

تحري سبيل تعطل البروتين p53 في السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق (دراسة كيميائية مناعية)

إشراف الأستاذ الدكتور
أحمد المنديلي**

إعداد طالبة الدكتوراه
مايا بسام الجوخدار*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: يعد البروتين p53 حارساً لمحتوى الخلية المورثي من أي تبديل، ووصفت المورثة التي تنتجها بالكابحة للورم التي تطفرف في 50% من حالات السرطان الشائك الخلايا منتجة بروتيناً طافراً. لم تفصل الدراسات في نسبة تعبيرية البروتين الطافر في الخلايا السرطانية ولم تتناول الحالات التي لا تظهر بروتيناً طافراً. التحري عن البروتين p53 السليم (wtp53) في عينات السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق و التحري عن البروتينين الـ ATM والـ MDM2 ودورهما في تعطيل البروتين p53 السليم في الخلايا السرطانية .

مواد البحث وطرائقه: تألفت العينة من عينة سرطانية شملت ثلاثين خزعة من السرطان الشائك الخلايا (3شفة، 12بلعوم، 15 الحفرة الفموية)، فضلاً عن عينة شاهدة مؤلفة من خمس خزعات مأخوذة من لثة حرة سليمة. مثبتة ومجهزة على شكل مكعبات شمعية. قطعت من كل عينة شريحتان لتلون بألية التلون المناعي المضاعف باستعمال مجموعة التلون EPITOMICS وضد أرنب متعدد النسائل للـ ATM البشري وضد أرنب متعدد النسائل للـ MDM2 البشري وضد فأري وحيد النسيلة للـ p53 wild type البشري. لونت إحدى الشرائح بالضدين wtp53، ATM والشريحة الأخرى بالضدين MDM2، wtp53. استخدمت الاختبارات: كأي مربع، معامل الارتباط بيرسون، معامل phi عند مستوى الدلالة $p < 0,05$ للدراسة الإحصائية.

النتائج: ظهرت إيجابية التعبير للبروتينات الثلاثة بفارق إحصائي $p < 0,05$ في شرائح الخزعات جميعها وكانت نسبة فرط تعبيرية كل من البروتين p53 والبروتين MDM2 والبروتين ATM في مجموعة الخزعات السرطانية SCC (42,1%، 51,9%، 59,6% على الترتيب)، كما ظهر أن البروتين wtp53 يرتبط مع كل من الـ MDM2، ATM في الحالة السليمة بعلاقة طردية في حين تكون عكسية في الحالة السرطانية.

الاستنتاج: ظهرت تعبيرية البروتين p53 السليم (wtp53) في الخلايا السليمة المتكاثرة لكن تعبيرية البروتينات p53 السليم (wtp53)، MDM2، ATM في الخلايا السرطانية بشكل أكبر وبفارق إحصائي $p < 0,05$ بالنسبة إلى الخلايا السليمة المتكاثرة مما يشير إلى دور كل من البروتينين MDM2، ATM في تعطل البروتين wtp53 في الحالة السرطانية.

* قسم النسيج والتشريح المرضي - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق.

** أستاذ - قسم النسيج والتشريح المرضي - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق.

Investigating the pathway of protein p53 inhibition in head and neck squamous cell carcinoma (Immunohistochemistry study)

Maya Bassam AL-jokhadar*

Ahmad Al-mandily**

Abstract

Background & Objective: The protein p53 is the guardian of the cell gene contents from changes, and the gene that produces it is called Tumor Suppressor Gene which mutates in 50% of Squamous cell carcinoma's cases producing defective protein. Studies have not detailed the expression ratio of the defective protein Within the cancer cells, also studies have less details about the cases which did not show a mutated protein.

Investigating the non mutant protein p53 (wtp53) in Squamous cell carcinoma's samples of the head and neck, and investigating the expression of the proteins ATM and MDM2 and their role in inhibiting the non mutant protein p53 (wtp53) in cancer cells.

Materials & Methods: The sample consisted of a cancer samples included thirty biopsies of squamous cell carcinoma (3 lip, 12 Pharynx, 15 oral cavity), and a control sample of five biopsies from healthy free gums. fixed and empedded in the wax. we made two slices from each sample and stain them double staining Immunohistochemistry, we stained one Slide by two antibodies ATM and wtp53, and the Other slide by two antibodies MDM2 and wtp53. The statistical experiments were: Person, k^2 , phi, at $p < 0,05$.

Results: Positive expression for the three proteins appeared in all biopsies slices, and the over-expression proportion of wtP53 and MDM2 and ATM protein in a SCC (42,1%, 51,9%, 59,6%, respectively). direct relation between wtp53 and each Of MDM2, ATM was shown in control samples while it was reverse relation in the cancer samples.

Conclusions: The expression of non mutant protein p53 (wtp53) observed strongly in proliferating cells. And the expression of each of wtp53 and MDM2 and ATM are higher in cancer cells than non mutant one. while it isn't effective in cancer cells. Each of MDM2 and ATM has a role in inactivation wtp53 in the case of cancer.

* Dept. of Histopathology, Damascus University.

** Ass. Prof. Dept. of Histopathology, Damascus University.

مقدمة:

توجد المورثة TP53 على الذراع القصير للصبغي السابع عشر في الموقع 13p17.6. ولقد عرف البروتين p53 منذ عام 1979، وبينت الدراسات ارتفاع مستوياته بشكل واضح في خلايا عدة أنماط من الأورام عند البشر، وعند المقارنة بالخلايا السليمة تأكدت خاصيته الورمية⁷. وعرفت وظيفته الكابحة للورم عندما أظهرت الخلايا المحقونة بـ c DNA لـ p53 سليماً وفقاً للدورة الخلوية أو استمواتها⁸ وذلك بعد عشرة أعوام من اكتشافه.

بينت الدراسات أن الارتفاع المشاهد في مستوى تعبيرية البروتين p53 في العديد من الخلايا الورمية إنما هو مؤشر لطفرة مورثة الـ TP53، وأن البروتين ذا الصفة الورمية هو البروتين الطافر.

يبقى الـ p53 السليم (wildtype) في الخلية السليمة (غير المعرضة لأذية *) في مستويات منخفضة الثبات، وذلك يعود لتحلله السريع المعتمد على MDM2⁹.

إن فسفرة وأسئلة البروتين p53 حدث قائم بالحالة الطبيعية لكنه يزداد عند حدوث أذية لتحقيق تفعيل واستقرار البروتين p53 مما يساعده في القيام بوظيفته النسخية¹⁰.

عند حدوث أذية في الـ DNA يتفسر الـ p53 في النهاية الأمينية والنهاية الكربوكسيلية، أما فسفرة النهاية الأمينية فتسبب تعطل ارتباط الـ p53 مع الـ MDM2 فيبقى الـ p53 مستقراً، في حين أن فسفرة النهاية الكربوكسيلية تنظم توضع الـ p53 في النواة وينظم عملية النسخ المتواسطة بالـ p53¹¹.

قدّرت نسبة الإصابة بسرطانات الرأس والعنق (السرطان الفموي، سرطانات الحنجرة، سرطانات البلعوم) حول العالم بنصف مليون إصابة سنوياً مما جعله السرطان السابع شيوعاً بين مجمل السرطانات¹، أما بالنسبة إلى السرطان الفموي فتبلغ نسبة الإصابة به نحو 6,9% من مجمل السرطانات عند الذكور و2,4% من مجمل السرطانات عند الإناث في أرجاء العالم² في حين يشكل نسبة 2,9% من مجمل السرطانات عند الذكور و1,6% من مجمل السرطانات عند الإناث في منطقة غرب آسيا². ويحتل السرطان الفموي بين مجمل السرطانات في العالم المرتبة الثانية عشرة شيوعاً عند الرجال والسابعة عشرة عند النساء²، ويشكل السرطان الشائك الخلايا Squamous cell carcinoma (SCC) نحو 80-90% من مجمل سرطانات الرأس والعنق ويشكل 95% من السرطانات الفموية وتشخص نحو 22,000 حالة جديدة من السرطان الشائك الخلايا في الولايات المتحدة سنوياً، وسجلت فيها حوالي 5300 حالة وفاة من هذا السرطان سنوياً³، مما أبرز أهمية التحري عن التغيرات الجزيئية التي تطرأ عليه والتي أبرزها التغير في وظيفة البروتين p53 فقد بينت البحوث أن المورثة المنتجة له (والتي صنفت أنها من المورثات الكابحة للورم) تطفر في 50% من حالات السرطان الشائك الخلايا في الرأس والعنق⁴ فتزداد تعبيرية البروتين الطافر، أما في الـ 50% من حالات السرطان الشائك الخلايا التي لا تبدي طفرة الـ p53 فقد ذكرت البحوث تعطل الـ p53 السليم فيها⁵. يعود تعطل البروتين السليم p53 إلى سببين: إما زيادة كبحه أو قلة تفعيله. يجري تفعيل البروتين p53 بآليات عديدة أهمها سبيل الـ ATM في حين يتعطل البروتين p53 بآليات عدة أهمها سبيل الـ MDM2.

* الأذيات الداخلية والخارجية التي تفعل الـ p53 هي إما أذية الـ DNA أو نقص الأكسجة أو تفعيل المورثات الورمية أو أذية فيروسية أو تآذي بخيوط الانقسام المغزلية أو تصنيع شاذ للريبوزومات أو اضطراب في طي البروتينات أو صدمة حرارة أو برودة أو اضطراب في التغذية أو تشوش بالضغط الحلولي أو اضطراب بالهيكل الخلوي.

يطفر في كثير من السرطانات. وجرى التعرف إلى ناشبات (epitops)** هذه الأضداد باستعمال p53 الهجين 20. أما ضد PAb240 فيرتبط بالشكل الطافر من p53²¹. سجلت طفرة الـ p53 في أكثر من 60% من حالات السرطان شائك الخلايا الفموي²²، في حين يراوح عدد الحالات التي سجل فيها طفرة الـ p53 في السرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق بين 30-70%²³. وأظهرت الدراسات أن طفرة الـ p53 تحدث في مرحلة مبكرة من تطور السرطان شائك الخلايا²³. أما بالنسبة إلى الشكل السليم wtp53 فقليلاً ما تعرضت له البحوث التي أجريت على سرطان شائك الخلايا وخاصة في الرأس والعنق فقد درست معظم الأبحاث وجود البروتين p53 في الخلايا سواء كان الشكل الطافر أم السليم. والقليل من البحوث بحثت عن وجود الشكل السليم فقط في الخلايا منها ما وجدت Balz ومجموعتها 2003 أن 77% من عينات سرطان شائك الخلايا أظهرت wtp53²⁴. كما وجد Yin ومجموعته (2005) في الخلايا المزروعة في المختبر (cell culture) والمأخوذة من سرطان شائك الخلايا للرأس والعنق بشري أن 50% من الحالات أظهرت wtp53²⁵. ووجدت Hassan ومجموعتها 2008 في دراستها على السرطان الفموي أن تعبيرية الـ WTP53 ظهرت في 30% أما تعبيرية الـ p53 الطافر فشكل نسبة 70%¹⁸.

الهدف من البحث: لذا اهتم هذا البحث بدراسة تعبيرية الخلايا التي تبدي البروتين p53 السليم (wild type) (wtp53) وارتباط هذه التعبيرية بتعبيرية البروتينين ATM،MDM2 في السرطان الشائك الخلايا للرأس والعنق، وعلاقة الأخيرين بتعطل البروتين p53 السليم.

تجري أسئلة البروتين p53 عند أذية الـ DNA فتساعد على استقرار الـ p53 ومنع تدركه (degradation)، وتتم الأسئلة في النهاية الكربوكسيلية للـ p53 مما يزيد ارتباطه مع الـ DNA. ويعتقد أن للفسفرة والأسئلة دوراً في تحديد مستويات البروتين p53 في الخلية¹². يرتبط الـ p53 بالـ DNA بتتاليات خاصة¹³ وينظم نسخ منتجات مورثات لها دور في حبس الخلية في مرحلة معينة وأخرى لها دور في إصلاح الـ DNA، وأخرى في الاستموات، وأخرى في كبح التشكل الوعائي المرافق للورم¹⁴، ولكي يقوم الـ p53 بدوره كعامل نسخ لا بد له أن يستقر ويتجمع في النواة على شكل رباعيات فعالة¹⁵؛ وذلك مهما كان نوع المحفز.

تفقد الأشكال الطافرة للبروتين p53 في الخلايا السرطانية قدرتها على تفعيل نسخ المورثات الهدفية التي يفعلها الشكل السليم وتحتاج تلك المورثات لتتفعل آليات مفعلة غير متشاركة مع الـ p53¹⁶.

بينت الدراسات أن سبب عدم تفعل البروتين p53 يعود إما لآلية مباشرة وهي طفرة المورثة بكلا أليليها¹⁷ والتي وجدت في نصف حالات السرطان البشرية، أو لآليات غير مباشرة التي منها¹⁷: ارتباط البروتين p53 السليم ببروتينات فيروسية. أو بحدوث اضطراب في مورثات البروتينات التي تفعل البروتين p53 السليم في الحالة الطبيعية. وقد تكون المعلومات التي تنقل للبروتين p53 السليم ومنه معلومات خاطئة. كما بينت الدراسات الحديثة أن البروتين p53 المعيب الناتج عن أليل المورثة الطافر قد يكون مسيطراً فيكبح فعالية البروتين السليم الـ wtp53 الناتج عن أليل المورثة السليم ومن ثم يكبح فعاليته النسخية¹⁸.

إن قيام الـ p53 بدوره يعتمد على إنه بالشكل السليم wildtype conformation والذي يجري التعرف إليه بالأضداد Pab1620 و PAb246¹⁹. ويفقد هذا الشكل عندما

** الناشبة epitop هي جزء من المستضد يرتبط عليها الضد (المستضد هنا البروتين p53)

مواد البحث وطرائقه:

عينة البحث:

أخذت العينة السرطانية من ثلاثين خزعة من السرطان شائك الخلايا من الرأس والعنق (3 شفة، 12 بلعوم، 15 الحفرة الفموية) عند 30 مريض بين عامي 2009-2005. راوحت أعمار المرضى بين 24-75 (بمتوسط عمري 56) منهم 26 ذكراً و4 إناثاً، وأخذت العينة شاهدة من خمس خزعات لثة حرة سليمة عند أفراد تراوحت أعمارهم بين 25-41 (بمتوسط عمري 31) منهم 2 ذكور و3 إناث. كانت الخزعات مثبتة ومجهزة على شكل مكعبات شمعية من أرشيف مشفى المواساة والبيروني، خضعت العينات للتقطيع والتلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين أيوزين بداية للتأكد من صحة تشخيصها.

الدراسة المناعية النسيجية:

قُطِعَ من كل عينة شريحتان لتلون بآلية التلوين المناعي المضاعف باستعمال مجموعة التلوين EPITOMICS وضد أرنب متعدد النسائل للـ ATM البشري (ab 10941-50)، وضد أرنب متعدد النسائل للـ MDM2 البشري (abcam 100-38618-abcam) وضد فأري وحيد النسيلة للـ wild type p53 البشري (Pab246 clone p53 wild type، AbD Serotec، بريطانيا)، لونت إحدى الشرائح بالصددين ATM، wtp53 والشريحة الأخرى بالصددين MDM2، wtp53. وكانت مراحل العمل كالاتي:

وُضِعَت الشرائح في فرن درجة حرارته 65 °م مدة ساعة، ينزع البارافين عبر الغسيل في حمامات متدرجة التراكيز للإيتانول.

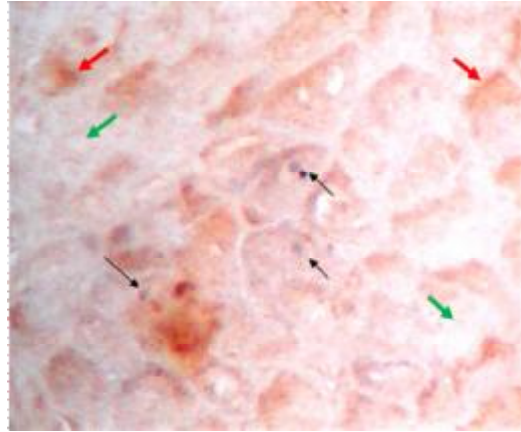
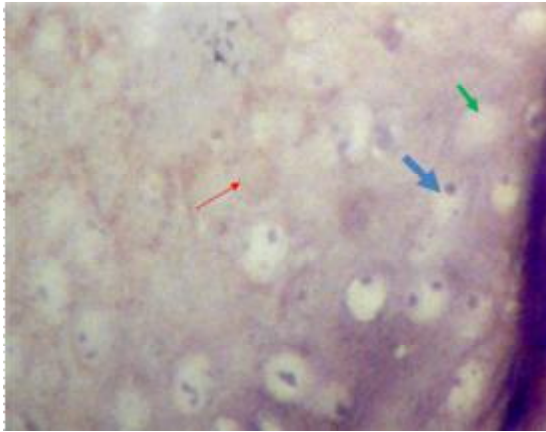
غُمِرَت الشرائح ضمن وعاء يحوي محلول الـ antigen retrieval. ثم وضع الوعاء مغطى ضمن المايكرويف ومعه 120مل من الماء المقطر على وضعية cook التي مدتها نحو 20-30 د، ثم تُرِكَ ليبرد دون غطاء لمدة 20 د. غُسِلَت الشرائح بالتريسي مدة 5 د على هزاز، ثم جُفِّت

الشرائح حول المقطع النسيجي. من ثم غُطِّلَ البيروكسيداز الداخلي بغمر النسيج بمحلول peroxide block مدة 10د، وغُسِلَت الشرائح 3 مرات بالتريسي (ثم جُفِّت الشرائح حول المقطع النسيجي، ثم غُمِرَت الشرائح النسيجية بالـ block solution لمدة ساعة وبعدها غُسِلَت الشرائح 3 مرات بالتريسي ثم جُفِّت الشرائح حول المقطع النسيجي، عندها حُلَّت الأضداد الأولية وحيدة النسيلة للفئران والأرانب، الحجم النهائي 100 ميكرو لتر (مدد الـ MDM2 بنسبة 50/1، أما كلٌّ من الـ wtp53 والـ ATM فمددت بنسبة 100/1). طُبِّقَت الأضداد الأولية معاً لكل مقطع نسيجي بنسبة 1:1 حجم و حُضِنَت طوال الليل ضمن حاضنة رطبة بدرجة 4°م و غُسِلَت الشرائح بتريسي 3 مرات ثم جُفِّت الشرائح حول المقطع النسيجي. ثم طُبِّقَ لكل سلايد على حدة الضد الثانوي HRP- ضد أرنب ثم AP- ضد فأر، وحُضِنَت كل منها مدة 45 د بدرجة حرارة الغرفة وبينها غُسِلَت بتريسي ثم جُفِّت الشرائح حول المقطع النسيجي و غُسِلَت الشرائح بتريسي 3 مرات ثم جُفِّت الشرائح حول المقطع النسيجي. من ثم يضاف الأزرق الجاهز للاستعمال إلى السلايدات وحُضِنَت المقاطع النسيجية في الأزرق لمدة 10-25 د بدرجة حرارة الغرفة، ثم غُسِلَت الشرائح بتريسي 3 مرات ثم جُفِّت الشرائح حول المقطع النسيجي، وأضيف الـ DAB المحضر أنياً للمقاطع وحُضِنَت المقاطع في محلول الـ DAB بدرجة حرارة الغرفة 1-2 د، ثم غُسِلَت المحضرات بالماء وتُرِكَت لتجف. وسُتِرَت المحضرات ببلم كندا فأصبحت المحضرات جاهزة للدراسة تحت المجهر.

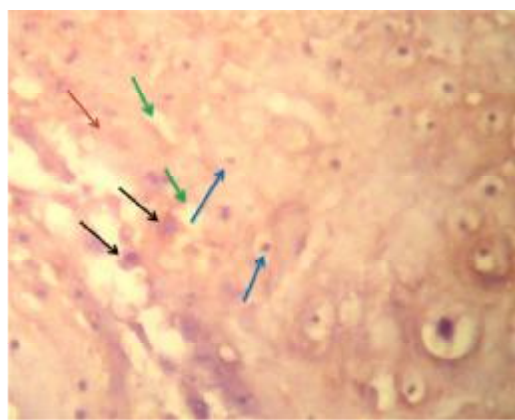
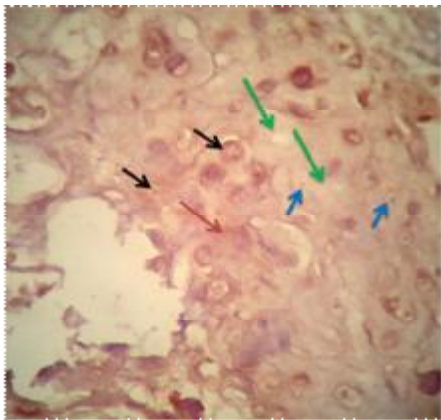
درست أربع ساحات مجهرية عالية التكبير HPF تحت العدسة X40، وكانت طريقة العد المتبعة point out بالاتفاق على النتائج من قبل 3 مختصين: فجرى عد الخلايا المظهرة لأحد البروتينات (ATM، MDM2، wtp53) أو

يظهر الـ **wtp53** في النواة يظهر باللون الأزرق والـ **MDM2** في الغشاء السيتوبلازمي أو السيتوبلازما باللون البني (الأسهم ذات اللون الأسود)، وتلون خلايا بشروية أخرى بالـ **wtp53** فقط (الأسهم ذات اللون الأزرق)، وتلون خلايا بالـ **MDM2** فقط (السهم الأحمر)، وخلايا سلبية التلون (السهم الأخضر).

• (شكل 1) يوضح تلون خلايا بشروية في السرطان الشائك الخلايا بالملونين **wtp53** و **MDM2** حيث

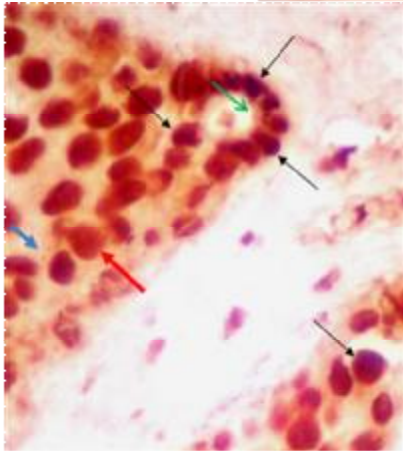
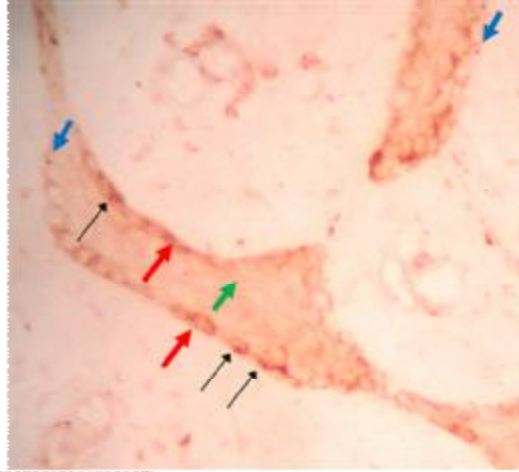


• (شكل 2) يوضح تلون خلايا بشروية في سرطان شائك الخلايا بالملونين **wtp53** و **ATM** حيث يظهر الـ **wtp53** في النواة يظهر باللون الأزرق والـ **ATM** في الغشاء السيتوبلازمي أو السيتوبلازما باللون البني (الأسهم ذات اللون الأسود)، وتلون خلايا بشروية أخرى بالـ **wtp53** فقط (الأسهم ذات اللون الأزرق)، وتلون خلايا بالـ **ATM** فقط (السهم الأحمر)، وخلايا سلبية التلون (السهم الأخضر).



• (شكل 3) يوضح تلون خلايا بشروية في العينة الشاهدة السليمة بالملونين **wtp53** و **MDM2** حيث يظهر الـ **wtp53** في النواة يظهر باللون الأزرق والـ **MDM2** في الغشاء السيتوبلازمي باللون البني وظهر الإيجابية المضاعفة في طبقة الخلايا القاعدية، أما باقي طبقات البشرة فتبدي سلبية للـ **MDM2** وإيجابية خفيفة جداً

للـ **wtp53** (الأسهم السوداء) الخلايا الملونة بالملونين
والأسهم الحمراء) الخلايا الملونة بالـ **MDM2** فقط في
والسهم الأزرق إيجابية الـ **wtp53** فقط.



40X الخلايا القاعدية

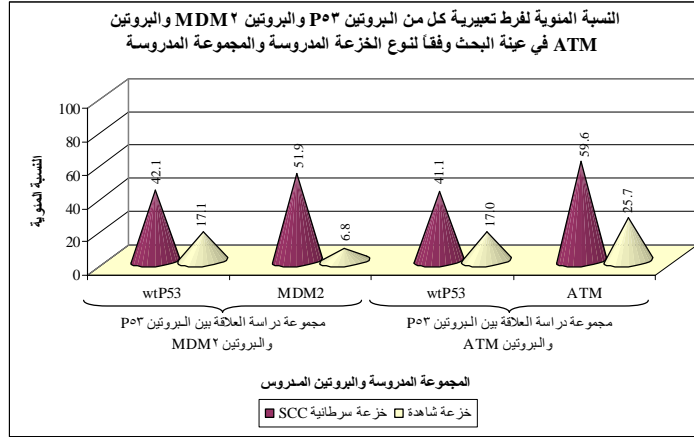
- (شكل 4) يوضح تلوّن خلايا بشرية في العينة الشاهدة السليمة بالملونين **wtp53** و **ATM** حيث يظهر الـ **wtp53** في نوى بعض الخلايا القاعدية باللون الأزرق المحمر مترافقاً في أغلب الأحيان مع الـ **ATM** في سيتوبلاسما معظم الخلايا القاعدية الذي يظهر باللون البني أما باقي طبقات البشرة فتبدي سلبية للـ **ATM** وإيجابية خفيفة جداً للـ **wtp53** (الأسهم السوداء) الخلايا الملونة بالملونين و (الأسهم الحمراء) الخلايا الملونة بالـ **ATM** فقط في السيتوبلاسما السهم الأخضر خلية سلبية للملونين والسهم الأزرق إيجابية الـ **wtp53** فقط.

الدراسة الإحصائية:

أجريت الحسابات الإحصائية باستخدام برنامج SPSS الإصدار 13,0 واستخدمنا لتحليل النتائج الاختبارات التالية: اختبار كاي مربع، معامل الارتباط بيرسون، معامل phi عند مستوى الدلالة $p < 0,05$.

النتائج:

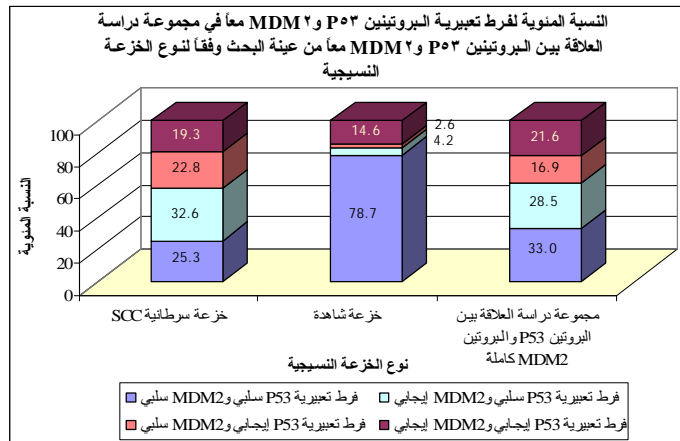
1- دراسة تأثير نوع الخزعة النسيجية والبروتين المدروس في فرط التعبيرية:



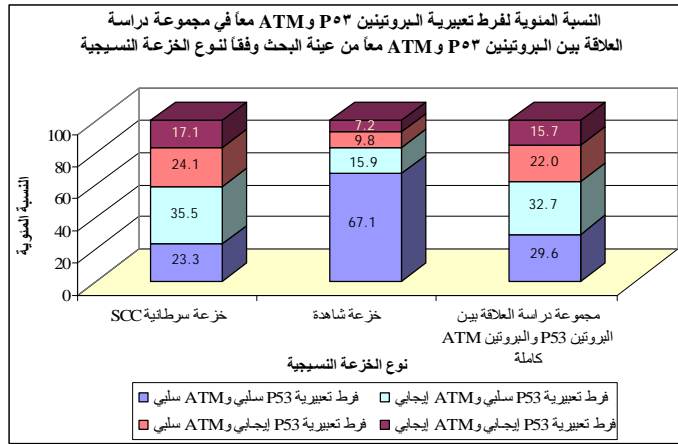
مخطط رقم (5) يمثل النسبة المئوية لفرط تعبيرية كل من البروتين P53 والبروتين MDM2 والبروتين ATM في عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة المدروسة والمجموعة المدروسة

يلاحظ أن نسبة فرط تعبيرية كل من البروتين p53 والبروتين MDM2 والبروتين ATM في مجموعة الخزعات السرطانية SCC (42,1%، 51,9%، 59,6%، على الترتيب) كانت أكبر من نظيراتها في المجموعة الشاهدة من عينة البحث (17,1%، 6,8%، 25,7%، على الترتيب).

وجدنا عند دراسة تأثير المجموعة المدروسة على تكرارات فرط تعبيرية البروتين p53 في عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة النسيجية عدم وجود فروق دالة إحصائية في تكرارات فرط تعبيرية البروتين p53 بين مجموعة دراسة العلاقة بين البروتين p53 والبروتين MDM2 ومجموعة



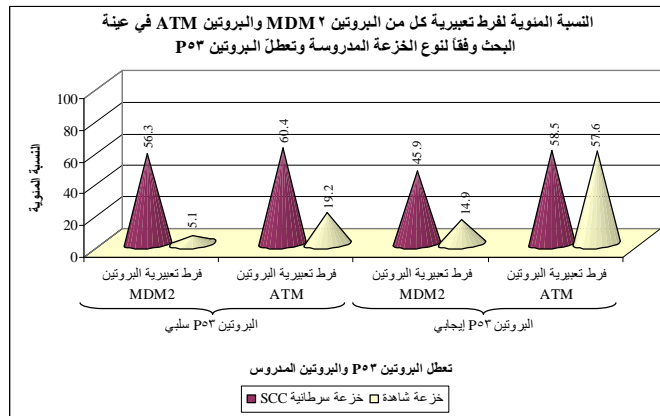
مخطط رقم (6) يمثل النسبة المئوية لفرط تعبيرية البروتين p53 و MDM2 معاً في مجموعة دراسة العلاقة بين البروتين p53 و MDM2 معاً من عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة النسيجية.



مخطط رقم (7) يمثل النسبة المئوية لفرط تعبيرية البروتينين P53 و ATM معاً في مجموعة دراسة العلاقة بين البروتينين P53 و ATM معاً من عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة النسيجية.

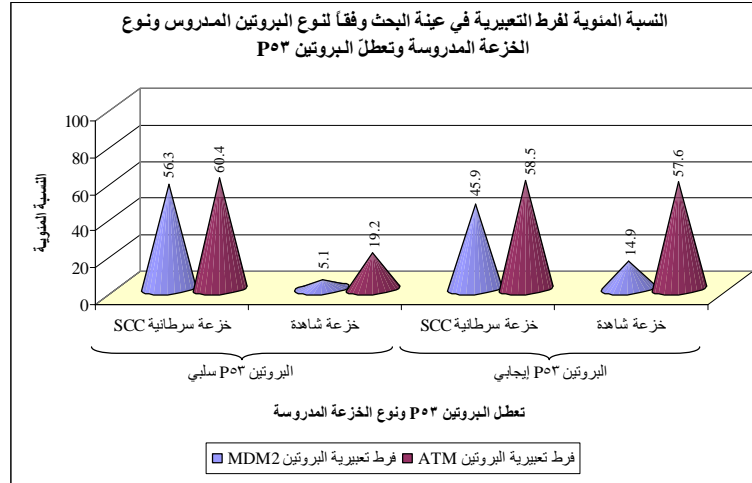
بينت دراسة العلاقة بين تكرارات فرط تعبيرية البروتين p53 وكل من تكرارات فرط تعبيرية البروتين MDM2 والبروتين ATM على حدة في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة أن الإشارة الجبرية لمعامل Phi سالبة في مجموعة الخزعة السرطانية SCC مهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة دراسة العلاقة بين البروتين p53 والبروتين MDM2 كاملة ، استنتجنا أن كلاً من العلاقات الموافقة كانت عكسية (سلبية فرط تعبيرية p53 يوافقها ايجابية فرط تعبيرية MDM2 أو ايجابية فرط تعبيرية Phi) ، ولما كانت الإشارة الجبرية لباقي معاملات Phi المحسوبة موجبة نستنتج أن كلاً من العلاقات الموافقة كانت طردية (سلبية فرط تعبيرية p53 يوافقها سلبية فرط تعبيرية MDM2 أو سلبية فرط تعبيرية Phi) ، وبما أن القيم المطلقة لمعاملات Phi المحسوبة كانت قريبة من القيمة 0.3 أو أقل استنتجنا أن كلاً من العلاقات الموافقة كانت ضعيفة الشدة ويمكن إهمالها في عينة البحث، وذلك مهما كان نوع الخزعة المدروسة ومهما كانت المجموعة المدروسة.

3- دراسة العلاقة بين نوع الخزعة النسيجية وتعطّل البروتين p53 و كل من البروتينين MDM2 و ATM:



مخطط رقم (8) يمثل النسبة المئوية لفرط تعبيرية كل من البروتين MDM2 والبروتين ATM في عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة المدروسة وتعطّل البروتين p53.

من المخطط 8 نجد أن نسبة فرط تعبيرية كل من البروتين MDM2 (56,3% من أصل 57,9% wtp53 سلبي) والبروتين ATM (60,4% من أصل 58,8%) في مجموعة الخزعات السرطانية SCC كانت أكبر منها في المجموعة الشاهدة (5,1 و 19,2 من أصل 82,9% wtp53 سلبي على الترتيب) في مجموعة عدم تراكم البروتين p53، ويُلاحظ أيضاً أن نسبة فرط تعبيرية البروتين MDM2 (45,9% من أصل 53,42,1% wtp53 إيجابي) في مجموعة الخزعات السرطانية SCC كانت أكبر منها في المجموعة الشاهدة (5,1 و 19,2 من أصل 82,9% wtp53 سلبي على الترتيب) في مجموعة عدم تراكم البروتين p53، ويُلاحظ أيضاً أن نسبة فرط تعبيرية البروتين MDM2 (45,9% من أصل 53,42,1% wtp53 إيجابي) في مجموعة الخزعات السرطانية SCC كانت أكبر منها في المجموعة الشاهدة (5,1 و 19,2 من أصل 82,9% wtp53 سلبي على الترتيب) في مجموعة عدم تراكم البروتين p53.



مخطط رقم (9) يمثل النسبة المئوية لفرط التعبيرية في عينة البحث وفقاً لنوع البروتين المدروس ونوع الخزعة المدروسة وتراكم البروتين p53.

كما لوحظ عند دراسة تأثير تراكم البروتين p53 على

المناقشة:

تبيين أن نسبة فرط تعبيرية كل من البروتين wtp53 والبروتين MDM2 والبروتين ATM في مجموعة الخزعات السرطانية SCC (42,1%، 51,9%، 59,6% على الترتيب) في حين كانت في المجموعة الشاهدة في عينة البحث (17,1%، 6,8%، 25,7% على الترتيب).

جرت مشاهدة معظم الخلايا التي تظهر تعبيرية البروتينات في طبقة الخلايا القاعدية في المجموعة الشاهدة وتعليل ذلك أن خلايا هذه الطبقة هي الخلايا

المولدة التي تنقسم عادة لتعطي خلايا الطبقات الأعلى منها، ومن الطبيعي أن تكون تعبيرية wtp53 في أثناء الانقسام شديدة، ليقوم بدوره الرقابي بتوازن تحفيزي من الـ ATM وتثبيطي من الـ MDM2 اللذين يشاهدان في الطبقة القاعدية فقط في المجموعة الشاهدة، ونظراً إلى الخلايا السرطانية خلايا شديدة الانقسام (في مختلف الطبقات) فمن المنطقي مشاهدة تعبيرية هذه البروتينات بشكل أكبر في المجموعة السرطانية. وذلك يتفق مع نتائج Moustafa ومجموعته (2004) الذي وجد أن البشرة الفموية السليمة تبدي p53 سليماً، واتفقنا مع Kramata ومجموعته (2005) الذي وجد إيجابية للـ wtp53 في البشرة الفموية عند الإنسان والفأر. كما اتفقنا مع Ralhan ومجموعته (2000) أن الأنسجة السليمة أظهرت فرطاً في تعبيرية الـ MDM2 بنسبة 5% (حالتان من أصل 40 حالة) وتقاربنا مع He ومجموعته (2008) الذي وجد أن تعبيرية الـ ATM في البشرة الفموية السليمة بنسبة 37,5%. أما بالنسبة إلى الأنسجة السرطانية فاتفقنا مع Yin ومجموعته (2005) الذي وجد في الخلايا المزروعة في المختبر (cell culture) المأخوذة من سرطان شائك للخلايا للرأس والعنق عند البشر أن 50% من الحالات (4 من أصل 8 مجموعات خلوية) أظهرت wtp53. في حين اختلفنا مع Balz ومجموعتها (2003) التي وجدت أن 77% من عينات سرطان شائك الخلايا (20 من 26 عينة) أظهرت wtp53 وسبب النسبة عالية في دراستها يعود إلى أن التحليل الإحصائي عدّ الوحدة الإحصائية هي العينة ككل وليس الخلية كما في دراستنا. كما تتقارب دراستنا مع دراسة Matsumura ومجموعته (1996) الذي وجد فرطاً في تعبيرية الـ MDM2 بنسبة 40% في خلايا سرطان شائك الخلايا الفموي، ومع دراسة Taghavi ومجموعته (2010) فرطاً تعبيرية للـ MDM2 بنسبة 42% في سرطان شائك

الخلايا في المري، واختلفنا مع Ralhan ومجموعته (2000) الذي وجد فرطاً في تعبيرية الـ MDM2 في 71% من العينات (71 حالة من أصل 100 حالة) في سرطان شائك الخلايا ومع Huang ومجموعته (2001) الذي وجد أن للـ MDM2 تعبيرية إيجابية نسبتها 69% في خلايا سرطان الشائك الخلايا الفموي، ومع Valentin-Vega ومجموعتها التي وجدت (2007) فرطاً في تعبيرية الـ MDM2 بنسبة 80% في خلايا سرطان شائك الخلايا الفموي ويمكن تليل الفارق بأنهم اعتمدوا في دراستهم النظام التالي في التصنيف: الخلايا التي تظهر أقل من 10% إيجابية عدّها سلبية التلون أعطى الرقم +1 للعينات التي تبدي إيجابية بخلاياها بين 10-30% والرقم +2 للعينات التي تبدي إيجابية بخلاياها بين 30-50% والرقم +3 للعينات التي تبدي إيجابية بخلاياها فوق 50% في حين اعتمدنا بدراستنا التحليل الإحصائي للخلايا جميعها من دون أن نعطي درجات للعينات. وتقاربت دراستنا مع ما وجد He ومجموعته (2008) في دراسته على سرطان شائك الخلايا الفموي تعبيرية للـ ATM بنسبة 68,7%، وتقاربنا أيضاً مع Chen ومجموعته (2008) الذي وجد أن نسبة تعبيرية البروتين ATM كانت 68,8% في خلايا سرطان شائك الخلايا الفموي.

جرى عد تعبيرية البروتين wtp53 في الشريحتين المأخوذتين من كلا الخزعة في الساحات نفسها، خاصة أن الشريحتين كانتا قريبتين المقطع، مما قارب النتائج بالنسبة إلى البروتين wtp53 وبقي الاختلاف بين البروتينين MDM2, ATM. أما تعليلنا أن نسبة فرط تعبيرية البروتين MDM2 كانت أصغر من نسبة فرط تعبيرية البروتين ATM في عينة البحث أن الخلايا المنقسمة تحتاج إلى مراقبة ومن ثمّ تحتاج إلى البروتين wtp53 فكانت تعبيرية البروتين المحفّز (ATM) أكبر من

فقط في شرائح الخزعات السليمة التي تشكل طبقة من الطبقات البشرية لذا كانت نسبة التراكم قليلة ونظراً إلى هذه الخلايا لا تظهر علامات خباثة فإننا نرجح أن التراكم كان بالبروتين الفعال في حين أن الخلايا السرطانية تبدي عدم استجابة للبروتين p53 السليم، ومن ثم نرجح أن البروتين هنا كان متعطلاً ولا يقوم بدوره، وبذلك اتفقنا مع Lentsch ومجموعته⁵ (2000) ومع Landers ومجموعته (1997)³⁵ الذي أكد تعطل البروتين p53 السليم عندما أظهرت العينات السرطانية المبدية له سلبية للبروتينات التي يفعل نسخها ومنها GADD45، p²¹. إن النسبة المنخفضة للبروتينين MDM2، ATM في مجموعة عدم تراكم البروتين p53 السليم في الخزعات الشاهدة تعطل بأن مجموعة عدم تراكم البروتين p53 هي في الطبقات الشائكة غير المنقسمة وإن الـMDM2 يكبح الـp53 في الحالة السليمة (الخلية المستقرة غير المنقسمة) ويقوم بآلية الفرغ الذاتي (autoubiquitination) فتبقى نسبته بالحدود الدنيا 38، أما بالنسبة إلى ATM فلا يكون فعالاً في الخلية السليمة غير المعرضة لأذية وتكون نسبته بالحدود الدنيا 39. أما ارتفاع نسبة البروتينين MDM2، ATM في مجموعة عدم تراكم البروتين p53 السليم وارتفاعها أيضاً في مجموعة تراكم البروتين p53 السليم في الخلايا السرطانية فهذا يدل على اضطراب في وظيفة الـMDM2، ATM (غير فعالين) أو اضطراب في تعديلات ما بعد الترجمة من فسفرة وأستلة وغلركة والتي تساعده في القيام بوظيفته النسخية أو لتدخل عنصر ثالث أقوى من هذين البروتينين في تفعيل البروتين p53 السليم وتعطيله. وجدنا أن نسبة فرط تعبيرية في مجموعة الخزعات الشاهدة لكل من البروتين MDM2 والبروتين ATM على حدة في مجموعة تراكم البروتين p53 كانت أكبر منها في مجموعة عدم تراكم البروتين p53، السبب الخلايا المتكاثرة تحتاج إلى مراقبة فيجري تحفيز البروتين p53

تعبيرية البروتين المثبط (MDM2) وخاصة أن عملية الانقسام مستمرة. وبالنسبة إلى العلاقة بين wtp53 وكل من الـMDM2، ATM فقد كانت طردية في العينة الشاهدة وهذا منطقي فزيادة الـATM تحفز الـwtp53 وزيادة الأخير تحفز الـMDM2. ودعمت نتائجنا ما وجدته Landers ومجموعته (1997)³⁵ من وجود علاقة طردية بين الـwtp53 والـMDM2 في الأنسجة السليمة، وهذا يتفق مع دراستنا. أما العلاقة بين wtp53 وكل من الـMDM2، ATM فكانت عكسية في العينة السرطانية وقد يعود ذلك إلى اضطراب في وظيفة الـMDM2، ATM (غير فعالين) أو إلى اضطراب في تعديلات ما بعد الترجمة من فسفرة وأستلة وغلركة والتي تساعده في القيام بوظيفته النسخية (وهذا ما يجب التحري عنه في بحوث أخرى). ودعمت نتائجنا ما وجدته الدراسات من عدم تفعل البروتين ATM في العديد من السرطانات مثل الخباثات اللمفاوية، وسرطان الثدي، وسرطان البروستات، وسرطان المبيض، والسرطان الكولوني المستقيمي، وسرطان الرئة، سرطان المري²⁹. وفي دراسة لـBolt ومجموعته (2005)³⁶ على السرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق تبين أن عدم تفعل طريق الـATM/P53 شائع في معظم العينات. كما تبين أن زيادة مستويات الـp53 لايعني بالضرورة زيادة مستويات الـMDM2 وذلك لأن زيادة مستويات الـp53 يجب أن ترافقها تعديلات أخرى على البروتين مثل الفسفرة والأستلة والغلركة كي يصبح البروتين جاهزاً لتفعيل نسخ بروتينات معينة مثل الـMDM2²²، واتفقنا مع Wang ومجموعته (2005)³⁷ وجود علاقة عكسية بين الـwtp53 والـMDM2 في خلايا سرطان الرئة. فقد حدث تراكم البروتين p53 السليم فقط في الخلايا المتكاثرة فقط، ونظراً إلى الخلايا القاعدية هي المتكاثرة

السليم من قبل الـ ATM والـ p53 يحفز الـ MDM2 الذي يقوم بتفعيل تدريجه ومن ثم نسبة وجودهما معاً عالية وأكبر من نسبة وجودهما المفرد. أما في مجموعة الخزعات السرطانية SCC فكانت نسبة فرط تعبيرية كل

الاستنتاج:

من البروتين MDM2 والبروتين ATM على حدة في مجموعة تراكم البروتين p53 أصغر منها في مجموعة عدم تراكم البروتين p53 وهذا الارتفاع في تعبيرية البروتين MDM2 يتوافق مع ما وجدته Landers ومجموعته (1997)³⁵ أن البروتين MDM2 سليم لكن الاضطراب يحدث على مستوى الـ mRNA الخاص به مما يزيد من نسخه، إلا أن هذه النتيجة تقتضي أن ينقص مستوى البروتين p53 لكن نتائجنا عللتها

References

- 1-Marron M; Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol* 2010;39:182-196.
- 2-Jemal A, Bray B, Melissa M. , Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global Cancer Statistics. Ca Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- 3-Neville et.al. *Epithelial pathology .Oral and Maxillofacial Pathology; 3^{ED} ed . USA :Saunders Elsevier; 2002:409-421.*
- 4-Eisold S, Linnebacher M, Ryschich E, Antolovic D, Hinz U, Klar E, Schmidt J. The effect of adenovirus expressing wild-type p53 on 5-fluorouracil chemosensitivity is related to p53 status in pancreatic cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2004;10(24):3583-3589.
- 5-Lentsch E.J, Myers J.N. pathogenesis and progression of squamous cell carcinoma of head and neck .Myers E.N, Suen J.Y, Hanna E. *Cancer of the Head and Neck. 4TH ed . USA: Saunders Elsevier; 2000:13.*
- 6-Stewart Z.A, Pietsenpol J.A. P53 Signaling And Cell Cycle Checkpoint ,invited review. *Chem Res Toxicol* 2001; 14(3): 243-263.
- 7- Crawford L. V, Pim D. C, Gurney E. G, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J. Detection of a common feature in several human tumor cell lines: A 53,000-dalton protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1981; 78, 41-45.
- 8- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nat* 1991;352: 345-347.
- 9- Oliner J. D, Pietsenpol J. A, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler K. W, and Vogelstein B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nat* 1993;362: 857-860.
- 10- Buschmann T, Adler V, Matusevich E, Fuchs S Y, Ronai Z . p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14ARF, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* 2000;60: 896-900.
- 11- Hecker D, Page G, Lohrum M, Weiland S, Scheidtmann K . Complex regulation of the DNA-binding activity of p53 by phosphorylation: Differential effects of individual phosphorylation sites on the interaction with different binding motifs. *Oncogene* 1996;12: 953-961.
- 12- Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson C.W, and Appella E. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase: Effect on Mdm2 binding. *J. Biol. Chem.* 2000;275: 9278-9283.
- 13- Kern S E, Kinzler K W, Bruskin A, Jarosz D, riedman P, Prives C, and Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991;252: 1708-1710.
- 14- Pietsenpol J A, Tokino T, El-Deiry W S, Kinzler K W, and Vogelstein B. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 1998-2002.
- 15- Bode A.M , Dong Z. Post Translational Modification Of P53 In Tumorigenesis . *Nature* 2004; 4: 793-805.
- 16- Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer, *Oral Oncol* 2003;39:222-231.
- 17- Vogelstein B, Lane D, Levine A.J. Surfing the p53 network. *Macmillan Magazines Ltd* 2000; 408:307-310.

- 18- Hassan N.M.M, Tada M, Hamada J.I, Kashiwazak H, Kameyama T, Akhter R, Yamazaki Y, Yano M, Inoue N, Moriuchi T. Presence of dominant negative mutation of TP53 is a risk Of early recurrence in oral cancer. *Cancer Letters* 2008 ; 270:108-119.
- 19-Cook A , Milner J. Evidence for allosteric variants of wild-type p53, a tumour suppressor protein. *Br. J. Cancer*1990; 61: 548- 552.
- 20- Wang P.L, Sait F, Winter G. The `wildtype` conformation of p53: epitope mapping using hybrid proteins; *Oncogene* 2001; 20: 2318– 2324.
- 21- Pedro A. Andrade Filho · Daisuke Ito ·Albert B. DeLeo · Robert L. Ferris. CD8+ T cell recognition of polymorphic wild-type sequence p53₆₅₋₇₃ peptides in squamous cell carcinoma of the head and neck: *Cancer Immunol Immunother Springer-Verlag* 2010;published online:25 june 2010, DOI 10.1007/s00262-010-0886-1.
- 22- Kubo Y, Murao K, Matsumoto K, and Arase S; Molecular carcinogenesis of squamous cell carcinomas of the skin. *J Med Invest* 2002; 49 :111-117.
- 23- Sakai E., Tsuchida N., Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes, *Oncogene* 1992;7: 927–933.
- 24- Balz V, Scheckenbach K, Götte Kl. Is the p53 Inactivation Frequency in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Underestimated: Analysis of p53 Exons 2-11 and Human Papillomavirus16/18 E6 Transcripts in 123 Unselected Tumor Specimens. *Cancer Res* 2003;63:1188-1191.
- 25- Yin X, Zhang H, Burrows F. Potent Activity of a Novel Dimeric Heat Shock Protein 90 Inhibitor against Head and Neck Squamous Cell Carcinoma In vitro and In vivo. *Clin Cancer Res* 2005;11:3889-3896.
- 26-Moustafa A.E, Foulkes W.D, Benlimame N, Wong A, Yen L, Bergeron J, Batist G, Alpert L, Alaoui-Jamal M.A: E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells;*Oncogene* 2004; 23: 350–358.
- 27- Kramata P, Lu Y.P, Lou Y.R, Singh R.N, Kwon SH.M, Conney A.H; Patches of Mutant p53-Immunoreactive Epidermal Cells Induced by Chronic UVB Irradiation Harbor the Same p53 Mutations as Squamous Cell Carcinomas in the Skin of Hairless SKH-1 Mice. *Cancer Res*, 2005; 65: 3577.
- 28- Ralhan R, Sandhya A, Meera M, Bohdan W, Nootan SH.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): 587-596.
- 29- He Y, Chen Q, Li B. ATM in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features: *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134(9):1013-1020.
- 30- Matsumura T, Yoshihama Y, Kimura T, Shintani S, Alcalde R.E. p53 and MDM2 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma; *Oncology* 1996;53:308-312.
- 31- Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Khademi H, Malekzadeh R, Moaven O, Memar B, A'rabi A , Abbaszadegan M.R. Rpl6^{INK4a1} hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma; *BMC Cancer* 2010, 10:138.
- 32- Huang J. SH, Ho T.J, Chiang CH.P. MDM2 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med*2001;30:53–8.
- 33- Valentin-Vega Y.A , Barboza J.A, Chau G, El-Naggar A.K, and Lozano G. High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. *Hum Pathol* 2007; 38(10) : 1553-1562 .
- 34- Chen Q, He Y, Wu LY, Li BQ. Role of ataxia telangiectasis mutated in the oncogenesis of oral squamous cell carcinoma; *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2008;26(1):90.
- 35- Landers J.E, Cassel S.L , George D.L. Translational Enhancement of mdm2 Oncogene Expression in Human Tumor Cells Containing a Stabilized Wild-Type p53 Protein. *Cancer Res* 1997;57:3562-3568.
- 36- Bolt J, Vo Q.N, Kim W.J, McWhorter A.J, Thomson J, Hagensee M.E, Friedlander P, Brown K.D , Gilbert J. The ATM/p53 pathway is commonly targeted for inactivation in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) by multiple molecular mechanisms. *Oral Oncol* 2005; 41: 1013–1020.
- 37- Wang Y.CH, Lin R.K, Tan Y.H, Chen J.T, Chen CH.Y . Wild-Type p53 Overexpression and Its Correlation WithMDM2 and p14ARF Alterations: An Alternative Pathway to Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23 (1) : 154-164.
- 38-An Q, Liu Y, Gao Y, Huang J, Fong X, Liu L, Zhang D, Zhang J,Cheng S .Deletion of tumor suppressor genes in Chinese non-small cell lung cancer. *Cancer Let* 2002 ;184:189–195.
- 39-Bakkenist, C. J. , Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421: 499–506.
- 40-Stommel J.M, Wahl G.M. Acceleratd MDM2 auto-degradation induced by DNA-damaged kinases is required for p53 activation . *EMBO J* 2004;23(7):1547-1556.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2011/3/23.

تاريخ قبوله للنشر 2011/6/27.