

بررسی بروز انکو پروتئین TP₅₃ در کارسینوم موکوپای درموئید غدد بزاقی و ارتباط آن با Grading

دکتر جهان‌شاه صالحی نژاد*#، دکتر نوریه شریفی**، دکتر علیرضا مومنی***، دکتر ستاره شجاعی****

* دانشیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دانشیار گروه آسیب شناسی بیمارستان قائم (عج) دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** مربی گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

**** دستیار تخصصی گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ ارائه مقاله: ۸/۵/۸۶ - تاریخ پذیرش: ۲۹/۱۱/۸۶

Title: Evaluation of TP₅₃ Oncoprotein Expression in Mucoepidermoid Carcinoma of Salivary Glands and its Relation with Grading

Authors: Salehinejad J*#, Sharifi N**, Momeni AR***, Shojaei S****

* Associate Professor, Dept of Oral & 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.

*** Instructor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, Dental School, Ahvaz University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

**** Postgraduate Student, Dept of Pathology, Dental School, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Introduction: Mucoepidermoid carcinoma is the most common malignancy in salivary glands. This tumor has a variable biologic potential, so it was first divided into two groups: one with malignant behavior and the other with benign behavior and good prognosis. The purpose of this study was evaluation of TP₅₃ oncoprotein and its relation to different grades of mucoepidermoid carcinoma.

Materials & Methods: This retrospective study included 22 paraffin embedded mucoepidermoid carcinoma samples stained by H&E. The samples were classified into low grade, intermediate grade and high grade. Then, new sections were made and stained by immunohistochemistry method (IHC method) for TP₅₃ marker. Finally, the relation between the two methods was statistically (ANOVA and Kendall test) analyzed. Seven sections of normal salivary gland tissue were also used as control group.

Results: All control cases were negative for TP₅₃ marker while 68.2% of mucoepidermoid carcinoma samples were positive. A significant relation was revealed between histological grade and nuclear TP₅₃ staining by IHC method.

Conclusion: Parallel to increasing histologic grade of salivary gland mucoepidermoid carcinoma, TP₅₃ expression is also increased so that immunohistochemistry technique is helpful for determination of the biologic behavior of salivary gland mucoepidermoid carcinoma and prognosis of patients.

Key words: Mucoepidermoid carcinoma, grading, immunohistochemistry, TP₅₃.

Corresponding Author: salehinejadJ@mums.ac.ir

Journal of Mashhad Dental School 2008; 32(1): 31-6.

چکیده

مقدمه: موکوپیدرومئید کارسینوما شایعترین بدخیمی غدد بزاقی است. این تومور از پتانسیل بیولوژیک متنوعی برخوردار است، لذا آن را به دو گروه یکی با رفتار بدخیم و دیگری با رفتار خوش خیم و پیش آگهی خوب تقسیم می کنند. در این مطالعه سعی شده است میزان بروز انکو پروتئین TP₅₃ به عنوان فاکتور مهم ژنتیک در چرخه سلولی و ارتباط آن با گردهای مختلف موکوپیدرومئید کارسینوما مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تحلیلی گذشته نگر، ۲۲ نمونه بلوک پارافینی موکوپیدرومئید کارسینوما گردآوری و به روش H&E رنگ آمیزی شد. سپس هر نمونه با اتکاء به معیارهای هستیولوژیک، درجه بندی گردید و در سه گروه Low grade، Intermediate grade و High grade دسته بندی شد. از هر بلوک برش جدید تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی TP₅₃ رنگ آمیزی شد و تحت بررسی قرار گرفت. سپس ارتباط مابین دو روش از نظر آماری به روش Kendall تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۷ نمونه از بافت غدد بزاقی نرمال بعنوان گروه کنترل انتخاب شد.

یافته ها: تمامی نمونه های گروه شاهد از نظر TP₅₃ منفی و % ۶۸/۲ گروه موکوپیدرومئید کارسینوما مثبت ارزیابی شد. و ارتباط معنی داری بین گردید هستیولوژیک تومور و میزان رنگ پذیری TP₅₃ مشاهده شد.

نتیجه گیری: به موازات افزایش درجه هستیولوژیک کارسینوم موکوپیدرومئید غدد بزاقی، میزان و شدت بروز مارکر TP₅₃ افزایش می یابد و می توان از این تکنیک در تعیین رفتار بیولوژیک تومور و پیش آگهی بیمار استفاده کرد.

واژه های کلیدی: موکوپیدرومئید کارسینوما، گردینگ، ایمونوهیستوشیمی، TP₅₃.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۸۷ / دوره ۳۲ / شماره ۱: ۳۱-۶.

مقدمه

موکوپایدرموئید کارسینوم، شایعترین بدخیمی غدد بزاقی است (به استثنای غده بزاقی تحت فکی، که در این جایگاه آدنوئید سیستیک کارسینوما قبل از موکوپایدرموئید کارسینوما قرار می‌گیرد). این تومور از پتانسیل بیولوژیک متنوعی برخوردار است. لذا در ابتدا آن را به دو گروه، یکی با رفتار بدخیم و دیگری با مشی خوش خیم و پروگنوز خوب تقسیم می‌کردند و به آن موکوپایدرموئید تومور اطلاق می‌شد. بعدها روشن شد که حتی تومورهای Low grade می‌توانند رفتار تهاجمی بروز دهند و نام موکوپایدرموئید کارسینوما ارجح شناخته شد.^(۱)

درجه هیستولوژیک نقش مهمی در تعیین رفتار بیولوژیک بازی می‌کند و تظاهرات بالینی این ضایعه قویاً تحت تاثیر گرید هیستولوژیک بدخیمی قرار دارد. تومورهای Low grade دوره ای طولانی از تورم بدون درد غدد بزاقی را طی می‌کنند و موارد داخل دهانی این تومورها به موکوسل شباهت دارند و بعضاً دارای تومور می‌باشند که علت آن تشکیل کیست موکوسی است.^(۲) در سوی دیگر طیف بیماری، موارد High grade این ضایعه با رشد سریع، زخم‌های مخاطی، علائم انسدادی و فلج عصب صورتی ایجاد می‌کنند.^(۳-۴) از دیگر علائم این تومور می‌توان به تریسموس، ریزش اشک، ترشح بینی، بزاق خون آلود، لقی دندانها و فیستول، بزرگی غدد لنفاوی و متاستاز به گره‌های لنفاوی را نام برد.^(۵-۷)

با توجه به اهمیت بررسی بدخیمی‌ها در سرژیکال پاتولوژی و تشخیص بهینه وضعیت بیمار به هنگام بیوپسی و بدلیل تنوع سلولی این ضایعه و نقش هر دو دسته سلولی در میزان بدخیمی و پیش‌آگهی آن، امروزه تکنیکهای جدیدی مورد استفاده قرار می‌گیرند تا بتوان به کمک آنها میزان درگیری بیمار را تشخیص داد و طرح مناسبی برای درمان و طول عمر او ارائه کرد. ایمنو هیستوشیمی بکارگیری تکنیک‌ها و اصول ایمنولوژیک در مطالعه سلولها و بافتها می‌باشد.

روش اصلی توسط Coones با استفاده از نشان دار کردن یک آنتی بادی به کمک پروب فلئوروسنت و مطالعه آن در زیر میکروسکوپ فلئوروسنت بعد از انکوباسیون انجام و ابداع شد.^(۸) هدف از این مطالعه استفاده از تکنیک معتبر و ارزشمند ایمنو هیستوشیمی به منظور درجه بندی کارسینوم موکوپایدرموئید بعنوان شایعترین بدخیمی غده بزاقی است به این ترتیب با استفاده از مارکر TP53 به عنوان فاکتوری مهم در تقسیم سلولی و بررسی ارتباط آن با گریدهای مختلف موکوپایدرموئید کارسینوما، شناخت کامل‌تر و دقیق‌تری از رفتار بیولوژیک تومور مذکور خواهیم داشت و می‌توان پانل‌های درمانی مناسب تری را ارائه کرد. پرتودرمانی و شیمی درمانی که دو روش رایج درمانی در سرطان‌ها هستند، اثرات خود را با القای آسیب DNA و متعاقب آن آپوپتوز اعمال می‌کنند. در نتیجه تومورهایی که ژنهای طبیعی TP53 را حفظ می‌کنند در مقایسه با آنهايي که دارای TP53 جهش یافته‌اند، به چنین درمانهایی بهتر پاسخ می‌دهند.^(۹)

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تحلیلی مقطعی تعداد ۲۲ نمونه موکوپایدرموئید کارسینومای غده بزاقی از آرشیوهای بخش آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی، بیمارستان قائم، بیمارستان امید و بیمارستان امام تهران و تعدادی آزمایشگاه خصوصی جمع‌آوری گردید که میانگین سنی بیماران مربوطه ۴۵/۶ سال بود که ۱۲ عدد مربوط به جنس مذکر و ۱۰ عدد مربوط به جنس مؤنث بود. بر طبق تشخیص قبلی ۵ نمونه با درجه بدخیمی پایین، ۱۰ نمونه با درجه بدخیمی متوسط و ۷ نمونه با درجه بدخیمی بالا بودند.

۷ نمونه بافت نرمال غدد بزاقی بعنوان شاهد استفاده شد. با توجه به استفاده از بلوک بیماران، ملاحظات اخلاقی در این پژوهش مطرح نبود.

از بلوکهای پارافینی نمونه‌ها، برشهای ۳-۵ میکرونی تهیه گردید و رنگ آمیزی های هماتوکسین انوزین (H&E) و ایمنو هیستوشیمی با مارکر TP53 انجام شد (تصاویر ۱ و ۲).

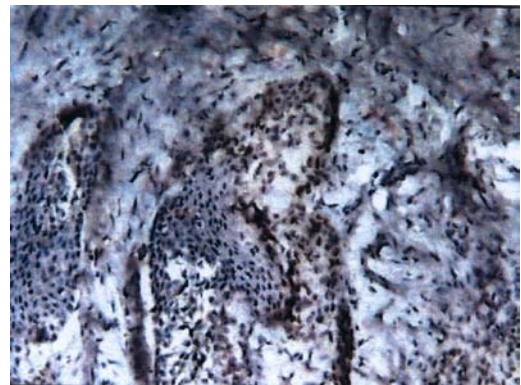
مقطر شسته و آنها را در محیط مرطوب گذاردیم و پس از آن به ترتیب در محلول پراکسیداز، محلول آنتی بادی، محلول Link، محلول استرپتویدین، محلول کروموزن، محلول همتاکسیلین گذاشته و در بین هریک از مراحل فوق، به مدت ۵ دقیقه آنها را در آب مقطر شستشو دادیم. سپس در الکل مطلق قرار داده و با چسب اتلان چسباندیم.

در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی TP₅₃ نمونه ها بر اساس ایمنو راکتیویتی هسته ها به مثبت و منفی و انواع مثبت براساس Visual impression به ضعیف، متوسط و قوی تفسیر می شوند. ایمنوراکتیویتی سلولهای تومورال بافتهای متفاوت جهت مارکر P₅₃، Cut off استاندارد جهت تلقی (+) و (-) ندارد و در مطالعات متفاوت و در بافتهای متفاوت متغیر ذکر می شود. در این بررسی رنگ هسته سلولها (قهوه ای) بعنوان حضور ژن موتان P₅₃ (مثبت) در نظر گرفته شد بطوریکه اگر در مجموع ۲۵٪-۱۰٪ هسته سلولها مثبت بود به عنوان (+)، اگر ۵۰٪-۲۵٪ آنها مثبت بود به عنوان (+) و اگر بیش از ۵۰٪ هسته سلول مثبت بود به عنوان (+) محسوب شد و بررسی شدت راکتیویتی (Visual) براساس میزان رنگ پذیری هسته بود. بطوریکه رنگ قهوه ای سوخته به عنوان قوی کم رنگ تر به عنوان متوسط و کم رنگ ترین به عنوان ضعیف تلقی شد.^(۱۰) لازم به ذکر است که در این مطالعه تعداد ۷ نمونه بافت نرمال بزاقی نیز به عنوان شاهد، با مارکر TP₅₃ رنگ آمیزی و بررسی شدند.

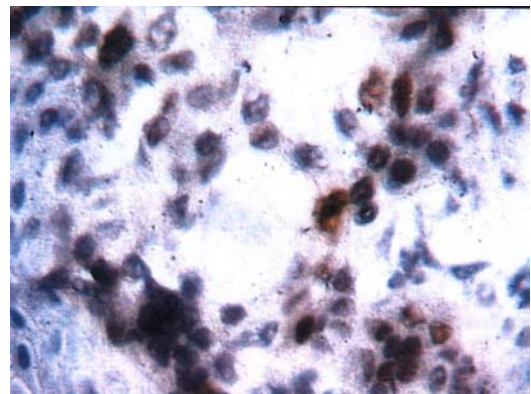
در پایان با استفاده از آزمون Kendall رابطه میان نتایج H&E و TP₅₃ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

در رنگ آمیزی TP₅₃ ۷ نمونه (۳۱/۸٪) منفی، ۳ نمونه (۱۳/۶٪) مثبت ضعیف و ۸ نمونه (۳۶/۴٪) مثبت متوسط و ۴ نمونه (۱۸/۲٪) مثبت قوی شمارش شدند. از سه نمونه مثبت ضعیف یک نمونه با درجه بدخیمی پائین و دو نمونه با درجه بدخیمی متوسط بودند. از ۸ نمونه مثبت متوسط، ۶ نمونه با درجه بدخیمی متوسط و دو نمونه با



تصویر ۱: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی TP₅₃ MEC X40



تصویر ۲: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی TP₅₃ MEC X100

هر یک از لامهای H&E به طور جداگانه توسط دو پاتولوژیست مورد بازبینی و تعیین مجدد گریدینگ قرار گرفتند.

در روش رنگ آمیزی TP₅₃ ابتدا بلوک های پارافینی به ضخامت ۳-۵ میکرون، تهیه شده و سپس بمدت ۲۴ ساعت در حرارت اتاق قرار داده شدند، سپس در گزینن دیپارافینه شده و مراحل رنگ آمیزی را براساس دستور العمل کارخانه سازنده (DAKO 2002) بدینصورت انجام گرفت: ابتدا آنها را در محلول سترات در ماکرو ویو قرار دادیم. سپس آنها را با آب

بالا بودند (جدول ۱). براساس آزمون غیرپارامتری کندال (Kendall) همبستگی نسبتاً قوی بین دو تشخیص H&E و TP₅₃ وجود داشت (P=۰/۰۰۳۹). ضریب همبستگی $r=۰/۸۶۱$ بود. به عبارت دیگر ۷۶٪ داده‌ها براساس دو نوع تشخیص قابل تبیین بودند.

درجه بدخیمی بالا ملاحظه شدند و از ۴ نمونه مثبت قوی، ۳ مورد با درجه بدخیمی بالا و یک مورد با درجه بدخیمی پائین بودند. ۷ نمونه منفی شامل سه نمونه با درجه بدخیمی پایین، دو نمونه با درجه بدخیمی متوسط و دو نمونه با درجه بدخیمی

جدول ۱: توزیع فراوانی نتایج آزمایشگاهی نمونه‌های MEC به تفکیک نتیجه رنگ آمیزی H&E و TP₅₃

نتیجه TP ₅₃										نتیجه H&E
کل		مثبت قوی		مثبت متوسط		مثبت ضعیف		منفی		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۲۲/۷	۵	۴/۵	۱	۰/۰	۰	۴/۵	۱	۱۳/۶	۳	Low
۴۵/۵	۱۰	۰/۰	۰	۲۷/۳	۶	۹/۱	۲	۹/۱	۲	Intermediate
۳۱/۸	۷	۱۳/۶	۳	۹/۱	۲	۰/۰	۰	۹/۱	۲	High
۱۰۰/۰	۲۲	۱۸/۲	۴	۳۶/۴	۸	۱۳/۶	۳	۳۱/۸	۷	کل

بحث

ژن P₅₃ ژن شناخته شده سرکوب کننده توموراست که محصول این ژن یعنی پروتئین TP₅₃ به عنوان یک پلیس مولکولی از بقای سلولهایی که آسیب ژنتیک دیده اند جلوگیری می کند. بدین ترتیب که با وقوع آسیب، سطح پروتئین TP₅₃ در هسته سلول افزایش یافته و به DNA متصل می گردد که نتیجه این عمل توقف چرخه سلول در مرحله G₁ و یا مکانیسم مرگ سلولی با آپوپتوز است. سلولی که ژن جهش یافته TP₅₃ را داشته باشد دیگر قادر به کنترل آسیب های ژنتیک خود نیست و شاید به همین علت باشد که از دست رفتن هموزیگوتی TP₅₃ از علل مهم مرگ در اثر

سرطان های شایع یعنی کارسینوم ریه، کولون و پستان می باشد.^(۸)

در مطالعه ای که بر روی ۱۲۱ مورد اسکواموس سل کارسینومهای دهان انجام شد، در ۵۱ مورد (۴۲٪) موتاسیون TP₅₃ وجود داشت^(۱۱) ولی در این مطالعه هیچ رابطه ای بین موتاسیون TP₅₃ و پارامترهای کلینیکو پاتولوژیک یافت نشد.^(۱۲)

در مطالعه ای دیگر میزان موتاسیون TP₅₃ در اسکواموس سل کارسینومای سرو گردن ۶۰٪ گزارش شده است^(۱۳) در مطالعه ما ۱۵ مورد از ۲۲ مورد معادل ۶۸/۲٪ موارد واجد موتاسیون TP₅₃ بودند که با بررسی های مشابه روی

تفسیری، وقت گیر بودن و هزینه زیاد است و از آنجا که برخی تومورها بدلیل تنوع سلولی (مثل موکوپیدرموئید کارسینوما) نتایج متفاوتی در رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی ممکن است بروز دهند،^(۱۴و۱۵) چنانچه پاتولوژیست در افتراق موکوپیدرموئید کارسینوما High grade با اسکواموس سل کارسینوما دچار شک و تردید شود می توان از رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی CD₁₄₆ (MEL-CAM) استفاده کرد.^(۱۶)

نتیجه گیری

با توجه به یافته های این مطالعه می توان به این نتیجه رسید که با بالا رفتن درجه هیستولوژیک کارسینوم موکوپیدرموئید غدد بزاقی ایمنورآکتیویتی سلولهای تومورال برای مارکر TP₅₃ از نظر شدت و میزان بروز بیشتر می شود.

تشکر و قدردانی

در پایان از مشاور محترم آمار آقای مهندس ابراهیم زاده و بخش های آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی، بیمارستان قائم و امید دانشگاه علوم پزشکی مشهد سپاسگزاری می شود.

اسکواموس سل کارسینوما همخوانی نسبی دارد، ضمن اینکه بعضی محققین معتقدند شکست در نشان دادن پروتئین TP₅₃ فقدان موتاسیون را اثبات نمی کند بلکه عوامل موثر دیگر چون مشکلات تکنیکی در نگهداری، فیکساسیون و مراحل مختلف پاساژ بافتی و رنگ آمیزی را مطرح می سازد.

در این مطالعه ۶۸٪ تومورها مثبت شدند یعنی TP₅₃ تمام افراد سالم را بدرستی سالم تشخیص می دهد ولی از هر صد نفر بیمار فقط می تواند ۶۸٪ آنها را شناسایی کند.

بر طبق این مطالعه، نمونه هایی که در رنگ آمیزی TP₅₃ قویاً مثبت می شوند با موارد High grade طبق معیارهای هیستولوژیک همخوانی دارند و از پروگنوز خوبی برخوردار نخواهند بود. آن دسته از کارسینوم های موکوپیدرموئید که در رنگ آمیزی TP₅₃ با نتیجه منفی یا مثبت ضعیف همراهند، Low to intermediate grade خواهند بود و نمونه های مثبت متوسط نیز Intermediate to high grade ارزیابی می شوند.

باید توجه داشت که روش رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی مستلزم تجهیزات آزمایشگاهی خاص، اشکالات تکنیکی و

منابع

- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 2th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2002: P. 406.
- Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RC. Oral Pathology. 4th ed. Philadelphia: Saunders Co; 2003: P. 183.
- Eversole LR. Clinical outline of oral pathology diagnosis and treatment. 3th ed. Ending burg: Churchill & Livingstone; 2002. P. 121, 157, 202.
- Cawson RA, Binne WH, Speith PM. Lucas pathology tumors of oral tissues. 2th ed. Ending burg: Churchill & Livingstone; 1998. P. 385.
- Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Textbook of oral pathology. 4th ed. Philadelphia: Saunders Co; 1983. P. 248.
- Sciubba JJ, Kinni M, Sachs SA. Mucoepidermoid carcinoma of parotid gland: an intra oral presentation with wide spread metastases. J Oral Path 1980; 9(6): 350-8.
- Eversole LR, Sabes WR, Rovins S. Aggressive growth and neoplastic potential of odontogenic cysts. Cancer 1975; 35(1): 270-82.
- Rosai J, Akerman M. Surgical pathology. 9th ed. Mosby Co; 2004. P. 45.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Saunders Co; 2005. P. 302.
- Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry. 1st ed. London: Churchill & Livingstone; 2002. P. 141.
- Harry N, Abrams R. Dentistry an Illustrated history. 2th ed. Inc Publisher; 1993. P. 15, 33, 41, 66, 67.
- Yamakazi Y, I tsu chiba. Specific TP₅₃ Mutations predid poor prognosis in oral squamous cell carcinoma oral oncology 2003; 39 (2): 163-9.
- Janti K, Nagpal V, Brbhu R, Das V. Oral cancer: reviewing present understanding of its molecular mechanism and exploring the future direction for its effective management. J Oral Oncology 2003; 39(3): 213-21.

14. El Nagggar AK, Bonez NC, Epithelial-Myoepithelial carcinoma of salivary gland. A clinical, pathologic, DNA Flow cytometric and immunohistochemistry study. Am J Clin Pathol 1995; 103: 432-9.
15. Giannoni C, El Nagggar AK, Bonez NC. C-erb B-2/Neu oncogene and Ki₆₇ analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms. Otolaryngol head & Neck Surg 1995; 112(3): 391-8.
16. Fabio RP, Le-Miny S, Danyel EDC. Mel-CAM expression in parotid MEC. J Oral Onc 2003; 39(3): 277-8.