● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ شانزدهم، شمارهٔ ۱، ص۱۱-۱، ۱۳۸۷

مقالهٔ پژوهشی

بررسی میزان رنگ‌پذیری پروتئین p53 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیا و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی

دکتر شهرزاد ادهمی[۱]، دکتر فهیمه بقایی[۲*]، دکتر شهلا کاکویی[۳] و دکتر مریم رئوف[۴]

خلاصه

مقدمه: لکوپلاکیا شایع‌ترین ضایعه پیش‌بدخیم مخاط دهان است و پتانسیل تغییر بدخیمی‌آن غیر قابل پیش‌بینی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی رنگ‌پذیری پروتئین p53 در سلول‌های مخاط دهانی طبیعی، لکوپلاکیا و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

روش : از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با روش استاندارد Biotin Streptavidin Peroxidase در این مطالعه استفاده شد تا رنگ‌پذیری پروتئین p53 روی بلوک‌های پارافینی ۸ مورد سرطان سلول سنگفرشی، ۲۰ مورد لکوپلاکیا و ۱۰ مورد مخاط طبیعی دهان مورد بررسی قرار گیرد.

یافته‌ها: تفاوت آماری معنی‌داری از نظر میزان و شدت رنگ‌پذیری پروتئین p53 در بین گروه لکوپلاکیا و گروه کنترل یافت نشد اما الگوی انتشار آن در گروه لکوپلاکیا عمدتاً در لایه‌های سوپرا بازال و در اپی‌تلیوم گروه طبیعی عمدتاً بازال بوده و میانگین سلول‌های مثبت برای p53 در گروه سرطان سلول سنگفرشی بالاتر از گروه‌های لکوپلاکیا و کنترل بود. سلول‌های محیط جزایر اپی‌تلیالی نئوپلاستیک بیشترین میزان بروز را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به این یافته‌ها افزایش سوپرا بازال p53 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیا در ناحیه فوق بازال ممکن است در ارتباط با پیش‌آگهی بالینی ضعیف باشد. افزایش بروز p53 ممکن است مشخصه مهمی در سرطان دهان باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان سلول سنگفرشی، لکوپلاکیا، بدخیمی، ایمونوهیستوشیمی، سرکوب کننده تومور p53

۱- استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان۲- استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان۳- استادیار گروه بیماری‌های دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان٤- استادیار گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان ● **آدرس پست الکترونیک :** fbaqhaei7@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸٦/٤/۳۰ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۷/۵/۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۵/۱٦

مقدمه

بر اساس تعریف سازمان جهانی بهداشت لکوپلاکیا لکه یا پلاک سفیدی است که از نظر بالینی و آسیب‌شناسی به هیچ ضایعه دیگری شباهت ندارد. این تعریف به عنوان یک شرح بالینی بکار می‌رود و هیچ اشاره هیستوپاتولوژیکی ندارد (۱).

تقریباً ۵٪ ضایعات لکوپلاکیا در طول یک دوره ۵ ساله تبدیل به بدخیمی‌می‌شوند و در طولانی مدت مشاهده شده که تبدیل ضایعات لکوپلاکیائی به بدخیمی ۲۰٪ می‌باشد. تغییراتی از قبیل آتروفی اپی‌تلیوم، هیپرپلازی اپی‌تلیوم با یا بدون هیپرکراتوزیس و درجات متنوعی از دیسپلازی یا کارسینوم in situ در ضایعات لکوپلاکیائی مشاهده می‌شود (۳-۱).

از طرفی تشخیص دیسپلازی کاملاً عینی نبوده و مشخص نیست که کدام یک از این ضایعات به بدخیمی‌تبدیل می‌شوند (۴،۵). مطالعات اپیدمیولوژیک عوامل خطر متعددی را در ایجاد بدخیمی مشخص کرده‌اند. با این وجود مکانیسم دقیق عوامل سرطان‌زا به خوبی شناخته نشده است. مطالعات اپیدمیولوژی ملکولی به بررسی حوادث ملکولی و تداخل آنها با عوامل محیطی در بدخیمی‌های انسانی می‌پردازد (۶).

بدخیمی‌های انسانی حاصل مجموعه‌ای از وقایع ژنتیکی مجزا می‌باشند و این تغییرات در ژن‌هایی ایجاد می‌شود که کنترل چرخه سلولی، بقای سلولی، حرکت سلولی و رگ‌سازی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. رفتار بیولوژیک سلول زمانی خود مختار خواهد شد که ژن‌های هدایت‌کننده چرخه سلولی به علت جهش یا تقویت دچار اختلال در عملکرد و مورفولوژی شوند (۷،۸).

از جمله ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، ژن P53 می‌باشد که نقش مرکزی و مهمی‌در ثبات ژنومیک و چرخه سلولی دارد. اختلال عملکرد این ژن در بسیاری از سرطان‌های انسانی دیده شده است (۳،۹).

هنگامی‌که DNA آسیب ببیند، p53 به عنوان ترمز فوری عمل می‌کند. با وارد شدن چنین آسیبی به مواد ژنتیکی سلول، تغییرات چشمگیری در p53 خفته اتفاق می‌افتد. از طریق مکانیسم‌هایی که به خوبی شناخته نشده است، افزایش سریع در سطح p53 و فعالیت آن به عنوان عامل رونویسی صورت می‌گیرد (۱۲-۱۰).

نوع وحشی p53 تجمع یافته به DNA متصل می‌گردد و رونویسی چندین ژن را که واسطه دو اثر عمده p53 هستند، تحریک می‌کند. این دو اثر توقف چرخه سلولی و آپوپتوز می‌باشند. وقفه در چرخه سلولی مفید است زیرا به سلول اجازه می‌دهد تا زمان لازم برای ترمیم آسیب DNA را کسب کند. در صورتی آسیب DNA با موفقیت ترمیم نگردد، P53 طبیعی به عنوان آخرین تلاش با القای فعال شدن ژن‌های ایجاد کننده آپوپتوز، سلول را از بین می‌برد. در صورت از دست رفتن عملکرد p53،آسیب DNA ترمیم نشده باقی می‌ماند، جهش‌ها در سلول‌های در حال تقسیم ثابت می‌شوند و سلول در مسیر یک‌طرفه‌ای که منتهی به تغییر شکل بدخیمی است، به حرکت می‌افتد. پروتئین p53 در بافت‌های طبیعی عمر کوتاهی داشته و نمی‌توان با روش‌های ایمنوهیستوشیمی آن را نشان داد اما این پروتئین، به دلایلی نظیر موتاسیون، مدت طولانی در بافت باقی می‌ماند. بنابراین افزایش تظاهر پروتئین p53 می‌تواند نشانه غیرفعال بودن فرایند آپوپتوز باشد. به همین دلیل موتاسیون‌های نقطه‌ای در p53 در ایجاد بدخیمی اهمیت دارند و به فراوانی در نئوپلاسم‌های مختلف از قبیل کارسینوم سلول سنگفرشی مشاهده می‌شوند (۱۳).

مطالعات اخیر چندین فاکتور پیش‌بینی‌کننده تغییرات بدخیمی از قبیل ملکول‌های چسبندگی مثل اینتگرین‌ها و کادهرین‌ها، مارکرهای تمایز از قبیل کراتین‌ها، تظاهر نامناسب سایر انکوژن‌ها ازقبیل سیکلین D1ها و افزایش بروز p53 و ki67را گزارش کرده‌اند(۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ انجام شد، بروز متوسط تا شدیدp53 در سرطان سلول سنگفرشی دهان ۵۶ درصد، در لیکن پلان ۳۲ درصد و در هیپرکراتوزیس ۱۳ درصد بود (۱۴).

کووسی و همکاران در سال ۲۰۰۳ بروز p53 را در اشکال مختلف لکوپلاکیا مشاهده کردند و افزایش ناپایداری ژنوم به موازات شدت دیسپلازی را نیز نشان دادند (۱۵).

در مطالعه دیگری که توسط سانتوز در سال ۲۰۰۵ انجام شد، به موازات افزایش شدت دیسپلازی و تشدید درجه (grade) هیستوپاتولوژیک، افزایش تظاهر p53 نیز مشاهده گردید (۱۶).

در مطالعه ورا و همکاران در سال ۲۰۰۶ رنگ‌پذیری p53 در ۷۹ درصد از نمونه‌های لکوپلاکیایی مثبت بود. ضایعات لکوپلاکیایی که رنگ‌پذیری مثبت برای پروتئین p53 داشتند، ریسک بالاتری برای ابتلا به بدخیمی نشان دادند (۱۷).

کوروکاوا و همکاران افزایش بروز p53 و رابطه مستقیم آن با گرید هیستوپاتولوژیک در سرطان سلول سنگفرشی را نشان دادند (۱۸).

مطالعه نیلاندر نشان دادکه بروز ملکول پروتئین P53 در اپی‌تلیوم دیسپلاستیک عمدتاً در لایه‌های فوق بازال بوده و شاخصی برای پیشرفت این ضایعات به سمت سرطان سلول سنگفرشی است (۱۹).

در مطالعه زاوو در سال ۲۰۰۵ رنگ‌پذیری پروتئین p53 در۳۰/۷ درصد از نمونه‌های لکوپلاکیا و ۶۰ درصد از سرطان سلول سنگفرشی مخاط دهان مثبت بود و بروز پروتئین p53 در هیچ یک از نمونه‌های مخاط سالم دهان مشاهده نشد (۲۰).

در مطالعه دیگری نیز یامارون نشان داد که بدخیمی‌هایی که در لبه تهاجم افزایش بروز پروتئین p53 را نشان می‌دهند ازgrade بالاتری برخوردار بوده و متاستاز و عود آنها نیز بیشتر است (۲۱).

بر اساس مطالعه سوشیتو و همکاران پیشرفت ضایعات پیش‌بدخیم به سمت بدخیمی توسط ارزیابی ایمونوهیستوشیمی می‌تواند ارزشمند باشد (۲۲).

اما با وجود تلاش‌های قابل توجه صورت گرفته، مکانیسم‌های سلولار و ملکولار کارسینوژنز لکوپلاکیا هنوز به خوبی مشخص نشده است. با توجه به اهمیت این مسأله و تعداد نسبتاً فراوان بیماران مبتلا به ضایعات پیش‌بدخیم و بدخیم دهانی در مراکز پاتولوژی کشور و با اشاره به این نکته که تفاوت واضحی در میزان وقوع سرطان‌ها در سرتاسر دنیا وجود دارد و علاوه بر استعدادهای نژادی، عوامل جغرافیایی نیز در این امر دخیل می‌باشند (۳) و در ایران نیز تاکنون مطالعه منتشرشده‌ای بر روی ضایعات پیش‌بدخیم و بدخیم دهانی وجود نداشته است، بر آن شدیم تا رنگ‌پذیری پروتئین p53 در سلول‌های مخاط دهان بیماران در معرض خطر در ایران را بررسی کرده و آن را با کارسینوم سلول سنگفرشی مقایسه نماییم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مقطعی تحلیلی بوده و بر روی بلوک‌های پارافینی نمونه‌های لکوپلاکیا و ضایعات

دیسپلاستیک و بدخیم موجود در بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی کرمان انجام گرفت که معادل ۲۰ نمونه در گروه لکوپلاکیا، ۸ نمونه مربوط به کارسینوم سلول سنگفرشی و ۱۰ نمونه مربوط به گروه کنترل می‌باشد. برای گروه کنترل نیز از اپی‌تلیوم سالم سطح ضایعاتی از قبیل فیبروم تحریکی استفاده گردید.

تعداد نمونه‌ها تقریباً مشابه سایر مطالعات انجام شده در این مورد می‌باشد (۱۳،۱۵) و برای تشخیص وجود پروتئین p53 در بافت‌ها از تکنیک ایمنوهیستوشیمی با روش بیوتن استرپتوآویدین پراکسیداز بر اساس دستورالعمل شرکت نووکاسترا (Novocastra) استفاده شد.

به منظور تشخیص وجود پروتئین p53 در بافت‌های مورد نظر از روش ایمنوهیستوشیمی استفاده شد که مراحل اصلی به شرح زیر انجام گرفت:

پس از مراحل دپارافینه کردن و آبدهی نمونه‌ها در محلول بافرسیترات PH=6 برای پایدار کردن آنتی ژن‌ها قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به محلول سالین فسفاته (PBS) منتقل شده و برای بلوک فعالیت پراکسیداز درونزا با پراکسید هیدروژن انکوبه گردیدند. سپس شستشو با آب مقطر و محلول PBS انجام شد و نمونه‌ها پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در آنتی‌بادی که به نسبت یک به ۵۰ رقیق شده بود قرار گرفتند. در مرحله بعدی آنتی‌بادی ثانویه اضافه شد و در مرحله بعدی اضافه کردن آویدین و دی آمینوبنزیدین به عنوان کروموژن صورت گرفت.

بعد از انجام مراحل ایمنوهیستوشیمی، نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین‌مایر رنگ‌آمیزی شده و سپس آبگیری شدند. هم‌چنین از کنترل مثبت و منفی به منظور تفسیر دقیق لام‌ها و اطمینان از صحت روش رنگ‌آمیزی استفاده شد و لام‌ها طبق معیارهای تعیین شده بررسی شدند. شدت رنگ‌پذیری (ضعیف و متوسط و شدید)، محل انتشار (بازال و سوپرا بازال) و هم‌چنین میانگین سلول‌های مثبت در سه میدان میکروسکوپی (۴۰۰×) در ضایعات مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت.

پس از جمع‌آوری اطلاعات و ورود آنها به برنامه SPSS ارتباطات بررسی و از آزمون‌های مجذور کای، فیشر، من‌ویتنی‌یو و کروسکال والیس استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج، از مجموع نمونه‌های مورد مطالعه، ۲۳ نمونه (۶۰/۵ درصد) مربوط به مردان و ۱۵ نمونه مربوط به خانم‌ها (۳۹/۵ درصد) بودند. با توجه به تشخیص بیماری ۲۰ نفر (۵۲/۶ درصد) در گروه لکوپلاکیا، ۸ نفر (۲۱/۱ درصد) در گروه سرطان سلول سنگفرشی و ۱۰ نفر (۲۶/۳درصد) در گروه کنترل قرار داشتند. از نظر استفاده از دخانیات در کلیه افراد گروه کنترل هیچ گونه عادتی دیده نشد، در حالی که در ۱۶ نفر (۸۰ درصد) از گروه لکوپلاکیا و ۲ نفر (۲۵ درصد) از گروه سرطان سلول سنگفرشی اعتیاد به سیگار وجود داشت.

جدول ۱ : *توزیع فراوانی مشخصات گروه‌های مورد مطالعه*

متغیر	گروه	لکوپلاکیا (n=۲۰)	سرطان سلول سنگفرشی (n=۸)	کنترل (n=۱۰)
جنس	مذکر	۱۲	۷	٤
	مونث	۸	۱	٦
عادات منفی	خیر	١٦	۲	۰
	بلی	٤	٦	۱۰

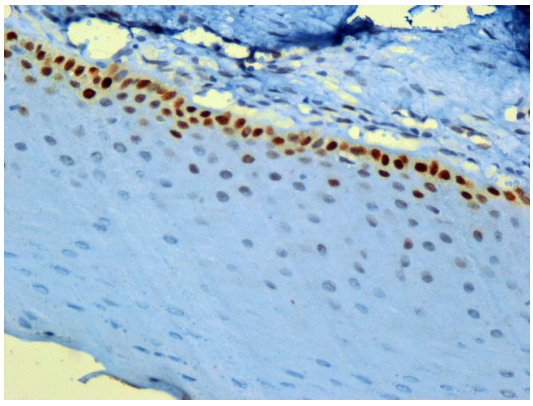
میانگین و انحراف معیار سن گروه مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی (۱۳/۹±۶۸/۳) به طور معنی‌داری از گروه لکوپلاکیا (۲۱/۶±۵۱/۱) و گروه کنترل (۱۲±۴۳) بیشتر بود (P<۰/۰۵) اما بین میانگین گروه لکوپلاکیا و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. مقایسه میانگین سنی سه گروه با استفاده از آزمون کروسکال والیس انجام شد با توجه به این که شرایط انجام آزمون‌های پارامتریک وجود نداشت.

از نظر محل ضایعه در گروه لکوپلاکیا در ۱۶ مورد (۸۰درصد) ضایعه در گونه قرار داشت در حالی که در گروه سرطان سلول سنگفرشی در ۵ مورد (۶۲/۵ درصد) محل ضایعه لثه بیمار بود.آزمون دقیق فیشر تفاوت معنی‌داری را بین محل ضایعه در این دو گروه نشان داد (P<۰/۰۵). لازم به ذکر است با توجه به این که محل ضایعات متنوع بود و برای انجام آزمون لازم بود محل ضایعات ادغام گردد و این ادغام از نظر علمی توجیهی نداشت. از این رو این ارتباط مورد بررسی قرار نگرفت.

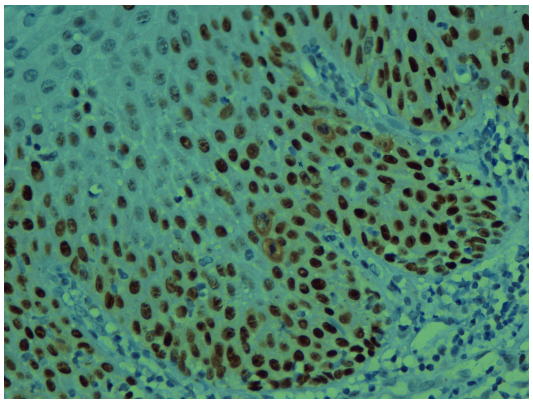
در لکوپلاکیای بدون دیسپلازی ۷ مورد (۸۷/۵ درصد)، در لکوپلاکیای با دیسپلازی خفیف ۶ مورد (۸۵/۷ درصد)، در نوع متوسط یا شدید ۴ مورد (۸۰ درصد)،در سرطان سلول سنگفرشی ۶ مورد (۷۵ درصد) و در گروه کنترل ۳ مورد (۳۰ درصد) رنگ‌پذیری سوپرا بازال وجود داشت (شکل ۱).

در مقایسه محل رنگ‌پذیری P53 بین گروه لکوپلاکیا با گروه کنترل (با استفاده از آزمون مجذور کای) تفاوت معنی‌داری دیده شد (P<۰/۰۵). به طوری که در گروه لکوپلاکیا محل رنگ‌پذیری در ۱۷ مورد (۸۵ درصد) در سوپرا بازال و در ۳ مورد (۱۵ درصد) در بازال بود (شکل ۱). در حالی که در گروه کنترل این موارد به ترتیب ۳ مورد (۳۰ درصد) و ۷ مورد (۷۰ درصد) بود (شکل ۲).

هم‌چنین بیشترین شدت رنگ‌پذیری در ۴ مورد (۵۰درصد) از نمونه‌های لکوپلاکیای بدون دیسپلازی، ۲ مورد (۲۸/۶ درصد) لکوپلاکیای با دیسپلازی خفیف، ۳ مورد (۶۰درصد) لکوپلاکیای با دیسپلازی متوسط تا شدید، ۴ مورد (۵۰ درصد) سرطان سلول سنگفرشی و یک مورد (۱۰درصد) گروه کنترل دیده شد (جدول ۲).



شکل ۱: *رنگ‌پذیری ناحیه بازال (Basal) پروتئین P53 درگروه کنترل*

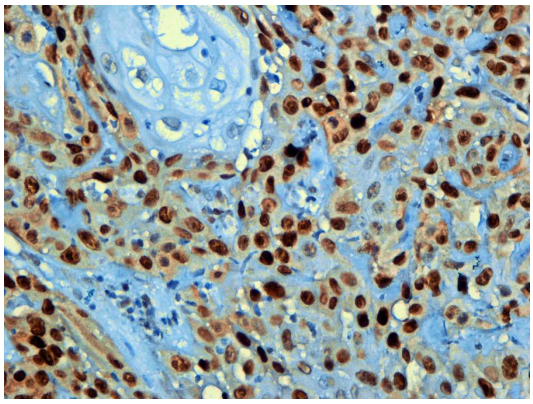


شکل ۲: *رنگ‌پذیری سوپرابازال (Suprabasal) پروتئین P53 در لکوپلاکیا*

جدول۲ : *توزیع فراوانی شدت رنگ‌پذیری در گروه‌های مورد مطالعه*

شدت رنگ‌پذیری p53 / گروه	لکوپلاکیا			سرطان سلول سنگفرشی	کنترل
	بدون دیسپلازی	دیسپلازی خفیف	دیسپلازی متوسط		
خفیف+	۰	۲	۱	۲	٤
متوسط++	٤	۳	۱	۲	٥
شدید +++	٤	۲	۳	٤	۱
جمع	۸	۷	٥	۸	۱۰

مقایسه تعداد سلول‌های مثبت در بین سه گروه لکوپلاکیا، سرطان سلول سنگفرشی و کنترل (با استفاده از آزمون کروسکال والیس باتوجه به این که شرایط انجام آزمون‌های پارامتریک وجود نداشت) تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۳). بر اساس نتیجه آزمون تعقیبی میانگین تعداد سلول‌های مثبت در گروه سرطان سلول سنگفرشی (۱۰۰/۱±۱۵۰) به طور معنی‌داری بیش از گروه لکوپلاکیا (۵۵±۶۶) و گروه کنترل (۱۹/۱±۵۰) بود (شکل۳). اما بین گروه لکوپلاکیا و گروه کنترل بر اساس نتیجه آزمون من‌ویتنی‌یو تفاوتی وجود نداشت.



شکل ۳: *رنگ‌پذیری پروئین P53 در سرطان سلول سنگفرشی*

میانگین تعداد سلول‌های مثبت در لکوپلاکیای خفیف ۴۴/۴، در متوسط ۱۱ سلول و در لکوپلاکیای شدید ۱۳۱/۲۵ بود.

بحث ونتیجه‌گیری

دیسپلازی یک واژه تشخیصی برای تغییرات پاتولوژیک مزمن و پیشرونده است که اختلالات پیش سرطانی را نشان می‌دهند. پیشرفت به سمت بدخیمی در ضایعات لکوپلاکیایی با شدت دیسپلازی ارتباط دارد (۱).

بسیاری از محققین تغییرات کارسینوماتوز را در ضایعات لکوپلاکیائی بین ۳۶ - ۱/۴ درصد در طی دوره زمانی ۳۰-۱ سال گزارش کرده‌اند. بنابر این دیسپلازی اپی‌تلیوم یک مارکر هیستوپاتولوژیک پیش‌بدخیم و شاخصی برای افزایش پیشرفت به سمت سرطان سلول سنگفرشی است (۱۵).

ارزیابی تغییرات سلولی توسط پاتولوژیست‌های مختلف متفاوت بوده و معیار تشخیص عینی می‌باشد. بنابر این تحقیقات در زمینه ارزیابی تغییرات ژنومی در سطح مولکولی از ارزش به سزایی برخوردار است. وقوع تکثیر سلولی در بافت اپی‌تلیالی نرمال فقط در لایه بازال‌اپی‌تلیوم می‌باشد. در حالی‌که سلول‌های طبقات فوقانی پوشش

اپیتلیالی بالغ هستند و مارکر سیتوکراتینی را بارز می‌کنند. بنابر این فعالیت سلولی در بالای طبقه بازال به عنوان یک علامت هشداردهنده است و تکثیر بی‌قاعده سلول زمانی میسر می‌شود که تغییرات ژنتیک در انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب کننده تومور اتفاق بیفتد. از آن جایی که یکی از مهارگرهای مهم تومور p53 می‌باشد و به دلیل این که این پروتئین در بافت‌های طبیعی عمرکوتاهی دارد بروز این ملکول پروتئینی در این بافت‌ها فقط در لایه بازال دیده می‌شود. اما فرم موتانت این ژن از فرم طبیعی آن پایدارتر است و مدت زمان طولانی‌تری در بافت‌ها باقی می‌ماند، بنابر این بروز این پروتئین درطبقات فوقانی اپی‌تلیوم می‌تواند به عنوان یک مارکر پیش‌بینی‌کننده تغییرات پیش‌بدخیم باشد. در مطالعه حاضر بروز پروتئین P53 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیایی فوق بازالی بود و در گروه کنترل این بروز درلایه بازال اپی‌تلیوم مشاهده شد. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین بروز این پروتئین در کارسینوم سلول سنگفرشی و گروه‌های لکوپلاکیایی مشاهده شد. اما ارتباطی بین شدت دیسپلازی و افزایش بروز مولکول P53 مشاهده نشد.

تحقیق نیلاندر نشان داد که مولکول پروتئین p53 در اپی‌تلیوم دیسپلاستیک عمدتا در لایه‌های فوق بازال بوده و شاخصی برای پیشرفت این ضایعات به سمت سرطان سلول سنگفرشی است که نتایج حاصله از این تحقیق با مطالعه حاضر متفاوت است. اما در مطالعه دیگری نشان داده‌اند که در بافت‌های نرمال P53 در ناحیه بازال رنگ‌پذیری داشته است (۲۳) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در مطالعه مذکور بروز فوق بازال p53 به عنوان یک مارکر تشخیصی در ضایعات دهانی با پتانسیل بدخیمی دانسته شده و از آن به عنوان یک مارکر قابل اعتماد در تعیین آتی بدخیمی این گونه ضایعات نام برده شده است (۱۲). البته در ضایعات لکوپلاکیائی مطالعه حاضر نیز بروز این پروتئین فوق بازالی (Supera basal) مشاهده شد که با مطالعات فوق مشابه است.

هم‌چنین مطالعات ژائو در سال ۲۰۰۵ نشان داد که رنگ‌پذیری p53 در ۳۱/۷ درصد از نمونه‌های لکوپلاکیا و ۶۰ درصد از سرطان سلول سنگفرشی مخاط دهان مثبت است. رنگ‌پذیری P53 در هیچ‌یک از نمونه‌های مخاط سالم دهان که به عنوان گروه کنترل در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند مشاهده نشد. بر اساس نتایج این مطالعهp53 می‌تواند به عنوان یک مارکر ملکولی در کارسینوژنز اپی‌تلیوم دهان استفاده شود (۲۰). اما نتایج حاصله از مطالعه حاضر متفاوت بود و رنگ‌پذیری این ملکول پروتئینی در مخاط سالم دهان نیز مشاهده شد.مثبت بودن پروتئینp53 در سلول می‌تواند بیانگر موتاسیون این ژن باشد ولی تجمع p53 در سلول‌های نرمال در موارد کمی مثلاً به دنبال استرس‌ها یا عواملی ازقبیل سیتوکین‌های التهابی نیز می‌تواند دیده شود بنابر این تجمع پروتئین p53 در اپی‌تلیوم نرمال دهان در مطالعه حاضر می‌تواند براثر تجمع p53 نرمال باشد که توسط کارسینوژن‌ها یا عوامل التهابی ایجاد می‌شود (۲۴).

کوواسی و همکاران نشان دادند که افزایش بروز پروتئین P53, Ki67 در انواع مختلف لکوپلاکیا همراه با افزایش ناپایداری ژنومی می‌باشد (۱۵).

سانتوزگارسیا پروتئین P53 را در اپی‌تلیوم لکوپلاکیائی مورد مطالعه قرار داد و نتایج حاصله نشان داد که بروز P53 در نمونه‌های کنترل به دلیل کوتاه بودن عمر این پروتئین قابل ارزیابی نیست ولی افزایش بروز این پروتئین در لایه‌های فوق بازال در بافت‌های آسیب دیده به دلیل موتاسیون این ژن و نهایتاً وجود این پروتئین به مدت طولانی در بافت‌ها قابل ارزیابی است و می‌توان از بروز این پروتئین در بافت‌های بیش بدخیم به عنوان یک مارکر ارزشمند استفاده کرد (۱۶).

لامرون تحقیقی در زمینه بروز پروتئین‌های P53 درسرطان سلول سنگفرشی انجام داد و نتیجه گرفت که

افزایش بروز پروتئین P53 در ضایعات بدخیم وجود دارد. کنترل سه ساله بیماران مورد مطالعه نشان دادکه بدخیمی‌هایی که در لبه تهاجم شدت بروز بیشتری از پروتئین فوق داشتند از Grade بالاتری برخوردار بوده و متاستاز و عود بیشتری نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر نیز افزایش بروز این پروتئین در سرطان سلول سنگفرشی نسبت به نمونه‌های کنترل مشاهده شد (P=۰/۰۰۳).

مطالعه سوچیتا و همکاران افزایش بروز پروتئین p53 به موازات بالارفتن رتبه (grade) تومور را نشان داد و آنها نتیجه‌گیری نمودند که پیشرفت ضایعات پیش‌بدخیم به سمت بدخیمی توسط روش ایمونوهیستوشیمی ارزشمند می‌باشد (۲۲).

کوروکاوا و همکاران درسال ۲۰۰۳ مطالعه بروز پروتئین P53 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیایی را انجام دادند. در نمونه‌های لکوپلاکیائی بروز این پروتئین به فرم منتشر در لایه‌های فوق بازال مشاهده شد در حالی‌که بروز این پروتئین در نمونه‌های کنترل بازالی بود که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۱۳). اما ما نتوانستیم ارتباطی بین نوع دیسپلازی و میزان بروز این پروتئین به دست آوریم البته مطالعه حاضر از نظر بروز p53 مشابه مطالعه وُرا می‌باشد (۱۷،۲۵).

در مطالعه حاضر بروز پروتئین P53 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیایی فوق بازالی بود و در گروه کنترل این بروز در لایه بازال اپی‌تلیوم مشاهده شد. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین بروز این پروتئین در کارسینوم سلول سنگفرشی و گروه‌های لکوپلاکیایی مشاهده شد. اما ارتباطی بین شدت دیسپلازی و افزایش بروز مولکول P53 مشاهده نشد. در مطالعه حاضر بروز پروتئین P53 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیایی فوق بازالی و در گروه کنترل این بروز در لایه بازال اپی‌تلیوم مشاهده شد. افزایش تظاهر ملکول پروتئین فوق دراپی‌تلیوم دیسپلاستیک نسبت به اپی‌تلیوم غیر دیسپلاستیک دیده شد.

البته اختلاف معنی‌داری بین بروز این پروتئین در کارسینوم سلول سنگفرشی و گروه‌های لکوپلاکیایی مشاهده شد هم‌چنین افزایش تظاهر ملکول پروتئین فوق در اپی‌تلیوم دیسپلاستیک نسبت به اپی‌تلیوم غیر دیسپلاستیک دیده شد. اما ارتباطی بین شدت دیسپلازی و افزایش بروز مولکول P53 مشاهده نشد که با مطالعه سوچیتا (۲۲) و وارا (۱۷،۲۵) هم‌خوانی دارد.

لازم به ذکر است که به دلیل ناقص بودن اطلاعات موجود در پرونده‌های بیماران مبتلا در مراکز پاتولوژی از قبیل محل دقیق ضایعه، سن، جنس و عادات بیماران بررسی نمونه بزرگ‌تری جهت مطالعه ایمنوهیستوشیمی‌امکان‌پذیر نبود. در مطالعه حاضر کلیه نمونه‌های موجود در آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی (تنها مرکز پاتولوژی که حاوی اطلاعات دقیقی از بیماران بود) استفاده شده است اما چه بسا اگر مطالعه بر روی تعداد نمونه‌های بیشتر انجام می‌گرفت، نتایج متفاوتی به دست می‌آمد یا اختلاف قابل‌توجهی بین دو گروه لکوپلاکیای دیسپلاستیک و غیردیسپلاستیک مشاهده می‌شد. امید است با تکمیل پرونده‌های بیماران در مراکز درمانی، مطالعات آینده‌نگر و تعداد بیشتری نمونه بتوان به اطلاعات ارزشمندتر و دقیق‌تری در مورد ماهیت ملکولی این ضایعات دست یافت.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه که حمایت مالی این طرح را به عهده گرفتند و سرکار خانم سکینه محمدعلیزاده که مسئولیت آنالیز آماری پروژه را پذیرفتند و هم‌چنین سرکار خانم فرزانه محمودی که در انجام مراحل ایمونوهیستوشیمی ما را یاری نمودند قدردانی می‌شود.

The Expression of P53 in Leukoplakia, Squamous Cell Carcinoma and Normal Oral Epithelium Using Immunohistochemical Staining Method

Adhami Sh., D.D.S[1], Baghaie F., D.D.S.[2*], Kakooi Sh., D.D.S[3], Raoof M., D.D.S[4]

1. Assistant Professor of Oral Pathology, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
2. Assistant Professor of Oral Pathology, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3. Assistant Professor of Oral Medicine, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
4. Assistant Professor of Endodontics, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

* Corresponding author, e-mail: fbaqhaei7@gmail.com

(Received 20 July 2007 Accepted 6 August 2008)

Abstract

Background & Aims: Leukoplakia is the most common premalignant or potentially malignant lesion of the oral mucosa and its potentiality for malignant transformation is unpredictable. The aim of the present study was to evaluate p53 expression in normal oral epithelium, leukoplakia and oral squamous cell carcinoma.

Methods: The standard Biotin streptavaidin peroxidase immunohistochemical staining method was used to study the expression of p53 on formalin fixed, paraffin embedded blocks of 8 cases of squamous cell carcinoma, 20 cases of leukoplakia and 10 cases of normal oral epithelium.

Results: There was no significant difference between immunostaining of leukoplakia and normal epithelium groups in the expression of P53, but the distribution patterns of p53 was mainly localized in the basal layer in the group of normal oral mucosa, while it extended into the suprabasal cell layer in leukoplakia group.
P53 expression in squamous cell carcinoma group was higher than other groups.

Conclusion: Considering the findings the expression of p53 in suprabasal cell layers in leukoplakia might show poor clinical outcome and alterations of p53 might be an important factor in the development of oral cancer.

Keywords: Squamous cell carcinoma, Oral leukoplakia, Neoplasm, Immunohistochemistry, Tumor suppressor protein p53

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(1): 1-11

References

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouqout JE. Oral and maxillofacial pathology.2nd ed., Philadelphia,W.B. Saunders, 2002; PP359-60.
2. Martin S, Greenberg Glick M. Burket's Oral medicine diagnosis and treatment.10th ed., Philadelphia, BC Decker, Inc., 2003; P85.
3. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robins pathologic basis of disease. 6th ed., Philadelphia, Saunders, 2005; PP300-4.
4. Regezi JA, Scuiba jj, Jordan RCK. Oral pathology clinical pathologic correlation. Philadelphia, Saunders, 2003; P45.
5. Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2): 357-62.

6. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(18): 4855-78.

7. Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control. *Genes Dev* 2004;18(16):1909-25.

8. Nasierowska-Guttmejer A, Trzeciak L, Nowacki MP, Ostrowski J. P53 Ptotein accumulation and p53 gen mutation in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2000; 6(4): 275-9.

9. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T, et al. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(10): 602-7.

10. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC Tp53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19(6): 607-14.

11. Ralhan R, Sandhya A, Meera M, Bohdan W, Nootan S.K. Induction of MDM2-P2 Transcripts Correlates with stabilized wild type p53 in Betel and tobacco related Human oral cancer. *Am J Pathol* 2000;157(2); 587-96.

12. Lawall, Mlaine de Almeida, Crivelini, Marcelo Macedo, Melaine de Almeida L, Marcelo Macedo C. PCNA and p53 expression in oral leukoplakia with different degree of keratinization. *APPL Oral Sci* 2006; 14(4): 276-80.

13. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(9): 513-21.

14. Ogmundsdottir HM, Hilmarsdottir H, Astvaldsdottir A, Johannsson JH, Holbrook WP. Oral lichen planus has a high rate of TP53 mutations. A study of oral mucosa in Iceland. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(3): 192-8.

15. Kovesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki-67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology* 2003; 65(4): 331-6.

16. Santos-Garcia A, Abad-Hernandez MM, Fonseca- Sanchez E, Cruz-Hernandez JJ, Bullon-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10(1): 5-8.

17. Vora HH, Trivedi TI, Shukla SN, Shah NG, Goswami JV, Shah PM. P53 expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue. *Int Biol Markers* 2006; 21(2): 74-80.

18. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Miura K, Murata T, Kajiyama M. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)and p53protein correlate with prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1999; 90(1): 6-13.

19. Nylander K, Dablesteen E, Hall PA. The P53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000; 29(9): 413-25.

20. Zhao XY, Liu HW, Wei MJ. Expression of PDCD5 and p53 in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005; 37(4): 429-32.

21. Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co – expression of P53 and Ki67 and lack of EBV Expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(1): 30-6.

22. Suchita P, Saleem S. P53 expression in benign,dysplastic and malignant oral squamous epithelial lesions. *Pak J Med Sci* 2008; 24(1): 130-5.

23. Cruz I, Napier SS, Van der Waal I, Snijders PJ, Walboomers JM, Lamey PJ, et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol* 2002; 55(2): 98-104.

24. Kaplan I, Vered M, Moskona D, Buchner A, Dayan D. An immunohistochemical study of p53 and PCNA in inflammatory papillary hyperplasia of the palate: a dilemma of interpretation. *Oral Dis* 1998; 4(3): 194-9.

25. Vora HH, Mehta SV, Shah KN, Brahmbhatt BV, Desai NS, Shukla SN, et al. Cytoplasmic localization of BAG- 1 in leukoplakia and carcinoma of the tongue: correlation with p53 and c-erbB2 in carcinoma. *Int J Biol Markers* 2007; 22(2): 100-7.