

## بررسی میزان بروز و رابطه P53، P63 و عفونت HPV با Stage کلینیکی و Grade میکروسکوپی کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان

دکتر محمد مشرف\*، دکتر لیلی مهرداد\*\*، دکتر فرزانه جدلی\*\*\*، دکتر فاطمه مشهدی عباس\*\*\*\*، دکتر محمدجواد خرازی فرد\*\*\*\*\*،

دکتر احمدرضا شمشیری\*\*\*\*\*

### چکیده

سابقه و هدف: سرطان سلول سنگفرشی دهان هشتمین سرطان شایع شناخته شده است. این سرطان از موتاسیون در DNA کراتینوسیت‌ها ایجاد می‌گردد و عوامل متعددی باعث ایجاد آن می‌شوند. انواع HPV با ریسک بالای عفونت‌زایی، موتاسیون در P53 به عنوان سرکوب‌گر تومور و تظاهر بیش از اندازه P63 در ایجاد این سرطان دخیل هستند. به همین دلیل مطالعه حاضر با هدف مقایسه بروز و رابطه این سه فاکتور در Stage و Grade در بیماران مبتلا به Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) صورت پذیرفت. مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی مقطعی، از ۴۰ بلوک پارافینی در Stage‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ هماهنگ‌سازی شده استفاده گردید و مارکرهای p53 و p63 به روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) و حضور HPV به روش PCR بررسی شده، اطلاعات حاصل به وسیله آزمون Spearman correlation آنالیز شدند.

یافته‌ها: در بررسی حاضر فراوانی کلی P53 در ۴۰ نمونه به طور متوسط  $33/04 \pm 25/66$  ( $CI=24/94-41/14$ ) و فراوانی کلی P63 در ۴۰ نمونه به طور متوسط  $39/25 \pm 19/35$  ( $CI=33/13-45/37$ ) بود. میزان بروز P53 با stage و grade رابطه آماری معنی‌داری را نشان داد که به ترتیب ( $P=0/001$ ) و ( $P=0/013$ ) بود. درصد رنگ‌پذیری P63 هم رابطه آماری معنی‌داری را با grade نشان داد ( $P=0/049$ ). حضور HPV در بیماران به این صورت بود که ژنوم HPV16 در ۸ نمونه از ۴۰ نمونه (۲۰٪) مشاهده گردید و حضور ژنوم HPV18 در ۳ نمونه (۷/۵٪) دیده شد. در کل، فراوانی حضور ویروس در ۴۰ نمونه (۴۰٪) بود (۱۰/۴۰). رابطه آماری معنی‌داری بین بروز P53 و HPV16 نیز مشاهده شد ( $P=0/003$ ). HPV18 نیز با grade رابطه آماری معنی‌داری داشت ( $P=0/011$ ). نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های حاصل می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بروز P53 و P63 می‌توانند در ایجاد و پیشرفت OSCC نقش داشته و حضور HPV مخصوصاً نوع HPV16 به عنوان یک ریسک فاکتور در ایجاد OSCC به حساب می‌آید.

کلید واژگان: Oral squamous cell carcinoma, PCR, IHC, HPV, P53, P63

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۳/۱۰ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۸/۲۷ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۸/۹/۸

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۸، ۲۱۳-۲۰۵

### مقدمه

آسیب‌هایی و هند، سرطان دهان شایع‌ترین نوع بدخیمی بوده، بیش از ۵۰٪ موارد بدخیمی را شامل می‌شود (۳). در ایران در تحقیقی که اخیراً انجام شده است، ۱/۷٪ آمار حضور SCC در جنوب ایران ذکر شده است (۲۰۰ نمونه از بین

سرطان سلول سنگفرشی (SCC) در حدود ۹۴٪ از بدخیمی‌های حفره دهان را در ایالات متحده آمریکا به خود اختصاص داده است (۱). این بدخیمی در مردان شیوع بیشتری نسبت به زنان دارد (۲). در برخی از کشورهای

\* دانشیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات اندودنتیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

e-mail: Lmehrdad@dent.sbmu.ac.ir

\*\* نویسنده مسئول: متخصص آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت.

\*\*\* دانشیار گروه آسیب‌شناسی، بیمارستان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\*\* استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\*\*\* مشاور آمار، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\*\*\* متخصص ایمونولوژی، مشاور آمار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، بیمارستان مفید.

پیش‌آگهی باید گفت که یافته‌ها متناقض بوده و توافق کلی در مورد نقش پروگنوستیک آنها در کارسینوم حفره دهان وجود ندارد (۸،۱۲).

بنابراین، باتوجه به اهمیت شناخت نقش این عوامل در مورد پیشرفت SCC و از آنجا که براساس منابع موجود تحقیقات کافی در زمینه رابطه بروز P53 و P63 و عفونت HPV با SCC دهان صورت نگرفته است، اذا هدف از انجام این تحقیق بر پایه بروز و رابطه هرکدام از این عوامل در SCC دهان و تأثیر آنها بر Grade و Stage بیماری بنا شد تا شاید بتوان با شناخت ارتباط بین عوامل نام برده، راهی در جهت پیشگیری و یا درمان SCC پیدا نمود.

### مواد و روشها

در این مطالعه آزمایشگاهی توصیفی تحلیلی و Cross sectional، از تعداد ۴۰ عدد بلوک پارافینی که ۱۳ بلوک از نمونه‌های OSCC بیمارستان طالقانی و ۲۷ بلوک OSCC از بخش آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی در طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۷ بودند، استفاده شد. کلیه نمونه‌های موجود در بخش پاتولوژی که تشخیص قطعی SCC برایشان گذاشته شده، و grade و stage آنها مشخص بود، وارد مطالعه شدند. نمونه‌هایی که پرونده‌هایشان ناقص بوده یا تشخیص قطعی SCC برایشان گذاشته نشده یا بافت کافی آنها در دسترس نبود، از مطالعه خارج شدند.

تعداد نمونه‌ها از طریق سرشماری تمام نمونه‌های موجود در بخش پاتولوژی دانشکده و بیمارستان که قابل استفاده و در دسترس بودند و پرونده کامل‌تری داشتند، بدست آمد. نمونه‌ها از نظر stage و grade به سه دسته مساوی تقسیم شده، مخصوصاً از نظر stage مشابه‌سازی شدند.

بررسی دو مارکر P53 و P63 به روش ایمونوهیستوشیمی و بررسی حضور HPV در بیماران به روش PCR انجام گرفت. نمونه‌گیری به صورت non-probability sampling انجام پذیرفت.

سپس برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگرهای P53، P63 (از شرکت داکو در دانمارک به سفارش شرکت اسکان طب در ایران)، با استفاده از روش Envision، از

۱۱۲۰۰ نمونه سرطان (۴).

در دهه اخیر یافته‌های زیادی در زمینه تغییرات مولکولی و ژنتیکی عوامل ایجاد کننده سرطان و رفتار بیولوژیک سلول بدست آمده است.

تغییرات ژنتیکی مولکولی در پیش‌بینی نتایج بیماری ارزشمند بوده، همچنین بعضی از این تغییرات ممکن است کمک کننده و راهنمایی برای موارد درمانی جدید باشند (۵).

P53 شایعترین ژنی است که در سرطان‌ها مخصوصاً حفره دهان موتاسیون پیدا می‌کند و یک ژن ساپرس کننده تومور می‌باشد (۶). یکی از هومولوگ‌های P53، P63 است که تولید بیش از اندازه یک نوع از ایزوفرم‌های آن باعث توقف رشد سلول با القاء آپوپتوز شده که مشابه با عمل P53 می‌باشد (۶). نوع دیگری از ایزوفرم‌های P63 هم هستند که ضد P53 عمل کرده و نقش انکوژن و کارسینوژن دارند (۶).

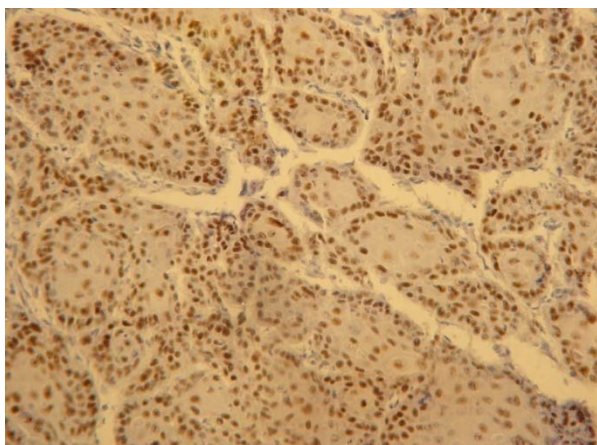
نقش عفونت HPV در سرطان‌های ناحیه anogenital مشخص شده است. عفونت HPV همچنین به عنوان یک ریسک فاکتور (مخصوصاً ساب‌تایپ‌های با ریسک بالای بیماری‌زایی آن مثل HPV16 و HPV18) در سرطان‌های بدخیم دهان و اوروفارنکس به شمار می‌آید (۷). اما در حفره دهان دامنه متغیری بین ۱۰٪-۰٪ برای آن در نظر گرفته شده است (۸). حضور HPV نیز در کارسینوم‌های لوزه کامی و قاعده زبان گزارش شده و عقیده براین است که ژن ایجاد کننده SCC در سرویکس مشابه با ناحیه لوزه و اوروفارنکس بوده، یکی از عللی که HPV در OSCC ناشایع است، را می‌توان به پاک شدن ویروس توسط بزاق در حفره دهان و باقی ماندن و حذف نشدن ویروس در چین‌های لوزه و اوروفارنکس نسبت داد (۹). میان کنش توالی E6 از انواع انکوژنیک با خطر بالا مثل (HPV16,18) سبب تخریب P53 از طریق مسیر پروتئولیز یوبی کوئیتین می‌شوند.

مشخص شده که هدف از تخریب P53، انجام یک عمل مهم برای چرخه زندگی طبیعی ویروس و ایجاد تومور می‌باشد. علاوه بر این E6، فعالیت‌های دیگری نظیر نامیرا کردن یا خصوصیت تغییر شکل دهنده سلول‌ها را برعهده دارد (۱۰،۱۱).

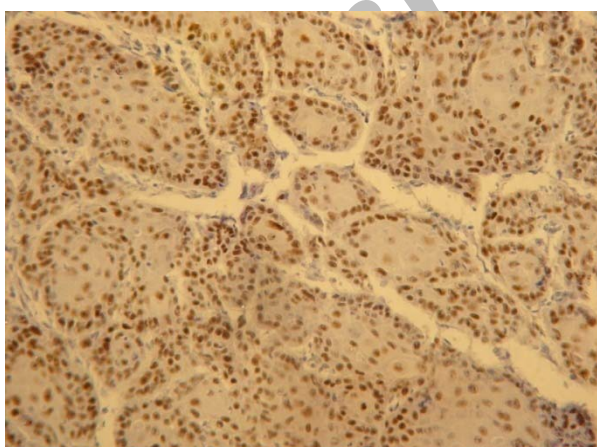
در مورد افزایش بروز مارکرهای P53، P63 و HPV در بدخیمی‌های سر و گردن و رابطه آن با Stage و Grade و

برای بررسی میکروسکوپی نمونه‌های ایمونوهیستوشیمی از میکروسکوپ نوری استفاده شد و مناطقی که رنگ‌پذیری هسته‌ای پیدا کرده بودند، مثبت تلقی شدند. برای محاسبه بروز P63 و P53 یک Total Score که حاصل جمع Intensity Score (کیفیت رنگ‌پذیری) و Proportional Score (کمیت رنگ‌پذیری) بوده، محاسبه شد (۱۲).

شمارش برای به دست آوردن Proportional Score در ۱۰ شان تصادفی (شمارش ۱۰۰۰ سلول با بزرگ‌نمایی ۴۰) توسط ۲ نفر دستیار تخصصی آسیب‌شناسی به صورت double-blind انجام شد (اشکال ۱ تا ۴).



شکل ۱- رنگ‌آمیزی P63 در یک تومور OSCC با stage یک و grade یک (×۲۰)



شکل ۲- رنگ‌آمیزی P53 در یک تومور SCC با stage یک و grade یک (×۲۰)

نمونه‌های ثابت شده در فرمالین ۱۰٪ که در بلوک پارافینی قرار دارند برش‌های ۳ میکرونی تهیه و به مدت یک شب روی لام شیشه‌ای مخصوص poly-L lysine (تهیه شده در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان مفید) قرار داده شدند. سپس، بافت‌ها پس از پارافین‌زدایی توسط گزلیل و آبدهی از الکل مطلق ۹۶ درجه، درون ظرف پلاستیکی حاوی محلول بافر Tris EDTA (pH=۹) رقیق شده به میزان ۱۰/۱ (ساخته شده در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان مفید) قرار داده شدند. سپس، کل ظرف در درون مایکروفر قرار داده شده و پس از ۱۵ دقیقه از مایکروفر خارج و داخل بافر (pH=۷/۲) TBS (ساخته شده در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان مفید) رقیق شده به میزان ۱۰/۱ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. پس از آن، بافت‌ها به اطاقک تاریک و مرطوبی جا به جا شده، روی آنها Dual endogenous enzyme block (شرکت اسکان طب نمایندگی شرکت داکو دانمارک در ایران) به میزان چند قطره در حدی که بافت را بپوشاند ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در فضای تاریک قرار داده شدند.

پس از آن آنتی‌بادی اولیه P53 (Monoclonal Mouse Anti-) (Human, Clone DO-7, Code M7001) (شرکت اسکان طب نمایندگی شرکت داکو دانمارک در ایران) و P63 (Monoclonal Mouse Anti-Human, clone4A4, Code M7247) (شرکت اسکان طب نمایندگی شرکت داکو دانمارک در ایران) بر روی لام‌ها ریخته شد. لام‌ها نیم ساعت در دمای ۳۷°C در اطاق مرطوب تاریک قرار گرفت. سپس، Envision (polymer-HRP) (شرکت اسکان طب نمایندگی شرکت داکو دانمارک در ایران) بر روی لام‌های چیده شده روی سطح صاف با قطره چکان ریخته شده، نیم ساعت در دمای ۳۷°C در اطاق مرطوب تاریک قرار داده شدند. بعد از آن یک یا دو قطره DAB+Chromogen و DAB+dual substrate (شرکت اسکان طب نمایندگی شرکت داکو دانمارک در ایران) روی بافت به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. سپس با آب شستشو داده شده، ۳۰ ثانیه درون هماتوکسیلین و پس از آن درون لیتیم کربنات به میزان ۵ دقیقه رنگ شد. در ادامه با آب شستشو داده شدند. سپس در اتانل ۹۶، ۹۶ به مدت ۵ دقیقه و xylem به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده، در آخر نمونه‌ها مانده شدند (۱۳).

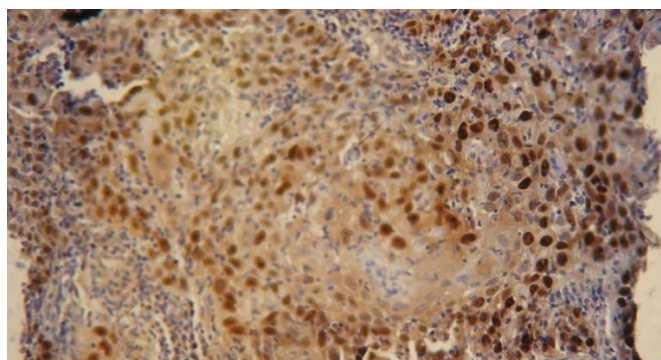
HPV subtype 18 پرایمرهای اختصاصی جلو برنده  
ACTATGGCGCGCTTTGAGGA (Forward') و پرایمر  
- های بازگرداننده به عقب (Reward) -  
GGCTTTCTGGCACCAGCA سفارش داده شده  
به شرکت MWG در آلمان (فرآیند دانش در ایران) مورد  
بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). تنها نمونه‌هایی جهت بررسی  
مورد استفاده قرار گرفتند که حداقل با یکی از این جفت  
پرایمرها Amplification نشان می‌دادند. همچنین در  
این آزمایش از HPV مثبت هم به عنوان کنترل استفاده  
شد (۱۴، ۱۵).

هر چرخه تکثیری شامل یک مرحله تخریب و شکسته شدن  
زنجیره DNA در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد برای یک دقیقه،  
چسبیدن پرایمر در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و  
طویل شدن و تکثیر در دمای ۹۲ درجه سانتیگراد برای یک  
دقیقه بود. نمونه‌ها با چرخه‌های مداوم معمولاً پس از سه یا  
چهار چرخه ۳۰، ۴۰ یا ۵۰ بار عمل PCR را انجام می‌دهند.  
پس از تکثیر قطعه مورد نظر ژل آگارز تهیه شد و DNAهای  
اختصاصی مورد نظر بر اساس وزن مولکولی (Base Pair)  
الکتروفورز شده، روی ژل به سمت جلو حرکت کردند.  
سپس DNAها توسط دستگاه UV مشخص شده، از آنها  
عکسبرداری شد (شکل ۴).

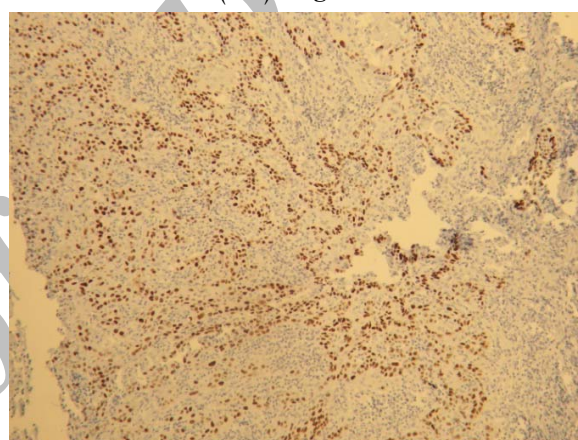
در روش PCR انواع HPV16، HPV18 بررسی شدند و  
حضور آنها در نمونه‌های مختلف بر روی ژل بر اساس  
خوانده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار  
آماري SPSS نسخه ۱۱/۵ و از روش آماری Spearman  
Correlation Test استفاده شد و  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر  
گرفته شد.

#### یافته‌ها

این تحقیق روی ۴۰ بلوک پارافینی موجود در بخش  
آسیب‌شناسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی  
شهید بهشتی و بیمارستان طالقانی متعلق به بیماران مبتلا به  
SCC حفره دهان صورت گرفت. میانگین سن بیماران ۹۳-  
۲۵ سال با میانگین  $58/42 \pm 18/41$  سال بود. ۲۱ مورد از  
بیماران زن (۵۲/۵٪) و ۱۹ مورد (۴۷/۵٪) مرد بودند.  
شایع‌ترین محل ابتلا SCC در داخل دهان در این تحقیق



شکل ۳- رنگ‌آمیزی P63 در یک تومور SCC با stage دو و  
grade سه (×۲۰)



شکل ۴- رنگ‌آمیزی P53 در یک تومور SCC با stage دو و  
grade سه (×۲۰)

Total Score در مورد P53 در بازده ۶-۰ بود و تومورها از  
نظر بروز P53 و P63 به ۳ دسته تقسیم شدند: بروز اندک =  
۰-۲، بروز متوسط = ۳-۴ و بروز شدید = ۴-۶ (۱۳).  
روش PCR به این صورت بود که در ابتدا DNA extraction  
از برش‌های ۵ میکرونی درون میکروتیوب‌های ۱/۵  
میلی‌لیتری توسط بافر لیز کننده Lysis Buffer انجام شد.  
سپس، مواد آلی موجود حذف شدند و DNA باقی‌مانده  
سانتریفیوژ شده، تغلیظ گردید.

DNA استخراج شده از نمونه‌ها، جهت جستجوی  
HPV 16 پرایمرهای اختصاصی جلو برنده  
'ATTAGTGAGTATAGACATTA (Forward) و پرایمر  
- های بازگرداننده به عقب (Reward) -  
GGCTTTTGACAGTTAATACA و جهت جستجو

زبان بود و به دنبال آن کف دهان، لثه و فک پایین و کمترین  
 مکان مخاط رترومولر و مخاط آلوئولر بودند. نمونه‌ها از  
 نظر staging مشابهت داشته، در تقسیم‌بندی در ۳ گروه قرار  
 گرفتند. غالب نمونه‌ها moderately well differentiated یا  
 differentiated بودند (جدول ۲).

جدول ۱- پرایمر های اختصاصی HPV subtypes 16, 18

پرایمر اختصاصی HPV16	
Forward primers	3'-ATTAGTGAGTATAGACATTA-5'
Reward primers	5'-GGCTTTTGACAGTTAATACA-3'
پرایمر اختصاصی HPV18	
Forward primers	3'-ACTATGGCGCGCCTTTGAGGA-5'
Reward primers	5'-GGCTTTCTGGCACCGCAGGCA-3'

جدول ۲- توزیع تومور بر اساس grade و stage

Stage	تعداد	درصد
۱	۱۲	۳۰
۲	۱۴	۳۵
۳	۳	۷/۵
۴	۱۱	۲۷/۵
جمع	۴۰	۱۰۰

grade	تعداد	درصد
well differentiated	۱۹	۴۷/۵
moderately differentiated	۱۶	۴۰
poorly differentiated	۵	۱۲/۵
جمع	۴۰	۱۰۰

جدول ۳- میزان total score در P53 و رابطه آن با stage در OSCC

P53 Total Score	بروز اندک			stage
	بروز متوسط	بروز شدید	جمع	
۷ (٪۵۸/۳)	۵ (٪۴۱/۶)	۰	۱۲	stage 1
۴ (٪۲۸/۵)	۹ (٪۶۴/۲)	۱ (٪۱۷/۱۴)	۱۴	stage 2
۰	۱ (٪۳۳/۳)	۲ (٪۶۶/۶)	۳	stage 3
۲ (٪۱۸/۱)	۳ (٪۲۷/۲)	۶ (٪۵۴/۵)	۱۱	stage 4
۱۳ (٪۳۲/۵)	۱۸ (٪۴۵)	۹ (٪۲۲/۵)	۴۰	جمع

جدول ۴- میزان total score در P53 و رابطه آن با grade در OSCC

Grade	P53 total score		
	بروز اندک	بروز متوسط	بروز شدید
تمایز خوب	۸ (٪۳۸)	۱۱ (٪۵۲/۳)	۲ (٪۹/۵)
تمایز متوسط	۳ (٪۲۱/۴)	۷ (٪۵۰)	۴ (٪۲۸/۵)
تمایز پایین	۲ (٪۴۰)	۰	۳ (٪۶۰)
جمع	۱۳ (٪۳۲/۵)	۱۸ (٪۴۵)	۹ (٪۲۲/۵)

تظاهر بیشتری نشان می‌دهد. این پیش‌فرض با یافته‌های Weber (۲۰۰۲)، Bortoluzzi (۲۰۰۴) و Oliveira (۲۰۰۷) هم مطابقت دارد (۱۲، ۱۴، ۱۵).

Choi و همکاران (۲۰۰۲) هم در تحقیق خود بروز بالای P53 را در OSCC بیشتر از اپیتلیوم دیسپلاستیک مشاهده نمودند ولی رابطه آماری معنی‌داری بین بروز P53 و P63 دیده نشد (۱۶) که با یافته‌های ما مشابه بود. این عدم وجود ارتباط در تحقیق Weber و همکاران (۲۰۰۲) نیز دیده شد (۱۵). این یافته را می‌توان این‌گونه تعبیر کرد که SCC طبیعت هتروژنی در محل‌های مختلف در سر و گردن دارد و اتیولوژی بروز آن در محل‌های مختلف متفاوت است و بروز و فانکشن بیولوژیکی مستقل و متفاوت این مارکرها می‌تواند باعث ایجاد هتروژنیسیته در این سرطان در مناطق مختلف سر و گردن گردد. اما در تحقیق Chen و همکاران (۲۰۰۳) رابطه آماری معنی‌دار بین تظاهر P73 و P53 و P63 با هم در نمونه‌های well differentiated OSCC of buccal mucosa مشاهده گردید (۱۷) که این تفاوت را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که آنها تنها موارد تمایز خوب تومور و مربوط به گونه را بررسی کردند. اما در تحقیق حاضر gradeهای مختلف و محل‌های متفاوت بررسی شده‌اند.

Abbas و همکاران (۲۰۰۶) بین درصد بروز P53 با درجات مختلف دیسپلازی و SCC رابطه آماری معنی‌دار نشان دادند اما میزان بروز آن در gradeهای مختلف SCC معنی‌دار نبود که با یافته‌های ما مغایرت دارد (۱۸). این تناقض را شاید بتوان به حجم نمونه کم (۲۱ نمونه) OSCC در بررسی مذکور مربوط دانست. همچنین Matsha و همکاران (۲۰۰۷) نیز رابطه آماری معنی‌داری بین grade بیماری و رنگ‌پذیری P53 پیدا نکردند (۲۳). این تناقض هم می‌تواند به این دلیل باشد که آنها ۸۰ نمونه در SCC مری را بررسی نمودند و مقالات مختلف ثابت کرده‌اند که مارکرهای دخیل در SCC در مناطق مختلف بروز متفاوتی دارند. اما Kozomara و همکاران (۲۰۰۵) رابطه آماری معنی‌داری را بین nuclear grading بیماری و موتاسیون در P53 دیدند که با یافته‌های ما مطابقت دارد (۸).

در تحقیق Lo Muzio و همکاران در سال (۲۰۰۷ و ۲۰۰۵) هم مشابه با تحقیق ما نشان داده شد که P63 رابطه آماری

فراوانی کلی P53 در ۴۰ نمونه به طور متوسط  $25/66\% \pm$   $33/04\%$  (CI= $24/94-41/14$ ) و فراوانی کلی P63 در ۴۰ نمونه به طور متوسط  $39/25\% \pm$   $19/35\%$  (CI= $33/13-45/37$ ) بود. در نمودار ۱ تعداد هر نمونه در stage و grade مربوطه ذکر شده است. رابطه‌ای معنی‌دار ( $P < 0/01$ ) بین دو متغیر P53 proportional score و Stage بیماری دیده شد (P<0/05). همچنین، P53 total score هم با Stage و Grade بیماری رابطه آماری معنی‌دار نشان داد (به ترتیب  $P=0/001$  و  $P=0/013$ ) (جدول ۳ و ۴). P63 رابطه آماری معنی‌داری را با هیچ یک از متغیرها نشان نداد. فاصله اطمینان P63 proportional score در stage 1 برابر  $25/95-44/01$ ، در stage 2 برابر  $31-53/84$ ، در stage 3 برابر  $30/09-62/97$  و در stage 4 برابر  $41/73-51/38$  بود. فاصله اطمینان P63 proportional score در grade 1 برابر  $27/27-41/51$ ، در grade 2 برابر  $28/59-50/67$  و در grade 3 برابر  $42/24-75$  بود. بروز P53 هم رابطه آماری معنی‌داری را با بروز P63 نشان نداد ( $P=0/916$ ).

یافته‌های تحقیق حاضر در مورد حضور ژنوم HPV در بیماران به این صورت بود که ژنوم HPV16 در ۸ نمونه از ۴۰ نمونه (۲۰٪) مشاهده گردید و حضور ژنوم HPV18 در ۳ نمونه (۷/۵٪) دیده شد. در کل فراوانی حضور ویروس در ۴۰ نمونه ۴۰٪ بود (۱۰/۴۰). تعداد موارد حضور مثبت HPV18 با افزایش grade میکروسکوپی افزایش پیدا کرد و این رابطه از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P=0/011$ ). همین‌طور، حضور HPV16 با میزان بروز P53 رابطه آماری معنی‌دار نشان داد ( $P=0/003$ ). اما حضور این دو ژنوم با هیچ متغیر دیگری رابطه آماری معنی‌دار نشان نداد. هیچ یک از متغیرها با سن رابطه آماری معنی‌داری نشان ندادند.

## بحث

در مطالعه حاضر سعی شده است بروز و رابطه مارکرهای P53 و P63 با هم و با حضور آلودگی با HPV و تاثیر آن در stage و grade کارسینوم سلول سنگفرشی در دهان به روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و PCR بررسی شوند. یافته‌های بدست آمده در مورد میزان بروز مارکر P53 با پیش فرض ما هماهنگی دارد. این مارکر در stage بالاتر

سیگار و وضعیت بهداشت دهان را هم مورد بررسی قرار داده و ماندگاری بیماری را نیز ارزیابی نموده که در تحقیق ما مورد بررسی قرار نگرفته و اطلاعات کافی از بیماران در دسترس نبود. این تفاوت در یافته‌ها با تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل محل متفاوت ایجاد بیماری باشد.

در تحقیق Matsha (۲۰۰۷)، ۱۱۴ بیمار مبتلا به SCC مری بررسی شده و حضور ویروس در ۶۶٪ نمونه‌ها با استفاده از روش PCR مشاهده شد. ویروس رابطه آماری معنی‌داری را با grade بیماری نشان نداد (۲۹) که این تفاوت در یافته‌ها با تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل محل متفاوت ایجاد بیماری باشد.

Scapli (۲۰۰۸) حضور High risk type of HPV را در ۳۱۴ نمونه بزرگ و گرید پایین OSCC به روش RT-PCR بررسی نمود و نشان داد که شیوع High risk type of HPV به میزان ۲٪ بوده و HPV نقشی در اتیولوژی OSCC ندارد (۳۱). روش انجام پذیرفته در تحقیق ما PCR بود و حجم نمونه ۴۰ عدد بلوک پارافینی بود و ساینز ضایعات در نظر گرفته نشده بود که اینها خود باعث تفاوت در نتایج می‌شوند.

در تحقیق Acay (۲۰۰۸) و همکاران از ۵۰ بلوک پارافینی استفاده کرده و ویروس را به روش ISH بررسی نمودند و مشاهده کردند که فراوانی انواع High risk HPV بیشتر بوده و در کارسینوم‌نژیوس OSCC نقش دارد (۳۲) که این یافته‌ها با یافته‌های تحقیق حاضر مشابه است. همچنین، Anaya (۲۰۰۸) نشان داد که High risk HPV در ایجاد OSCC موثر بوده و نقش اتیولوژیک دارد (۳۳).

تا به امروز در هیچ تحقیقی رابطه P63 و عفونت HPV و نقش آن در Stage و Grade بیماری OSCC بررسی نشده است. در تحقیق ما هم رابطه آماری معنی‌داری بین بروز P63 و حضور ویروس دیده نشد.

در نهایت تحقیقات بیشتر و جامع‌تر و با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته‌تر در این زمینه لازم به نظر می‌رسد.

### نتیجه گیری

از بررسی یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که P63 فاکتور قابل اعتمادی برای تعیین گرید

معنی‌داری با سن جنس و staging نداشته ولی رابطه آن با grade میکروسکوپی و پیش‌آگهی ضعیف بیماری معنی‌دار است (۲۰). Bortoluzzi و همکاران (۲۰۰۴) و Foschini و همکاران (۲۰۰۴) هم رابطه آماری معنی‌داری بین بروز P63 و grade بیماری مشاهده کردند. همچنین، این یافته در تحقیقات Quade (۲۰۰۱) و Hall (۲۰۰۰) هم مشاهده شد (۲۲)، (۲۱).

تحقیق ما با یافته‌های Reis-Filho (۲۰۰۲) که ۱۳ نمونه SCC را بررسی نموده و رابطه آماری معنی‌داری بین تظاهر P63 و grade مشاهده نمودند، مغایرت داشت و این تفاوت را می‌توان به تعداد کم نمونه در این تحقیق مرتبط دانست (۲۷).

در مورد حضور HPV در OSCC تحقیقات مختلفی انجام گرفته و مخصوصاً در سال‌های اخیر توجه بسیاری به آن شده و رابطه آن با سایر عوامل اتیولوژیک ایجاد کننده بیماری و محل ایجاد بیماری مورد بررسی قرار گرفته است.

در تحقیق حاضر نیز، دو ژنوم HPV16 و HPV18 که در مقالات مختلف ثابت شده ریسک بالایی در ایجاد بیماری‌زایی دارند و حضور آنها در کنسرهای دهانی دامنه‌ای بین (۱۰-۱۰۰٪) دارد (۵، ۲۴، ۲۵)، در نظر گرفته شده است. در تحقیق Kozomara (۲۰۰۵) از ۵۰ بیمار مبتلا به OSCC زبان و کف دهان استفاده شد که بیماران در Stage ۲ و غالباً ۳ بودند و از نظر Staging برخلاف تحقیق ما هماهنگ‌سازی انجام نشده بود. بیماران براساس مصرف الکل و سیگار و بهداشت دهانشان هم طبقه‌بندی شدند و دیده شد که نمونه‌های مثبت HPV16 درصد زیادی را تشکیل می‌داد (۳۹٪)، اما حضور ویروس رابطه آماری معنی‌داری را با بروز P53 نشان نداد ولی در مواردی که هم موتاسیون در P53 و هم عفونت با ویروس دیده شد ماندگاری بیماری کاهش پیدا کرد (۸). مغایرت بین یافته‌های ما و این تحقیق را می‌توان در روش‌های مختلف بررسی بروز P53 دانست که در تحقیق ما موتاسیون بررسی نشد و صرفاً بروز P53 به روش IHC بررسی شد و همین‌طور نمونه‌های با تعداد متفاوت و محل آناتومیکی متفاوت (۲۶-۲۸) و اپیدمیولوژیکی مختلف (۴۰، ۴۱) و منطقه جغرافیایی متفاوت هم در نتیجه‌گیری متفاوت دخیل هستند. این تحقیق تاثیر مصرف

تکیه بر این یافته‌هاست که می‌توان به راه کارهای درمانی مثلاً ساخت واکسن بر علیه انواع High risk HPV رسید.

### تشکر و قدردانی

بخش آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات عفونی اطفال بیمارستان کودکان مفید، خانم نویدی، خانم شمشیری و آقای ملکان، بخش آسیب‌شناسی عمومی بیمارستان طالقانی.

میکروسکوپی است و می‌تواند به عنوان فاکتور موثر تشخیصی و پروگنوستیک کمک کننده باشد. همچنین، حضور بالاتر P53 در مراحل پیشرفته‌تر بیماری نشان‌دهنده تاثیر این مارکر در پیشرفت بیماری است. همچنین، موتاسیون و غیرفعال شدن P53 و آلودگی با HPV خصوصاً انواع (High risk: HPV16, HPV18)، فاکتورهای اتیولوژیک موثری در ایجاد و پیشرفت OSCC هستند و با

### References

1. Neville B, Damm D, Allen M, Baugot J: Oral and Maxillofacial pathology. 3rd Ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2009;Chap10:365-366.
2. Pintos JJ, Black M, Sadeghi N: Human papillomavirus infection and oral cancer: A case-control study in Montreal, Canada. J Oral Oncol 2008;44:242-250.
3. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan R: Clinical pathologic correlation. 5th Ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2008; Chap2:52-56.
4. Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST: Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity. J Craniofac Surg 2008;19:1699-1702. [Persian]
5. Ernest J, Stoter R, Bloemena E: The importance of EGFR in squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radio therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;65:1332-1329.
6. Chen YK, Huse SS, Lin LM: Differential expression of P53-P63 and P73 Proteins in human buccal squamous cell carcinomas. Clin Otolaryngol 2003;28:451-455.
7. Hausen HZ: Human papillomavirus and cancer from base is studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002; 2:342-350.
8. Kozomara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic M, Minc V: P53 mutations and human papilloma virus infection in oral cell carcinomas : correlation with overall survival. J Cranio-Maxillofacial Surg 2005;33:342-348.
9. Campisi G, Giovannelli MB: Controversies surrounding HPV infection of the head and neck vs. oral cancer, implication for prophylaxis and treatment. Head and Neck Oncol 2009;1:80-86.
10. Scand J: Human papillomavirus involvement in Eosophageal precancerous lesions and squamous cell carcinomas as evidenced by microscopy and different DNA techniques. J Gastroenterol 1992;27:553-563.
11. Lowen L: MIC128C perspectives in general microbiology. J Microb1999;2:312-317.
12. Oliveria LR, Riberio-Silve A, Zucoloto S: Prognostic impact of P53 and P63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol and Med 2007;36:191-197.
13. Key M: Immunohistochemical staining methods. 4th Ed. Dako, Denmark Co. 2006;Chap7:50-51.
14. Bortoluzzi M, Yurgel LS, Dekker N, Regezi JA: Assessment of P63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod 2004;98:698-704.
15. Weber A, Bellmann U, Bootz F, Tannapfel A: Expression of p53 and it's homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer 2002;99:22-28.



16. Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA: Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumorigenesis* 2002;33:158-164.
17. Chen X, Sturgis EM, Naggar AK, Wei Q, Guojun LI: Combined effects of the p53 codon 72 and p73 G4C14 to A4T14 polymorphisms on the risk of HPV16 associated oral cancer in nerve smokers. *Carcinogenesis* 2008;29:2120-2125.
18. Abbas NF, Labib EIS, Abbas EA, Abdel Monem M: Immunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and pre neoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:385-390.
19. Matsha T, Donninger H, Erasmus RT, Parker MI: Expression of P53 and its homolog, P73 in HPV DNA positive oesophageal squamous cell carcinoma. *Virology* 2007;369:182-190.
20. Muzio L, Santarelli A, Caltabiaco R: P63 over expression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Pathol* 2005;36:187-194.
21. Hall PA, Campbell SJ, O'Neill M: Expression of the p53 homologue p63 alpha and deltanp63alpha in normal and neoplastic cells. *Carcinogenesis* 2000;21:153-160.
22. Quade BJ, Yang A, Wang Y: Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001;80:24-29.
23. Reis-Filho JS, Torio B, Albergaria A: P63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *J Cutan Pathol* 2002;29:517-523.
24. Brandwein M, Zeitlin J, Nuovo GJ, MacConnell P, Bodian C: HPV detection using hot start polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. *Med Pathol* 1994;7:720-727.
25. Ryerson AB, Peters ES, Coughlin SS, Chen VW, Gillison ML, Wu X, et al: Burden of potentially human papilloma virus associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US1998-2003. *Laryngoscope* 2000; 109:351-456.
26. Correnti M, Rivera H, Cavazza ME: Detection of humanpapillomavirus of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Dis* 2004;10:163-166.
27. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD: Age dependence of human papilloma virus DNA presence in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32:55-62.
28. Correnti M, Rivera H, Cavazza ME: Detection of humanpapillomavirus of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Dis* 2004;10:163-166.
29. Rivero ERC, Nunes FD: HPV in oral squamous cell carcinomas of Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res* 2006;20:21-24.
30. Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P: Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2005;34:62-64.
31. Scapoli L, Palmieri A, Rubini C, Martineilli M, Spinelli G, Ionna F, Carinici F: Low prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma limited to oral cavity proper. *J Oral Pathol Med* 2001;23:42-45.
32. Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad F, Nunes S: Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. *Int J Cancer* 2008;23:271-274.
33. Anaya-Savedraa G, Ramirez V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia CM, Mendez R: High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res* 2008;39:189-197.