

بررسی بروز آنتی ژن های P53 و PCNA در لکوپلاکیای مخاط دهان با و بدون دیسپلازی به روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر نوشین محتشم*، دکتر نصرالله ساغروانیان**، دکتر نوریه شریفی***، دکتر محمد تقی شاکری****، دکتر شیمایا عامل قریب*****،
دکتر ستاره شجاعی*****#

* دانشیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
** استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*** دانشیار گروه آسیب شناسی بیمارستان قائم دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**** دانشیار گروه اپیدمیولوژی و آمار حیاتی بیمارستان قائم دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***** دندانپزشک
***** دستیار تخصصی گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
تاریخ ارائه مقاله: ۸۷/۹/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۰

Evaluation of P53 and PCNA Expression in Oral Leukoplakic Lesions with and without Epithelial Dysplasia by Immunohistochemistry Technique

Nooshin Mohtasham*, Nasrollah Saghravani**, Noorieh Sharifi***, Mohammad Taghi Shakeri****, Shima Amel Garieb*****, Setareh Shojaee*****#

* Associate Professor, Dept of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry and Dental Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

** Assistant Professor, Dept of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry and Dental Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*** Associate Professor, Dept of Pathology, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**** Associate Professor, Dept of Epidemiology, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
***** Dentist

***** Postgraduate Student, Dept of Oral and Maxillofacial Pathology, Dental School, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 3 December 2008; Accepted: 1 March 2009

Introduction: Leukoplakia is the most common precancerous lesion of the oral mucosa and may range microscopically from benign hyperkeratosis to invasive squamous cell carcinoma. P53 is a tumor suppressor protein; whereas, proliferative cell nuclear antigen (PCNA) is a proliferative marker. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expressions of P53 and PCNA in oral leukoplakia with and without dysplasia.

Materials & Methods: The expression of P53 and PCNA proteins were determined immunohistochemically in paraffin sections of 53 leukoplakias (17 without dysplasia, 15 with mild dysplasia, 14 with moderate dysplasia and 7 with severe dysplasia), in addition to 10 normal oral mucosa. Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA, Kruskal-Wallis, and spearman tests.

Results: P53 protein was expressed in 60% of normal oral mucosa, 82.4% of leukoplakias without dysplasia and 100% of leukoplakias with dysplasia. PCNA protein was expressed in all of the specimens. There were statistical differences between P53 and PCNA expression among normal mucosa, leukoplakias with and without dysplasia, regarding their grading and severity ($P < 0.001$). There was a positive correlation between P53 and PCNA expression.

Conclusion: Increase in P53 and PCNA expression is related to the degree of dysplasia in oral leukoplakias. Therefore, we can use these markers in order to indicate and grade dysplastic lesions more exactly. PCNA and P53 could also be used as appropriate markers to estimate the potential of malignant transformation in oral leukoplakia lesions.

Key words: Oral leukoplakia, epithelial dysplasia, immunohistochemistry, P53 and PCNA.

Corresponding Author: ShojaeeS851@mums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2009; 33(2): 169-76.

چکیده

مقدمه: لکوپلاکیا شایع ترین ضایعه پیش بدخیم مخاط دهان می باشد و یک هایپرکراتوز خوش خیم تا کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم را دربر می گیرد. P53 پروتئین مهارکننده رشد تومور و PCNA بیومارکر تکثیر سلولی است. هدف از این مطالعه تعیین و مقایسه بروز آنتی ژن P53 و PCNA در لکوپلاکیای مخاط دهان با و بدون دیسپلازی و اپی تلایوم طبیعی مخاط دهان به روش ایمونوهیستوشیمی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی تظاهر P53 و PCNA در ۵۳ نمونه از بلوک‌های پارافینی مربوط به لکوپلاکیا (بدون دیسپلازی (۱۷ مورد)، دیسپلازی خفیف (۱۵ مورد)، دیسپلازی متوسط (۱۴ مورد) و دیسپلازی شدید (۷ مورد) و ۱۰ مورد مربوط به مخاط طبیعی دهان به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. آزمون‌های آماری مورد استفاده آنالیز واریانس یک طرفه، کروسکال-والیس و ضریب همبستگی اسپیرمن بود.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۴۰٪ از نمونه‌های نرمال، ۷۶/۵٪ از لکوپلاکیاهای بدون دیسپلازی و ۹۳/۳۳٪ از لکوپلاکیاهای دیسپلاستیک، P53 را بروز دادند و PCNA در تمامی این ضایعات تظاهر یافت. اختلاف معنی‌داری از لحاظ تعداد سلول‌های P53 و PCNA مثبت و شدت تظاهر این مارکرها بین ضایعات وجود داشت ($P < 0.001$). ارتباط مثبتی بین تظاهر P53 و PCNA مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: افزایش بروز P53 و PCNA با درجه دیسپلازی لکوپلاکیای دهان ارتباط دارد و از این دو نشانگر می‌توان برای درجه بندی دقیق تر دیسپلازی، همچنین یافتن ضایعات لکوپلاکیای دیسپلاستیک استفاده نمود. همچنین، می‌توان از PCNA و P53 بعنوان مارکرهای پیش بینی کننده تغییرات بدخیمی در ضایعات لکوپلاکیای دهانی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: لکوپلاکیای دهانی، دیسپلازی اپی تلیوم، ایمونوهیستوشیمی، P53 و PCNA.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۸۸ دوره ۳۳ / شماره ۲: ۷۶-۱۶۹.

مقدمه

دیسپلازی اصولاً در اپی تلیوم دیده می‌شود و با مجموعه‌ای از تغییرات شامل عدم شکل بودن سلول‌ها و نیز از بین رفتن نظم ساختاری آنها مشخص می‌شود. همچنین سلول‌های دیسپلاستیک تفاوت قابل توجهی در شکل (پلی مورفیسم) از خود نشان می‌دهند و اغلب دارای هسته‌های هیپرکروماتیک می‌باشند و نسبت اندازه هسته به سیتوپلاسم به طور غیرطبیعی بزرگ می‌باشند. اشکال میتوزی بیشتر از حد عادی دیده می‌شوند. به طور شایع میتوز در نواحی غیرطبیعی در اپی تلیوم ظاهر می‌شود.^(۵) اکثر ضایعات لکوپلاکیایی در بیوپسی هیچ گونه تغییر دیسپلازی را نشان نمی‌دهند. شواهد مبنی بر وجود دیسپلازی اپی تلیال تنها در ۵٪ تا ۲۵٪ موارد (در صورت احتساب کلیه نقاط دهان) دیده شده است. در صورتی که دیسپلازی حضور داشته باشد، این تغییرات دیسپلاستیک معمولاً از قسمت‌های بازال و پارابازال اپی تلیوم آغاز می‌شوند. هر قدر اپی تلیوم بیشتر دیسپلاستیک گردد، تغییرات غیرمعمول اپی تلیال به سوی درگیری کل ضخامت اپی تلیوم وسعت می‌یابند.^(۱۳)

در مطالعه‌ای که توسط Warnakulasuriya و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی سیستم‌های طبقه بندی دیسپلازی دهانی انجام شد، پیشنهاد شده است به علت اختلاف در بین پاتولوژیست‌ها در تصمیم‌گیری برای وجود دیسپلازی و شدت آن، بهتر است از سیستم جدید طبقه‌بندی دوتایی (بدون دیسپلازی، مشکوک، ریسک پایین / متوسط تا شدید و متمایل

لکوپلاکیا بنا به تعریف WHO عبارت است از: پلاک یا لکه (Patch) سفیدی که از لحاظ بالینی یا آسیب‌شناسی به هیچ ضایعه دیگری اطلاق نشود و نتوان آن را از روی مخاط پاک کرد.^(۱-۴) به علت اینکه لکوپلاکیا محدوده وسیعی از یک هایپرکراتوز خوش خیم تا یک سرطان سلول سنگفرشی مهاجم را دربرمی‌گیرد، بیوپسی برای تشخیص قطعی الزامی می‌باشد. مانند اکثر ضایعات سفید دهانی، رنگ ضایعه در نمای بالینی، ناشی از ضخیم شدن لایه کراتین سطحی یا ضخیم شدن لایه خاردار می‌باشد.^(۱-۳)

لکوپلاکیا معمولاً به عنوان یک ضایعه پیش‌بدخیم یا پیش‌سرطانی در نظر گرفته می‌شود. شیوع تغییرات بدخیمی این ضایعات بیشتر از مخاط طبیعی است.^(۱) تغییرات هیستوپاتولوژیک از یک هایپرکراتوز، دیسپلازی تا کارسینوم درجا و سرطان سلول سنگفرشی متفاوت است.^(۱۳)

از لحاظ میکروسکوپی، لکوپلاکیا به وسیله یک لایه ضخیم کراتین روی اپی تلیوم سطحی (هایپرکراتوز)، همراه یا بدون افزایش ضخامت لایه خاردار (آکانتوزیس) مشخص می‌شود. برخی از لکوپلاکیاها در عین حال که هایپرکراتوز سطحی دارند، آتروفی یا نازک شدن اپی تلیوم زیرین را نشان می‌دهند. اغلب در بافت همبندی زیرین، تعداد متفاوتی از سلول‌های آماسی مزمن مشاهده می‌شوند.^(۱۳)

PCNA در لکوپلاکیای مخاط دهان با و بدون دیسپلازی و اپی تلیوم طبیعی مخاط دهان به روش ایمونوهیستوشیمی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی که به صورت مقطعی اجرا گردید، نمونه‌ها از آرشیو دانشکده دندانپزشکی مشهد بخش آسیب‌شناسی تهیه شد. نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۶۳ بلوک موجود در بایگانی بخش آسیب‌شناسی دانشکده دندانپزشکی مشهد بود. ۵۳ مورد از این ۶۳ بلوک، مربوط به لکوپلاکیا (۱۷) مورد بدون دیسپلازی، ۱۵ مورد با دیسپلازی خفیف، ۱۴ مورد با دیسپلازی متوسط و ۷ مورد با دیسپلازی شدید) و ۱۰ مورد مربوط به مخاط طبیعی دهان بود. ولی به دلیل آماسی بودن بافت همبندی مربوط به مخاط طبیعی دهان در اکثر موارد، نتوانستیم نمونه‌های بیشتری تهیه نماییم.

پس از بازبینی نمونه‌ها توسط دو پاتولوژیست و نشانه‌گذاری کانون مناسب از هر بلوک پارافینی دو برش ۴ میکرونی جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای مشخص شدن میزان بروز پروتئین‌های P53 و PCNA طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (Novo Castra) تهیه گردید.

روش رنگ‌آمیزی: پس از تهیه برش‌های بافتی از بلوک‌های پارافینی به ضخامت ۴ میکرون، آنها را بمدت ۲۴ ساعت در حرارت اتاق قرار دادیم. سپس آنها را در گزینن پارافینه کرده و سپس مراحل رنگ‌آمیزی را براساس دستورالعمل کارخانه سازنده (Novo Castra) بدینگونه انجام دادیم: به منظور بازیافت آنتی‌ژنی ابتدا آنها را در محلول سیترات در ماکروویو به مدت ۳۵ دقیقه قرار دادیم. سپس آنها را با آب مقطر شسته و آنها را در محیط مرطوب گذاشتیم و پس از آن به ترتیب در محلول‌های پراکسیداز، آنتی‌بادی (P53, PCNA), Link, استرپتوایدین، کروموزن، همتوکسیلین گذاشته و در بین هر یک از مراحل فوق، به مدت ۵ دقیقه آنها را در آب مقطر شستشو دادیم. سپس در الکل مطلق قرار داده و با چسب اتلان چسبانیدیم. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی $\times 400$ و $\times 100$ تحت مطالعه قرار گرفته و با استفاده از مقایسه با نمونه شاهد مثبت

به ریسک بالا) استفاده کرد. به نظر می‌رسد کاهش میزان انتخاب از سیستم سه‌تایی به دو‌تایی، باعث افزایش میزان توافق در بین پاتولوژیست‌ها می‌شود. میزان کارآیی این سیستم باید در آینده ارزیابی شود.^(۶)

PCNA^۱، یک پروتئین با وزن مولکولی ۳۶ کیلودالتون می‌باشد و در اوایل فاز G1 و فاز S از چرخه سلولی ساخته می‌شود. این پروتئین همچنین در ارتباط با مکانیسم‌های تخریب و ترمیم DNA می‌باشد. PCNA بطور قوی با مناطق هسته‌ای که در آن سنتز DNA اتفاق می‌افتد مرتبط می‌باشد PCNA یک مارکر مفید در پروليفراسیون سلولی است چون تظاهر و انتشار آن با میزان پروليفراسیون سلولی و سنتز DNA مرتبط می‌باشد.

P53 یک مهارکننده ذاتی رشد سلولی می‌باشد و شکل جهش یافته آن در ایجاد تومور نقش دارد.^(۷و۸) ژن سرکوب کننده تومور P53 اثرات مهارکننده رشد خود را حداقل تا حدی به وسیله تنظیم افزایشی تولید مهارکننده کینازهای وابسته به سیکلین اعمال می‌کند. موتاسیون این ژن و افزایش پروتئین آن در کارسینوم‌های سر و گردن مشاهده می‌گردد.^(۳و۵) Soares و همکارانش در سال ۲۰۰۶ یک مطالعه گذشته نگر بر روی ۹۵ بیوپسی دهانی انجام دادند که ۲۷ نمونه فیروز هیپرپلازی، ۴۰ نمونه لکوپلاکیا و ۲۸ نمونه کارسینوم سلول‌های سنگفرشی دهانی بود. از ۴۰ نمونه لکوپلاکیا، ۱۶ مورد غیردیسپلاستیک و ۲۴ مورد دیسپلاستیک بودند که ۵۰٪ آنها دیسپلازی متوسط تا شدید داشتند. مقایسه بین این ۴ گروه نشان داد که P53 و Ki67 به ترتیب در ضایعات خوش‌خیم، پیش‌بدخیم و بدخیم افزایش داشت. در مقابل ارتباط بین افزایش سطح PCNA و ضایعات پیش‌بدخیم و بدخیم غیرممکن بود و در نتیجه آنها نتیجه گرفتند که PCNA مارکر خوبی برای نشان دادن ضایعات پیش‌سرطانی نمی‌باشد.^(۹)

هدف از این مطالعه تعیین و مقایسه بروز آنتی ژن P53 و

با دیسپلازی شدید (۰/۴۲/۹) و مربوط به کل ضخامت اپی تلیوم بود (تصویر ۱).

در نهایت ۴۰٪ نمونه‌های نرمال و ۱۷/۶٪ لکوپلاکیای بدون دیسپلازی P53 را بروز دادند. با توجه به آزمون کروسکال-والیس اختلاف معنی‌داری از لحاظ درجه بندی P53 در بین گروه‌های تحت مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱). با توجه به این آزمون اختلاف معنی‌داری از لحاظ درجه‌بندی P53 در بین انواع لکوپلاکیا وجود داشت (P<۰/۰۰۱). همچنین اختلاف معنی‌داری از لحاظ درجه‌بندی P53 در بین سه گروه مخاط نرمال، لکوپلاکیا بدون دیسپلازی و لکوپلاکیاهای با دیسپلازی به عنوان یک مجموعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

تمامی نمونه‌ها PCNA را بروز دادند. بیشترین میانگین درصد بروز PCNA در بین گروه‌های تحت مطالعه در لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید (۸۷/۱±۱۲/۵) و کمترین میزان آن در لکوپلاکیا بدون دیسپلازی (۱۵/۰۶±۷/۱) دیده شد و با توجه به آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ بروز PCNA بین گروه‌های تحت مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱ و F=۵۰/۳۹۵).

بر طبق آزمون، اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ بروز PCNA در بین انواع لکوپلاکیا وجود داشت (P<۰/۰۰۱) و F=۵۴/۷۵۲. همچنین اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ بروز PCNA بین سه گروه مخاط نرمال، لکوپلاکیا بدون دیسپلازی و مجموعه لکوپلاکیاهای با دیسپلازی وجود داشت (P<۰/۰۰۱ و F=۸/۷۲۸). با توجه به آزمون کروسکال-والیس اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ درجه بندی PCNA در بین ۵ گروه تحت مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۰۱) و همچنین اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ درجه‌بندی سلول‌های اپی تلیالی ضایعات، در بروز PCNA در بین انواع لکوپلاکیاها وجود داشت (P<۰/۰۰۱) که در لکوپلاکیا بدون دیسپلازی در رابطه با درجه بندی (+) از همه بیشتر و در لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید از همه کمتر بود. درجه بندی (++) در لکوپلاکیا با دیسپلازی متوسط از همه بیشتر و در لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید از همه کمتر بود. درجه بندی (+++) در

(آدنوکارسینوم کولون، گره لنفی راکتیو) از صحت رنگ‌آمیزی اطمینان حاصل گشت. برای ارزیابی فعالیت نشانگر P53 نمونه‌هایی که کمتر از ۵٪ سلول‌های اپی تلیالی آنها رنگ گرفته بود به عنوان (-)، نمونه‌هایی که ۶-۲۵٪ سلول‌های اپی تلیالی آنها رنگ گرفته بود به عنوان (+) در نظر گرفته شدند. نمونه‌هایی که ۲۶-۵۰٪ سلول‌های اپی تلیالی آنها رنگ گرفته بود به عنوان (++) در نظر گرفته شدند.^(۱۰) در نهایت چنانچه بیش از ۵۰٪ سلول‌های اپی تلیالی رنگ می‌گرفت به عنوان (+++) در نظر گرفته می‌شد. برای ارزیابی فعالیت نشانگر PCNA، تعداد سلول‌های مثبت در حداقل ۱۰۰۰ سلول در مناطقی با حداکثر فعالیت PCNA شمارش گردید و تعداد سلول‌های مثبت به شکل درصدی از کل سلول‌های شمارش شده برآورد شد (Label Index).^(۱۱)

از لحاظ شدت رنگ پذیری نشانگرها، رنگ پذیری هسته سلول‌های تومورال به ۴ دسته عدم بروز (-) ضعیف (قهوه‌ای کم رنگ +)، متوسط (قهوه‌ای بلوطی ++) و شدید (قهوه‌ای سوخته +++) تقسیم‌بندی شدند.^(۱۲)

موقعیت بروز P53 و PCNA به تفکیک محل در اپی تلیوم در (۱) طبقه بازال، (۲) در طبقه بازال و پارابازال، (۳) در ۱/۳ ضخامت اپی تلیوم، (۴) در ۱/۲ ضخامت اپی تلیوم، (۵) در ۲/۳ ضخامت اپی تلیوم، (۶) در تمام ضخامت اپی تلیوم مشخص گشت.

آزمون‌های آماری مورد استفاده عبارت بود از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه، کروسکال-والیس و ضریب همبستگی اسپیرمن. در همه آزمون‌ها سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بود.

یافته‌ها

اکثریت نمونه‌های بافت نرمال و لکوپلاکیای بدون دیسپلازی، پروتئین P53 را در طبقه بازال بروز دادند (به ترتیب ۵۰٪ و ۷۶/۵٪) و همچنین اکثریت نمونه‌های لکوپلاکیا با دیسپلازی خفیف، P53 را در ناحیه بازال بروز دادند (۶۶/۷٪). این ارقام در مورد لکوپلاکیا با دیسپلازی متوسط (۲۱/۴٪) و مربوط به ناحیه بازال و پارابازال و برای لکوپلاکیا

با توجه به آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی داری بین گروه‌های تحت مطالعه از نظر بروز P53 وجود داشت ($F=63/9$ و $P<0/001$).

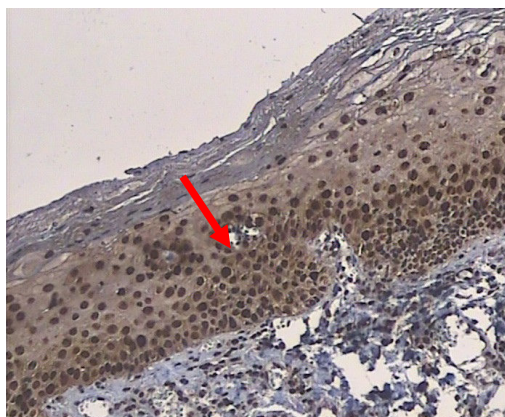
بر طبق همین آزمون اختلاف معنی داری از لحاظ درصد بروز P53 در بین انواع لکوپلاکیا وجود داشت ($P<0/001$) و همین طور تفاوت معنی داری از لحاظ بروز P53 بین بافت نرمال، لکوپلاکیای بدون دیسپلازی و مجموعه لکوپلاکیا با دیسپلازی وجود داشت ($F=9/097$ و $P<0/001$). با توجه به ضریب همبستگی اسپیرمن، P53 و PCNA با یکدیگر ارتباط مستقیم داشته و همسوی با هم عمل می‌کنند ($r=0/764$) (نمودار ۱).

لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید از همه بیشتر بود (تصویر ۲). همچنین اختلاف آماری معنی داری از لحاظ درجه بندی PCNA بین سه گروه مخاط نرمال، لکوپلاکیای بدون دیسپلازی و مجموعه لکوپلاکیاهای با دیسپلازی وجود داشت ($P<0/001$) (جدول ۲).

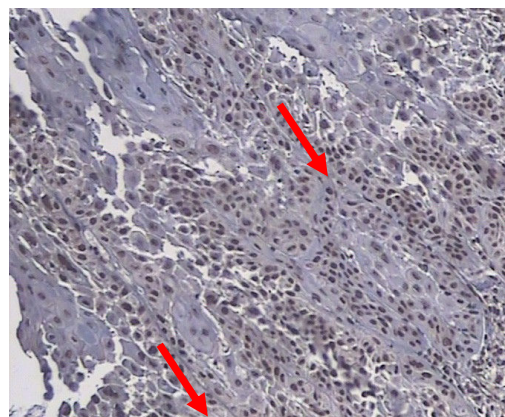
با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف آماری معنی داری میان ۵ گروه وجود داشت ($P<0/001$). همچنین اختلاف آماری معنی داری میان انواع لکوپلاکیا وجود داشت ($P<0/001$) و تفاوت معنی داری بین بافت نرمال، لکوپلاکیا بدون دیسپلازی و مجموعه لکوپلاکیا با دیسپلازی وجود داشت ($P<0/001$) (جدول ۳).

جدول ۱: فراوانی درجه بندی تظاهر نشانگر P53 در گروه‌های تحت مطالعه بر حسب تعداد سلول‌های شمارش شده مثبت

ضایعه	-		+		++		+++	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بافت نرمال	۶	۶۰/۰	۴	۴۰/۰	۰	۰/۰	۰	۰/۰
لکوپلاکیا بدون دیسپلازی	۴	۲۳/۵	۱۳	۷۶/۵	۰	۰/۰	۰	۰/۰
لکوپلاکیا با دیسپلازی خفیف	۳	۲۰/۰	۱۰	۶۶/۷	۲	۱۳/۳	۰	۰/۰
لکوپلاکیا با دیسپلازی متوسط	۰	۰/۰	۵	۳۵/۷	۸	۵۷/۱	۱	۷/۲
لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید	۰	۰/۰	۰	۰/۰	۲	۲۸/۶	۵	۷۱/۴



تصویر ۲: تظاهر شدید PCNA با سلولاریتی +++ در تمام ضخامت دیسپلازی شدید (بزرگنمایی ۱۰۰x)



تصویر ۱: تظاهر شدید P53 با سلولاریتی +++ در دیسپلازی شدید در تمام ضخامت اپی‌تلیوم (بزرگنمایی ۱۰۰x)

جدول ۲: محل بروز PCNA در گروه‌های تحت مطالعه

محل بروز	نرمال	لکوپلاکیا بدون دیسپلازی		لکوپلاکیا با دیسپلازی خفیف		لکوپلاکیا با دیسپلازی متوسط		لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
ناحیه بازال	۶	۱۲	۷۰/۵	۷	۴۳/۷	۰	۰/۰	۰	۰/۰
ناحیه بازال و پارابازال	۴	۵	۲۹/۴	۶	۳۷/۵	۵	۳۸/۴	۰	۰/۰
ناحیه ۱/۳ ضخامت اپی تلیوم	۰	۰	۰/۰	۲	۱۲/۵	۲	۱۵/۳	۰	۰/۰
ناحیه ۱/۲ + ۲/۳ ضخامت اپی تلیوم	۰	۰	۰/۰	۱	۶/۲۵	۳	۲۳/۰	۴	۵۷/۱
کل ضخامت اپی تلیوم	۰	۰	۰/۰	۰	۰/۰	۳	۲۳/۰	۳	۴۲/۸

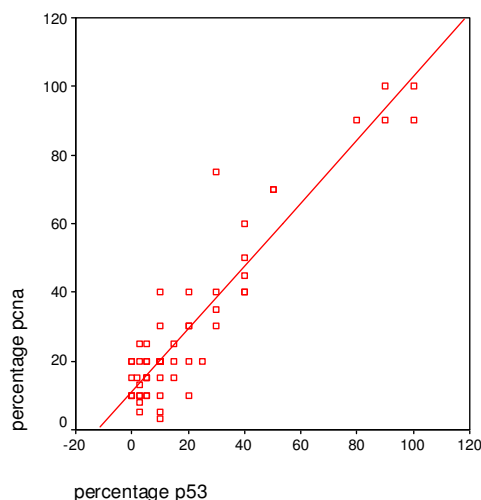
جدول ۳: میانگین و انحراف معیار درصد سلول‌های اپی تلیالی رنگ آمیزی شده با PCNA و P53

ضایعه	PCNA		P53	
	تعداد	(انحراف معیار) میانگین	تعداد	(انحراف معیار) میانگین
بافت نرمال	۱۵	۱۸/۰ (۴/۲)	۱۰	۴/۲ (۶/۱)
لکوپلاکیا بدون دیسپلازی	۱۷	۱۵/۰ (۷/۱)	۱۷	۷/۱ (۵/۷)
لکوپلاکیا با دیسپلازی خفیف	۱۶	۲۲/۶ (۱۷/۸)	۱۵	۱۷/۸ (۱۰/۳)
لکوپلاکیا با دیسپلازی متوسط	۱۳	۳۴/۶ (۱۲/۱)	۱۴	۱۲/۱ (۱۲/۳)
لکوپلاکیا با دیسپلازی شدید	۷	۸۷/۱ (۱۲/۵)	۷	۱۲/۵ (۱۲/۶)

F=۶۳/۹ و P<۰/۰۰۱

F=۵۰/۳۹۵ و P<۰/۰۰۱

نتیجه آنالیز واریانس



نمودار ۱: ارتباط تظاهر P53 و PCNA در ضایعات مورد مطالعه

می باشد. (۱۵ و ۱۳ و ۱۰)

بحث

از لحاظ میکروسکوپی لکوپلاکیا به وسیله یک لایه ضخیم کراتین روی اپی تلیوم سطحی همراه یا بدون افزایش ضخامت لایه خاردار مشخص می شود. تغییرات هیستوپاتولوژیک از یک هیپرکراتوز، دیسپلازی تا کارسینوم درجا و سرطان سلول

لکوپلاکیا شایع ترین ضایعه پیش بدخیم در مخاط دهان است. (۱۳ و ۱۴) علت آن همچنان ناشناخته باقی مانده است. (۴) البته موارد متعددی را در بروز آن دخیل دانسته اند که شامل سیگار یا تنباکوی جویدنی، برخی از میکروارگانیسم ها و ...

سنگفرشی متفاوت است.^(۳۰)

اکثر ضایعات لکوپلاکیا در بیوپسی هیچ‌گونه تغییر دیسپلازی را نشان نمی‌دهند و دیسپلازی اپی‌تلیال تنها در ۲۵-۵٪ موارد دیده شده است.^(۴)

P53 یک مهارکننده ذاتی رشد سلولی می‌باشد و شکل جهش یافته آن در ایجاد تومور نقش دارد.^(۱۷)

یک مارکر دیگر که برای پیش‌بینی در بعضی از مطالعات پیشنهاد گردیده است، Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) می‌باشد که جهت بررسی فعالیت تکثیری سلول‌ها استفاده می‌شود.^(۱۶) مطالعه ما که تظاهر P53 را هم از لحاظ تعداد سلول‌های اپی‌تلیالی مثبت و هم از لحاظ شدت رنگ‌پذیری آنها بررسی نموده، نشان داده است که تعداد سلول‌های P53 مثبت و همچنین شدت رنگ‌پذیری آنها به ترتیب از بافت نرمال به سمت دیسپلازی شدید افزایش می‌یابد و این در حالی است که هر چه به سمت دیسپلازی شدید پیش می‌رویم محل بروز P53 از لایه‌های بازال در سلول‌های طبیعی به سمت لایه‌های سطحی‌تر و تمام ضخامت پیشرفت می‌کند.

این نتایج با تحقیق Soares و همکارانش مطابقت دارد. در این مطالعه نشان داده شد که تظاهر P53 به ترتیب از ضایعات خوش‌خیم به پیش‌بدخیم تا بدخیم افزایش می‌یابد.^(۹)

همین‌طور در مطالعه‌ای که توسط Santos-Garcia با استفاده از تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی انجام شد، مشخص گردید که ارزیابی نشانگر Ki-67 در مراحل اولیه ضایعات لکوپلاکیا و مارکر P53 در مراحل پیشرفته این ضایعات ارزشمند است و مطالعه این مارکرها می‌تواند در تشخیص زودرس ضایعات پیش‌سرطانی و نتیجتاً درمان آنها مفید باشد. این مطالعه از لحاظ بررسی P53 و نتایج آن، با مطالعه ما مطابقت نسبی دارد.^(۱۷)

در مطالعه ما، بررسی بروز PCNA از لحاظ تعداد سلول‌های اپی‌تلیالی مثبت و شدت رنگ‌پذیری آنها در گروه‌های هدف انجام شد که به ترتیب از دیسپلازی خفیف تا شدید افزایش داشت و همین‌طور محل بروز آن در

نمونه‌های بافت نرمال و دیسپلازی خفیف، بیشتر در لایه بازال و در دیسپلازی شدیدتر به سمت لایه‌های سطحی و در نهایت کل ضخامت اپی‌تلیوم بوده است. این نتایج در مورد نشانگرهای P53 و PCNA مشابه مطالعات ذیل بوده است.

در مطالعه Tsuzuki، تظاهر PCNA را در سرطان سلول سنگفرشی با استفاده از تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی نشان داد و نتیجه گرفت که PCNA با پیشرفت بیماری افزایش می‌یابد.^(۱۸)

در مطالعه Iwasa، P53 و PCNA مثبت بطور ثابتی از ۳۵ تا هیپرپلازی تا دیسپلازی خفیف، متوسط، شدید و در نهایت سرطان سلول سنگفرشی افزایش نشان داد که با مطالعه ما در مورد لکوپلاکیا همخوانی دارد.^(۱۹)

همین‌طور در مطالعه Girod که بر روی ۲۵۶ نمونه پیش‌بدخیم، بدخیم و متاستاتیک نشان داده شد که یک افزایش در تظاهر PCNA از بافت طبیعی به سمت سرطان سلول سنگفرشی با درجه تمایز متوسط وجود دارد.^(۲۰)

Lan و همکارانش نشان دادند که میزان بروز P53 و PCNA با درجه دیسپلازی ضایعات لکوپلاکیا و درجه‌بندی هیستولوژیک سرطان سلول سنگفرشی حفره دهان ارتباط مستقیم دارد و در اپی‌تلیوم دیسپلاستیک این دو مارکر در نواحی سوپرابازال و لایه‌های تحتانی‌تر طبقه‌بندی‌شده بروز می‌یابند که از لحاظ خصوصیات دیسپلاستیک با مطالعه ما مطابقت دارد.^(۲۱)

در مقابل می‌توان از مطالعه Anghelina و همکاران نام برد که میزان بروز P53 در نمونه‌های کارسینوم درجا در درصد پایینی از نمونه‌ها بروز یافته است (۲۸٪ دیسپلازی متوسط و فقط یک نمونه کارسینوم درجا) که ممکن است به دلیل اختلاف در نحوه رنگ‌آمیزی ایمنو‌هیستوشیمی باشد. البته در این مطالعه نشانگر PCNA در تعیین شدت دیسپلازی مفید دانسته شده است.^(۲۲)

مطالعه دیگری که با نتایج تحقیق ما ناهمگون می‌باشد، مطالعه‌ای است که توسط Liu و Klein با استفاده از تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی انجام گردید، نشان داده شد که مارکرهای پرولیفراسیون سلولی مثل PCNA، قادر به درجه‌بندی

لکوپلاکیای دیسپلاستیک استفاده نمود. همچنین، می‌توان از PCNA و P53 بعنوان مارکرهای پیش بینی کننده تغییرات بدخیمی در ضایعات لکوپلاکیای دهانی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان این مقاله از حمایت مادی و معنوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد در انجام این طرح تحقیقاتی قدردانی می‌گردد.

دیسپلازی در لکوپلاکیا نمی‌باشند و با توجه به سادگی در استفاده و پذیرش همگانی، Ki-67 را به عنوان یک مارکر قابل اعتماد برای پیش بینی بدخیمی پیشنهاد کردند.^(۲۳)

نتیجه گیری

افزایش بروز P53 و PCNA با درجه دیسپلازی لکوپلاکیای دهان ارتباط دارد و از این دو نشانگر می‌توان برای درجه بندی دقیق تر دیسپلازی، همچنین یافتن ضایعات

منابع

- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & Maxillofacial Pathology. 3th ed. China: W.B.Saunders Co; 2009. P. 388-97.
- Gyeenberg MS, Glick M. Burket's Oral Medicine Diagnosis and Treatment. 10th ed. Spain: B.C. Decker; 2002. P. 85-125.
- Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral Pathology Clinical Pathologic Correlation. 5th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co; 2008. P. 73-125.
- Burns T, Breathnach SM, Cox N, Griffith CE. Rook's Textbook of Dermatology. 7th ed. USA: Black Well Co; 2004: P. 66-91.
- Kumar V, Fausto N, Abbas A. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. China: W.B. Saunders Co; 2004. P. 292, 302-3, 328-31.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: Predictive value, utility, weaknesses, and scope for improvement. J Oral Pathol Med 2008; 37(3): 127-33.
- Sandra F, Nakamura N, Kanematsu T, Hirata M, Ohishi M. The role of MDM2 in the proliferative activity of ameloblastoma. Oral Oncol 2002; 38(2): 153-7.
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The P53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 1989; 57(7): 1083-93.
- Soares CP, Zuanon JA, Teresa DB, Fregonezi PA, Neto CB, Oliveira MR. Quantitative cell-cycle protein expression in oral cancer assessed by computer-assisted system. Histol Histopathol 2006; 21(7): 721-8.
- Gnepp DR. Diagnostic Surgical Pathology of the Head & Neck. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2000. P. 3-4.
- Lee JJ, Kuo MY, Cheng SJ, Chiang CP, Jeng JH, Chang HH, et al. Higher expressions of P53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99(4): 471-8.
- Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. 1st ed. London: Churchill Livingstone; 2002. P. 141-3.
- Levin AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the P53 tumour-suppressor gene in tumori genesis. Br J Cancer 1994; 69(3):409-16.
- Fan GK, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57, P53 and HSP60 expressions in premalignant and malignant oral tissue. Oral Oncol 2006; 42(2): 147-53.
- Banoczy J, Gintner Z, Dombic. Tobacco use and oral leukoplakia. J Dent Educ 2001; 65(4): 322-7.
- Rosai J. Rosai Ackerman's Surgical Pathology 2 volume set. 9th ed. Edinburgh London: Mosby Co; 2004. P. 66.
- Santos-Garcia A, Abad-Hernandez MM, Fonseca-Sanchez E, Cruz-Hernandez JJ, Bullon-Sopelana A. Proteic expression of P53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. Med Oral Pathol Oral Cir Bucal 2005; 10(1): 5-8, 1-5.
- Tsuzuki H, Fujieda S, Sunaga H, Narita N, Tokuriki M, Saito H. Expression of P27 and apoptosis in oral leukoplakia. Anticancer Res 2003; 23(2): 1265-70.
- Iwasa M, Imamura Y, Noriki S, Nishi Y, Kato H, Fukuda M. Immunohistochemical detection of early-stage carcinogenesis of oral leukoplakia by increased DNA-instability and various malignancy markers. Eur J Histochem 2001; 45(4): 333-46.
- Girod SC, Pape HD, Krueger GR. P53 and PCNA expression in carcinogenesis of the oropharyngeal mucosa. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994; 30(6): 419-23.
- Lan HA, Zain RB, Saitoh M, Muramatsu Y, Shrestha P, Mori M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and P53 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of oral mucosa-a marker for poor tumor differentiation, increasing nuclear atypia and invasiveness? Anticancer Res 1996; 16(5): 3059-65.
- Anghelina F, Ionita E, Popescu CF, Ionita I, Mogoanta C, Ciolofan S, et al. Clinical, morphological and immunohistochemical aspects in laryngeal premalignant lesions. Rom J Morphol Embryol 2006; 47(2): 169-74.
- Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. Oral Oncol 2000; 36(2): 145-51.