دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال ششم، شماره ۲، صفحه ۱۲۱-۱۱۵ (اسفند۱۳۸۲)

مطالعه لکتین هیستو شیمی دی ساکارید گالاکتوز /N – استیل گالاکتوز آمین در ازوفاژیت و کارسینومای مری

دکتر محمد رضا عرب[۱]، دکتر مهربد کریمی [۲]، دکتر رسول اسمی [۳]

[۱] استادیار بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
[۲] استادیار آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
[۳] پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

چکیده:
تغییر ماهیت قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول بدلیل تغییر روند گلیکوزیلاسیون ترکیبات پروتئینی درسطح سلول و ماتریکس خارج سلولی یکی از فرآیندهائی است که در تعداد زیادی از بیماری های سرطانی گزارش شده است و بدین دلیل توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است. بعلاوه اهمیت تشخیصی، پیش آگهی و حتی تعیین پروتکل درمانی بیماران سرطانی با توجه به ترکیبات فوق مورد تاکید قرار گرفته است. هدف از این مطالعه ردیابی دی ساکارید گالاکتوز / N– استیل گالاکتوز آمین در ازوفاژیت و کارسینوم سلولهای سنگفرشی مری بود. بدین منظور ۲۰ بیمار (۱۰ بیمار ازوفاژیت و ۱۰ بیمار با کارسینوم سلول های سنگفرشی) از فایل آسیب شناسی بیمارستان خاتم الانبیاء زاهدان انتخاب گردید. بلوکهای پارافینی برش گیری شد و نمونه‌ها با تکنیک **PNA/Alcian Blue pH** = ۲/۵ رنگ آمیزی شدند. (لکتین در بافر **PBS** با **pH** = ٦/٦ و غلظت **M** ۰/۱ به میزان **µg/ml** ۱۰ رقیق گردید). برای ظهور واکنش از محلول ۰/۰۳٪ **DAB** استفاده شد.نتایج حاصل از این مطالعه حضور قند انتهائی گالاکتوز / **N** – استیل گالاکتوز آمین را به صورت داخل هسته‌ای در سلول های بازال و با شدت بیشتری در سیتوپلاسم سلول های سطحی در ازوفاژیت نشان داد. در غدد ازوفاژیال در بیماران ازوفاژیت پاسخ سلول ها به صورت آپیکال و با شدت بیشتری مشاهده گردید. در کارسینوم سلول های سنگفرشی حضور این قند انتهائی فقط به صورت خیلی ضعیف در هسته سلول های نئو پلاستیک ملاحظه شد. عناصر التهابی در هیچکدام از موارد به لکتین پاسخی ندادند. بنظر می‌رسد در سلول های نئوپلاستیک مری نوعی کاهش پاسخ به لکتین **PNA** در سلول های بدخیم ملاحظه می‌گردد. مطالعات آینده نقش بیشتر این ترکیبات را در نئوپلازی نشان خواهد داد.

واژگان کلیدی: ازوفاژیت، کارسینوم مری، لکتین، نئوپلاستیک

آدرس: زاهدان، میدان مشاهیر، دانشکده پزشکی گروه علوم تشریحی.، فاکس: ۲٤٤۲٤۸۱ – ۰٥٤۱، تلفن همراه ۰۹۱٥۳٤۱٤۳٥٤
پست الکترونیک: mr_arabz@yahoo.com

مقدمه:

علیرغم پیشرفتهای فراوان دهه های گذشته در تشخیص، درمان و اپیدمیولوژی سرطان مری (کارسینوم سلول های سنگفرشی)، این بیماری هنوز یکی از دلایل اصلی مرگ و میر به علت سرطان در دنیا می باشد. به نظر می رسد شیوع این بیماری در بعضی مناطق دنیا بسیار بالاتر از سایر قسمت ها است. در ایران و بخصوص استانهای شمالی (استان مازندران) شیوع این بیماری سرطانی ۵۰-۲۰۰ بیمار به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت می‌باشد، که بسیار بالاتر از ۲ بیمار به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (۱). با توجه به فاکتورهای متعددی که رفتار بیولوژیک سلولهای سرطانی را تحت تاثیر خود قرار می دهد، به نظر می رسد که تغییر ماهیت قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه های سطح سلول یکی از فاکتورهای مهم و موثر در تغییر ماهیت این سلولها و زمینه ساز قابلیت تهاجم و متاستاز در آنها است (۲).

مطالعات هیرایزومی و همکاران (۱۹۹۰) نشان داده است که اختلافات کمّی فراوانی میان زنجیره های قندی گلیکوکونژوگه های اپی تلیوم طبیعی و کارسینومایی مری وجود دارد(۳). کارسینوم سلولهای سنگفرشی (Squamous Cell Carcinoma) SCC بیماری نئوپلاستیکی با پیش آگهی بد می باشد که بیان گالکتین ها به عنوان لکتین های اندوژنوس در آن به شدت تغییر می یابد. مطالعات نشان داده است که این پدیده می تواند به عنوان الگویی برای گریدینگ سلولهای نئوپلاستیک و هم چنین تعیین پروگنوز بیماران مورد توجه قرار گیرد(٤). لکتین ها ترکیباتی گلیکوپروتئینی هستند که قابلیت فوق العاده ای برای اتصال به قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه های سلولی دارند. از آنجا که در سیر تغییرات نئوپلازی، قندهای انتهایی گلیکوکونژوگه های سلولی تغییرات کمی و کیفی فراوانی پیدا می کنند، الگوی واکنش سلولها به لکتین ها نیز بشدت تغییر می یابد و شناسایی این تغییرات به کمک لکتین ها می تواند مبنایی برای شناسایی سلولهای با پتانسیل بالا برای حرکت به سمت نئوپلازی باشد (۵). مطالعات نشان داده است که قابلیت واکنش سلول های نئوپلاستیک به لکتین ها در کارسینومای پستان ، معده، تخمدان، مری و کولون متفاوت از همتای نرمال آنها است و بعلاوه ارزش پروگنوستیک آنها نیز نشان داده شده است، آن چنان که تقریبا ۸۰ درصد سلول‌های با پتانسیل متاستاز در پستان با لکتین Helix Pomatia Agglutinin (HPA) واکنش داده و بنابراین رد یابی می‌شوند، وتنها ۲۰ درصد سلول‌ها به این لکتین پاسخی نمی دهندکه این موضوع نشان دهنده مکانیسم‌های پیچیده‌ای در مسیر گلیکوزیلاسیون، گلیکوکونژوگه‌های سلولی و تغییرات احتمالی آنها در مسیر نئوپلازی می باشد. یکی از موضوعات سئوال بر انگیز و امیدوار کننده این تحقیقات، تعیین ساختار دقیق گیرنده های لکتینی و شناسایی نقش های احتمالی آنها در مسیر نئوپلازی و متاستاز می باشد(٦).

اپی تلیوم پوشاننده مری، پوششی از نوع سنگفرشی مطبق غیر شاخی می باشد که قابلیت بالایی برای مقاومت در برابر فشارهای مکانیکی وارد بر اپی تلیوم دارد. به نظر می سد گلیکوکونژوگه های بین سلولی پوشش مخاط مسئول اصلی نفوذناپذیری و مقاومت مکانیکی پوشش مری هستند. بعلاوه نشان داده شده است که بیشترین میزان واکنش به لکتین ها در ردیف های سلولهای سطحی پوشش مخاط وجود دارد(۷). هدف از این مطالعه ردیابی قند انتهایی(Gal/GalNac) Galactose/N-acetyl galactose amine به عنوان یک تومور مارکر در پوشش التهابی و کارسینوم سلولهای سنگفرشی در مری بود.

مواد و روش‌ها:

بلوک‌های پارافینی از ۲۰ بیمار (۱۰ بیمار با تشخیص ازوفاژیت و ۱۰ بیمار با تشخیص کارسینوم سلول های سنگفرشی) از فایل آسیب شناسی بیمارستان خاتم الانبیا زاهدان انتخاب گردید، پس از مطالعه لام های هماتوکسیلن_ائوزین بیماران و تایید تشخیص قبلی از بلوکهای فوق مقاطعی به ضخامت ۵-٦ میکرومتر (٤ برش از هر بلوک) تهیه شد. برای انجام واکنش لکتین هیستوشیمی از لکتی(PNA) Peanut agglutinin با رقت ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر، رقیق شده در بافر فسفات(PBS) Phosphate buffer solution با غلظت ۰/۱ مولار و PH = ٦/٦ استفاده شد. برشها پس از پارافین زدائی و آبدهی به روش معمول در آسیب شناسی

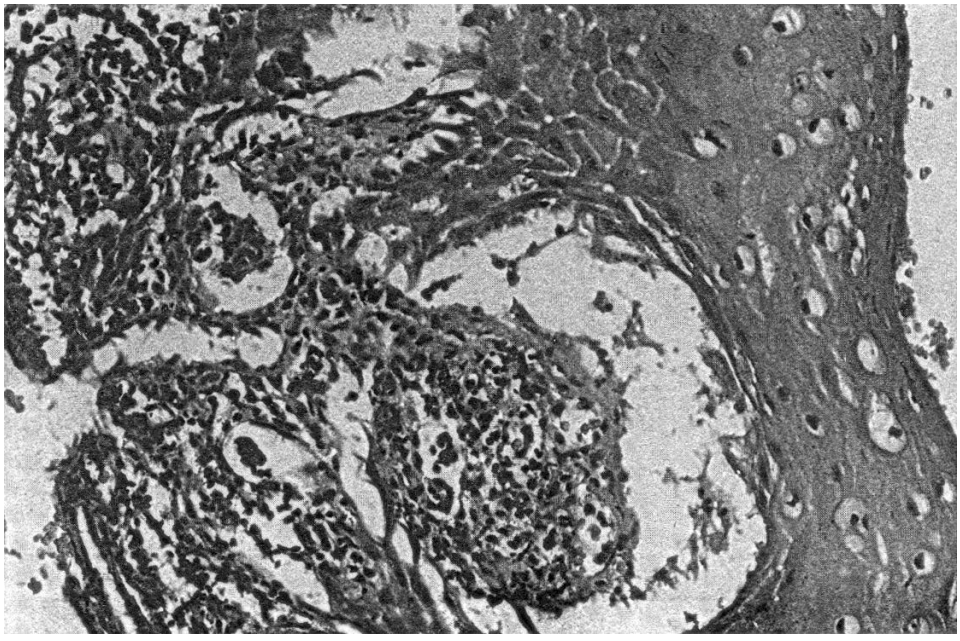
به مدت ۲ ساعت در اتاقک مرطوب در مجاورت لکتین قرار گرفتند. مقاطع پس از شستشو در بافر فسفات به منظور ظهور واکنش به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در محلـــــــول ۰/۰۳ % DAB)Diaminobenzidine) که محتوی ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات بود، قرار گرفتند. برای توقف واکنش مقاطع به مدت ۲-۵ دقیقه در آب جاری شستشو شدند. سپس برشها به مدت ۲-۵ دقیقه در محلول آلسین بلو با pH= ۲/۵ قرار گرفتند و آنگاه به روش معمول آبگیری و چسبانده شدند(۸). مواد و رآژین های لازم از شرکت سیگما با واسطه هلال احمرجمهوری اسلامی ایران خریداری شدند.

نتایج:

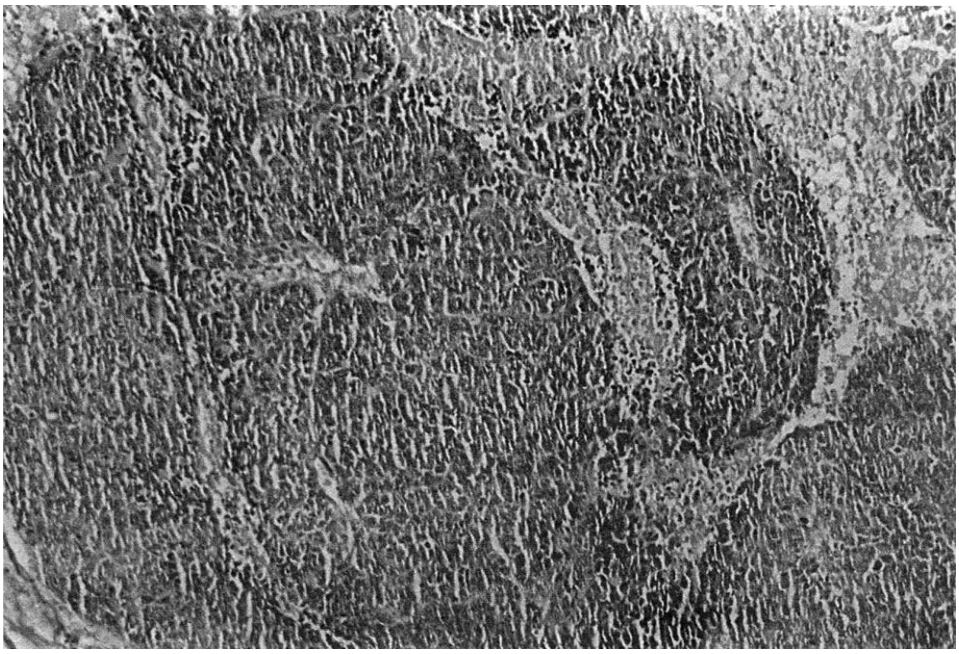
در مطالعه لامهای هماتوکسیلن_ائوزین بیماران با تشخیص ازوفاژیت، کاهش ضخامت پوشش مخاطی و طویل شدن پاپیلاها همراه با از هم گسیختگی سلولی و از بین رفتن نظم سلولهای ردیف بازال به خوبی مشخص بود. بیشتر سلولهای ردیف میانی حالت چند وجهی خود را از دست داده بودند و حالت خار مانند سلولهای ردیف میانی قابل تشخیص نبود. لامینا پروپریا حالت ادماتوز داشت و انفیلترای آماسی شدید آن کاملا مشخص بود. در لامهای بیماران کارسینومایی درجات متفاوتی از تمایز سلولی مشاهده شد. اشکال میتوزی به وفور در میدان دید قابل تشخیص بود، سلولهای تومورال از نظر شکل و اندازه نوعی پلئومورفیسم نشان می دادند و سلولهای نئوپلاستیک به صورت طنابها و توده های سلولی در میدان دید قابل تشخیص بود. (فتومیکروگراف ۲ و ۱).

در مطالعه لامهای لکتینی از موارد ازوفاژیت، نوعی گرادیان افزایش پاسخ به لکتین در پوشش مخاطی از ردیف های سلولی قاعده ای تا سطحی مشاهده شد. سلولهای ردیف های سطحی واکنش شدیدتری نسبت به ردیف های قاعده ای از خود نشان می دادند. هسته سلولها در بیماران ازوفاژیت واکنشی به لکتین از خود نشان نمی داد. در غدد ازوفاژیال در موارد ازوفاژیت پاسخ سلولها به لکتین به صورت آپیکال و با شدت بیشتری مشاهده گردید. در بیماران کارسینومایی، هسته های سلولی واکنش به لکتین از خود نشان می دادند؛ در حالی که در سیتوپلاسم سلول های تومورال واکنشی به لکتین دیده نشد. استرومای تومور نیز به لکتین پاسخی نداشت. واکنش استرومای تومور به رنگ آمیزی آلسین بلو برای ترکیبات اسیدی گلیکوزآمینوگلیکانی مثبت بود. عناصر التهابی در هیچکدام از موارد به لکتین پاسخی ندادند (فتومیکروگراف ۳ و ٤).

فتومیکروگراف ۱: انفیلتراسیون سلولهای التهابی همراه با کاهش ضخامت اپی تلیوم در نمونه ای از ازوفاژیت نشان داده شده است. H_E ×۱۲۵

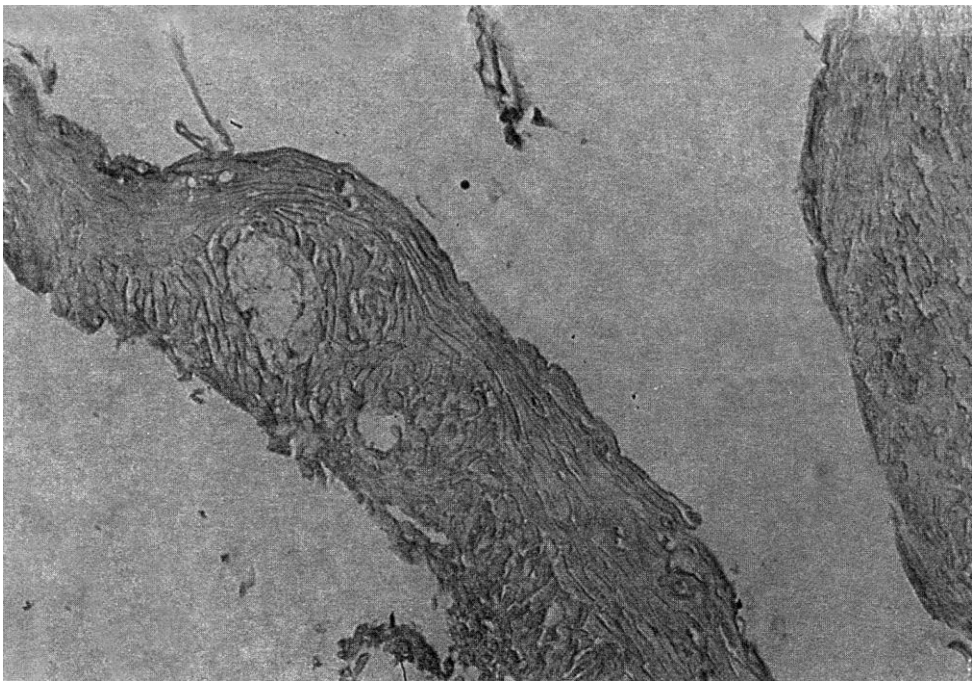


فتومیکروگراف ۲: اجتماع فراوان سلولهای تومورال برای تشکیل مجتمع های سلولی مرواریدی در کارسینوم سلولهای سنگفرشی مری نشان داده شده است.۱۲۵ × H_E.

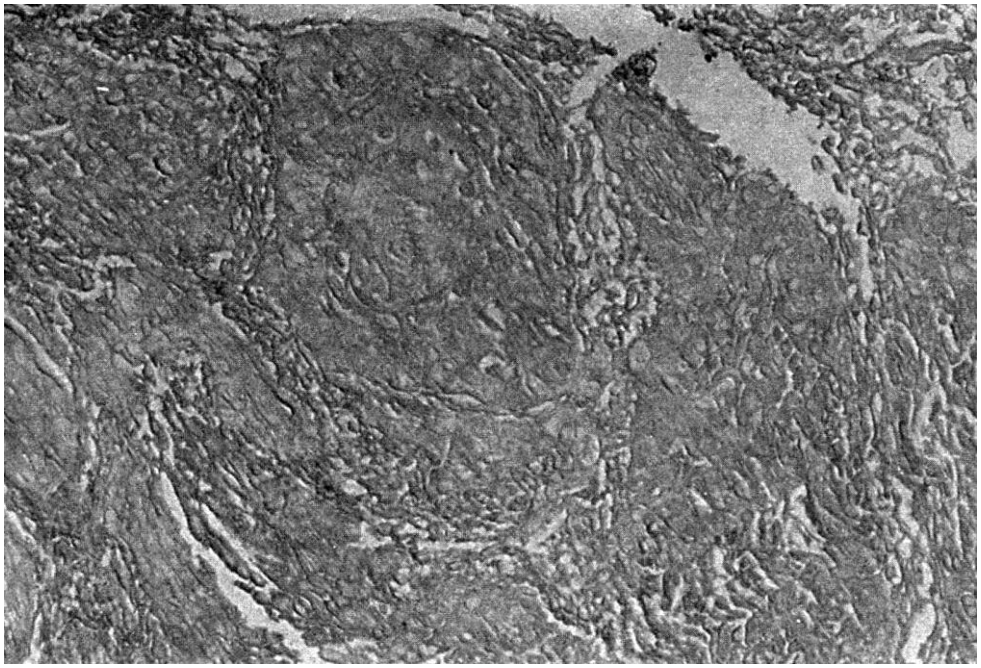


فتومیکروگراف ۳: واکنش شدید سلولهای سطحی به لکتین در ازوفاژیت نشان داده شده است

× ۱۲۵ PNA/Alcian blue pH=2.5



فتومیکروگراف ٤: واکنش درون هسته ای سلولهای نئوپلاستیک به لکتین **PNA** و واکنش منتشر استروما به آلسین بلو در کارسینوم سلولهای سنگفرشی مری نشان داده شده است. ۱۲۵ × **PNA/Alcian blue pH=2.5**



بحث:

لکتین PNA توانایی ردیابی دی ساکارید Gal/GalNac را در مقاطع بافتی دارد، این دی ساکارید به عنوان شاخص آنتی ژنیک Antigenic determinant برای بعضی آنتی ژنهای گروههای خونی نیز می باشد که بیان آن در بیماریهای نئوپلاستیک تغییر می یابد(۹). نتایج مطالعه حاضر وجود گلیکوکونژوگه های با این دی ساکارید را در هسته سلولهای نئوپلاستیک و سیتوپلاسم سلولهای ردیف های سطحی در پوشش التهابی مری نشان داد. این دی ساکارید معمولا به عنوان تومور مارکر در سرطانهای کولورکتال نیز شناخته می شود. به نظر می رسد در سیر تغییرات نئوپلازی در مری نوعی شیفت در محل واکنش به لکتین از سیتوپلاسم در سلولهای ردیفهای سطحی در پوشش التهابی مری به هسته در سلولهای کارسیـــــنوماتوز اتفاق می افتد.

مطالعات کولار و همکاران (۱۹۹۰) نشان داده اســـت که تغییر در الگوی بیان گلیکوکونژوگه های سلولی حاصل تغییر در روند گلیکوزیلاسیون ترکیبات پروتئینی در سلول و تجمع ترکیبات غیر طبیعی در آن می باشد(۱۰). مطالعات یوشیدا و همکاران (۱۹۹۳) نشان داده است که ماهیت گلیکوکونژوگه های سلولی در سرطان مری تغییر می کند، آنچنان که سلولهایی که قابلیت واکنش به لکتین HPA را دارند از توان متاستاز بالاتری نیز برخوردارند. این مطالعه هم چنین نشان داده است که پیش آگهی در بیمارانی که سلولهای نئوپلاستیک در آنها HPA مثبت است به مراتب از بیمارانی که HPA منفی هستند بدتر است. بنابر این پیشنهاد می شود از این لکتین برای ارزیابی پیش آگهی در بیماران سرطانی مری استفاده شود(۲). مطالعات روبلوسکی و همکاران (۲۰۰۰) نیز نشان داده است که قابلیت سلولهای اپی تلیوم بارت Barrets Epithelium در مری نسبت به سلولهای طبیعی بیشتر است(۵). مطالعه حاضر نیز نشان داد که محل واکنش سلولها به لکتین PNA در ازوفاژیت نسبت به موارد سرطانی متفاوت است. آن چنان که این

واکنش در سلولهای پوشش التهابی مری، واکنشی سیتوپلاسمی و در سلولهای نئوپلاستیک واکنشی درون هسته ای بود. به نظر می رسد در سلولهای در حال تقسیم واکنش به این لکتین محدود به هسته می باشد، پاسخ مثبت سلولهای بازال در پوشش مری به لکتین موید این موضوع است. مطالعه یانگ و همکاران (۱۹۹۲) نشان داده است که تغییر در الگوی واکنش سلولها به لکتین ها قبل از بروز مشخصات مورفولوژیک ویژه ی آنها روی می دهد(۱۱). بنابر این می توان از لکتین هیستوشیمی در شناسایی ابتدایی ضایعات تومورال استفاده کرد. شناسایی این بیماریها در مراحل ابتدایی می تواند مبنایی برای برنامه های بیماریابی دسته جمعی برای افراد در معرض خطر و هم چنین افزایش بقا عمر پنج ساله در بیماران باشد(۱۲). مطالعات هم چنین اهمیت واکنش پذیری سلولهای نئوپلاستیک به لکتین ها را از جهت تعیین پروتکل درمانی نیز نشان داده است(۱۳). به نظر می رسد تغییرات گلیکوکونژوگه ها در سلولهای نئوپلاستیک مسئول فرار سلولهای تومورال از روند مرگ برنامه ریزی شده سلولی و هم چنین مقاومت در برابر داروهای سیتوتوکسیک نیز باشد(۱٤). هر چند مطالعات اهمیت دیاگنوستیک یا پروگنوستیک لکتین ها برای تعدادی از بیماریهای تومورال را نشان داده است، به نظر می رسد درک بیولوژی ترکیبات قندی سلول برای توجیه فرآیندهای فوق، هنوز محتاج مطالعات بیشتری باشد.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله بر خود واجب می دانند از همکاری شورای محترم پژوهش دانشکده پزشکی زاهدان در تصویب این کار پژوهشی صمیمانه تشکر نمایند. هم چنین از همکاران محترم بخش های تشریح دانشکده پزشکی و آسیب شناسی بیمارستان خاتم الانبیا زاهدان و مرکز تحقیقات دانشگاه تشکر و قدردانی می شود.

References :

1. Leichman L, Israil V. Neoplasm of the esophagus. In: Carabresi P, Schein P. Medical oncology. 2nd ed. New York: Mc Graw Hill Inc, 1993, 649-70.
2. Yoshida Y, Okamura T, Shirakusa T. An immunohistochemical study of Helix Pomatia agglutinin binding on carcinomas of the esophagus. Surg Gynecol Obst 1993; 177:299-302.
3. Hiraizumi S, Takasaki S, Nishishira T, et al. Comparative study of N-linked oligosacharide released from normal human esophageal epithelium and esophageal squamous carcinoma. Jpn J Cancer Res 1990; 81: 363-71.
4. Kayser K, Hauck E, Andrews S, et al. Expression of endogenous lectins (galectins, receptors for ABH epitope) and the MIB-1 antigen in esophageal carcinoma and their syntactic structure analysis in relation to post surgical tumor stage and lymph node involvement. Anticancer Res 2001; 21: 1439-44.
5. Wroblewski S, Berenson M, Kopeckova P, et al. Biorecognition of HPMA copolymer lectin conjugate as an indicator of differentiation of cell surface glycoconjugate in development, maturation and disease of human and rodent gastrointestinal tissue. J Biomed Mater Res 2000; 51: 329-42.
6. Brooks SA. The involvement of Helix pomatia lectin binding N-acetylgalactoseamine glycans in cancer progression. Histol Histopathol 2000; 15: 143-58.
7. Poorkhakhali N, Jacobson I, Helander HF. Lectin histochemistry of esophagus in several mammalian species. Anat Embryol 1999; 200: 541-9.
8. Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cell differs with genera. Anat Rec 1990; 228: 177-84.
9. Said IT, Shamsudin AM, Sherief MA, et al. Comparison of different technique for detection of Gal/GalNac, an early marker of colonic neoplasia. Histol Histopathol 1990; 14: 351-7.
10. Kolar Z, Mikolaskora J, Majerova S, et al. Occurrence of some blood group antigen like glycoconjugate in colorectal tumor. Acta Univ Palacki Fac Med 1990; 125: 73-78.
11. Yang K, Liu Y, Lipkin M, et al. Precancerous lesions of the human esophagus: Multiparametric study of esophageal biopsies from a high population in linxian, China. J Cell Biochem 1992; 16: 187-94.
12. Boland CR, Ahen DJ. Binding of lectins to goblet cell mucin in malignant and premalignant colonic epithelium in the CF1 mouse. Gastroentrol 1985; 89: 127-37.

13. Vierbunchen M, Klain PJ, Rosel S, et al. PNA binding sites: A useful marker for hormonal dependence in experimental breast cancer. Cancer Prev 1983; 6: 207-14.

14. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiate cellular multidrug resistance. FASEB J 2001; 15: 719-30.

15. Soderman KO. Lectin binding to prostatic adenocarcinoma. Cancer 1987; 60: 1823-31.