ارزش تشخیصی آنزیم تلومراز در اسمیر تهیه شده از بیماران جهت تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

دکتر ابوالفضل باقری*، دکتر بهنام اسلامی**، دکتر بهرام کاظمی***، دکتر محمد مشرف**، اذناله آذرگشب****، نسیم صبا*****

چکیده

سابقه و هدف: *کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) شایعترین بدخیمی حفره دهان است. در حال حاضر بهترین روش تشخیصی آن برداشت بیوپسی از بیمار است، گرچه در سالهای اخیر استفاده از روشهای غیرتهاجمی‌تر مانند Brush biopsy و سیتولوژی معمول شده است. بیشتر تومورهای بدخیم در انسان خصوصاً SCC دهان با تلومراز همراه بوده، رابطه مستقیمی بین بدخیمی و میزان بروز ژن hTERT وجود دارد. از ردیابی این ژن در اسمیر تهیه شده از سرطان سلولهای سنگفرشی دهان به عنوان یک روش تشخیصی کاملاً غیرمهاجم استفاده شده است. هدف این تحقیق تعیین میزان بروز ژن hTERT آنزیم تلومراز در SCC دهان و مقایسه آنها با سلولهای مخاطی نرمال بود.*

مواد و روشها: *این تحقیق یک کارآزمایی بالینی از نوع تشخیصی بود. از ۱۸ بیمار با بدخیمی OSCC در درجات مختلف و در محلهای مختلف دهان اسمیر تهیه و نمونه‌های کنترل نیز از ناحیه سالم مقابل ضایعه بدست آمدند. سپس میزان بروز ژن hTERT آنزیم تلومراز به دو روش Reverse Transcriptase - PCR و Nested PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی آماری از تست دقیق فیشر استفاده گردید.*

یافته‌ها: *از ۱۸ اسمیر تهیه شده از ناحیه ضایعه در ۸ مورد hTERT بروز پیدا کرد و در هیچ کدام از ۱۸ مورد نمونه کنترل، این ژن ردیابی نشد که این یافته از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۳). براساس نتایج حاصل، آزمون تلومراز از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار بود. اما موارد مثبت تشخیص داده شده توسط این آزمون با قاطعیت بیشتری به بیوپسی نیاز دارند.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به اینکه ارزش اخباری مثبت تست ۱۰۰ درصد بوده است موارد مثبت حاصل از این تست قطعاً سالم نیستند.*

کلید واژگان: *سرطان سلولهای سنگفرشی، آنزیم تلومراز، اسمیر*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/٤/۳ *تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۵/۱/۲۹* *تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۵/۲/۲*

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ویژه‌نامه (تشخیص – پاتولوژی) ۱۳۸۶، ۴۵۲-۴۴۵

مقدمه

Squamous cell carcinoma (SCC) شایعترین شکل سرطان دهان است که یکی از مشکلات جامعه بالای ۴۰ سال را تشکیل می‌دهد. در کشورهای توسعه یافته این سرطان ۳٪ کل سرطانهای بدن را شامل می‌شود(۱). از شیوع آن در ایران گزارش دقیقی در دست نیست، در حالی که در کشورهای افغانستان، پاکستان و هندوستان ۵۰٪ کل سرطانهای بدن را تشکیل می‌دهد(۲). منشاء این سرطان که شایعترین ضایعه بدخیم حفره دهانی است، سلولهای اسکواموس اپی‌تلیال

*نویسنده مسئول: استادیار گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان.E-mail: Abolfazl_bageri@yahoo.com

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

***دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

****مربی و مشاور پژوهشی، گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

*****کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان.

می‌باشد(۳). هم اکنون درمان این سرطان با همکاری متخصصین انکولوژی، جراحی، پرتودرمانی و پروتز امکان‌پذیر است(۴). بنابراین تشخیص زودهنگام و یافتن علل ایجاد این سرطان می‌تواند عامل مهمی در کاهش مرگ و میر ناشی از آن باشد(۵،۶).

امروزه برای تشخیص این سرطان، بیوپسی پروتکل اصلی محسوب می‌شود(۱). از آنجا که بیوپسی می‌تواند عامل متاستاز بوده و مشکلات زیادی در موارد نقص ایمنی بوجود آورد(۷)، روشهای دیگری مانند بررسی میکروسکوپی اسمیر بعنوان روش جایگزین پیشنهاد شده‌اند. از طرف دیگر بررسی میکروسکوپی اسمیر با ۳۷٪ جواب منفی کاذب، در حال حاضر روش مناسبی محسوب نمی‌شود(۴).

یکی از بیومارکرهای سرطان که امروزه بسیار مورد توجه است، فعالیت آنزیم تلومراز است(۶،۸). در سالهای اخیر در بعضی سرطانها تحقیقاتی با استفاده از روشهای سیتولوژیک به همراه روشهای مولکولی RT-PCR (Reverse - Transcriptase) و Nested PCR (روشی که در آن از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود و جفت دوم در دل جفت اول جای می‌گیرد) برای بررسی میزان فعالیت آنزیم تلومراز به منظور کاهش استفاده از روشهای تهاجمی (aggressive) و بیوپسی صورت گرفته‌اند (۱۲-۹).

این تحقیق با هدف کلی تعیین ارزش تشخیصی فعالیت آنزیم تلومراز در اسمیر تهیه شده از کارسینوم سلولهای سنگفرشی دهان، اهداف دیگری را نیز در بر می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به تعیین موارد مثبت و منفی از طریق بیوپسی به عنوان Golden استاندارد و مقایسه آن با اسمیر برای سنجش Sensitivity و Specificity اسمیر، همچنین تعیین موارد مثبت و منفی (سرطانی و سالم) در مقایسه فعالیت آنزیم تلومراز و بروز hTERT در آنها اشاره کرد.

مواد و روشها

این تحقیق یک کارآزمایی بالینی از نوع تشخیصی (Diagnostic clinical Trial) بود که در آن نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند. تکنیک مطالعه استخراج RNA به روش RT-PCR و ردیابی ژن hTERT-mRNA به روش Nested PCR از اسمیر بافت سرطانی و بافت سالم طرف مقابل بود. جامعه مورد مطالعه، ۱۸ بیمار (۹ نفر مونث و ۹ نفر مذکر) با طیف سنی ۳۴ تا ۹۰ سال مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی دهان مراجعه کننده به بیمارستان‌های طالقانی، شریعتی و انستیتو کانسر بودند. در این تحقیق بیشتر از تومورهایی که در مراحل مختلف از grade و stage بدخیمی بودند، استفاده شد. برای نمونه‌گیری، ابتدا از بیمار درخواست می‌شد تا مقداری سرم فیزیولوژی را غرغره کند تا محیط از دبری‌های غذایی و آلودگی پاک شود. در مرحله بعد توسط دو اسپاتول فلزی از روی ناحیه مبتلا و ناحیه سالم طرف مقابل ضایعه، اسمیر تهیه شد. به این شکل که لبه اسپاتول با زاویه ۴۵ درجه کنار بافت قرار گرفته، ۳ تا ۴ مرتبه به عرض ۲-۱ سانتی متر روی بافت کشیده شد. به این ترتیب کوچکترین آسیب یا خونریزی به بیمار وارد نشد. سلول و مواد جمع شده روی لبه اسپاتول با سرم فیزیولوژی داخل لوله ۱/۵cc شسته شد. به دو دلیل ابتدا از ناحیه سالم اسمیر تهیه شد: اول اینکه بیمار از بی‌خطر بودن روش مطمئن می‌شد. دیگر اینکه از آلودگی نمونه کنترل اجتناب می‌گردید. پس از چسباندن برچسب روی لوله نمونه، به بیمار مجدداً سرم نرمال سالین داده شد تا غرغره کند. سپس بلافاصله نمونه‌ها به مرکز تحقیقات منتقل و در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- قرار گرفتند.

به این ترتیب ۳۶ نمونه که ۱۸ مورد آن اسمیر بافت سرطانی و ۱۸ مورد اسمیر بافت سالم طرف مقابل بودند، در فاصله زمانی ۸ ماه جمع‌آوری شدند. در این فاصله نتیجه بیوپسی بیماران تا مرحله گزارش نهایی پاتولوژی پیگیری و grade، stage و اطلاعات دیگر ثبت و نگهداری شدند.

آنزیم تلومراز از آنزیم‌های مهم در تکثیر و تقسیم سلولی بوده، از ساب‌یونیت‌های مختلف تشکیل شده است که هر کدام نقشی در تنظیم تکثیر سلولی برعهده دارند. ساب‌یونیت بکار رفته در این تحقیق hTERT بود که قبلاً پرایمرهای مربوط به آن براساس نوع پروتکل طراحی و آماده شده بودند.

برای بررسی فعالیت تلومراز باید mRNA آنزیم بررسی شود. برای انجام PCR رشته هدف باید DNA باشد. این توانایی با استفاده از ویژگی آنزیمی نسخه‌بردار معکوس که قادر است از روی رشته RNA، DNA سنتز کند، حاصل می‌شود. آنزیم RT از روی رشته RNA یک رشته DNA سنتز می‌کند که به آن اصطلاحاً cDNA یا complementary DNA می‌گویند.

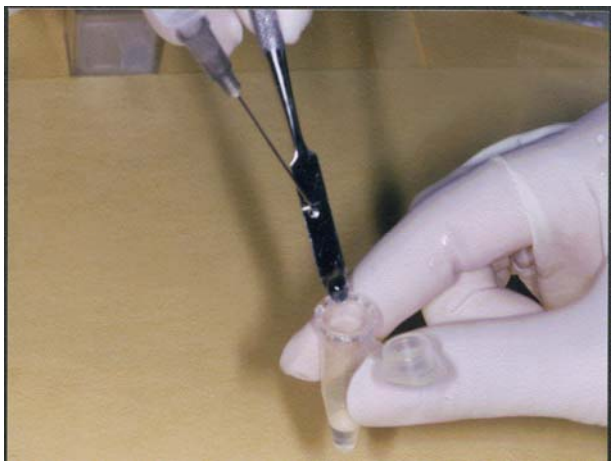
برای استخراج RNA میکروتیوب حاوی نمونه در مدت ۳ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. فاز بالایی دور ریخته شد و به فاز پایینی ۲۰۰ µl از بافر RNA × Plus افزوده و بعد از مدت ۲ دقیقه ۵۰ µl کلروفرم اضافه شد. این محلول مجدداً ۲ دقیقه در محیط آزمایشگاه انکوبه شد. محلول در دمای ۴ °C با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. این بار فاز بالایی به یک میکروتیوب جدید منتقل و معادل آن، حدود ۳۰۰ µl الکل مطلق اضافه و با وارونه کردن میکروتیوب محلول کاملاً همگن شد. بار دیگر میکروتیوب در دمای ۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل ۱۰۰ µl الکل ۷۰٪ افزوده و خوب تکان داده شد تا رسوب حل گردد. این کار جهت شستشوی بیشتر انجام شد. مجدداً میکروتیوب با دور ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴ °C به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. این بار رسوب حاصل RNA بود. فاز رویی دور ریخته شده و میکروتیوب به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. سپس به آن ۲۰ µl DEPC water اضافه شد تا برای انجام واکنش RT آماده گردد. توالی پرایمرهایی که بصورت Nested PCR مورد استفاده قرار گرفتند، به شرح زیر است:

Telo 1F 5’ –ACC ACG TTT CAA AAG AAC AG– 3’
Telo 1R 5’– TTT CTC TGC G GA ACG TTG TG – 3’
250 bp

Telo2F 5’ – CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3’
Telo2R 5’ – GGA TGA AGC GGA GTC TGG A – 3’
144bp

برای تهیه cDNA، RNA حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفته، روی یخ منتقل شد. سپس در یک لوله جدید، RNA به میزان یک میکروگرم، dNTP به میزان ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر اختصاصی به میزان ۴۰pmol، 5xRF Buffer به میزان ۶ میکرولیتر، Reverse Transcriptase به میزان ۱۰۰ واحد و آب DEPC به میزان ۳۰ میکرولیتر مخلوط شدند. لوله حاصل، سانتریفوژ و فاز رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل یک ساعت در بن ماری ۴۲ °C قرار گرفت. سپس روی یخ منتقل شد. cDNA ساخته شده در این مرحله آماده PCR بود.

شکل ۱- تهیه اسمیر از ناحیه مبتلا به SCC



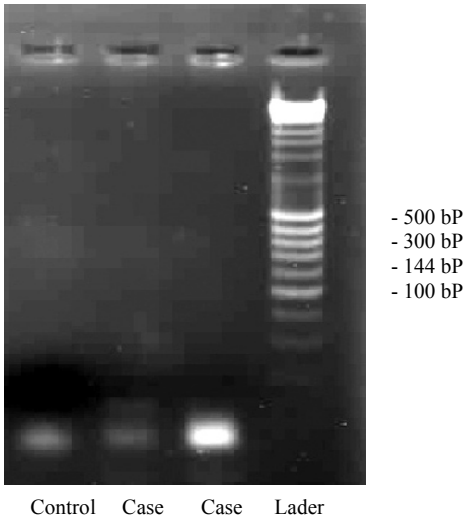
شکل ۲- شستشوی اسمیر تهیه شده به داخل لوله ۱/۵cc

برای انجام PCR، cDNA ساخته شده به یک لوله جدید منتقل شد تا بعنوان DNA الگو برای تکثیر قطعه مورد نظر عمل کند. از پرایمرهای اختصاصی که پیشتر شرح آنها گذشت، در این واکنش شرکت داشتند. مخلوط PCR شامل ترکیبات cDNA، 10xPCR Buffer، dNTP، Primer (F and R)، Mgcl2، Taq DNA Polymerase و DW (deionized water) بود، در دستگاه ترموسیکلر (Primus) قرار گرفت.

برنامه PCR برای ۳۰ سیکل بصورت زیر تنظیم شد:

۵ دقیقه	۹۴ $^{\circ}$ C
۳۰ ثانیه	۹۴ $^{\circ}$ C
۳۰ ثانیه	۵۰ $^{\circ}$ C
۳۰ ثانیه	۷۲ $^{\circ}$ C
۵ دقیقه	۷۲ $^{\circ}$ C

بطور کلی Nested PCR برای بالا بردن حساسیت PCR استفاده می‌شود. از محصول PCR اول بعنوان الگو برای PCR دوم استفاده شد و پرایمرهایی که توالی کوتاهتری از PCR اول دارند، تکثیر شد. برای انجام این مرحله، مواد PCR product، 10xBuffer، dNTP، Primer (F' and R')، Mgcl2، Taq DNA Polymerase و DW (deionized water) در یک میکروتیوب جدید مخلوط و در دستگاه ترموسیکلر قرار گرفت. برنامه PCR برای ۳۰ سیکل بصورت قبل تنظیم شد.



شکل ۳ - الکترفورز محصول ۱٤٤bP PCR در ژل آگارز ۳٪

برای مشاهده محصول PCR از ژل آگارز ۳٪ برای الکتروفورز استفاده شد. آگارز پلی ساکاریدی از واحدهای تکرارشوندهٔ آرابینوز دی ساکارید است که با حل کردن پودر آگارز در بافر 1xTBE (Tris – BoricAcid – EATA) و کمی حرارت بدست می‌آید. برای رنگ‌آمیزی این ژل از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده شد و با نور UV در 254nm با دستگاه UV Transilliminator مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR در این تحقیق برابر 144bp شد. برای آزمون آماری از تست دقیق فیشر استفاده گردید.

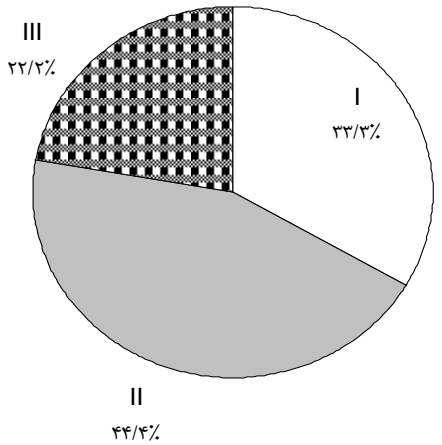
یافته‌ها

از ۲۱ بیمار بیوپسی شده با ضایعه مشکوک ۱ مورد موکو اپی درموئید کارسینوما و ۲ مورد لیکن پلان تشخیص داده شد. بنابراین ۳ مورد به دلیل تشخیص ضایعه‌ای بجزء SCC از نمونه‌ها خارج شدند. ۱۸ مورد باقی مانده توسط بیوپسی به عنوان squamous cell carcinoma (Golden standard) تشخیص و تأیید گردید. در بررسی این ۱۸ مورد اسمیر تهیه شده از ناحیه ضایعه، ۸ مورد hTERT آنزیم تلومراز مثبت با حساسیت (sensitivity) ۴۴/۴٪ و تمام اسمیرهای تهیه شده از ناحیه سالم مقابل ضایعه hTERT آنزیم تلومراز منفی با اختصاصیت (specificity) ۱۰۰٪ ارزیابی شد.

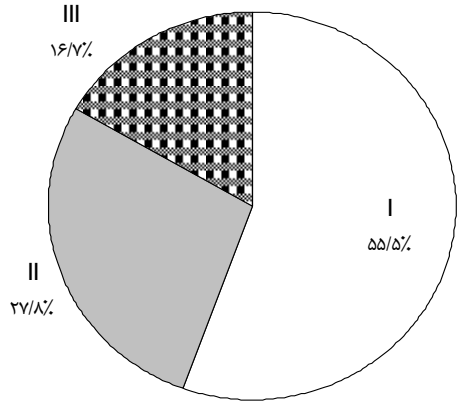
از این بیماران ۷ مورد SCC مربوط به زبان، ۳ مورد لب پایین، ۳ مورد کف دهان، ۳ مورد گونه، ۱ مورد کام و ۱ مورد روی ریج آلوئول قرار داشتند. از نظر Stage کلینیکی که برای بیماران قبل از جراحی توسط جراح مربوطه براساس سیستم TNM تهیه شده بود ۶ نفر از بیماران در stage I قرار داشتند. ۸ مورد stage II و ۴ مورد stage III بودند (نمودار ۱). از نظر grade ضایعه، ۱۰ مورد از بیماران grade I، ۵ مورد grade II و ۳ مورد grade III که grade ضایعه بعد از جراحی توسط پاتولوژیست مربوطه براساس آخرین معیارهای هیستوپاتولوژی تعیین می‌شد (نمودار ۲).

در این مرحله، ۸ مورد از بیماران سرطانی فعالیت آنزیم تلومراز مثبت بودند که براساس تست دقیق فیشر کاملاً معنی‌دار بود

(P<۰/۰۰۳). با توجه به اینکه اساس روش تهیه نمونه‌ها روی سادگی و راحتی بیماران گذاشته شده، تا در آینده به تمام بیمارانی که زخم مشکوک در دهان دارند و انجام بیوپسی در آن مرحله مشکلات خاص خود را دارد، عمومیت دهیم، مثبت شدن این تعداد بسیار جالب بود. در واقع با انجام این تست بر روی بیماران، در صورت مثبت شدن می‌توان بیوپسی‌های بعدی را با اطمینان بیشتری تجویز کرد و یا در صورت منفی شدن، بیمار را به سمت درمان‌های راحت‌تری هدایت کرد مگر اینکه خلاف این ثابت شود.



نمودار ۱ – توزیع فراوانی stage بیماران مبتلا به سرطان سلولهای سنگفرشی دهان مراجعه کننده به بیمارستان‌های طالقانی و شریعتی در سال ۸۲-۸۱



نمودار ۲ – توزیع فراوانی grade بیماران مبتلا به سرطان سلولهای سنگفرشی دهان مراجعه کننده به بیمارستان‌های طالقانی و شریعتی در سال ۸۲-۸۱

درصد ژن hTERT – mRNA بیان شده در نمونه‌های بافت سرطانی بیشتر از بافت سالم بود (۴۴/۴ درصد در مقابل صفر درصد). اختلاف آماری معنی‌دار از نظر درصد بیان ژن در نمونه‌های سالم و سرطانی مشاهده شد (P<۰/۰۰۳).

بحث

تلومراز یک آنزیم ریبونوکلئوپروتئین است که با استفاده از RNA خود به عنوان الگو، نوکلئوتیدهای تکراری TTAGGG را به انتهای 3' تلومر اضافه می‌کند. به این ترتیب، کاهش طول تلومر طی چرخه تکثیر سلول جبران می‌شود. این آنزیم به عنوان یک بیومارکر در سرطانها مطرح است. در سلولهای سرطانی این آنزیم به مقدار زیادی فعال باقی مانده و مانع آپوپتوزیس سلول پس از چند تقسیم متوالی می‌شود. تحقیقات زیادی در مورد نوع فعالیت و مقدار فعالیت این آنزیم به روشهای مختلف توسط محققین انجام شده است و ارتباط معنی‌داری بین فعالیت این آنزیم و کارسینوژنزیس گزارش شده است. این آنزیم از اجزای مختلفی تشکیل شده است. hTERT یکی از اجزای تلومراز است که با استفاده از الگوی RNA موجود در آنزیم و الگوی hTR بازهای TTAGGG را به تلومر اضافه می‌کند. hTR جزء دیگر تلومراز است که الگویی برای hTERT است و TP1 آخرین جزء تلومراز که فعالیت و نقش آن خیلی معلوم نیست(۶،۵). در نهایت اعتقاد اکثر محققین این است که تلومراز یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین است که با فناناپذیری و تغییر شکل نئوپلاستیک همراه است به طوری که تقریباً در همه تیپ‌های سرطان این آنزیم دوباره فعال می‌شود و طول تلومر را ثبات می‌بخشد. همچنانکه در بازنگری منابع اشاره شد برای بررسی این آنزیم و فعالیت و مقدار بروز آن از روشهای مختلفی استفاده شده است. عمده تحقیقات بر روی بیوپسی‌های به عمل آمده و بلوکهای پارافینی که سلول به اندازه کافی داشتند انجام شده است و

هدف اصلی هم ردیابی خود تلومراز و تفاوت آن در سلولهای بدخیم و سالم بود. اکثر محققین در سلولهای سرطانی و پیش سرطانی و سالم فعالیت تلومراز را سنجیده اند و به ارتباط معنی‌داری در مورد فعالیت این آنزیم در حالتهای مختلف سلولی و یا در مراحل مختلف کارسینوژنزیس رسیده‌اند – و یا عده‌ای اثرات داروهای مختلف را روی این آنزیم مورد بررسی قرار داده‌اند و دریافتند که بعضی از داروها می‌توانند باعث توقف و یا غیرفعال شدن آنزیم شده و می‌تواند یکی از راه کارها در درمان سرطان باشد(۱۱،۱۳،۱۴). هدف اصلی محققین حاضر، فعال بودن و یا نبودن تلومراز در نمونه‌های اسمیر بیماران سرطانی نیست، این مسئله تا حد زیادی در اکثر تحقیقات ثابت شده است. هدف اصلی کار ما استفاده از این بیومارکر در تشخیص OSCC در مراحل اولیه، با راحت‌ترین روش ممکن می‌باشد. روش کار ما دو تفاوت عمده با تحقیقات قبلی دارد یکی اینکه بر روی اسمیر تهیه شده از بافت سرطانی قبل از اینکه بیمار متحمل جراحی و بیوپسی شود انجام می‌گیرد یعنی در واقع، راحت‌ترین روش برای رسیدن به تشخیص انتخاب شده است که در تحقیقات قبلی بر روی بیوپسی و بلوکهای پارافینی و یا کشت سلولی این کار انجام شده – دوم اینکه نتایج تحقیق نشان داد که فعالیت تلومراز بر روی همین تعداد کم سلول نیز قابل ردیابی است و ثابت شد که این روش می‌تواند یک روش تشخیصی غربالگری مفیدی قبل از تهیه بیوپسی باشد.

در مجموع از ۳۶ اسمیر تهیه شده از ۱۸ بیمار یعنی ۱۸ مورد اسمیر از ناحیه ضایعه و ۱۸ مورد اسمیر از بافت سالم طرف مقابل بدست آمد و کارهای لابراتواری RT-PCR و Nested PCR در نمونه‌ها براساس پروتکل طراحی شده انجام شد که ۸ مورد از اسمیرهای بدست آمده از ضایعه تلومراز مثبت بودند و هیچ کدام از نمونه‌های طرف سالم از نظر کلینیکی، مثبت نبودند یعنی ۴۴/۴٪ مثبت و ۵۵/۶٪ منفی در مورد casehaها (ضایعات سرطانی) در مقابل صفر٪ مثبت و ۱۰۰٪ منفی در مورد کنترلها ارزیابی شد که با انجام تست دقیق فیشر با P<۰/۰۰۳ نشان داده شد که از نظر آماری کاملاً معنی‌دار است.

در سال ۱۹۹۸، Sumidu و همکاران در ژاپن روی ۲۹ ضایعه بدخیم مختلف به روش بیوپسی و در سال ۲۰۰۱، MG Downey و همکاران روی ۴۸ مورد OSCC از آرشیو بلوکهای پارافینی این کار را انجام داده بودند که ارتباط آماری معنی‌داری بین فعالیت آنزیم تلومراز و سرطان دهان بدست آوردند که در مقایسه با تحقیق حاضر آنهم به روش تهیه اسمیر با کمترین سلول و بدون هیچ گونه آسیب به بیمار نتایج مثبت بدست آمد که با آن تحقیقات کاملاً مشابهت دارد(۱۱).

در رابطه با توزیع stage بیماران ۶ مورد در stage I قرار داشته (۳۳/۳٪) و ۸ مورد در stage II (۴۴/۴٪) و ۴ مورد در stage III بودند. توزیع stage کلینیکی نامتقارن بوده و رابطه‌ای هم با فعالیت تلومراز نداشت. ۴ مورد از بیماران با فعالیت تلومراز مثبت در stage II قرار داشته و ۲ مورد در stage I و دو مورد stage III که از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین stage کلینیکی و فعالیت تلومراز یافت نشد. البته برای بدست آوردن رابطه دقیق باید تعداد بیماران خیلی بیشتر باشد. در مقایسه با مطالعات Bu-Kyulee و همکاران در سال ۲۰۰۱ در آلمان بر روی ۴۲ بیمار که ۱۵ مورد در stage (I, II) و ۳۲ مورد در stage III, IV قرار داشتند. آنها نیز ارتباط معنی‌داری بین فعالیت تلومراز و مراحل مختلف stage بدست نیاوردند(۱۵).

در رابطهٔ با grade پاتولوژیک ۱۰ مورد از بیماران در grade I بودند (۵۵/۶٪) و ۵ مورد grade II (۲۷/۸٪)، ۳مورد grade III (۱۶/۷٪) و اما ۴ مورد از بیماران با فعالیت تلومراز مثبت را grade II، ۲ مورد را grade I و ۲ مورد را grade III تشکیل می‌دادند و رابطهٔ معنی‌داری بین فعالیت تلومراز و grade بیماری وجود نداشت. در مطالعهٔ Sumida و همکاران در ژاپن روی ۲۰ نمونه SCC که ۱۰ مورد grade I، ۶ مورد grade II و

۴ مورد grade III بودند و نیز مطالعات Bukeyulee و همکاران در آلمان روی ۴۲ بیمار که ۲ مورد grade I و ۲۸ مورد grade II و ۱۲ مورد grade III بودند ارتباط معنی‌داری بین مراحل مختلف grade و فعالیت تلومراز یافت نشد. البته مانند stage در اینجا نیز جهت ارتباط دقیق باید تعداد بیماران بیشتر باشد(۱۲،۱۶،۱۷).

در نهایت این تحقیق برای اولین بار فعالیت آنزیم تلومراز را در اسمیرهای تهیه شده از بیماران سرطان نشان داد که شاید در آینده بتوان از این روش بعنوان یک روش تشخیصی غیرمهاجم و سریع در نمونه‌های مشکوک برای غربالگری سرطان استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

با این روش می‌توان بیان ژن hTERT و فعالیت آنزیم تلومراز را بررسی کرد که در این تحقیق با ۴۴/۴٪ موارد مثبت در oral squamous cell carcinoma نسبت به عدم فعالیت در مورد کنترل ها ارزیابی شد. با توجه به اینکه ارزش اخباری مثبت تست ۱۰۰ درصد بوده است موارد مثبت حاصل از این تست قطعاً سالم نیستند.

References

1. Nevill WB, Damm DD: Oral and maxillofacial pathology. 2nd Ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2002;Chap10: 357.
2. Wood KN, Goaz WP: Differential Diagnosis of oral and maxillofacial lesions. 5th Ed. St. Louis: The CV Mosby Co. 1997;Chap22:474.
3. Regezi JA: Oral Pathology.4th Ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2003;Chaps2,18:52,509.
4. Rabbins SL: Basic Pathology. 7th Ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2003;Chap4,6:117,195.
5. Lodish H: Molecular Biology. 4th Ed. New York: Freeman. 2000;Chap3:285.
6. Snustad DP: Principles and genetics 2nd Ed. Scientific American Book 2000;Chap2:85.
7. Peterson CJ, Edward E, Hupp J, et al: Contemporary oral and maxillofacial surgery. 2nd Ed. St. Louis: The CV Mosby Co.Chap22:480-498.
8. Ito H, Kyo S, Kanaya T: Detection of human reverse transcriptase mRNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. Clin Cancer Res 1998;4:2807-10.
9. Muniyappa K, Kironmai KM: The telomere structure, replication and length maintainance, Critical Reviews In Biochemistry and Molecular biology; 1998;33:297-336.
10. Nijyama H, Mizumoto M, Ogawa T: Activation of telomerase and its diagnostic application in biopsy specimens from biliary tract neoplasms. Cancer 1999;5: 2138-43.
11. Sumida T, Sogawa K, Hamakawa K, Sugitan A, Tanioka H, Veda N: Detection of telomerase activity in oral lesions. J Oral Pathol Med 1998;27:111-115.
12. Scully C, Fieldjk JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. Oral Oncol 2000;36;311-27.
13. Ueno T, Takahashi H, Oda M, Mizunuma M, Yakoyma A: Inhibition of human telomerase by Rubromycin. Biochemistry 2000;23:5995– 6002.

14. Preisle HD, Li B, Yang BL: Suppression of telomerase activity and cytakine m - RNA levels in acute myelogenic leukemia cells in viro in patients by Amifostine and Interlukine 4. Clin Cancer Res 2000;6:807–12.
15. BU – Kyulee: Diagnostic and prognostic relevance of expression of human telomerase subunits in oral cancer. Int J Oncol 2001;19:1063-1068.
16. Cressey TR, T Lby MJ, Newell DR. Decreased telomerase activity is not a reliable indicator of chemosensitivity in testicular cancer cell lines. Eur J Cancer 2002;38:586-93.
17. Rayband H, Odin G, Fafet A: Genic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas. Pathol Biol (Paris) 2003;51:176-84.