مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۰، شماره ۱، بهار ۱۳۸۷، ۲۲-۲۹

بررسی مقایسه ای رنگ پذیری پروتئین p53 و آنتی ژن Ki67 در لکوپلاکیای هموژن و غیرهموژن

دکتر فهیمه بقایی[۱]- دکتر شهرزاد ادهمی[۲] - دکتر شهلا کاکویی[۳] - دکتر محمدرضا زارعی[۴]

۱- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان.

۲- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان.

۳- استادیار گروه آموزشی بیماریهای دهان و تشخیص دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان.

۴- دانشیار گروه آموزشی بیماریهای دهان و تشخیص دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان.

چکیده

زمینه و هدف: *لکوپلاکیا شایعترین ضایعه پیش بدخیم مخاط دهان است و توان تغییر بدخیمی آن غیرقابل پیش‌بینی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی رنگ پذیری پروتئین p53 در ارتباط با وضعیت پرولیفراسیون (آنتی ژن Ki67)در مخاط دهانی نرمال، لکوپلاکیای هموژن و لکوپلاکیای غیرهموژن می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی، از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با روش استاندارد Biotin Streptavidin peroxidase استفاده شد تا رنگ‌پذیری پروتئین p53 و آنتی‌ژن Ki67 روی بلوک‌های پارافینی هفت مورد لکوپلاکیای هموژن، ده مورد لکوپلاکیای غیرهموژن و نُه مورد مخاط نرمال دهان مورد بررسی قرار گیرد. اطلاعات به دست آمده توسط آزمونهای ANOVA , Fisher exact test و McNemar تجزیه و تحلیل گردید.*

یافته‌ها: *هیچ ارتباطی بین میزان و شدت رنگ‌پذیری پروتئین p53 و آنتی‌ژن Ki67 با نمای بالینی لکوپلاکیا دیده نشد. اما الگوی انتشار آنها در لکوپلاکیا عمدتاً در لایه‌های بازال و سوپربازال و در اپی تلیوم نرمال عمدتاً بازال بود. میانگین سلول‌های مثبت برای Ki67 در ضایعات دیسپلاستیک نسبت به غیردیسپلاستیک بالاتر بود. همچنین رابطه معنی‌داری بین میزان و شدت رنگ‌پذیری p53 و Ki67 در ضایعات تحت بررسی مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *این یافته‌ها نشان می‌دهند که افزایش سوپر بازال p53 و Ki67 در اپی تلیوم لکوپلاکیا می‌تواند نشان‌دهنده پروگنوز بالینی ضعیف باشد و افزایش بروز p53 ممکن است شروع کننده پرولیفراسیون سلولی باشد.*

کلید واژه‌ها: *لکوپلاکیای دهانی – ایمونوهیستوشیمی – پروتئین p53 – آنتی‌ژن K67 – رنگ‌پذیری.*

وصول مقاله: ۱۳۸۶/۶/۱۴ اصلاح نهایی: ۱۳۸۶/۱۱/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۲/۱۴

نویسنده مسئول: گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان e.mail:sh_adhami@kmu.ac.ir

مقدمه

لکوپلاکیا شایعترین ضایعه پیش سرطانی مخاط دهان است و بر اساس تعریف WHO به پلاک یا لکه‌های سفید رنگی اطلاق می‌شود که از نظر هیستوپاتولوژیک و بالینی نتوان آنرا به هیچ بیماری دیگری که منجر به ضایعات سفید در دهان شود، نسبت داد.(۱)

لکوپلاکیا نماهای بالینی متنوعی دارد و ممکن است با گذشت زمان دستخوش تغییراتی گردد. ضایعات اولیه به صورت پلاک‌های برجسته سفید خاکستری با سطح صاف هستند که ممکن است پیشرفت کرده، پلاک‌های ضخیمتر و شیارداری را ایجاد کنند که لکوپلاکیای هموژن نامیده می‌شود.(۱) با گذشت زمان، بعضی از ضایعات، نمای نامنظمتری پیدا کرده و دارای برجستگیهای سطحی می‌شوند و با پیشرفت بیماری، نواحی قرمز رنگی در سطح ضایعه ظاهر می‌شود که نمایانگر الگویی از لکوپلاکیاست که سلول‌های اپی‌تلیالی آن به قدری نابالغ هستند که دیگر قادر به ساختن کراتین نمی‌باشند. به این نوع لکوپلاکیا، لکوپلاکیای غیرهموژن گفته

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود.(۱)
اگرچه لکوپلاکیا دارای نمای هیستوپاتولوژیک اختصاصی نیست ولی به عنوان یک ضایعه پیش بدخیم در نظر گرفته می‌شود که عمدتاً مردان بالای چهل سال را مبتلا می‌کند و شیوع آن با بالارفتن سن، افزایش می‌یابد.(۱)
نمای بالینی راهنمای دقیقی برای پیشگویی احتمال تغییرات بدخیمی در لکوپلاکیا محسوب نمی‌شود. به عبارت دیگر، لکوپلاکیا ممکن است بدون اینکه دچار تغییرات کلینیکی شود، دیسپلاستیک و یا حتی دچار تغییرات کارسینوماتو گردد.(۱)
تجمع تغییرات ملکولی و ژنتیکی می‌توانند تغییرات فنوتیپیکی را آغاز کنند که از نظر هیستولوژیک در بافتها مشاهده می‌شود.(۲)، این تغییرات ممکن است با اختلال در تنظیم پرولیفراسیون و تمایز سلولی همراه باشند وp53 وKi67 ملکول‌های پروتئینی مهمی در این رابطه می‌باشند. ملکول p53 در هسته قرار دارد و ژن مولد آن بر روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۷ قرار دارد. این ژن یک فسفوپروتئین هسته‌ای را کد می‌کند که نقش مهمی در تنظیم پرولیفراسیون سلولی ازطریق فعال کردن آپوپتوز بر عهده دارد. پروتئین p53 در بافتهای طبیعی عمر کوتاهی داشته و نمی‌توان با تکنیک ایمنوهیستوشیمی آن را نشان داد اما این پروتئین به دلایل مختلفی نظیر موتاسیون به مدت طولانی در بافت باقی می‌ماند. بنابراین افزایش تظاهر p53 می‌تواند نشانه غیرفعال بودن فرایند آپوپتوز باشد.(۳)
موتاسیون در ژن p53 در بیش از ۷۰٪ از سرطانهای انسانی، مبین اهمیت این ژن در سرطان زایی است.(۳)
آنتی‌ژنKi67 یک مارکر اختصاصی سلول‌های درحال تزاید است که در مراحل G_1، S، G_2, M تظاهر می‌یابد و به عنوان یک عامل دلتا پلیمراز درطول فاز سنتز DNA سیکل سلولی عمل می‌کند. اما در سلول‌های درحال استراحت بروز نمی‌کند. بنابراین،Ki67 یک مارکر پرولیفراسیون سلولی است.(۲)
Tokmanوهمکارانش در تحقیقی که درسال ۲۰۰۴ بر روی اسکواموس سل کارسینوماهای(SCC)دهانی انجام دادند، مشاهده کردند که مثبت بودن p53 نقش پیش‌بینی کننده مهمی در پیش آگهی SCC دارد.(۴)
در مطالعه دیگری که توسط Santos در سال ۲۰۰۵ انجام شد، با افزایش شدت دیسپلازی و کاهش تمایز سلول‌ها، افزایش تظاهر p53 نیز مشاهده گردید.(۵)
همچنین در مطالعه‌ای که Kurokawa در سال۲۰۰۳ در زمینه تظاهرP53, Ki67 در لکوپلاکیا انجام داد مشاهده کرد که رنگ‌پذیریp53 وKi67 در لکوپلاکیا به میزان قابل توجهی از مخاط نرمال بیشتر است، اما تفاوت معنی‌داری بین میزان رنگ‌پذیری و محل یا نوع لکوپلاکیا دیده نشد.(۲)
با توجه به اینکه مطالعات انجام شده بر روی ارتباط رنگ‌پذیری پروتئین‌های p53 وKi67 و نمای بالینی لکوپلاکیا بسیار اندک بوده و نتایج متفاوتی را به همراه داشته است. هدف از این مطالعه استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی (رنگ‌پذیری مارکرهای p53 وki67) جهت مطالعه لکوپلاکیای هموژن وغیرهموژن و همچنین بررسی رابطه بین مارکرهای فوق (افزایش بروزp53 و مهار آپوپتوز با افزایش قابلیت تکثیر سلولی) در این ضایعات می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی بوده و بر روی بلوک‌های پارافینی کلیه نمونه‌های لکوپلاکیای هموژن و غیرهموژن موجود در بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی انجام گرفت که معادل هفت لکوپلاکیای هموژن و ده لکوپلاکیای غیرهموژن و نه کنترل می‌باشد که این تعداد بر اساس نمونه‌های قابل استفاده موجود در بخش بوده و از نظر تعداد نمونه‌ها تقریباً مشابه سایر مطالعات انجام شده در این رابطه می‌باشد. نمونه‌هایی وارد مطالعه شدند که بافت اپی‌تلیالی کافی و مناسبی داشتند و بلوک سالم آنها در فایل موجود بود و در صورت عدم مشاهده بافت اپی‌تلیالی یا بلوک بافتی نامناسب از مطالعه خارج می‌شدند. برای گروه کنترل نیز، مشابه سایر مطالعات از اپی تلیوم سالم سطح ضایعاتی ازقبیل فیبروم تحریکی استفاده گردید.
برای تشخیص وجود پروتئین Ki67 و p53 در بافتها از تکنیک ایمنوهیستوشیمی با روش Biotin Streptavidin peroxidase استفاده شد.
از آنتی بادی منوکلونال p53 کلون DO7 با شماره سریال ۸۰۳۱۱۵ با منشا موش برای رنگ آمیزی p53 و از

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی بادی منوکلونال Ki67 کلون MM1 با شماره سریال ۸۰۱۷۰۹ با منشا موش ساخت شرکت Novocastra و آنتی بادی ثانویه Novocastra post primary blockRE7111 استفاده گردید و NovolinkRE7112 به عنوان یک پل رابط بین ماده کروموژن DAB و آنتی بادی به کارگرفته شد. مراحل اصلی تکنیک به شرح زیر انجام شد:

ابتدا از هرکدام از بلوک‌های پارافینی برشهایی به ضخامت چهار میکرون تهیه گردید و سپس در دمای شصت درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند و سه تغییر گزیلول به منظور پارافین زدایی و پنج تغییر الکل به منظور دهیدراتاسیون تا آب مقطر را طی کردند. در مرحله بعد نمونه‌ها در محلول بافر سیترات قرار گرفتند، سپس به مدت بیست دقیقه در دمای اتاق سرد شدند. بعد از این مرحله نمونه‌ها به محلول PBS منتقل شده و به مدت پنج دقیقه در هیدروژن پراکساید ۳٪ جهت بلوک شدن فعالیت پراکساید از اندوژن انکوبه گردیدند. به منظور جلوگیری از رنگ‌آمیزی کاذب در زمینه از محلول سوپربلاک به مدت پنج دقیقه استفاده شد. پس از آن به مدت ده دقیقه توسط تریپسین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و به مدت ده دقیقه در محلول آنتی بادی منوکلونال (p53 یا Ki67) قرار گرفتند و سپس در محلول Link که یک آنتی بادی بر علیه آنتی بادی اولیه است، درمدت ده دقیقه انکوبه گردیدند و پس از آن در محلول Avidinbiotin (به مدت ده دقیقه) قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌ها در کروموژن DAB انکوبه شدند. در این مرحله آنتی‌ژن مورد نظر در صورتی که در بافت وجود داشته باشد، به رنگ قهوه ای مشاهده خواهد شد. در فواصل تمام مراحل فوق از محلول PBS جهت شستشوی لام ها استفاده گردید.

بعد از انجام مراحل ایمنوهیستوشیمی، نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین مایر رنگ‌آمیزی و لام‌ها طبق معیارهای تعیین شده بررسی شدند.

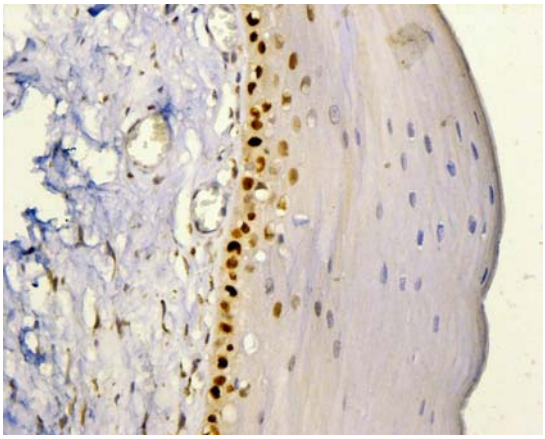
شدت رنگ پذیری (ضعیف، متوسط و شدید)، محل انتشار(بازال و سوپرابازال) و همچنین میانگین سلول‌های مثبت در سه میدان میکروسکوپی (۴۰۰×) در ضایعات مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت. علت انتخاب متوسط سه میدان میکروسکوپی این بود که به دلیل کوچک بودن مقاطع اپی‌تلیالی بیوپسی‌ها که عمدتاً انسیزنال بودند، بررسی تقریباً تمامی ناحیه رنگ گرفته در سه تا چهار میدان امکان پذیر بود که برای نمونه‌های بزرگتر میانگین چهار میدان محاسبه شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات و ورود آنها به برنامه SPSS (با در نظرگرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و $\alpha = ۰/۰۵$) با استفاده از آزمون Fisher exact test ارتباطات بررسی و از تست آماری ANOVA یک راهه برای ارزیابی تفاوت میانگین سلول‌های رنگ گرفته (درلکوپلاکیای هموژن، غیرهموژن و کنترل و همچنین نمونه های دیسپلاستیک و غیردیسپلاستیک) و برای تعیین ارتباط بین دو مارکر از تست Mc Nemar استفاده شد.

یافته‌ها

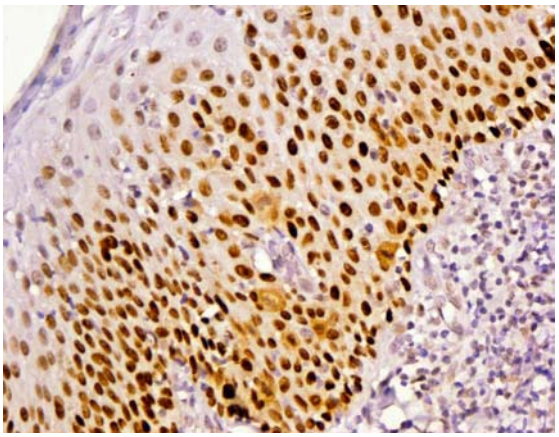
از۲۶ نمونه مورد مطالعه، ده مورد لکوپلاکیای غیرهموژن و هفت مورد لکوپلاکیای هموژن بودند و نُه مورد در گروه کنترل قرار داشتند. میانگین سن در گروه غیر هموژن ۱۴/۴ ± ۴۸/۹، در گروه هموژن ۱۰/۹± ۴۹/۴ و در گروه کنترل ۱۲/۴ ± ۴۳/۹ بود که در این هر سه گروه تفاوت آماری معنی‌داری از نظر سن دیده نشد. در گروه غیرهموژن (هفت نفر) ، گروه هموژن ۴۲/۹٪ معادل سه نفر و در گروه کنترل ۴۴/۴ برابر چهار نفر مرد و بقیه زن بودند. محل نمونه‌ها در ۱۹ مورد گونه، چهار مورد لثه، یک مورد ریج بی‌دندانی، یک مورد کف دهان و یک مورد در زبان بود. در گروه غیرهموژن ۵۰٪ معادل پنج نفر و در گروه هموژن ۸۵/۷ برابر شش نفر عاداتی از قبیل کشیدن سیگار و قلیان داشتند. از ده نمونه لکوپلاکیای غیرهموژن، هفت مورد دیسپلاستیک و از هفت مورد لکوپلاکیای هموژن فقط دو مورد دیسپلاستیک بودند. تقریباً تمامی نمونه‌ها (به جز یک مورد) رنگ پذیری p53 و Ki67 را نشان دادند.

رنگ پذیری سوپرابازال برای پروتئین p53 و آنتی‌ژن Ki67 در گروه هموژن بیش از گروه کنترل بود، اما فقط در مورد Ki67 این تفاوت معنی‌دار بود.($p=۰/۰۱$) همچنین دراین مقایسه (رنگ‌پذیری سوپرابازال p53 و Ki67)، بین گروه غیرهموژن و کنترل تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده گردید. ($p=۰/۰۵$ و $p=۰/۰۰۳$) اما میزان رنگ پذیری سوپرابازال در نمونه‌های هموژن و غیرهموژن تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. نهایتاً میزان رنگ پذیری سوپرابازال p53 (شکل۱) و Ki67 (شکل۲) در کلیه نمونه‌های

Archive of SID
www.SID.ir

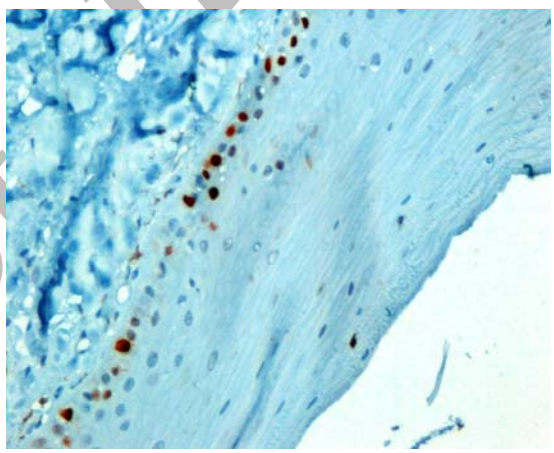


شکل ۱: الف

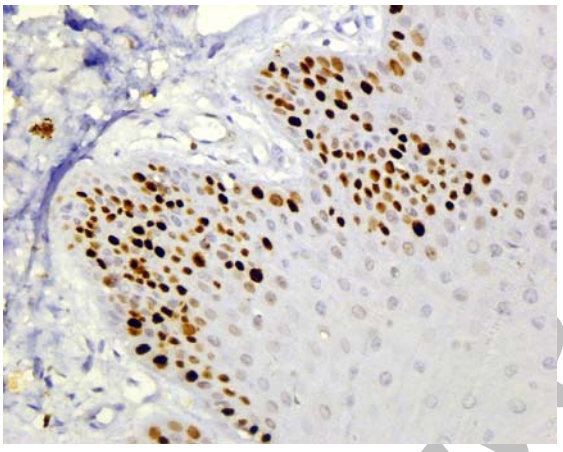


شکل ۱: ب

الف: رنگ‌پذیری ناحیه بازال پروتئین p53 در گروه کنترل
ب: رنگ‌پذیری سوپرا بازال پروتئین p53 در لکوپلاکیای غیرهموژن



شکل ۲: الف



شکل ۲: ب

الف: رنگ‌پذیری ناحیه بازال آنتی‌ژن Ki67 در گروه کنترل
ب: رنگ‌پذیری سوپرابازال پروتئین Ki67 در لکوپلاکیای هموژن

لکوپلاکیا (اعم از هموژن و غیرهموژن) با گروه کنترل مقایسه گردید که در هر دو مورد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده شد به گونه‌ای که درصد رنگ پذیری سوپرابازال در لکوپلاکیا از گروه کنترل بالاتر بود. (جدول۱)

شدت پذیریp53 وKi67 درلکوپلاکیا ی هموژن وغیرهموژن و گروه کنترل یکسان بود.

میانگین تعداد سلول‌های رنگ گرفته برای پروتئینp53 و Ki67 در سه گروه (هموژن ، غیرهموژن و کنترل) اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد که برای p53 وKi67 به ترتیب در گروه غیرهموژن ۷۷/۴ و۴۶/۲ در گروه هموژن ۵۳/۹ و۶۴/۷ و در گروه کنترل ۴۹/۹ و۵۳ بود.

تعداد سلول‌های مثبت برای آنتی‌ژن Ki67 در لکوپلاکیای دیسپلاستیک (۱۴/۳± ۷۴) به طور معنی‌داری از غیر دیسپلاستیک (۱۵/۵± ۳۴/۶) بالاتر بود. (p=۰/۰۰۲)

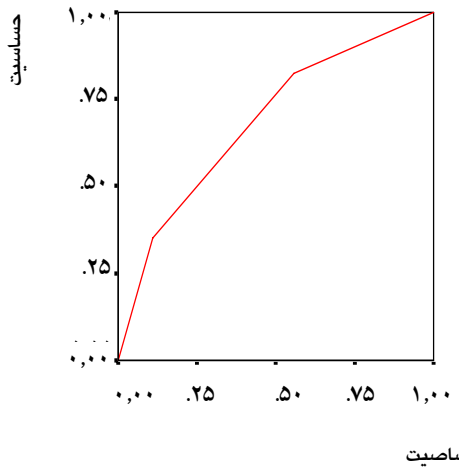
سطح زیر سطح منحنیROC درمورد p53 از نظر تعداد سلول‌های رنگ گرفته در لکوپلاکیا نسبت به بافت سالم در نمودار ۱ نشان داده شده است. میزان توافق بین محل رنگ پذیری سوپرا بازال برای پروتئینp53 وKi67 در کلیه نمونه‌ها با استفاده از ضریب کاپا، توافق ۰/۷۱ را نشان داد.

ضریب همبستگی شدت رنگ پذیری در دو مارکر با استفاده از ضرایب همبستگی Spearman، ۰/۳۹ و ضریب همبستگی Pearson بین تعداد سلول های مثبت در دو روش ۰/۴۲ بود.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه محل رنگ پذیری p53 و Ki67 در نمونه های لکوپلاکیاو مخاط دهانی نرمال

متغیرها	گروه	لکوپلاکیا		نرمال		نتیجه آزمون Fisher exact
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
P53	رنگ پذیری بازال	۲	۱۲/۵	۶	۶۶/۷	P = ۰/۰۱
	رنگ پذیری سوپرابازال	۱۴	۸۷/۵	۳	۳۳/۳	
Ki67	رنگ پذیری بازال	۱	۶/۳	۶	۶۶/۷	P = ۰/۰۰۳
	رنگ پذیری سوپرابازال	۱۵	۹۳/۸	۳	۳۳/۳	



نمودار ۱: سطح زیر منحنی ROC برای تشخیص لکوپلاکیا در مقابل بافت سالم با استفاده از تعداد سلول های مثبت در رنگ آمیزی p53

بحث

تا کنون مطالعات کمی ارتباط بین نمای بالینی لکوپلاکیا با پروتئین p53 و آنتی‌ژن Ki67 را بررسی کرده‌اند. در این مطالعه رابطه آماری معنی‌داری بین شدت و میزان رنگ پذیری p53 و Ki67 با نمای کلینیکی لکوپلاکیا مشاهده نگردید، اما ارتباط مثبتی بین میزان و شدت رنگ پذیری p53 و Ki67 مشاهده شد.

در مطالعه‌ای که توسط Kikegawa در سال ۲۰۰۱ در ژاپن برای بررسی ارتباط p53 با پیش آگهی لکوپلاکیا انجام گرفت، ارتباط مستقیمی بین بروز p53 و ویژگیهای بالینی لکوپلاکیا از نظر آماری دیده شد و تغییرات بدخیمی بیشتر در لکوپلاکیاهایی مشاهده شد که رنگ پذیری p53 را نشان دادند.(۶)، اما در مطالعه حاضر، میزان رنگ پذیری p53 در لکوپلاکیای هموژن و غیرهموژن یکسان بود.

zhao XY در سال ۲۰۰۵ طی مطالعه‌ای دریافت که رنگ پذیری p53 در ۳۱/۷ ٪ از نمونه‌های لکوپلاکیا و ۶۰٪ از نمونه‌های SCC مخاط دهان مثبت است.p53 در هیچ یک از نمونه‌های مخاط سالم دهان که به عنوان گروه شاهد دراین مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، مشاهده نشد. براساس نتایج این مطالعه p53 می‌تواند به عنوان یک مارکر ملکولی در کارسینوژنز اپی تلیوم دهان استفاده شود.(۷) اما نتایج حاصله از مطالعه متفاوت بود و رنگ پذیری p53 در مخاط سالم دهان نیز مشاهده گردید و شدت و میزان آن با اپی‌تلیوم لکوپلاکیا تفاوت معنی‌داری نداشت. علت این وضعیت ممکن است حجم کم نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه Takeda در سال ۲۰۰۶، افزایش سوپرابازال Ki67 نسبت به اپی‌تلیوم نرمال و همچنین افزایش میانگین تعداد سلول‌های مثبت در اپی‌تلیوم لکوپلاکیا نسبت به مخاط نرمال مشاهده گردید.(۸)، همچنین نتایج تحقیق Kurokawa درسال ۲۰۰۳ نشان داد که رنگ‌پذیری P53 و Ki67 در لکوپلاکیا به میزان قابل توجهی از مخاط نرمال بیشتر است اما تفاوت معنی‌داری بین میزان بروز و محل یا نوع لکوپلاکیا در این مطالعه دیده نشد.(۲)

در این مطالعه نیز افزایش رنگ‌پذیری سوپرابازال p53 و Ki67 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیا مشاهده شد. همچنین ملاحظه گردید که رنگ‌پذیری Ki67 به موازات شدت دیسپلازی افزایش می‌یابد. باوجود این، بین میزان رنگ‌پذیری و نوع لکوپلاکیا ارتباط آماری معنی‌داری دیده نشد که این نتایج

Archive of SID
www.SID.ir

موافق با یافته‌های مطالعات دیگر می‌باشد.

در بررسی Inmaroon و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در تایلند میانگین تعداد سلول‌های مثبت ازنظر وجودp53 وKi67 در ضایعات پیش بدخیم عمدتاً در لایه‌های بازال و سوپرابازال ولی در اپی‌تلیوم نرمال عمدتاً بازال بود و بین میزان رنگ‌پذیری این دو مارکر ارتباط مستقیمی مشاهده گردید (۹) که محل انتشار سلول‌های مثبت در این مطالعه مشابه بررسی فوق بود و همچنین رابطه مثبتی بین p53 وKi67 مشاهده شد اما میانگین سلول‌های مثبت برای p53 در مطالعه حاضر مشابه ضایعات پیش بدخیم بود.

بر اساس نتایج مطالعه Kovesi در سال ۲۰۰۳ که در آن شدت دیسپلازی، رنگ‌پذیری و همچنین محل و شدت رنگ‌پذیریp53 وKi67 در ارتباط با نمای کلینیکی لکوپلاکیا بررسی شد. این مطالعه نشان داد که بروزKi67 به میزان قابل توجهی به موازات شدت دیسپلازی افزایش می‌یابد. افزایش بروزKi67 به موازات دیسپلازی با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد.(۱۰)

همچنین در مطالعه Kovesi مثبت بودن و محل داخل سلولی p53 بر طبق شکل کلینیکی لکوپلاکیا متغیر بود. رنگ پذیری در انواع هموژن و ندولار، سیتوپلاسمیک و اریتروپلاکیا و کارسینوما ازالگوی هسته‌ای تبعیت می‌کرد.(۱۰)

در مطالعه حاضر تنها رنگ‌پذیری هسته‌ای در نمونه‌های بافتی ضایعات مورد بررسی قرار گرفت و همین امر می‌تواند توجیه کننده علت اختلاف نتایج این مطالعه با مطالعه Kovesi باشد.

همچنین در مطالعه Merks و همکارانش در سال ۲۰۰۵ برای تعیین ارزش عوامل پروگنوستیک در بروز تغییرات بدخیمی مخاط دهان، یک مطالعه گذشته نگر انجام شد و ویژگیهای کلینیکی و هیستوپاتولوژیک ۱۰۴ بیمار مبتلا به لکوپلاکیا آنالیز شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ ارتباطی بین اندازه ضایعه، نمای کلینیکی، محل و نوع درمان اولیه ضایعه با ریسک ایجاد سرطان وجود ندارد و تنها شدت دیسپلازی با بروز تغییرات بدخیمی مرتبط بود.(۱۱)، گزارشات مطالعه Merks که فقدان ارتباط بین نمای کلینیکی و ریسک ایجاد بدخیمی را بیان کرده است، می‌تواند تأیید کننده این مطالعه باشد که در آن ارتباطی بین میزان و شدت رنگ پذیری p53 و Ki67 با نمای بالینی لکوپلاکیا مشاهده نشد.

موتاسیون ژن تومورساپرسورp53 متداولترین اختلال ژنتیکی است که در سرطانهای انسانی مشاهده شده است.(۳)، پروتئین p53 جهش یافته پایدارتر از شکل طبیعی آن است و بنابراین می‌تواند به وسیله ایمنوهیستوشیمی نشان داده شود و تجمع پروتئین p53 در سلول عمدتاً در نتیجه موتاسیون ژن p53 می‌باشد. در این مطالعه الگوی رنگ پذیریp53 وKi67 در مخاط نرمال عمدتاً بازال بود در حالی که در لکوپلاکیا علاوه بر لایه بازال به لایه‌های سوپر بازال نیز گسترش یافته بود. مطالعات قبلی (ذکر شده) نیز نتایج مشابهی را نشان داده بودند که می‌تواند پیشنهاد کننده این مسئله باشد که افزایش سوپر بازال در اپی‌تلیوم لکوپلاکیا می‌تواند در ارتباط با پروگنوز بالینی ضعیف باشد.(۹)

اخیراً بروز Ki67 در محل Invasive Tumor Front کارسینوم سلول سنگفرشی دهان گزارش شده است که می‌تواند نشان دهنده ارتباط قوی با میزان تمایز سلول‌های سرطان دهان باشد. همچنین در مطالعه فوقKi67 به عنوان یک مارکر ارزشمند پروگنوستیک درSCC دهانی معرفی شده است، در حالی که این مسئله در مورد p53 یا PCNA مصداق نداشته است (هیچ ارتباطی بینp53 و PCNA و پیش آگهی بیماری دیده نشد).(۱۲)، پس می‌توان بیان کرد که در بین این دو مارکر، آنتی‌ژنKi67 همراهی قابل توجه تری با پیشرفت بیماری دارد و این تغییر بروز می‌تواند برای ضایعات پیش بدخیم اهمیت پروگنوستیک داشته باشد.

مثبت بودن ایمنوهیستوکمیکال برای پروتئینp53 در سلول پیشنهاد کننده موتاسیون این ژن می‌باشد. از طرفی تجمع پروتئینp53 در سلول‌های نرمال به دنبال فشارهایی از قبیل اشعهUV و قرار گرفتن در معرض کارسینو ژن‌ها جمع می‌شود.(۳)، علاوه بر آن عواملی از قبیل سیتوکین‌های التهابی نیز می‌توانند نیمه عمرp53 طبیعی را افزایش دهند که در این حالات با متد IHC آنتی‌ژن نوع طبیعی را می‌توان شناسایی کرد.(۱۳)، بنابراین ممکن است رنگ پذیری p53 در اپی‌تلیوم نرمال دهان در نتیجه تجمعp53 نرمال باشد که توسط کارسینوژن‌ها یا عوامل التهابی ایجاد شده است. در مطالعه حاضر همراهی بروز p53 وKi67 به وضوح مشاهده شده است و ارتباط معنی‌دار بین بروز p53 و Ki67 پیشنهاد کننده این مسئله است که تغییرp53 منجر به افزایش پرولیفراسیون سلولی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعـه بـر روی بـروز ایمنوهیـستوکمیکال p53 و Ki67 در لکوپلاکیا نتایج متفاوتی را در پی داشته است. علت ایـن امـر مشخص نیست اما روشـهای رنـگ‌آمیـزی و یـا کلـون آنتـی بادی های مختلف می‌تواننـد توجیـه کننـده ایـن ناهماهنگیهـا باشند. مطالعات آینده نگر با تعداد نمونه بیشتر و در صورت امکان بررسیهای ژنتیکی پیشنهاد مـی‌شـود تـا بـه اطلاعـات ارزشمندتر و دقیقتری درمورد ماهیت ملکولی و ژنتیکی ایـن ضایعات دست یافت.

نتیجه‌گیری

این یافته‌ها نشان می‌دهند که هیچ ارتباطی بین میزان و شدت رنگ پذیری پروتئین p53 و آنتـی‌ژن Ki67 بـا نمـای بـالینی لکوپلاکیا وجود ندارد. همچنین افـزایش سـوپر بـازال p53 و Ki67 در اپی‌تلیوم لکوپلاکیا می‌تواند نشان دهنـده پروگنـوز بالینی ضعیف باشد و افزایش بروز p53 ممکن است شـروع کننده پرولیفراسیون سلولی باشد.

تقدیر و تشکر

بـدین‌وسـیله از معاونـت محتـرم پژوهـشی دانـشگاه علـوم پزشکی کرمان به جهت تصویب و تأمین بودجـه مـورد نظـر تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouqout JE. Oral and maxillofacial pathology. 2nded. Philadelphia: Saunders CO; 2002, 337, 340-341.
2. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T.Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the exoression of p53 protein or Ki67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial displasia. J Oral Pathol Med. 2003 Oct;32(9):513-21.
3. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders Co; 1999, 290 , 291,292.
4. Tokman B,Gultekin SE,Sezer C,Alpar R.The expression of p53 ,p16 proteins and prevalence of apoptosis in oral squamous cell carcinoma.correlation with mode of invasion grading system.Saudi Med J.2004Dec;25(12):1922 30.
5. Santos-Garsia A,Abad-Hernandez MM,Fonseca-Sanchez E,Cruz-HernandezJJ,Bullon-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 2005 Jan-Feb;10(1):5-8.
6. Kikegawa A. Immunohistochemical analysis of the p53 tumor suppressor gene product in oral leukoplakia. Kokubyo Gakkai Zasshi. 2001 Mar; 68(1):51-9.
7. Zhao XY, Liu HW, Wei MJ. Expression of PDCDS and p53 in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. Beijing Da Xue Xue Bao 2005 Aug; 37(4):429-32.
8. Takeda T,Sugihara K,Hirayama Y,Hirano M,Tanuma JI,SembaJ I.Immunohistological evaluation of Ki67 , p63,CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasia.J Oral Pathol Med. 2006 Jul;35(6):369-75.
9. Iamaroon A,Khemaleelakul U,Pongsiriwet S,Pintong J. Coexpression of p53 and ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2004 Jan;33(1):30-6.
10. Kovesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. Oncology 2003 Nov;65(4):331-6.

Archive of SID
www.SID.ir

11. Merks MA, Hoeven J,Wild PC. Premalignant lesions of the oral mucosa.prognosis, treatment and follow up. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2005 Feb; 112(2):51-5.
12. Sittel C,Ruiz S,Volling P,Kvasnicka HM,Jungehulsing M,Eckel HE. Prognostic significance of Ki67 ,PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. Oral Oncol. 1999 Feb ;35(6):583-9.
13. 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 interpratation. Oral Dis. 1998 Sep;4(3):194-9.

Archive of SID

www.SID.ir