تولید LH و FSH و در نتیجه کاهش تولید آندروژن ها انجام می دهد (۸-۹). با این حال مطالعات نشان داده شده اند که بیان ER در بسیاری از تومور های پروستات بویژه تومور های با درجه ی بالا از دست می رود (۱۰-۱۲). بنابراین این یافته مطرح کننده ی نقش احتمالی ER به عنوان یک مارکر پیش آگهی دهنده در سرطان پروستات است. در تلاش برای آزمون این فرضیه مطالعه ی حاضر به ارزیابی ارتباط بیان ER با یافته های پیش آگهی دهنده ی بیماران مبتلا به سرطان پروستات پرداخته است.

های قاعده ای و ترشحاتی نشان میدادند (۱۶). از دست رفتن گیرنده ی استروژن در کارسینوم پروستات نشان دهنده ی نقش آن به عنوان مهارکننده ی تومور است.

نتیجه گیری

به طور کلی یافته های این مطالعه نشان می دهد که گیرنده ی استروژن در بدخیمی های پروستات کاهش یافته و این کاهش در تومور های با درجه ی بالاتر بیشتر است. عدم ارزیابی ارتباط بیان گیرنده ی ER با میزان بروز متاستاز، بقای کلی، عود و پاسخ به درمان به عنوان مهمترین نشانگر های پیش آگهی دهنده ی بیماری از محدودیت های مطالعه ی حاضر بود.

دادند که ارتباط معنی داری بین نمره ی گلیسون و بیان مارکر ER وجود دارد، به طوری که نشان داد شد با افزایش نمره ی گلیسون بیان ER کاهش می یابد. بنابراین سرطان پروستات در طول پیشرفت خود مارکر ER را از دست می دهند. این یافته ها همراستا با دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه بودند. در مطالعه ای که عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور ایران بر روی ۵۲ نمونه بیوپسی آدنوکارسینوم پروستات انجام دادند دیده شد که بیان رسپتور استروژن بتا در در کسرهای با گرید پایین و متوسط ۶۸،۴۱٪ و در گرید ها بالا ۴۹،۴۸٪ است (۱۵). در مطالعه ای که لواکو و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور بین بیماران مبتلا به هایپرپلازی خوش خیم پروستات و بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم پروستات در گرید های مختلف انجام دادند، دیده شد که آدنوکارسینوم های با تمایز ضعیف، کاهش بیان رسپتور مذکور را در سلول

منابع

- 1-Clegg NJ, Couto SS, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Taylor BS, Ellwood-Yen K, Gerald WL, Sander C, Sawyers CL. MYC cooperates with AKT in prostate tumorigenesis and alters sensitivity to mTOR inhibitors. *PLoS one*. 2011 Mar 4;6(3):e17449.
- 2-Kim SC, Jeong I, Song C, Hong JH, Kim CS, Ahn H. Biochemical recurrence-free and cancer-specific survival after radical prostatectomy at a single institution. *Korean journal of urology*. 2010 Dec 1;51(12):836-42.
- 3-Rhodes DR, Sanda MG, Otte AP, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003 May 7;95(9):661-8.
- 4-Mandair D, Rossi RE, Pericleous M, Whyand T, Caplin ME. Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. *Nutr Metab* 2014; 11: 30.
- 5-Key TJ. Hormones and cancer in humans. *Mutat Res* 1995; 333: 59-67.
- 6-Balducci L, Khansur T, Smith T, Hardy C. Prostate cancer: a model of cancer in the elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 1989; 8: 165-187.
- 7-Huggins C, Stevens RE, Jr, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: Ii. the effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg*. 1941;43:209-23.
- 8-Koutsilieris M, Tolis G. Long-term follow-up of patients with advanced prostatic carcinoma treated with either buserelin (HOE 766) or orchiectomy: classification of variables associated with disease outcome. *Prostate*. 1985;7:31-9.
- 9-Klotz L, McNeill I, Fleshner N. A phase 1-2 trial of diethylstilbestrol plus low dose warfarin in advanced prostate carcinoma. *J Urol*. 1999;161:169-72.
- 10-Gabal SM, Habib FM, Helmy DO, Ibrahim MF. Expression of estrogen receptor-B (ER-B) in benign and malignant prostatic epithelial cells and its correlation with the clinico-pathological features. *J. Egypt Natl. Canc. Inst*. 2007;19:239-48.
- 11-Gallardo F, et al. Expression of androgen, oestrogen alpha and beta, and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands. *J. Comp. Pathol*. 2007;136:1-8.
- 12-Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr. Relat. Cancer*. 2004;11:537-51.

- 13-Konishi N, Nakaoka S, Hiasa Y, Kitahori Y, Ohshima M, Samma S, Okajima E. Immunohistochemical evaluation of estrogen receptor status in benign prostatic hypertrophy and in prostate carcinoma and the relationship to efficacy of endocrine therapy. *Oncology*. 1993;50(4):259-63.
- 14-Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R. Frequent loss of estrogen receptor- β expression in prostate cancer. *Cancer research*. 2001 Jul 15;61(14):5331-5.
- 15-Gangkak G, Bhattar R, Mittal A, Yadav SS, Tomar V, Yadav A, Mehta J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in prostate and clinical correlation in men with benign prostatic hyperplasia. *Investigative and clinical urology*. 2017 Mar 1;58(2):117-26.
- 16-Asgari M, Morakabati A. Estrogen receptor beta expression in prostate adenocarcinoma. *Diagnostic pathology*. 2011 Dec;6(1):61.

Evaluation of the Relationship between Estrogen Receptor Immunohistochemical Expression and Gleason Score in Prostate Carcinoma

Sanaz Mohsenizadeh¹, Parvin Kheradmand^{2*}

1-Resident of Pediatrics.

2-Assistant Professor of Pathology.

1,2-Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author:

Parvin kheradmand; Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +989386116307

Email: parvinkheradmand@mail.com

Abstract

Background and Objective: This study aimed to evaluate the frequency of estrogen receptors in prostate carcinoma cells in order to better understand the relationship between estrogen receptors in malignant cells and their pathological significance.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, tissue paraffin blocks of excised prostate samples taken from patients diagnosed with prostate adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia, considered as control, were studied. These patients referred to teaching hospitals of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences. Clinical and demographic data of patients were extracted from hospital records. Immunohistochemical staining was performed using Anti ER monoclonal antibody.

Results: Thirty prostate tissue specimens were found which included 20 specimens with prostate carcinoma and 10 specimens with benign hyperplasia. The mean age of patients was 69.65 yr. Estrogen receptor marker was expressed in only 25% of malignant samples. In contrast, 100% of benign samples showed ER marker expression. ER marker expression was significantly correlated with Gleason score ($P=0.039$).

Conclusion: Overall, the findings of this study indicate that the estrogen receptor is decreased in prostate malignancies and is more pronounced only in higher grade tumors.

Keywords: Estrogen receptor, Prostate Carcinoma, Tumor grade.

► Please cite this paper as:

Mohsenizadeh S, Kheradmand P. Evaluation of the Relationship between Estrogen Receptor Immunohistochemical Expression and Gleason Score in Prostate Carcinoma. *Jundishapur Sci Med J* 2020; 19(2):167-176

Received: Jan 6, 2019

Revised: Mar 1, 2020

Accepted: Mar 4, 2020