بررسی تکثیر و بیان انکوژن *C-MYC* در سرطان معده در جمعیت ایرانی با دو روش

IHC (Immunohistochemistry) و CISH (Chromogenic in situ hybridization)

چکیده

زمینه وهدف : بروز سرطان معده در کشور های غربی در سال های اخیر کاهش نشان داده است، در حالی که در ایران شایع ترین سرطان در بین مردان است. ژن *MYC* ، در روی کروموزوم 8q24.1 قرار گرفته وتقریباً ۱۵% ژنهای انسان را تنظیم ، ودر ۲۰% تمام تومورهای انسان فعال میشود. تکثیر *MYC* و بیان بیش از حد آن در ۳۰-۱۵% نئوپلازیهای معده مشاهده شده است. هدف از این مطالعه، بررسی برتری آزمایش CISH نسبت به IHC در پیش آگهی سرطان معده بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، ۱۰۲ بلوک پارافینه ازنمونه سرطان معده مورد بررسی قرارگرفت و تمام بیماران در انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد جراحی قرار گرفته بودند. روش های CISH وIHC بر روی نمونه ها انجام شد.

یافته ها :داده ها نشان داد که هر دو نوع سرطان معده منتشر و روده ای در مردان به طور قابل توجهی بیشتر اتفاق می افتد. نتایج ما نشان داد که نشانه ای از همبستگی بین grade و آزمایش CISH وجود دارد، گرچه این تفاوت معنی دار نبود، ولی بین stage و IHC تفاوت معنی داری وجود داشت. آزمایش CISH بیشتر بیماران، بیش از دو سیگنال (۴۳،۱%) ولی تعداد کمتری از بیماران تست IHC(۱۴،۷%)سیگنال مثبت داشتند. بین آزمایش CISH وIHC ارتباط وجود داشت.ولی هیچ اختلاف معنی داری بین تکثیر CISH در انواع منتشر و روده ای وجود نداشت.

نتیجه گیری : این نتایج نشان داد که با توجه به حساسیت و ویژگی، آزمایش CISH نسبت به IHC آزمایش بهتری میباشد.

کلمات کلیدی : تکثیر و بیان انکوژن *C-MYC*، سرطان معده، جمعیت ایرانی، CISH،IHC.

Study of C-MYC amplification and expression in stomach cancer samples in Iranian population using two techniques of CISH and IHC

Abstract

Background: The incidence rate of gastric cancer in Western Countries has shown a remarkable decline in recent years while it is still the most common cancer among men in Iran. The proto-oncogene *MYC*, located at 8q24.1, regulates almost 15% of human genes and is activated in 20% of all tumors. *MYC* amplification and overexpression of its protein product are observed in 15-30% of gastric neoplasias. The objective of this study was to find the preference of CISH or IHC in diagnosis and prognosis of gastric cancer.

Methods: In this cross-sectional investigation, 102 paraffin blocks samples of Iranian patients with gastric cancers were studied. All the patients had undergone primary surgical resection at Cancer Institute Hospital, Tehran University of Medical Sciences. CISH and IHC techniques were applied on the samples. All samples were adenocarcinoma gastric cancer and were selected randomly.

Results: Our data revealed that both diffuse and intestinal types of gastric cancer occurred significantly more in men than women. Our results showed that there was an indication of some correlation between grades and CISH results, although the difference was not significant. Our data also showed that CISH+ patients (43.1%) were more frequent in comparison with IHC+ patients (14.7%).There was correlation between CISH and IHC. This result revealed that there was a significant difference between grades and IHC. There was also no statistically significant difference between *CISH* amplification in diffuse and intestinal types.

Conclusion: Our conclusion is that for the treatment management of stomach cancer, and monitoring of progress and prognosis of tumor, which is most important for patients and clinicians, CISH is a better and more feasible test than IHC, with regards to sensitivity and specificity.

Keywords: C-MYC amplification and expression, stomach cancer, Iranian population, CISH, IHC.

مقدمه

سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دوّمین علت اصلی مرگ در اثر سرطان در جهان است. بر اساس تخمین جهانی، بیش از ۹۳۰،۰۰۰ مورد جدید سرطان معده، سالیانه تشخیص داده می شود و حداقل ۷۰۰،۰۰۰ نفر از این بیماری می میرند، و بنا براین یک مشکل جدی سلامت جامعه محسوب میشود [۱]. تا این اواخر سرطان معده شایع ترین سرطان در جهان بود، اما میزان بروز آن به طور چشمگیری کاهش یافته است. دلیل کاهش قابل توجه در بروز سرطان معده ناشناخته است، ولی استفاده گسترده و همزمان از تکنیک های نگهداری مدرن غذا و یخچال می تواند در این کاهش نقش داشته باشد. بهبود کلی وضعیت تغذیه ای و در دسترس بودن انواع میوه های کافی و سبزیجات تازه، همچنین آگاهی عمومی در مورد خطرات ناشی از مواد غذایی فست فود و شور و نیزآگاهی در مورد عفونت هلیکوباکتر پیلوری، فاکتورهای محافظت کننده ای از ابتلا میباشند [۲]. شناسایی مشخصات ژنتیکی خاص تومورهای معده میتواند به پیش آگهی در بیماران مبتلا به سرطان معده کمک نماید و راه کارهای درمانی دقیق تری را نشان دهد.ما به علت مزایایی که CISH دارد آنرا جهت بررسی انتخاب کردیم. مراحل آماده سازی بافت و دورگه سازی پروب در FISHو CISHمشابه همدیگر هستند. با توجه به قابل انجام بودن،دقت و هزینه، CISH یک جایگزین مناسب برای FISH میباشد [۳]. همچنین بررسی *MYC* را انجام میدهیم زیرا،انکوژن *MYC(C-MYC)* به عنوان یک عنصر کلیدی در مراحل مختلف کارسینوژنز در انسان شناخته شده است[۵, ۴]. در بیش از ۴۰% از سرطان های معده بیان فراوان *MYC*شرح داده شده است. شناسایی تکثیر *MYC* مي تواند به عنوان یک وسیله کمکی برای تشخیص سرطان معده و نیز به عنوان یک فاکتور پیش بینی برای پیشرفت سرطان معده استفاده شود.همینطور با مهار ژن *C-MYC* می توان استفاده درمانی داشت و *MYC* میتواند به عنوان هدف درمانی باشد. چندین مطالعه تجربی نشان داده که در مدل های حیوانی، غیر فعال شدن *MYC* باعث پسرفت تومورها میشود، واین نشان میدهد که *MYC*می تواند به عنوان یک هدف مولکولی در درمان سرطان محسوب شود[۷, ۶] . به طور خلاصه ، این مطالعه قصد دارد تا با بررسی تکثیر *ژن-C MYC* در دو نوع سرطان معده(خوب متمایز شده یا روده ای ومتمایز نشده یا منتشر) با روش کاملاً جدید واختصاصی CISH،و نیز مقایسه بیان این دو ژن در هر دو نوع سرطان معده به تعیین دقیق تر و اختصاصی تر، پیش آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده کمک نماید[۱, ۶].

روش بررسی

بیماران ونمونه های بافتی

۱۰۲ بلوک پارافینه ازنمونه بافت سرطان معده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان انستیتو کانسر، که گزارش پاتولوژی آنان نیز بیماری را تأیید کرده بود، و از ۵۰ بلوک از بافت نرمال معده اطراف توموربه عنوان کنترل منفی استفاده گردید. تمام نمونه ها با تایید از مؤسسه سرطان ایران (بانک DNA) تهیه گردیدند. این مطالعه از سال ۱۳۹۳-۱۳۸۷ انجام گردید. قبل از ورود به این مطالعه، تمام نمونه ها توسط یک هیستوپاتولوژیست ارشد (ع.ج) تأیید گردیدند. همه افراد قبل از عمل جراحی، در معرض شیمی درمانی ویا پرتو درمانی قرار نگرفته بودند. تومورهای معده با توجه به سیستم لورن[۸] طبقه بندی ، و نیز بر اساس سیستم طبقه بندی TNM [۹] دسته بندی شده اند.

انجام CISH

بر روی برش های بافت، که با ضخامت 3µm تهیه، و قبلاً با فرمالین تثبیت شده و در بلوک پارافینه قرار داده شده بودند، CISH انجام گردید. برشهای بافتی، بر روی لام مخصوص سوپر فراست قرارداده شدو با کیتZitovision

CISH انجام گردید.برش ها با گزیلل دپارافینه شده،سپس در سری اتانول از ۱۰۰% به ۷۰% آب دهی شدند. از کیت Zytodot شماره 3018 -C (آلمان) استفاده گردید.

روز اول، اسلاید ها دربافر پرتریتمنت (pretreatment) انکوبه گردیدند،محلول پرتریتمنت (PT2) خوب بهم زده شد. سپس مقداری از آن را در جار مخصوص ریخته و در بن ماری C ^{0}۸۵ (Memmert آلمان) قرار گرفت، تا محلول گرم شود. سپس لامها بمدت نیم ساعت در محلول پرتریتمنت انکوبه شدند. محلول پپسین را بر روی بافت ریخته و بمدت ۱۰ دقیقه در محفظه مرطوب انکوبه شد. برش ها در سری اتانول آب گیری و در معرض هوا خشک شدند.

پروب *C-MYC* ZytoDot CISH (متصل به دیگوکسی ژنین) را ورتکس کرده و به هر نمونه 10µl اضافه شد. نمونه ها با یک لامل 22mm x22mm پوشانده شدند. اطراف لامل با یک لایه چسب داغ ویا rubber cement گرفته شد. اسلایدها در ^{0}C94-95 بمدت ۵ دقیقه روی یک اجاق دنچوره شدند(پلیت PCR). سپس اسلایدها به یک ظرف مرطوب منتقل شده تا در طول شب در ^{0}C37 هیبریدایز شوند(انکوباتور ^{0}C37).

روز دوم، چسب بدقت برداشته شد. لامل با فروبردن در بافر شستشوی SSC بمدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق برداشته شد. بمدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ^{0}C75-80 اسلاید در بافر شستشوی SSC شسته شد.اسلاید ها بمدت ۱۰ دقیقه در H2O2 3% انکوبه شدند. 3-4 قطره محلول Blockingرا بر روی هر اسلاید ریخته و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.محلول Blocking را خالی کرده ، اما دیگر شستشو لازم نیست. 3-4 قطره Mouse-Anti-DIG را بر روی اسلایدها ریخته وبمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. 3-4 قطره محلول Anti -Mouse-HRP-Polymer بر روی اسلایدها ریخته و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. 3-4 قطره محلول DAB را بر روی اسلایدها ریخته و بمدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه شدند. پراکسیداز با DAB (دی آمینوبنزیدین) واکنش نشان داده ورنگ قهوه ای آشکار می شود. بافت یا نمونه های سلول بمدت ۱۰-۸ ثانیه با هماتوکسیلین مایر رنگ شدند. آب گیری ودر گزیلل خالص انکوبه کرده و برشها در معرض هوا خشک شدند.

نمونه ها را با لامل با استفاده از محلول مونتینگ (پایه الکل) پوشانده و اسلایدها معرض هوا خشک شدند.. ارزیابی نمونه ها با میکروسکپ نوری انجام گردید.

تفسیر نتایج CISH توسط نویسنده اول با استفاده از یک میکروسکپ نوری با لنز ۴۰ انجام گردید (شکل۱: A,B,C,D). سیگنال ها به صورت نقاط قهوه ای تیره مشاهده شد. در هر نمونه تا ۲۰۰ هسته سلول بررسی گردید.

اگر کمتر از ۲ سیگنال در هر سلول دیده شود به عنوان عدم تکثیر No amplification ، اگر بین ۴-۲ سیگنال در هر سلول باشدLow amplification و اگر بین ۶-۴ سیگنال در هر سلول دیده شود Moderate amplification است. اگر تعداد سیگنالها بیش از ۶ سیگنال باشد High amplification اطلاق میگردد. سلولهای غیرسرطانی در بافت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. CISH با یک میکروسکپ لایتز آنالیزگردید. تصاویر با دوربین نیکون گرفته شد. تمام لامهای بیماران برای تشخیص نهایی توسط یک هیستوپاتولوژیست ارشد (ع.ج) بررسی وتأیید گردید.

انجام IHC

رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی برطبق روشCalcagno وهمکاران انجام شد(۱۰). بر روی برش های بافت که با ضخامت 3µm که قبلاً با فرمالین تثبیت شده و در بلوک پارافینه قرار داده شده بود،IHC انجام گردید. برشهای بافتی

بر روی لام مخصوص سوپر فراست قرار داده شدو با کیتScyTek تست IHC انجام گردید و بهترین آنتی بادی Biocare بود.لامها دپارافینه شدند. برای کاهش زمینه غیراختصاصی رنگ، که پراکسیداز درونزا ایجاد می کند، اسلایدها در هیدروژن پراکساید (H2O2) بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه انکوبه شدند.

مرحله Antigen Retrival با بافر سیترات در ماکروفر(بوتان) با درجه ۳۰% انجام شد.برای بهتر پیدا شدن اپی توپ ها می توان از آنزیم پپسین ویا پروتئیناز K استفاده کرد. یک قطره از آنزیم را بر روی اسلاید ریخته و در یک ظرف مرطوب در درجه حرارت 37^0C بمدت ۸ دقیقه انکوبه گردید.

چند قطره از Blocking (بطری درب آبی) را بر روی اسلاید ریخته وبمدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه شد.این مرحله نیاز به شستشو ندارد. بلاکینگ برای از بین بردن زمینه رنگ آمیزی غیراختصاصی است.10 µl آنتی بادی اولیه را بر روی اسلاید ریخته و روی آن یک لامل قرار داده و دریک ظرف که مرطوب باشد در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. این انکوبیشن می تواند ۲ ساعته و یا در طول شب باشد.مرحله بعدی سه تا شستشوی یک دقیقه ای در PBS است. آنتی بادی ثانویه Ultra Tek Anti-Polyvalent را بر روی اسلاید ریخته تا کل بافت را بپوشاند، سپس ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه گردید. یک قطره HRP بر روی اسلاید ریخته وسپس بمدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه گردید. یک قطره کروموژن DAB (40µl) رابه 1ml سوبسترای DAB اضافه ومخلوط کرده وچند قطره از آن را بر روی اسلاید ریخته وبمدت ۱۵- ۱۰ در درجه حرارت اتاق انکوبه گردید. سپس از رنگ هماتوکسیلین به عنوان Counterstain استفاده می شود. مرحله آب گیری که گذراندن اسلایدها از الکل ۷۰% به الکل ۱۰۰% است .نمونه ها را با لامل با استفاده از محلول مونتینگ (پایه الکل) پوشانده و اسلایدها را بمدت ۳۰ دقیقه در معرض هوا خشک گردیدند. رنگ هسته با یا بدون رنگ آمیزی سیتوپلاسمیک با توجه به شدت رنگ به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته میشود.اگر ۱۰% یا بیشتر از ۱۰% سلولهای توموری برای پروتئین MYCمثبت بودند،بیمار به عنوان MYC مثبت در نظر گرفته می شود (شکل۲: A,B).

آنالیز آماری

محاسبه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ویراست ۱۸ انجام گردید. به منظور دستیابی به درجه توافق بین IHC, CISH تست آماری Kappa انجام گردید.متغیرها در جدول ۱ با استفاده از تست chi-square آنالیز شدند. برای متغیرها ی نشان داده شده در جدول ۲، آنهایی که دو متغیر مستقل بودند از تست Mann-whitney وآنهایی که بیش از دو متغیر مستقل داشتند از تست kruskal-wallis استفاده گردید. برای تعیین ارتباط بین IHC, CISH، آزمایش Kappa و ضریب همبستگی spearman به کار رفت.

یافته ها

این تحقیق شامل ۱۰۲ بیمار ایرانی با آدنوکارسینوم معده بود. در نمونه های ما ، ۷۸ بیمار مرد و ۲۴ مورد زن، و با متوسط سن ۶۲،۶۰ سال بودند. تکثیر *MYC* وبیان پروتئین آن (آزمایش IHC, CISH) بین بیماران انجام وآنالیز گردید.

یافته های بالینی

ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. محل تومور در ۳۵/۳% بیماران فوندوس بود، در حالی که تنها در ۳% نمونه ها کاردیا بود.نوع سرطان معده در ۵۶/۹% سرطان ها منتشر و در ۴۳/۱% روده ای، ومتوسط اندازه تومور بیماران ۶/۴۹cm بود. جدول ۱ نشان می دهد که برخی متغیر ها شامل جنسیت، محل تومور ، نکروز ، تهاجم رگی ، تهاجم عصبی ، CISH,IHC بین دو نوع منتشر و روده ای تفاوت معنی داری داشتند.این به آن معنا است که زیر گروه های هر متغیر در دو نوع سرطان معده متفاوتند. این نتایج همچنین نشان داد که هیچ ارتباطی بین سن ،درجه و مرحله (Stage) با نوع سرطان معده وجود ندارد. نتایج ما نشان داد که هر دو نوع سرطان روده ای و منتشر در سرطان معده به طور معنی داری در مردان بیشتر از زنان میباشد(جدول ۱). عمده بیماران ما در درجه دو و سه (۶۹/۶%)، و همچنین از نظر مراحل (stages) نیزبا ۵۹/۸% در استیج دو وسه بودند (جدول ۱).

نتایج CISH

نتایج CISH,IHC در جدول ۱ نشان داده شده است.این مطالعه نشان داد که هیچ ارتباطی بین سن، جنسیت ، محل تومور، نکروز، تهاجم رگی،تهاجم عروقی، استیج و نوع سرطان معده با تست CISH وجود ندارد.نتایج ما نشان داد که نشانه ای از ارتباط بین گرید و CISH وجود داشت، گر چه تفاوت معنی دار نبود. همچنین این مطالعه نشان داد که بیماران CISHمثبت (۴۳/۱%) در مقایسه با بیماران IHCمثبت(۱۴/۷%) فراوانترمیباشند. جدول ۳ ارتباط بین CISH ,IHC را نشان می دهد. تکثیر افتراقی آزمایش CISH درجدول ۲ نشان داده شده است. بر طبق نتایج CISH ۵۸ نمونه هیچ تکثیری نشان ندادند و ۴۴ نمونه CISH مثبت بودند، ۲۴ نمونه تکثیر پایین، ۶ نمونه تکثیرمتوسط و۱۴ نمونه نیزتکثیر بالا نشان دادند. در این تحقیق، تکثیر پایین به عنوان CISH مثبت در نظر گرفته شد (جدول ۳).

نتایج IHC

جدول ۲ مقایسه CISH,IHC را نشان می دهد. این نتایج نشان می دهدکه تفاوت معنی داری بین درجه و IHC وجود دارد. جدول ۳ نتایج IHC مثبت و منفی را نشان می دهد. ایمونو هیستوشیمی MYC در ۱۵ بیمار دیده شد.۱۳ بیمار هر دو هم تکثیر MYC وهم ایمونوهیستوشیمی MYC مثبت بودند. ۵۶ نمونه هیچ تکثیری نداشتند و IHC هم منفی بود. همچنین بین ۴۴ نمونه CISH مثبت ، ۱۳ نمونه سیگنال مثبت، و ۳۱ نمونه سیگنال منفی برای IHC داشتند. بیشتر بیماران با IHC منفی هیچ تکثیری نداشتند، وفقط ۲ بیماربا IHC مثبت، هیچ تکثیری نداشتند. ضمنا سلولهای طبیعی IHC منفی داشتند (جدول ۳).

بیماران به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اوّل هر دو CISH+,IHC+ (۱۲/۷%) ، گروه دوم CISH+,IHC- (۳۰/۳%) ، گروه سوم CISH-,IHC+(۲%)، چهارمین گروه CISH-, IHC- (۵۵%). بین چهار گروه ،آزمایش kappa ۰/۲۸۴ بود که نشان دهنده توافق کم بین تست CISH,IHC است (جدول ۳). برای تعیین ارتباط بین تست CISH,IHC ضریب همبستگی اسپرمن انجام گردید. ضریب همبستگی ۰/۳۶۵- با $P\text{-}value = 0.0001$ بود که نشان دهنده ارتباط بین دو تست بود. در این تحقیق ۴۳% نمونه ها برای CISH مثبت، ولی فقط ۱۴/۷% IHC مثبت داشتند.

بحث

در مطالعه حاضر، نمونه ۱۰۲ بیمار با سرطان معده بررسی شد. بیماران شامل ۷۸ مرد و ۲۴ زن، با نسبت زن/ مرد ۳:۱ و با متوسط سن ۶۰،۶۲ سال بودند. نتایج این تحقیق، با تحقیقات دیگر که نسبت زن/ مرد ۲:۱ وعمده بیماران مسن تر از ۵۵ سال بودند هم سو بود[۱۴]. همچنین مطالعات دیگر در ایران، در راستای نتایج مااست و به این اشاره دارند که سرطان معده شایع ترین سرطان در بین مردان ایرانی میباشد [۱۱]. در این مطالعه ، محل تومور به ۷ زیر گروه تقسیم گردید، و در بیشتر بیماران محل تومور فوندوس(نان کاردیا) بود. اگر محل تومور در بیماران به دو گروه کاردیا و نان کاردیا تقسیم شود، فقط ۳% کاردیا و ۹۷% نان کاردیا داریم. برخی از محققین، سرطان معده را، با تقریباً همین تعداد نمونه و با دو زیر گروه، کاردیا و نان کاردیا بررسی کرده، و۴،۵۸% نان کاردیا یافته اند، که با توجه به بیشتر بودن تعداد افراد نان کاردیا در راستای نتایج مااست[۱۴]. دراین پژوهش،اکثر بیماران از نوع منتشر بودند(۵۶،۹%)، اما برخی از محققین [۱۴, ۱۵] گزارش کرده اند که نوع روده ای بیشتر از نوع منتشر میباشد. بهترین تفسیر برای این تفاوت در نمونه ها بوده است، چون نمونه های این دو گزارش،از برزیل وژاپن، هردو از نواحی با خطر بالا بوده اند. در حالی که نمونه های ما از تهران بود، که به عنوان یک ناحیه با خطر پائین، به حساب می آید، و بر طبق مطالعات انجام شده، نوع روده ای سرطان معده، فراوانتر از نوع منتشر، در کشورهای با خطربالا است [۱۶]. برخی از محققین ارتباط بین بیان بالای C-MYC را با بیش از ۵۰% سرطانهای انسان، و همچنین اثر این بیان بالا را برروی تهاجم و پیش آگهی بد در بیماران گزارش کرده اند. شرکت MYC در تومورزایی، با وادار کردن سلول به رشد لجام گسیخته، رگ زایی، تکثیر وناپایداری ژنومی قبلاً اثبات شده است [۱۷]. پیشنهاد شده است که بیان اساسی C-MYC شامل تکثیر، موتاسیون و یا جابجایی کروموزومی میباشد که در توسعه وپیشرفت سرطانهای مختلف درگیر است [۱۸]. بی نظمی در C-MYC موتاسیون های نقطه ای، شروع همانند سازی ناقص، شکست های DNA , تغییرات درتعمیر DNAرا تحریک می کند و با ایجاد تغییر در ساختمان هسته ای تلومرها و کروموزومها، ایجاد ساختار های توپولوژیکی کرده که ناپایداری ژنومی را شروع می کند[۱۹].

در مطالعات مختلف، بیشتر بیماران با تکثیر بالا در مرحله اولیه سرطان معده و همچنین از نواحی با ریسک بالا مثل ژاپن وکره بوده اند. ولیکن در تحقیق دیگری در نوع منتشر نسبت به نوع روده ای، C-MYC تکثیر بالاتری داشته که در توافق با نتایج مااست[۲۰]. در یک مطالعه، بررسی IHC نشان داده است که بیان MYC در نوع روده ای، فراوانتر از نوع منتشر است [۲۱]. در حالی که برعکس ما مشاهده کردیم که بیان MYC در نوع منتشر فراوانتر بوده

است. رابطه بیان بالای MYC با مراحل تکثیری سلول ها اثبات شده است. این بیان تنها در فاز تکثیری رشد، ولی نه در سلول های کاملاً تمایز یافته و یا سلول هایی که در مرحله خاموشی هستند، نشان داده شده است[۲۲].

نتایج ما نشان داد که تفاوت معنا داری بین Grade و IHC وجود دارد. نتایج ما افزایش در بیان MYC ،بخصوص در Grade II,III را نشان داد. این نتیجه مشابه با یافته های نتایج قبلی است که نشان می دهد که بیان MYC با تنظیم پائین تمایز سلولی ارتباط دارد.همچنین تحقیق دیگری نشان داده که بیان MYC در Grade I سرطان معده پائین میاید، در حالی که افزایش قابل توجهی در بیان پروتئین MYC درGrade II,III وجود دارد [۲۲].

در این تحقیق، هیچ تفاوت معنا داری بین IHC و Stage وجود نداشت. در حالی که ، برخی مطالعات، سطوح بالای بیان پروتئین MYC را در مرحله اولیه نشان داده اند[۲۳]. هیچ تفاوت معنا داری در درصد سلولهای با تکثیر

C- MYC بین سرطانهای معده اولیه (PT_1) و پیشرفته (PT_{2-4}) وجود ندارد [۲۴]. این مطالعه نیزاز نظر بیان پروتئین در راستای مطالعه مامیباشد.

مطالعات قبلی نشان می دهد که هیچ رابطه ای بین تکثیر ژن *C- MYC* و کارسینوم های تمایز یافته وتمایز نیافته وجود ندارد[۲۴]. ولیکن ،یافته های ما نشان داد که نشانه ای از ارتباط بین CISH و Grade وجود داشت، هر چند که این تفاوت،از نظر آماری، به سطح معنا داری نرسید.

میزان بیان بیش از حد MYC در سرطان معده از ۱۵،۶% تا ۱۰۰% گزارش شده است [۲۴]. ولیکن در این مطالعه، تنها ۱۴،۷% بیان بالای MYC (IHC+) در هر دو نوع سرطان معده نشان داده شده، و۳،۸۵% هیچ بیانی نداشتند.این میزان تقریباً نزدیک به مطالعات قبلی بود[۱۴].

شایع ترین مکانیزم بی نظمی MYC در سرطان معده، تکثیر MYC است[۱۲].این مکانیسم منجر به افزایش محصولات انکوژنیک در کمیت هایی می شود که اضافه بر ظرفیت نسخه برداری است[۱۱].در این راستا ، ما در ۴۳% تومورهای معده در بین بیماران، سه کپی یا بیشتر از سه کپی ژن را مشاهده کردیم. و در مطالعات قبلی ۵۱/۵% تکثیر نشان داده اند، لذااین تحقیق، مطالعات قبلی را تأیید می کند[۲۰].

همچنین در این مطالعه تکثیر *C-MYC* در نوع منتشر فراوانتر از نوع روده ای بود، که با مطالعات قبلی سازگار نیست [۲۰, ۱۱]. مطالعه ما هیچ ارتباطی بین سن ، جنسیت، محل تومور، نکروز، vascular invasion, perineural invasion ونوع تومور با آزمایش CISH را نشان نداد. مطالعه ای از چین نشان داده است که هر ارتباطی بین تکثیر*C-MYC* و خصوصیات کلینیکوپاتولوژیک (گرید واستیج ، متاستاز غدد لنفاوی ومحل تومور) در سرطان معده به قومیّت مربوط است[۲۵, ۲۶]. چون ما نمی توانیم هیچ ارتباطی بین تکثیر *C-MYC* و خصوصیات کلینیکوپاتولوژیک پیدا کنیم، بنابراین، قومیّت جمعیت مبتلا، منجر به هیچ ارتباطی، بین این دو پارامتر نمی شود.

در نمونه های ما ۷،۱۲% هر دو CISH ,IHC مثبت بودند،هر چند که ما عدم تکثیر *C-MYC* و IHC را در دو بیمار مشاهده کردیم، اما به نظر می رسد خطای آزمایشگاهی می باشد. ۳۰،۳% بیماران ما تکثیر *C-MYC* مثبت (CISH+) ،اما در آنها پروتئین بیان نشده و IHC منفی بودند (جدول ۳). تفسیر این حالت می تواند این باشد که مکانیسمی پروتئین یا احتمالاً mRNA را تخریب می کند [۲۵]. داده های ما نشان داد که CISH ,IHC با هم ارتباط دارند، و درصد CISH مثبت و IHC مثبت به ترتیب ۴۳% و ۱۴،۷% بود.بنابراین ، نتیجه گیری میتوان کرد که آزمایش CISH آزمایش بهتری برای شناسایی *C-MYC* در سرطان معده است.

نتیجه گیری

سرطان معده شایع ترین سرطان در بین مردان ایرانی است. در بیشتر بیماران محل تومور فوندوس(نان کاردیا) بود. اکثر بیماران از نوع منتشر بودند(۵۶،۹%). در نوع منتشر نسبت به نوع روده ای، C-MYC تکثیر و بیان بالاتری داشته است.افزایش در بیان MYC بخصوص در Grade II,III وجود داشت. داده های ما نشان داد که CISH IHC, با هم ارتباط دارند، و درصد CISH مثبت و IHC مثبت به ترتیب ۴۳% و ۱۴،۷% بود.بنابر این ، میتوان نتیجه گرفت که آزمایشCISH آزمون بهتری برای شناسایی *C-MYC* در سرطان معده است.

شکل ۱: نتایج تکثیر *C-MYC* با آزمایش CISH.(A) عدم تکثیر(۱-۰). (B) تکثیر کم (۴-۳ سیگنال). (C) تکثیر متوسط (۶-۵ سیگنال).(D) تکثیرزیاد (بیش از ۶ سیگنال، که دراکثر هسته های سلولهای سرطان معده بصورت خوشه های بزرگ ژنی دیده می شوند). (بزرگنمایی اصلی ۵۰۰X).

شکل ۲: نتایج بیان *C-MYC* با آزمایش IHC.

(A) IHC منفی در آدنوکارسینوم معده. (B) IHC مثبت در آدنوکارسینوم معده.

جدول۱: نتایج آزمایشگاهی و بالینی بیماران براساس دو نوع سرطان معده نوع منتشر و روده ای

متغیر	نوع سرطان معده			
	منتشر		روده ای	
	N (%)	p-value	N (%)	p-value
جنسیت		0.0001		0.0001
مرد	44(75.9)		34(77.3)	
زن	14(24.1)		10(22.7)	
محل تومور		0.0001		0.009
فوندوس	25(43.1)		11(25)	
پیلوروس	3(5.2)		2(4.5)	
ازوفاگوس	6(10.3)		3(6.8)	
کاردیا	2(3.4)		1(2.3)	
Lesser curativure	5(8.6)		8 (18.2)	
Corpus-body	11(19)		8(18.2)	
آنتروم	5(8.6)		11(25)	
اطلاعات نبود	1(1.7)		-	
درجه		0.319		0.110
I	16(27.6)		13(29.5)	
II	16(27.6)		21(47.7)	
III	24(41.4)		10(22.7)	
اطلاعات نبود	2(3.4)		-	
نکروز		0.002		0.002
دارد	13(22.4)		6(13.6)	
ندارد	9(15.5)		11(25)	
معلوم نیست	28(48.3)		24(54.4)	
اطلاعات نبود	8(13.8)		3(6.8)	

Vascular invasion		0.001		0.001
دارد	48(82.8)		30(68.2)	
ندارد	6(10.3)		13(29.5)	
اطلاعات نبود	4(6.9)		1(2.3)	
Perineural invasion		0.002		0.446
دارد	39(67.2)		24(54.5)	
ندارد	16(27.6)		19(43.2)	
اطلاعات نبود	3(5.2)		1(2.3)	
مرحله		0.313		0.651
I	13(22.4)		9(20.5)	
II	18(31)		14(31.8)	
III	17(29.3)		12(27.3)	
IV	9(15.5)		9(20.5)	
تزاید ژنی CISH		0.0001		0.0001
<2 Signals	32(55.2)		26(59.1)	
2-4 Signals	14(24.1)		10(22.7)	
4-6 Signal	4(6.9)		2(4.5)	
(>6 Signal	8(13.8)		6(13.6)	
سیگنال CISH				
بیان ژنی IHC		0.0001		0.0001
Positive	11(19)		4(9.1)	
Negative	47(81)		40(90.9)	

جدول ۲: نتایج بالینی و آزمایشگاهی بیماران بر اساس تزاید ژنی وبیان ژنC- MYC

متغیر	IHC			CISH				
	Positive(n=	Negative(n=87)		No(n=58)	Low(n=2	Moderate(n=6)	High(n=14)	
	N (%)	N(%)	sig	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	sig
جنسیت			0.830					0.320
مرد	12(80)	38(43.7)		43(74.1)	17(70.8)	6(100)	12(85.7)	
زن	3(20)	49(56.3)		15(25.9)	7(29.2)	0(0)	2(14.3)	
محل تومور			0.824					0.330
فوندوس	7(46.7)	29(33.3)		14(24.1)	13(54.2)	3(50)	6(42.9)	
پیلوروس	1(6.7)	4(4.6)		3(5.2)	0(0)	1(16.7)	1(7.1)	
ازوفاگوس	1 (6.7)	8(9.2)		7(12.1)	0(0)	0(0)	2(14.3)	
کاردیا	0(0)	3(3.4)		2(3.4)	0(0)	0(0)	1(7.1)	
Lesser	2(13.3)	11(12.6)		7(12.1)	4(16.7)	1(16.7)	1(7.1)	
Corpus-body	1(6.7)	18(20.7)		14(24.1)	3(12.5)	1(16.7)	1(7.1)	
Antrum	3(20)	13(14.9)		10(17.2)	4(16.7)	0(0)	2(14.3)	
اطلاعات ندارد	-	1 (1.1)		1(1.7)	0(0)	0(0)	0(0)	
درجه			0.002					0.061
I	1(6.7)	28(32.2)		20(34.5)	7(29.2)	0(0)	2(14.3)	
II	3(20)	34(39.1)		22(37.9)	9(37.5)	2(33.3)	4(28.6)	
III	11(73.3)	23(26.4)		15(25.9)	8(33.3)	4(66.7)	7(50)	
اطلاعات ندارد	-	2(2.3)		1(1.7)	0(0)	0(0)	1(7.1)	
Necrose			0.790					0.167
Yes	3(20)	16(18.4)		14(24.1)	2(8.3)	2(33.3)	1(7.1)	
No	4(26.7)	16(18.4)		9(15.5)	5(20.8)	2(33.3)	4(28.6)	

N/A	7(46.7)	45(51.7)		31(53.4)	14(58.3)	2(33.3)	5(35.7)	
Missing	1(6.7)	10(11.5)		4(6.9)	3(12.5)	0(0)	4(28.6)	
Vascular			0.248					0.238
Yes	12(80)	66(75.9)		43(74.1)	19(79.2)	4(66.7)	12(85.7)	
No	1(6.7)	18(20.7)		13(22.4)	4(16.7)	1(16.7)	1(7.1)	
اطلاعات ندارد	2 (13.3)	3(3.4)		2(3.4)	1(4.2)	1(16.7)	1(7.1)	
Perineural			0.072					0.148
Yes	12(80)	51(58.6)		33(56.9)	15(62.5)	5(83.3)	10(71.4)	
No	2(13.3)	33(37.9)		23(39.7)	8(33.3)	1(16.7)	3(21.4)	
اطلاعات ندارد	1 (6.7)	3(3.4)		2(3.4)	1(4.2)	0(0)	1(7.1)	
مرحله								
I	4(26.7)	18(20.7)	0.252	15(25.9)	5(20.8)	0(0)	2(14.3)	0.508
II	5(33.3)	27(31)		18(31)	6(25)	3(50)	5(35.7)	
II	6(40)	23(26.4)		17(29.3)	6(25)	2(33.3)	4(28.6)	
IV	0(0)	18(20.7)		8(13.8)	6(25)	1(16.7)	3(21.4)	
اطلاعات ندارد	0(0)	1(1.1)		0(0)	1(4.2)	0(0)	0(0)	
Type			0.165					0.706
منتشر	11(73.3)	47(54)		32(55.2)	14(58.3)	4(66.7)	8(57.1)	
روده ای	4(26.7)	40(46)		26(44.8)	10(41.7)	2(33.3)	6(42.9)	

جدول ۳: نتایج ارتباط بین تکثیر *C-MYC* و بیان آن در بین ۱۰۲ بیماربا سرطان معده

CISH / IHC	**Positive**	**Negative**	**Total**
Positive	13 (12.7%)	2 (2%)	15(14.7%)
Negative	31 (30.4%)	56 (55%)	87(85.3%)
Total	44(43.1%)	58 (57%)	102(100%)

Kappa:

مقدار توافق =0.284, درصد توافق =28.4%, P-value = 0.0001

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مولف اوّل تحت عنوان "بررسی تکثیر و بیان انکوژن *C-MYC* درسرطان معده با دو روش CISH و IHC و مطالعه ارتباط آنها با پیش آگهی و رشد تومور" در مقطع دکترای تخصّصی رشته ژنتیک پزشکی در سال ۱۳۹۳و کد ۳۹ میباشد که قسمتی از مخارج آن با بودجه شخصی و قسمتی با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

References

1.Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. GLOBOCAN 2012 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.

2.Matsuzaka M , Fukuda S, Takahashi I, Shimaya S, Oyama T, Yaegaki M, et al.The decreasing burden of gastric cancer in Japan. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2007; 212(3) 207-19.

3. Park DI, Yun JW, Park JH ,Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Digestive Diseases and Sciences* 2006; 51(8): 1371-9.

4. Felsher D W. MYC inactivation elicits oncogene addiction through both tumor cell–intrinsic and host-dependent mechanisms. *Genes & Cancer* 2010; 1(6): 597-604.

5. Oster S K , Ho CS, Soucie EL, Penn LZ . The myc oncogene: marvelously complex. *Advances in Cancer Research* 2002; 84: 81-154.

6. Boxer RB , Jang JW, Sintasath L, Chodosh LA. Lack of sustained regression of c-MYC-induced mammary adenocarcinomas following brief or prolonged MYC inactivation. *Cancer Cell* 2004; 6(6): 577-586.

7. Shachaf C M , Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S , et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; 431(7012): 1112-7.

8.Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.

9.Sobin LH, Gospodarowicz MK,Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons: 2011.

10.Calcagno DQ, Guimaraes AC, Leal MF, Seabra AD, Khayat AS, Pontes TB, et al. MYC insertions in diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Anticancer Research* 2009;29(7):2479-83.

11. Sadjadi A , Zahedi MJ, Darvish moghadam S , Nouraie M, Alimohammadian M , Ghorbani A ,et al. The first population-based cancer survey in Kerman Province of Iran. *Iranian Journal of Public Health* 2007; 36(4): 26-34.

12. Calcagno D Q, Leal MF, Seabra AD, Khayat AS, Chen ES, Demachki S, et al. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12(38): 6207-11.

13. Meyer N , Penn L Z . Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8(12): 976-90.

14. de Souza CRT, Leal MF, Calagno DQ, Costa Sozinho EK, Borges BN, Montenegro RC, et al. *MYC* Deregulation in Gastric Cancer and Its Clinopathological Implications. *PLOS* 2013;8(5):1-9.

15. Chang MS, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Sakuma K, et al. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clinical Cancer Research* 2006; 12(10): 2995-3002.

16. Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC press Lyon; 2000.

17. Arvanitis C , Felsher D W. Conditionally MYC: insights from novel transgenic models. *Cancer Letters* 2005; 226(2): 95-9.

18. Louis S F,Vermolen BJ, Garini Y,Young IT, Guffei A, Lichtensztejn Z, et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(27): 9613-18.

19. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005; 6(8): 635-45.

20. Calcagno DQ, Guimaraes AC, Leal MF, Seabra AD, Khayat AS . MYC insertions in diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Anticancer Research* 2009; 29(7): 2479-83.

21. Calcagno DQ, Freitas VM, Leal MF, de Souza CRT, Demachki S, Montenegro R, et al. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in Gastric Cancer. *BMC Gastroenterology* 2013; 13(1): 1-10.

22. Han S, Kim HY, Park K. c-Myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *Journal of Korean Medical Science* 1999; 14: 526-30.

23. Suzuki S, Tenjin T, Watanabe H, Matsushima S, Shibuya T, Tanaka S. Low level c-myc gene amplification in gastric cancer detected by dual color fluorescence in situ hybridization analysis. *Journal of Surgical Oncology* 1997; 66(3): 173-8.

24. Calcagno DQ, Leal MF, Assumpcao PP, Smith MAC. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 2008;14(39): 5962-8.

25. Shah MA , Ajani JA. Gastric cancer-an enigmatic and heterogeneous disease. *Jama* 2010; 303(17): 1753-4.

26. Liu X, Cai H, Huang H, Long Z, Shi Y,Wang Y. The prognostic significance of apoptosis-related biological markers in Chinese gastric cancer patients. *PLOS One* 2011; 6(12): e29670.