

## طبقه‌بندی مجدد کارسینوماهای سرورز تخمدان با روش جدید تقسیم‌بندی دوگانه (two-tier) و بررسی بروز ژن P53 با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۱۵ آنلاین: ۱۳۹۲/۰۹/۱۰

نرگس ایزدی مود<sup>۱\*</sup>

سهیلا سرمدی<sup>۱</sup>، بنفشه رجیبیان<sup>۲</sup>  
فریبا یاراندی<sup>۳</sup>، افسانه رجیبیانی<sup>۲</sup>

۱- گروه پاتولوژی، بیمارستان زنان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
۲- گروه پاتولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
۳- گروه آنکولوژی زنان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

**زمینه و هدف:** در حال حاضر در تشخیص هیستولوژیک کارسینوماهای سرورز تخمدان سیستم درجه‌بندی دوگانه (two-tier grading) مورد قبول محققان می‌باشد. این روش تقسیم بر مبنای اصول بیولوژی مولکولی و ژنتیک استوار است. با توجه به توافق بین فردی بالای این سیستم درجه‌بندی ما نیز سعی در بازنگری کارسینوماهای سرورز نموده، تا با در نظر گرفتن نمای مورفولوژیک و استفاده از مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی P53 به بررسی آن‌ها پردازیم.

**روش بررسی:** پس از بازنگری ۳۲ مورد (هشت مورد تومور با تمایز خوب و ۲۴ مورد با تمایز ضعیف تا متوسط) با در نظر گرفتن معیارهای تعریف شده بر اساس سیستم درجه‌بندی دوگانه، در دو گروه با درجه پایین (Low grade) و درجه بالا (High grade) بار دیگر طبقه‌بندی شده و بروز ایمونوهیستوشیمیایی P53 در آن‌ها بررسی گردید.

**یافته‌ها:** بر اساس طبقه‌بندی گذشته کارسینوماهای سرورز با تمایز متوسط و ضعیف، به‌طور عمده در گروه با درجه بالا قرار گرفتند در حالی که کارسینوم‌های با تمایز خوب در گروه با درجه پایین جای داده شدند که ارتباط معناداری در هر گروه پیدا گردید ( $P < 0/005$ ). هم‌چنین رنگ‌پذیری P53 در کارسینوم‌های با درجه بالا در ۱۲ مورد (۵۴٪) دیده شد، در حالی که در هیچ‌کدام از کارسینوم‌های با درجه پایین واکنش مثبت مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** علی‌رغم این که بروز P53 در کلیه موارد کارسینوم با درجه پایین منفی بود ولی به دلیل تعداد اندک این دسته از کارسینوم‌های تخمدان و هم‌چنین پایین بودن تعداد نمونه‌های ما تفاوت آشکاری بین میزان بقا و بروز P53 به روش ایمونوهیستوشیمی در دو گروه کارسینوم با درجه بالا و پایین در این تعداد از بیماران دیده نشد.

**کلمات کلیدی:** نتوپلاسم‌های تخمدان، ژن P53، ایمونوهیستوشیمی، درجه‌بندی نتوپلاسم.

\* نویسنده مسئول: تهران، خیابان کریم‌خان زند، خیابان استاد نجات‌الهی شمالی، بیمارستان زنان بخش پاتولوژی.  
تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۰۶۷۶۷  
E-mail: nizadimood@yahoo.com

### مقدمه

به‌طور عمده تومورهای تخمدانی به صورت اولیه (De novo) به‌وجود می‌آیند. نکته مهم دیگر در بررسی کارسینوماهای تخمدان این است که ارزیابی‌های مورفولوژیک که راه‌کار اصلی در تشخیص می‌باشد را می‌توان توسط مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی تکمیل کرد. هم‌چنین در سالهای اخیر اطلاعات نوینی در خصوص وقایع مولکولار ژنتیک منجر به گروه‌بندی به دسته‌های کوچک‌تر شده است. از آن‌جا که کارسینوم سرورز شایع‌ترین بدخیمی اولیه تخمدان بوده و حدود ۶۸٪ تومورهای تخمدان و ۸۷٪ موارد پیشرفته کارسینوم‌های تخمدان

سرطان تخمدان کشنده‌ترین بدخیمی ژنیکولوژیک محسوب می‌شود. تا به حال تلاش‌ها در جهت تشخیص زودهنگام و راه‌کارهای درمانی ناموفق بوده و این امر ناشی از عدم درک کامل منشاء و پاتوژنز این نوع تومورها می‌باشد. علی‌رغم مطالعات فراوان جهت شناخت ضایعات پیش‌ساز این‌گونه تومورها، هنوز نتیجه قابل قبول و مستدلی ارایه نشده است.<sup>۱</sup> به همین علت پیشنهاد شده است که

serous carcinoma نیز به عنوان معادل کارسینوم سروز با درجه پایین استفاده می‌کند.<sup>۹</sup> از آنجایی که بعضی از کارسینوم سروز با درجه پایین فاقد این نمای رشد بوده و در مقابل بسیاری از کارسینوم سروز با درجه بالا، چنین طرح رشدی دارند این موضوع مورد تایید بسیاری دیگر از افراد نیست.

کارسینوم سروز با درجه بالا متشکل از سلول‌هایی با درجه آتیپی شدید بوده و تعداد میتوز در آن‌ها بیش‌تر از ۱۲ عدد در ده میدان میکروسکوپی با قدرت بالا ( $10 > 12$ /HPF) است. نکروز تومورال و سلول‌های چندهسته‌ای نیز از مشخصات این دسته می‌باشد. در ۲/۳ موارد کارسینوم سروز با درجه پایین، جهش در ژن‌های KRAS و یا ERBB2 را نشان می‌دهند<sup>۱۰</sup> در مقایسه با کارسینوم سروز با درجه پایین، اطلاعات محدودتری در مورد پاتوژنز کارسینوم سروز با درجه بالا وجود دارد. در این تومورها جهش ژن نامبرده قبلی بسیار به ندرت رخ می‌دهد و این در حالی است که جهش ژن P53 در ۸۰٪ موارد دیده می‌شود.<sup>۱۱</sup>

جهش ژنی و یا از دست رفتن هتروزیگوتی در ژن P53 را در کارسینوماهای مراحل اولیه، اپیتلیوم کیست‌های انکلوژیونی و در اپیتلیوم تخمدان مجاور کارسینوما می‌توان شناسایی کرد و آنرا به‌عنوان یک اتفاق اولیه مستلزم ایجاد این دسته از تومورها محسوب کرد.<sup>۱۲،۱۳</sup> با وجود این‌که ارتباط بین درجه رنگ‌پذیری ایمونوهیستوشیمیایی ژن P53 و وضعیت جهش آن در تومورهای سروز تخمدان قطعی نیست ولیکن به جهت تفاوت موجود بین کارسینوم سروز با درجه بالا و پایین از این لحاظ می‌توان از آن به‌عنوان معیار مفیدی جهت افتراق این دو دسته از تومورها بهره جست. هدف ما از انجام مطالعه حاضر ضمن بازبینی و طبقه‌بندی کردن مجدد کلیه کارسینوم‌های سروز بر اساس سیستم طبقه‌بندی جدید، بررسی بروز ژن P53 بر اساس رنگ‌پذیری ایمونوهیستوشیمیایی در کارسینوم سروز با درجه پایین و بالا و نیز یافتن ارتباط بین بقای بیماران و بروز P53 بود.

## روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، بیماران مبتلا به تومور تخمدان با تشخیص قبلی کارسینوما سروز با هر درجه از تمایز و با هر مرحله

(Stage III, IV) را تشکیل می‌دهد،<sup>۲</sup> سیستم‌های مختلفی برای درجه‌بندی (Grading) آن مورد استفاده قرار گرفته است. به‌عنوان مثال کرایتریای درجه‌بندی سازمان بین‌المللی زنان و مامایی (International Federation of Gynecology and Obstetric, FIGO) که بر اساس ساختار توپر بودن تومورها بدون در نظر گرفتن آتیپی هسته‌ای می‌باشد<sup>۳</sup> و یا سیستم تقسیم‌بندی مربوط به سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization, WHO) که بر مبنای ساختار ساختمانی سلول‌های تومورال و خصوصیات سیتولوژیک آن‌ها بنا نهاده شده<sup>۴</sup> و یا سیستم درجه‌بندی Shimizu-Silverberg که بر اساس نمای مورفولوژیک هسته‌ای و فعالیت میتوزی تعریف شده است و در گذشته به سیستم درجه‌بندی عمومی (Universal) یا درجه‌بندی سه‌گانه (3-tier) شهرت داشته است.<sup>۵</sup>

به‌تازگی سیستم دوگانه که توسط Malpica در مرکز سرطان دانشگاه M.D.Anderson تگزاس ارائه شد بسیار مورد توجه واقع گردید که در آن کارسینوم‌های سروز تخمدان را به دو دسته با درجه بدخیمی بالا و پایین (High and Low grade) تقسیم می‌کند.<sup>۶</sup> این سیستم بر مبنای درجه هسته‌ای و فعالیت میتوزی بوده و برخلاف سیستم‌های قبلی دارای اساس ژنتیک مولکولار مدون می‌باشد. این مساله تایید بیولوژیکی است که نشان می‌دهد طبقه‌بندی تومورهای سروز تخمدان تنها بر مبنای کرایتریای مورفولوژیک نمی‌باشد. باید تاکید کرد که دو گروه کارسینوماهای سروز با درجه بالا و پایین در حقیقت دو درجه متفاوت از نظر تمایز نیستند بلکه دو نوع کاملاً متمایز از این دسته تومورها بوده که پاتوژنز، زمینه مولکولار، سیربالینی و پیش‌آگهی متفاوتی دارند.<sup>۷،۸</sup> در تقسیم‌بندی جدید معیار تفکیک کارسینوم‌های سروز تخمدان به دو گروه درجه بالا و پایین بر مبنای مورفولوژی سلول‌های نئوپلاستیک، شاخص میتوز و وجود یا عدم وجود نکروز تومورال می‌باشد به گونه‌ای که تومورهای با درجه پایین شامل سلول‌هایی با هسته‌های کم و بیش یک شکل، آتیپی خفیف و میانگین تعداد میتوز در آن‌ها ۱۲ عدد در ده میدان میکروسکوپی با قدرت بالا ( $10 \leq 12$ /HPF) هستند. نکروز و سلول‌های غول‌آسا چندهسته‌ای دیده نمی‌شود و اجسام پساموما (Psammoma bodies) گه‌گاهی به تعداد فراوان وجود دارد.<sup>۹</sup> طرح رشد در این تومورها اغلب به صورت نمای میکروپاپیلاری بوده تا آنجا که بعضی محققان از اصطلاح میکروپاپیلاری سروز کارسینوم مهاجم "Invasive micropapillary"

سرورز با درجه بالا و بافت طبیعی تخمدان در هر سری کاری گذاشته شد.

سیستم امتیازدهی مورد استفاده برای P53 در این تحقیق به شرح زیر بود: رنگ‌پذیری هسته‌ای سلول‌ها برای P53 به‌عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد و بر اساس تخمین تعداد هسته‌های مثبت در میدان میکروسکوپی مورد بررسی به صورت زیر امتیازدهی شد: صفر: هیچ هسته‌ای رنگ نگرفت، +۱: ۱-۲۵٪ از هسته‌ها رنگ گرفت، +۲: ۲۶-۵۰٪ از هسته‌ها رنگ گرفت، +۳: ۳-۹۰٪ از هسته‌ها رنگ گرفت، +۴: <۹۰٪ از هسته‌ها رنگ گرفت. امتیاز صفر و +۱ و +۲ به‌عنوان منفی و امتیاز +۳ و +۴ به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شد.

شدت رنگ‌پذیری هسته‌ای نیز به صورت نیمه کمی از صفر تا +۳ (صفر = منفی، +۱ = ضعیف، +۲ = متوسط، +۳ = قوی) درجه‌بندی گردید و در این مطالعه ما فقط درجه رنگ‌پذیری متوسط و قوی (+۲ و +۳) را به‌عنوان موارد مثبت در نظر گرفتیم.

سپس با استفاده از پرونده‌های پی‌گیری بیماران و یا تماس تلفنی اطلاعات مربوط به پی‌گیری آن‌ها شامل موارد بدون عود، با عود و یا فوت به علت بیماری و نیز سطح سرمی CA125 قبل از جراحی و تظاهر عود بیماری به‌دست آمد.

اطلاعات به‌دست آمده از بررسی اسلایدهای پاتولوژی و پرونده‌های بالینی بیماران، توسط نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۸، و با کمک آزمون‌های آماری log rank،  $\chi^2$  مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

## یافته‌ها

از ۳۲ مورد کارسینوم سرورز، ۲۴ مورد تومور با درجه بالا (۷۵٪) و هشت مورد تومور با درجه پایین، (۲۵٪) بوده است. لازم به ذکر است که تومورهایی که در گذشته تحت عنوان خوب تمایز یافته گزارش شده بودند، به‌طور کامل در گروه با درجه پایین قرار گرفته و تومورها با تشخیص قبلی متوسط یا ضعیف تمایز یافته، جز گروه با درجه بالا قرار گرفتند و از این بابت هیچ‌گونه عدم هم‌خوانی بین گزارشات قبلی تومورها که بر اساس سیستم‌های متداول گذشته تنظیم گردید (به‌طور عمده طبق سیستم‌های WHO و Universal) و درجه‌بندی جدید تومور یافت نشد. مطابق با سیستم Universal که

بالینی که در بیمارستان زنان تهران بین سال‌های ۱۳۸۱ تا ۱۳۹۱ تحت درمان بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. تمام این بیماران تحت عمل جراحی و مرحله‌بندی بالینی و پاتولوژیک قرار گرفته و شیمی درمانی بر پایه پلاتینیوم (شش دوره) دریافت کردند. مدت زمان پی‌گیری بیماران از سه ماه تا ۱۰۸ ماه و به طور متوسط ۲۵ ماه بود. با توجه به آمار میانگین سالیانه موارد ثبت شده در حدود ۴۰ مورد بود که پس از حذف مواردی که اطلاعات پرونده‌های بالینی ناقص و یا نمونه ناکافی جهت بررسی ایمونوهیستوشیمیایی داشتند، در مجموع ۳۲ مورد شامل (هشت مورد کارسینوم سرورز با تمایز خوب (Well differentiated) و ۲۴ مورد کارسینوم سرورز با تمایز متوسط و ضعیف (Moderately and poorly differentiated) با طیف سنی ۳۱ تا ۶۶ سال وارد مطالعه شدند. اسلایدهای تهیه شده از بلوک‌های پارافینی توسط پروسه‌های تکنیکی لازم برای بررسی روتین هیستولوژیک پس از تثبیت بافت در بافر فرمالین خنثی و تهیه برش‌های با ضخامت ۵  $\mu\text{m}$  و سپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین معمول تهیه شده بودند. اسلایدهای به‌دست آمده توسط دو پاتولوژیست جهت نوع تومور و درجه تمایز آن‌ها و پارامترهایی چون میتوز، وجود یا عدم وجود تهاجم عروقی، درگیری سطح تخمدان و یا امتوم و در نهایت تعیین درجه تومور مورد بازبینی قرار گرفت.

قابل ذکر است برای تعیین آنتی‌بندی هسته‌ای و میتوز نواحی از تومور با بیش‌ترین شاخص مربوطه در نظر گرفته شد. برش‌های ۳  $\mu\text{m}$  از بلوک انتخاب شده از هر نمونه که نشان‌دهنده هیستوپاتولوژی تومور باشد، تهیه و پس از پارافینه شدن در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان دکتر علی شریعتی جهت بازیافت آنتی‌ژن در بافر سیترات (PH=۶) به مدت ده دقیقه گذاشته شد و سپس با آنتی‌بادی اول به مدت یک ساعت مجاور شد و بعد از این مرحله با آنتی‌بادی منوکلونال موشی (Monoclonal Mouse Anti-Human, Dako, Glostrup, Denmark) که با پروتیین P53 وارد واکنش می‌شود و برای این واکنش از متد آویدین-بیوتین پراکسیداز بهره می‌گیرد، انکوبه شد. محصول واکنش با کروموژن DAB قابل رویت شد و در نهایت با هماتوکسیلین ۱/۰٪ به‌عنوان رنگ زمینه رنگ‌آمیزی شد و در نهایت اسلاید تهیه گردید. تمام مراحل فوق طبق پروتکل رایج شده توسط شرکت سازنده آنتی‌بادی (Dako, Glostrup, Denmark) انجام گرفت. کنترل مثبت و منفی نیز به ترتیب با در نظر گرفتن کارسینوم

جدول ۱: خلاصه اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران

مجموع	تومور با		
	تومور با درجه بالا	تومور با درجه پایین	
۳۲	۲۴	۸	تعداد موارد
۵۰	۵۵	۴۶	سن (سال)
			دو طرفه بودن
۱۷	۱۴	۳	بله
۱۵	۱۰	۵	نه
			درمان جراحی
۲۲	۱۴	۸	اپتیمال
۱۰	۱۰	۰	ساب‌اپتیمال
			مصرف قرص ضد بارداری
۳	۳	۰	بله
۲۹	۲۱	۸	خیر
			سیگار
۰	۰	۰	بله
۳۲	۲۴	۸	خیر
			FIGO Grade
۴	۱	۳	۱
۱۲	۷	۵	۲
۱۶	۱۶	۰	۳
			Stage (FIGO)
۳	۰	۳	I
۵	۱	۴	II
۲۴	۲۳	۱	III
۰	۰	۰	IV
۷۷	۸۳	۶۵	متوسط زمان پی‌گیری (ماه)

سه معیار درجه ساختاری تومور (غددی، پاپیلا و یا توپر)، میتوز ( $\leq 9$ )، ۲۴-۹،  $\geq 25$  میتوز در (HPF/۱۰) و درجه آتیپی هسته‌ای (تنوع سایز هسته‌ای ۱:۲، بین ۱:۲ و ۴:۱ و  $\geq 4:1$  و هستک برجسته و طرح کروماتین) را مورد بررسی قرار می‌دهد و پس از امتیازدهی به هر پارامتر (۱-۳) و جمع زدن نهایی امتیازها، تومورها را به سه درجه (تمایز خوب یا درجه ۱ (۳-۵ امتیاز)، تمایز متوسط یا درجه ۲ (۶-۷ امتیاز) و تمایز ضعیف یا درجه ۳ (۸-۹ امتیاز) تقسیم می‌کند. بر این اساس تومورهای مورد مطالعه در این تحقیق که پس از بازنگری در گروه با درجه بالا طبقه‌بندی شدند، در گزارشات قبلی به طور متوسط از درجه تمایز ساختاری ۲ و ۳ ( $79/2\%$  و  $20/8\%$  به ترتیب)، میتوز با شاخص ۲ و ۳ ( $29/2\%$  و  $70/8\%$  به ترتیب) و درجه آتیپی هسته‌ای ۲ و ۳ ( $33\%$  و  $67\%$  به ترتیب) برخوردار بودند.

در گذشته کارسینوم‌های سروز بال درجه بالا، در گروه متوسط یا ضعیف تمایز یافته از سیستم Universal ( $29\%$  و  $71\%$  به ترتیب) دسته‌بندی شده بوده‌اند و از این بابت ارتباط معناداری بین آن‌ها پیدا گردید ( $P \leq 0/005$ ) ولیکن کارسینوم‌های سروز با درجه پایین، به‌طور متوسط از درجه تمایز ساختاری ۱ و ۲ ( $63\%$  و  $37\%$ )، میتوز با شاخص ۱ و ۲ ( $50\%$  و  $50\%$ ) و درجه آتیپی ۱ و ۲ ( $25\%$  و  $75\%$ ) برخوردار بودند که در مجموع در سیستم Universal در گروه خوب تمایز یافته قرار گرفتند که ارتباط معناداری نیز در این دسته پیدا شد ( $P \leq 0/005$ ). پارامترهای دیگر که در بررسی معمول هیستوپاتولوژیک اسلایدها مورد توجه قرار گرفت، درگیری سطح تخمدان‌ها، تهاجم عروقی، درگیری امتنوم و وجود یا عدم وجود اجسام پساموما (Psammoma bodies) بود که به همراه بعضی اطلاعات دموگرافیک بیماران در جدول ۱ آورده شد. هم‌چنین از نظر پاراکلینیک، سطح سرمی CA125 قبل از جراحی در بیماران با کارسینوماهای سروز با درجه بالا در محدوده ۶۵ تا ۵۹۳۶ (میانگین ۸۶۱) بود که در مقایسه با کارسینوماهای سروز با درجه پایین با محدوده ۷۸ تا ۱۰۶۷ (میانگین ۵۳۴) بالاتر بود ولی اختلاف معناداری بین این دو گروه یافت نشد ( $P = 0/42$ ).

رنگ‌پذیری P53 در کارسینوماهای سروز با درجه بالا به میزان ۱۲ مورد ( $54\%$ ) و درجه رنگ‌پذیری در موارد مثبت، بیش‌تر متوسط تا قوی ( $3+$  و  $4+$ ) بود در حالی‌که در هیچ‌کدام از کارسینوماهای سروز با درجه پایین واکنش مثبت برای P53 دیده نشد و در مواردی

که به صورت کانونی واکنش مثبت مشاهده شد. درجه رنگ‌پذیری ضعیف تا متوسط ( $1+$  و  $2+$ ) داشتند. در بررسی آماری انجام شده در این زمینه اختلاف معناداری در واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی P53 در کارسینوماهای سروز با درجه بالا ( $54\%$ ) و درجه پایین ( $0\%$ ) به‌دست آمد ( $P = 0/01 < 0/05$ ). از طرف دیگر رنگ‌پذیری P53 در کارسینوماهای سروز با درجه بالا و پایین ارتباطی با تهاجم عروقی، درگیری سطح تخمدان‌ها و یا امتنوم نداشت ( $P > 0/05$ ).

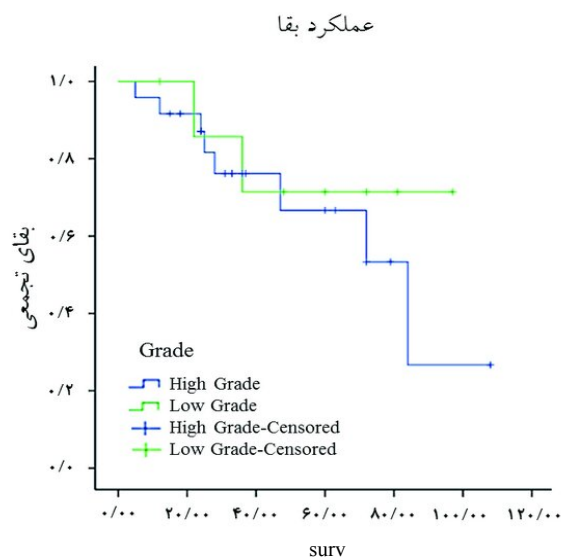
پی‌گیری بیماران بین سه تا ۱۰۸ ماه با میانگین ۶۵ ماه در بیماران کارسینوم سروز با درجه پایین و ۸۳ ماه در بیماران کارسینوم سروز

مورد تردید بود<sup>۶</sup> طی چندین بررسی مورد تایید قرار گرفت<sup>۱۶</sup> در حالی که بعضی مطالعات در اثبات آن ناموفق بودند<sup>۱۷</sup> که به‌طور قطع یکی از عوامل دخیل در این زمینه عدم وجود یک سیستم درجه‌بندی موثق و همگانی در درجه‌بندی کارسینوم سرروز تخمدان بود.

این عدم وجود هماهنگی و تکرارپذیری در درجه‌بندی کارسینوم‌های سرروز تخمدان که در نهایت منجر به گمراهی و ناهماهنگی در دسته‌بندی این تومورها می‌شود، افراد صاحب‌نظر را بر آن داشت تا سیستم درجه‌بندی جدیدی که دارای پایه و اساس بیولوژیک و مولکولار قوی و خدشه‌ناپذیر باشد را ارائه دهند که از درجه تکرارپذیری بین فردی و درون فردی بالایی نیز برخوردار باشد و بدین ترتیب در طبقه‌بندی کارسینوم‌های سرروز تخمدان تحول بزرگی ایجاد کرده و موجب هماهنگی در گزارشات پاتولوژی ارایه شده برای این دسته از تومورها در گذشته، حال و آینده شود و در نهایت در تنظیم پروتکل‌های درمانی این بیماران نیز مورد استفاده قرار گیرد. این سیستم جدید که تحت عنوان سیستم دوگانه (two-tier system) نام‌گذاری می‌شود، در مطالعات مختلف (به‌طور عمده گذشته‌نگر) ارزش پیش‌آگهی آن از لحاظ آماری و بررسی مولکولی مورد تایید قرار گرفته است. از طرف دیگر ارتباط کلی خوبی بین این سیستم و سیستم‌های قبلی نیز برقرار می‌باشد.<sup>۱۸</sup>

همان‌گونه که در بعضی مطالعات نیز تایید شده است، تقسیم کردن کارسینوماهای سرروز با درجه بالا به دو گروه متوسط یا ضعیف تمایز یافته دیگر ارزش پیش‌آگهی و بالینی نداشته و این دو طیف تمایز تومورهای سرروز تخمدان دارای یک مسیر بیماری‌زایی مشترک بوده و رفتار بیولوژیک یکسانی دارند. سعی ما بر این بوده است که با درجه‌بندی مجدد به یک هماهنگی و تکرارپذیری در این زمینه دست یابیم و سپس جهت تایید صحت کار به مطالعه ایمنوهیستوشیمیایی برای واکنش‌پذیری P53 به عنوان فاکتور مهم موثر در تومورزایی کارسینوماهای سرروز با درجه بالا پردازیم.

از آن‌جایی که فرم جهش یافته P53 پایدارتر است، سطح آن به حدی می‌رسد که با تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمیایی قابل شناسایی بوده و این حالت در فرم وحشی (جهش نیافته) P53 دیده نمی‌شود.<sup>۱۹</sup> لذا قابل مشاهده شدن P53 با روش ایمنوهیستوشیمیایی به معنای افزایش بیان آن می‌باشد که بیش‌تر به‌نظر می‌رسد به علت افزایش پایداری پروتیین یا نیمه عمر آن باشد تا افزایش رونویسی این ژن و



نمودار ۱: مقایسه میزان بقای پنج ساله در بیماران با کارسینوماهای سرروز با درجه پایین و بالا

با درجه بالا بود. از ۲۴ مورد کارسینوماهای سرروز با درجه بالا ۱۰ مورد عود و ۱۲ مورد مرگ به‌دلیل بیماری دیده شد که عودها به‌صورت ایجاد آسیت و افزایش CA125 تظاهر یافت که در بیماران با مرحله بالا (Stage III) و جراحی ساب‌اپتیمال رخ داده بود. از هشت مورد کارسینوماهای سرروز با درجه پایین، عود دیده نشد، هم‌چنین میزان بقای پنج ساله در بیماران با کارسینوماهای سرروز با درجه پایین و بالا به ترتیب ۷۸٪ و ۶۷٪ بود که در تست Log rank اختلاف معناداری بین آن‌ها یافت نشد. هم‌چنین به لحاظ آماری بین میزان بقا در دو گروه و بروز P53 تفاوتی وجود نداشت ( $P=0.08 > 0.05$ ) (نمودار ۱).

## بحث

اهمیت دو پارامتر، مرحله‌بندی (FIGO staging) و مقدار تومور باقیمانده بعد از جراحی در پیش‌آگهی بیماران مبتلا به کارسینومای سرروز تخمدان بر کسی پوشیده نیست و طی مطالعات قبلی انجام شده به اثبات رسیده است.<sup>۱۴، ۱۵</sup> هم‌چنین ارزش درجه‌بندی (Grading) هیستولوژیک تومور در پیش‌آگهی بیماران که در ابتدا

نظریه دیگری را که می‌توان مطرح کرد بر اساس مدل پاتوژن کارسینوم‌های سرروز با درجه بالا می‌باشد که شامل مراحل آغاز و پیشرفت این دسته از تومورهاست این مدل که توسط بسیاری از دانشمندان، به طرق مختلف، بیان شده است<sup>۲۳،۲۴</sup> به‌طور خلاصه نشان‌دهنده وقوع جهش ژن P53 و در نتیجه از دست رفتن عملکرد آن، به‌عنوان یک واقعه ابتدایی در تومورزایی می‌باشد. با از دست رفتن عملکرد این ژن به‌عنوان ژن سرکوب‌کننده تومور و به‌دنبال آن غیرفعال شدن ژن BRCA1، ناپایداری کروموزومی در نتیجه عدم کارایی آنزیم‌های ترمیم‌کننده DNA ایجاد می‌شود که زمینه‌ساز تغییرات گسترده در تعداد کپی‌های ژنوم و تسهیل وقوع جهش‌های بعدی خواهد شد.<sup>۲۵</sup>

با پیشرفت هرچه بیش‌تر در این مسیر امکان تغییر در نمای مورفولوژیک تومور و سیر بالینی آن بیش‌تر خواهد شد به‌گونه‌ای که شدت تغییرات ژنتیکی متعاقب واقعه اولیه، امکان شناسایی اتفاق (جهش) ابتدایی را کاهش خواهند داد.

اگرچه این تئوری نیازمند اثبات بر پایه اصول ژنتیک و مولکولار می‌باشد ولی تا حدودی توجیه‌کننده شرایط این چنینی است. در نهایت با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، بر اساس تقسیم‌بندی جدید، هرچند تفاوت معناداری بین رنگ‌پذیری P53 بین دو گروه کارسینوم سرروز به‌دست نیامد ولی چون تمامی موارد کارسینوم‌های سرروز با درجه پایین منفی بودند و ۵۴٪ موارد کارسینوم‌های سرروز با درجه بالا مثبت بودند شاید بتوان تعداد کم کارسینوم‌های سرروز با درجه پایین در این مطالعه و هم‌چنین گروه با تمایز ضعیف در گروه کارسینوم سرروز با درجه بدخیمی بالا که ممکن است متعلق به سایر گروه‌های تومورهای اپیتلیالی تخمدان باشند دلیل معنادار نشدن نتایج دانست که لازمه آن مطالعه با حجم نمونه بیش‌تر و استفاده از روش‌های تکمیلی دیگر مانند میکروسکوپ الکترونی و یا بررسی موتاسیون ژن P53 می‌باشد.

سپاسگزار: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بازنگری و طبقه‌بندی مجدد کارسینوماهای سرروز تخمدان بر اساس سیستم ارایه شده و بررسی بروز مارکر P53 در بیمارستان زنان تهران طی ده سال اخیر" در مقطع دکترای تخصصی پاتولوژی در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

یا ترجمه آن. البته لازم به ذکر است که افزایش بیان این ژن به معنای موتاسیون ژن نیست، همان‌گونه که جهش ژن نیز همیشه منجر به تجمع داخل سلولی پروتیین P53 نمی‌شود. بسیاری از مطالعات ضمن تایید ارتباط واکنش‌پذیری P53 در روش‌های ایمنو‌هیستوشیمیایی و وضعیت جهش این پروتیین در روش‌های مولکولار،<sup>۲۰</sup> حساسیت و ویژگی ناکافی الگوهای ایمنو‌هیستوشیمیایی در پیش‌گویی قطعی وضعیت جهش این ژن را اذعان می‌کنند در عین حال در مطالعه‌ای که توسط Singer انجام شد بیان شده است که احتمال جهش P53 در صورت رنگ‌پذیری ایمنو‌هیستوشیمیایی منتشر P53 (>۹۰٪) بالا خواهد بود و این احتمال در شرایط منفی بودن واکنش، بسیار پایین می‌باشد. از سوی دیگر واکنش کم‌تر منتشر P53 (<۹۰٪ از سلول‌ها) با فرم وحشی (جهش نیافته) در ۸۵٪ موارد مورد بررسی در آن مطالعه همراه بوده است.

لذا رنگ‌پذیری P53 در صورتی پیشنهادکننده جهش این ژن می‌باشد که الگوی منتشر و قوی در واکنش دیده شود و واکنش‌دهی کانونی یا ضعیف و نه حتی به‌کلی منفی در جهت رد جهش، به اندازه کافی قابل اطمینان خواهد بود.<sup>۲۱</sup>

اگرچه وجود این محدودیت‌ها باعث می‌شود بررسی ایمنو‌هیستوشیمیایی P53 را نتوان به‌عنوان روش جایگزین قطعی برای تعیین جهش P53 به‌جای بررسی توالی نوکلئوتیدها که روش استاندارد طلایی محسوب می‌شود به‌کار برد، اما با در نظر گرفتن الگوی رنگ‌پذیری و شدت آن می‌توان تخمین خوبی از وقوع جهش این ژن ارایه داد. معیاری که ما نیز در این مطالعه بر آن استناد کرده و به ارتباط معنادار خوبی بین رنگ‌پذیری P53 و درجه تومور دست یافتیم. فراوانی واکنش مثبت P53 در کارسینوم‌های سرروز با درجه بالا در مطالعه ما ۵۴٪ بود که با بررسی‌های انجام شده در مراکز دیگر هم‌خوانی داشت.<sup>۲۱،۲۲</sup>

در چهار مورد (۳۳٪) از کارسینوم‌های سرروز با درجه بالا که واکنش منفی P53 از خود نشان دادند، از نظر ساختاری، نمای غالب توپر (تمایز ضعیف) داشتند که می‌تواند پیشنهادکننده این مساله باشد که این تومورها ممکن است هم‌زمان متعلق به سایر گروه‌های تومورهای اپیتلیالی تخمدان (اندومتروئید، موسینوس یا تمایز نیافته) نیز باشند هرچند که شواهدی از تمایز سرروز را می‌توان در مورفولوژی این تومورها یافت.



## References

- Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 2010;34(3):433-43.
- McCluggage WG. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *J Clin Pathol* 2008;61(2):152-63.
- Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* 2009;16(5):267-82.
- Tavassoli FA, Devilee P. WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics. Tumors of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003. p. 113-61.
- Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 1998;82(5):893-901.
- Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol* 2004;28(4):496-504.
- Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R 2nd, Gardner G, Bristow R, Wang TL, et al. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18(3):487-91.
- Ayhan A, Kurman RJ, Yemelyanova A, Vang R, Logani S, Seidman JD, et al. Defining the cut point between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: a clinicopathologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol* 2009;33(8):1220-4.
- Vang R, Shih IeM, Salani R, Sugar E, Ayhan A, Kurman RJ. Subdividing ovarian and peritoneal serous carcinoma into moderately differentiated and poorly differentiated does not have biologic validity based on molecular genetic and in vitro drug resistance data. *Am J Surg Pathol* 2008;32(11):1667-74.
- Kurman RJ, Shih IeM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27(2):151-60.
- Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(6):484-6.
- Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;156(2):409-17.
- Frutoso C, Silva MR, Amaral N, Martins I, De Oliveira C, De Oliveira HM. Prognosis value of p53, C-erbB-2 and Ki67 proteins in ovarian carcinoma. *Acta Med Port* 2001;14(3):277-83.
- Hannibal CG, Vang R, Junge J, Kjaerbye-Thygesen A, Kurman RJ, Kjaer SK. A binary histologic grading system for ovarian serous carcinoma is an independent prognostic factor: a population-based study of 4317 women diagnosed in Denmark 1978-2006. *Gynecol Oncol* 2012;125(3):655-60.
- Mayr D, Diebold J. Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19(4):348-53.
- Doyle EM, Foley M, Kelehan P, Mooney EE. Histological grading of epithelial ovarian carcinomas. *J Obstet Gynaecol* 2007;27(1):71-4.
- Mauch PM, Ehrmann RL, Griffiths CT, Marck A, Knapp RC, Levene MB. Radiation therapy in stage II ovarian carcinoma: the influence of histologic grade. *Cancer* 1980;45(6):1344-51.
- Ishioka Si, Sagae S, Terasawa K, Sugimura M, Nishioka Y, Tsukada K, et al. Comparison of the usefulness between a new universal grading system for epithelial ovarian cancer and the FIGO grading system. *Gynecol Oncol* 2003;89(3):447-52.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351(6326):453-6.
- Soong R, Robbins PD, Dix BR, Grieu F, Lim B, Knowles S, et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996;27(10):1050-5.
- Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, et al. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol* 2005;29(2):218-24.
- Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164(5):1511-8.
- Abeln EC, Smit VT, Wessels JW, de Leeuw WJ, Cornelisse CJ, Fleuren GJ. Molecular genetic evidence for the conversion hypothesis of the origin of malignant mixed müllerian tumours. *J Pathol* 1997;183(4):424-31.
- Leitao MM, Soslow RA, Baergen RN, Olvera N, Arroyo C, Boyd J. Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;93(2):301-6.
- Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 10:x111-7.

## A new grading system "two-tier" in classification of ovarian serous carcinoma and evaluation of P53 gene expression by immunohistochemical staining

### Abstract

Received: 04 Jun 2013 Accepted: 07 Oct. 2013 Available online: 01 Dec. 2013

Narges Izadi-Mood M.D.<sup>1\*</sup>  
Soheila Sarmadi M.D.<sup>1</sup>  
Banafsheh Rajabian M.D.<sup>2</sup>  
Fariba Yarandi M.D.<sup>3</sup>  
Afsaneh Rajabiani M.D.<sup>2</sup>

1- Department of Pathology,  
Women Hospital, Tehran University  
of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Pathology,  
Shariati Hospital, Tehran Univer-  
sity of Medical Sciences, Tehran,  
Iran.

3- Department of Gynecology On-  
cology, Women Hospital, Tehran  
University of Medical Sciences, Te-  
hran, Iran.

**Background:** Recently the use of "two-tier" grading system in which ovarian serous carcinoma was classified as low-grade or high grade in comparing to preceding system has improved authority in prognosis and survival. This approach is simplistic, reproducible, and based on biologic evidence. In this study, we reclassified ovarian serous carcinoma by a new two-tier system for grading and then evaluation of P53 expression in these tumors by immunohistochemistry method.

**Methods:** We retrospectively reviewed 32 cases of ovarian serous carcinoma with previous diagnosis of well differentiated (eight cases) and moderate to poorly differentiated serous carcinoma (24 cases) and according "two-tier" grading system in low-grade vs. high grade serous carcinoma reclassified. Subsequently all cases immunostained by P53 marker. Also clinical data related to survival of patients (with or without recurrence of tumor and death) and paraclinical findings such as presurgical blood serum level of CA125 are gathered.

**Results:** Out of total eight patients with previously diagnosis, well differentiated serous carcinoma and of 24 patients with moderate to poorly differentiated serous carcinoma reclassified as low grade and high grade ovarian serous carcinoma respectively and a statistically significant difference was found between two groups. ( $P < 0.005$ ) Also of total 24 cases with high grade serous carcinoma, in 12 cases (54%) P53 immunostaining was detected but in non of all low grade serous carcinoma was seen. All 8 low grade serous carcinoma were alive without recurrence of tumor. In 10 and 12 out of 24 cases with high grade serous carcinoma recurrence of tumor and death were seen respectively.

**Conclusion:** Since the presence of P53 negative expression in all of low grade serous carcinoma by immunostaining and low grade serous carcinoma accounts for small population of all ovarian serous carcinoma and also few cases in our study, we did not find significant differences between P53 expression and survival in two low grade vs high-grade serous carcinoma groups.

**Keywords:** gene P53, immunohistochemistry, neoplasm grading, ovarian neoplasms.

\* Corresponding author: Department of Pathology, Women (Mirza Koochak Khan) Hospital, Nejatollahi St., Karim Khan Zand Ave., Tehran, Iran.  
Tel: +98- 21- 88906767  
E-mail: nizadimood@yahoo.com