

## دراسة مناعية كيميائية ترافعية لتعبيرية البروتين p21 في بعض أورام الغدد اللعابية

د. حبيب السلوم<sup>1</sup>

<sup>1</sup> مدرس- قسم التشريح المرضي- كلية طب الأسنان-جامعة الرشيد الدولية الخاصة للعلوم والتكنولوجيا.

### الملخص:

**خلفية البحث وهدفه:** تلعب الأورام دوراً مؤثراً على حياة الإنسان مما يتوجب تحريها وتشخيصها مبكراً لنستطيع تجنبها والحصول على العلاج المناسب لها، مما يعطي المريض فرص جيدة للشفاء والبقاء على قيد الحياة. هدف البحث لتوصيف التغيير في التعبير المناعي للبروتين p21 في بعض أورام الغدد اللعابية السليمة والخبيثة. مواد البحث وطرقه: درست حالات مجموعة من المرضى المصابين بأورام الغدد اللعابية (50 حالة) والمسجلة في أرشيف مخابر أقسام التشريح المرضي بين أعوام (2013-2017) في مشافي: مشفى جراحة الوجه والفكين في كلية طب الأسنان جامعة دمشق، مشفى ابن النفيس ومشفى المجتهد في دمشق، وقد اشتملت العينة على (24) ورم غدي سليم و (26) ورم غدي خبيث ولونت بالملون المناعي (p21). **النتائج:** بينت الدراسة ان ايجابية تعبيرية البروتين p21 كانت أعلى في عينات الأورام الخبيثة بمتوسط قدره (76.2%) مقارنة مع ايجابية تعبيرية البروتين p21 في عينات الأورام السليمة (22.2%). **الاستنتاجات:** أظهرت الدراسة اختلاف في تعبيرية البروتين p21 ما بين أورام الغدد اللعابية السليمة وأورام الغدد اللعابية الخبيثة. **الكلمات المفتاحية:** أورام الغدد اللعابية، البروتين p21، البروتين p53.

تاريخ القبول: 2023/8/20

تاريخ الإيداع: 2023/5/23

حقوق النشر: جامعة دمشق - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب CC BY-NC-SA

ISSN: 2789-7214 (online)

<http://journal.damascusuniversity.edu.sy>



## A Retrospective Immunohistochemistry Study of P21 Protein Expression in Some Salivary Gland Tumors

Dr. Habib Salloum<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lectuer. Department Histopathology, Al Rasheed International Private University for Science &Technology.

### Abstract:

**Background:** tumors play a great influence on human life for that it must be investigated and diagnosed early, "to be able to avoid them and have appropriate treatment to it, giving the patient good chances of cure and survival

**Target:** Our study aimed to describe the change in the expression of the immune protein p21 in tumors of the salivary glands

**Materials research:** Pathology laboratory reports of patients suffering from salivary gland tumors retrieved from oral pathology lab in three hospitals: the oral and Maxillofacial surgery Hospital at the Faculty of Dentistry of Damascus University, the Ibn Al-Nafees Hospital and the Al-Mujtahid Hospital in Damascus during the period (2013-2017) were studied .

The sample included (24) glandular benign tumors and (26) glandular malignant tumors.

**Results:** positive expression of p21 in samples of benign tumors had an average of (22.2%), while the positive expression of p21 in samples of malignant tumors was (76.2%).

**Conclusion:** our data indicates the difference in p21 protein expression between benign tumors of the salivary glands and malignant tumors of the salivary glands.

**Keywords:** Salivary Gland Tumors, P21 Protein, P53 Protein.



Submitted: 23/5/2023

Accepted: 20/8/2023

Copyright: Damascus University Syria.

The authors retain copyright under CC BY-NC-SA

**1. المقدمة (Introduction):**

تهدف دراستنا التي أجريت في كلية طب الأسنان - جامعة دمشق ما بين الأعوام (2014-2018) إلى تقييم التعبير المناعي للبروتين p21 في بعض أورام الغدد اللمفاوية السليمة والخبيثة.

**2. الدراسات المرجعية (Review Literature):**

تمثل أورام الغدد اللمفاوية أقل من 2% من جميع أنواع الأورام وهناك قلة في المعلومات المتاحة بشأن الأحداث الجزيئية التي وقعت في هذه الأورام، و 5% من الأورام التشنؤية في الرأس والعنق (Regezi et al., 2016).

تشكل أورام الغدد اللمفاوية مجموعة واسعة من الأمراض مترافقة بتغيرات مورفولوجية واضطرابات بالسلوك البيولوجي وبسبب طبيعتها النادرة وغير المتجانسة، فإن هذه الأورام غالباً ما تقدم صعوبات تشخيصية وعلاجية وإن آليات تكون الورم وتطور الورم ما تزال غير واضحة (Nagao et al., 2012).

يُعتقد أنّ التطور السريري والإنذار النهائي للكثير من المرضى الذين يعانون من أورام الغدد اللمفاوية لا يمكن التنبؤ به بشكل موثوق على أساس الميزات الشكلية النسيجية لذلك من المُفضّل بشكل كبير العثور على علامات تشخيصية جديدة تهدف إلى تحسين التنبؤ بعدوانية وإنذار الورم (Nagler et al., 2003).

يعتبر البروتين (P21) منتجاً جينياً من المورثة (p21WAF1/CIP1)، والتي تلعب دوراً هاماً في تنظيم الانتقال (G1-S) في دورة حياة الخلية (Chung et al., 2008) وفي حال تعرض (DNA) للتلّف، يتراكم البروتين (p53) في النواة ويفعل مورثات (p21WAF1/CIP1) والتي بدورها تقوم بتنشيط نشاط معقدات الشيكلين لمنع تقدم دورة الخلية (Huo et al., 2004) (Li et al., 1994) (Giordano et al., 2017).

ذكرت دراسات عديدة وظائف أخرى للبروتين (P21) بحسب موقعه ضمن الخلية بحيث يمكن له أن يسهل تجميع

(cyclinD) مع (CDK) وبالتالي تسهيل إكمال الخلية لدورة حياتها والهروب من الموت الخلوي المبرمج وكل ذلك عندما يكون هيولياً بالإضافة لدوره في تنظيم حركة الخلايا والحد من انتشارها (Coqueret, 2003).

بيّنت دراسة قام بها Adnan J وزملائه أنّ فقدان تعبيرية البروتين (p21) يلعب دوراً هاماً في عدوانية الورم وحجم الورم (Adnane et al., 2000).

تنظم مستويات البروتين (P21) من خلال مسارات معتمدة على البروتين (P53) ومسارات مستقلة عنه (Ng et al., 1999). تعتبر التعبيرية المناعية للبروتين (P21) معبرة عن الجين الطبيعي (P21) وهي بمثابة علامة مفيدة لتقييم وظيفته (Goan et al., 2005).

تختلف تعبيرية البروتين (P21) في مختلف أنواع الأورام الخبيثة (Huang and Tao, 2000).

خلصت دراسة قام بها Bassel Tarakji وزملائه إلى أنّ تعبيرية (P21) تزداد في الأورام الغدية الخبيثة مقارنة مع الأورام الغدية السليمة (Tarakji and Nassani, 2010).

قام Deguchi وزملائه بدراسة مناعية كيميائية، وقد لوحظ إيجابية التعبير للبروتين (p21) في (24%) من الأورام الغدية السليمة متعددة الأشكال، وفي (50%) من السرطان الخبيث للورم الحميد متعدد الأشكال (Deguchi et al., 1993).

خُصّنت دراسة إلى أنّ تثبيط البروتين (p53) والبروتين (p21) تلعب دوراً هاماً في تطور السرطان الناشئ في الورم الحميد متعدد الأشكال، وتعبيرية البروتين (P21) مستقلة عن تعبيرية البروتين (p53) في السرطان الناشئ في الورم الحميد متعدد الأشكال (Tarakji et al., 2012).

وجدت دراسة قام بها Affolter وزملائه على مجموعة من الأورام الحميدة والخبيثة في الغدد اللمفاوية أن كل الأورام الخبيثة كانت ذات إيجابية تعبيرية للبروتين (p21) (Affolter et al., 2005).

أظهرت دراسة قام بها Etemad-Moghadam وزملائه،

معنوية بين تعبيرية (P21) والدرجة النسيجية للورم ( Taghavi *et al.*, 2019).

كانت تعبيرية البروتين (P21) إيجابية في دراسة Goulart-Filho وزملائه والتي أجريت على (25) حالة من السرطان الغدي الكيسي في الغدد اللمفاوية الصغيرة لتقييم دور مسارات الموت الخلوي المبرمج والبلعمة الذاتية والشيخوخة (Goulart-Filho *et al.*, 2019).

### 3. المواد وطرق البحث ( Methods and Materials):

#### أولاً: عينات البحث:

تألفت عينة البحث من (50) خزعة ورمية مقسمة إلى مجموعتين:

- مجموعة أورام الغدد اللمفاوية السليمة وعددها (24) خزعة.
- مجموعة أورام الغدد اللمفاوية الخبيثة وعددها (26) خزعة. (جدول -1)

وأجريت على (35) حالة من السرطان الغدي المشبه بالبشري (MEC) لتحصي التعبير المناعي للبروتين (p21)، أن جميع العينات كانت إيجابية التعبير ونسبة تتراوح بين (8.6% و 22.9%) (Etemad-Moghadam *et al.*, 2007).

في دراسة قام بها Talaat لتقييم التعبير المناعي للبروتينات (p21/p53/p27)، على (15) مريض مصابين بالسرطان المخاطي المشبه بالبشري (7) حالات و السرطان الكيسي (8) حالات في الغدد اللمفاوية الصغيرة وارتباطها المحتمل مع درجات الخباثة النسيجية المرضية، كانت نسبة الإيجابية التعبيرية المناعية للبروتين (p21) (20%) (3 حالات/15 حالة)، و خلصت الدراسة أن الإيجابية التعبيرية للبروتين (p21) قد تكون العلامة الأكثر فائدة عند تقييمها مع الإيجابية التعبيرية للبروتين P53 في أورام الغدد اللمفاوية الخبيثة (Talaat, 2013).

في دراسة أخرى قام بها Marques وزملائه وأجريت لتقييم وربط التعبيرات المناعية للبروتينات (MDM2، P53، P21WAF1 وPAKT) على مجموعة من أورام الغدد اللمفاوية السليمة، كانت تعبيرية (MDM2 وPAKT) قوية وموجودة في جميع العينات، مع غياب كامل لتعبيرية (P21 وp53) (Marques *et al.*, 2008).

بينت نتائج دراسة قام بها de Lima و زملائه وأجريت لتقييم وربط التعبيرات المناعية للبروتينات (MDM2، P53، P21WAF1 وPAKT) في (22) حالة من السرطان الغدي الكيسي، أن تعبيرية البروتين (MDM2) كانت قوية وتعبيرية البروتينات (PAKT، P53) كانت ضعيفة، مع سلبية تامة لتعبيرية البروتين (P21WAF1) (de Lima *et al.*, 2009).

بينت نتائج دراسة قام بها TAGHAVI وزملائه وأجريت لتقييم وربط تعبيرية (P21) والدرجة النسيجية للورم كمؤشر تنبؤي رئيسي، أن تعبيرية البروتين (P21) قد تكون مؤشراً تنبؤياً مفيداً في السرطان الغدي الكيسي وقد لوحظ وجود علاقة عكسية

| مجموعة أورام الغدد اللعابية الخبيثة |                           |            |    |
|-------------------------------------|---------------------------|------------|----|
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>49  | 25 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>56  | 26 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | أنثى<br>39 | 27 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>37  | 28 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>46  | 29 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>46  | 30 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>49  | 31 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>44  | 32 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | أنثى<br>34 | 33 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>39  | 34 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>63  | 35 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>52  | 36 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة تحت الفك            | ذكر<br>71  | 37 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة تحت الفك            | أنثى<br>44 | 38 |
| Adenoid cystic carcinoma            | الغدة النكفية             | ذكر<br>73  | 39 |
| mucoepidermoid adeno carcinoma      | باطن الخد                 | أنثى<br>56 | 40 |
| Adenoid cystic carcinoma            | قبة الحنك الرخو           | ذكر<br>60  | 41 |
| mucoepidermoid carcinoma            | الغدة تحت الفك            | أنثى<br>45 | 42 |
| duct carcinoma                      | الغدة تحت الفك            | ذكر<br>56  | 43 |
| duct carcinoma                      | الغدة تحت الفك            | ذكر<br>40  | 44 |
| Adenocarcinom                       | الغدة تحت الفك            | أنثى<br>40 | 45 |
| Adenocarcinom                       | قبة الخنك                 | ذكر<br>65  | 46 |
| Adenoid cystic carcinoma            | الغدة تحت الفك            | أنثى<br>54 | 47 |
| Adenocarcinom                       | سنخ رحي اولي سفلية        | ذكر<br>60  | 48 |
| mucoepidermoid carcinoma            | منطقة الناب العلوي الأيسر | ذكر<br>48  | 49 |
| mucoepidermoid carcinoma            | قبة الحنك                 | ذكر<br>55  | 50 |

الجدول(1): يبين معلومات عن الخزعات المدروسة (التشخيص - مكان الإصابة - جنس المريض - عمر المريض - رقم الخزعة)

| رقم                                 | الجنس<br>العمر | مكان الإصابة         | التشخيص             |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|---------------------|
| مجموعة أورام الغدد اللعابية السليمة |                |                      |                     |
| 1                                   | ذكر<br>30      | الغدة تحت الفك       | warthin s tumor     |
| 2                                   | ذكر<br>39      | الغدة تحت الفك       | pleomorphic adenoma |
| 3                                   | ذكر<br>28      | الغدة النكفية        | warthin s tumor     |
| 4                                   | أنثى<br>40     | الغدة النكفية اليمنى | warthin s tumor     |
| 5                                   | أنثى<br>30     | الغدة النكفية اليسرى | pleomorphic adenoma |
| 6                                   | أنثى<br>26     | الغدة النكفية اليمنى | pleomorphic adenoma |
| 7                                   | أنثى<br>28     | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 8                                   | ذكر<br>43      | الغدة تحت الفك       | warthin s tumor     |
| 9                                   | أنثى<br>22     | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 10                                  | ذكر<br>32      | قبة الحنك            | pleomorphic adenoma |
| 11                                  | ذكر<br>27      | قبة الحنك            | pleomorphic adenoma |
| 12                                  | أنثى<br>29     | الفك العلوي          | pleomorphic adenoma |
| 13                                  | ذكر<br>30      | الغدة تحت الفك       | warthin s tumor     |
| 14                                  | أنثى<br>30     | الغدة تحت الفك       | warthin s tumor     |
| 15                                  | أنثى<br>22     | الغدة تحت الفك       | pleomorphic adenoma |
| 16                                  | ذكر<br>30      | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 17                                  | ذكر<br>42      | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 18                                  | ذكر<br>22      | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 19                                  | أنثى<br>24     | الغدة النكفية        | warthin s tumor     |
| 20                                  | أنثى<br>27     | كتلة داخل الفم       | pleomorphic adenoma |
| 21                                  | ذكر<br>47      | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 22                                  | ذكر<br>49      | الغدة النكفية        | warthin s tumor     |
| 23                                  | أنثى<br>50     | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |
| 24                                  | أنثى<br>46     | الغدة النكفية        | pleomorphic adenoma |

|                                     |      |      |     |    |
|-------------------------------------|------|------|-----|----|
| 15.2                                | 985  | 835  | 150 | 4  |
| 5.3                                 | 449  | 425  | 24  | 5  |
| 7.3                                 | 410  | 380  | 30  | 6  |
| 20.8                                | 524  | 415  | 109 | 7  |
| 12.2                                | 286  | 251  | 35  | 8  |
| 3                                   | 424  | 411  | 13  | 9  |
| 13.2                                | 311  | 270  | 41  | 10 |
| 20                                  | 219  | 175  | 44  | 11 |
| 51                                  | 290  | 142  | 148 | 12 |
| 81.5                                | 206  | 38   | 168 | 13 |
| 77.8                                | 225  | 50   | 175 | 14 |
| 17.9                                | 351  | 288  | 63  | 15 |
| 7.6                                 | 353  | 326  | 27  | 16 |
| 22.7                                | 273  | 211  | 62  | 17 |
| 9.4                                 | 1156 | 1047 | 109 | 18 |
| 8.9                                 | 1219 | 1110 | 109 | 19 |
| 24.1                                | 170  | 129  | 41  | 20 |
| 7.1                                 | 392  | 364  | 28  | 21 |
| 29                                  | 389  | 276  | 113 | 22 |
| 0.1                                 | 1126 | 1124 | 2   | 23 |
| 25.1                                | 466  | 349  | 117 | 24 |
| مجموعة أورام الغدد اللعابية الخبيثة |      |      |     |    |
| 96                                  | 1367 | 82   | 128 | 25 |
| 99.1                                | 1407 | 13   | 139 | 26 |
| 97.2                                | 1252 | 35   | 121 | 27 |
| 98.9                                | 539  | 6    | 533 | 28 |
| 98.6                                | 579  | 8    | 571 | 29 |
| 95.2                                | 1619 | 77   | 154 | 30 |
| 94.2                                | 656  | 38   | 618 | 31 |
| 97.8                                | 534  | 12   | 522 | 32 |
| 97.8                                | 818  | 18   | 800 | 33 |
| 96                                  | 602  | 24   | 578 | 34 |
| 98.8                                | 565  | 7    | 558 | 35 |
| 90.1                                | 684  | 68   | 616 | 36 |
| 94.5                                | 415  | 23   | 392 | 37 |
| 99.2                                | 473  | 4    | 469 | 38 |
| 75.6                                | 803  | 196  | 607 | 39 |
| 98                                  | 994  | 20   | 974 | 40 |
| 97.9                                | 967  | 20   | 947 | 41 |
| 99.6                                | 473  | 2    | 471 | 42 |
| 17.7                                | 682  | 561  | 121 | 43 |
| 11.4                                | 472  | 418  | 54  | 44 |
| 33.9                                | 62   | 41   | 21  | 45 |
| 20.9                                | 81   | 64   | 17  | 46 |
| 23.7                                | 160  | 122  | 38  | 47 |
| 76.3                                | 228  | 54   | 174 | 48 |
| 68.4                                | 323  | 102  | 221 | 49 |
| 8                                   | 274  | 252  | 22  | 50 |

تم اقتطاع (2) شرائح نسيجية من كل خزعة للقيام بعملية التلوين على الشكل التالي:

1- مجموعة الشرائح الملونة بالملون هيماتوكسيلين الأيوزين، (24) شريحة لأورام الغدد اللعابية السليمة، (26) شريحة لأورام الغدد اللعابية الخبيثة، وكان المجموع الكامل (50) شريحة.

2- مجموعة الشرائح الملونة بالملون المناعي P21 (24) شريحة لأورام الغدد اللعابية السليمة، (26) شريحة لأورام الغدد اللعابية الخبيثة، وكان المجموع الكامل (50) شريحة (مجموعة دراسة تعبيرية البروتين P21).

كان العدد الكامل للشرائح النسيجية المدروسة (100) شريحة نسيجية، واعتمدنا على الشرائح الملونة بالملون هيماتوكسيلين الأيوزين لتأكيد التشخيص النسيجي ولم يتم إدخالها في الدراسة الإحصائية.

#### طريقة العد وتفسير البيانات:

تم عد الخلايا ذات الايجابية النووية أو السيتوبلازمية في (4) ساحات عالية التكبير من كل محضر بالنسبة إلى عدد الخلايا الكلي، مع اختيار الساحات الغنية بالمكونات الغدية والتي لا يحتل النسيج الضام مساحات واسعة منها. وتم حساب النسبة المئوية للخلايا المتلونة من مجموع خلايا الورم كاملة عند التكبير  $\times 40$  (Deb-Joardar N et al., 2007).

من خلال قاعدة البيانات استطعنا الحصول على متوسط الايجابية التعبيرية للملون المناعي (P21) لكل مجموعة (أورام سليمة/أورام خبيثة)، واستطعنا من خلالها إجراء التحليل الإحصائية. (جدول -2)

الجدول(2): يبين قاعدة البيانات الخاصة بالملون المناعي P21 في كامل العينة.

| رقم                                 | عدد الخلايا الإيجابية (4 ساحات) | عدد الخلايا السلبية (4 ساحات) | عدد الخلايا الكلي (4 ساحات) | النسبة المئوية (الإيجابية التعبيرية) |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| مجموعة أورام الغدد اللعابية السليمة |                                 |                               |                             |                                      |
| 1                                   | 34                              | 295                           | 329                         | 10.3                                 |
| 2                                   | 88                              | 78                            | 166                         | 53                                   |
| 3                                   | 36                              | 284                           | 320                         | 11.3                                 |

## ثانياً: المواد والأجهزة المستخدمة في البحث:

### 1. مواد وأجهزة التلوين النسيجي التقليدي:

المبشرة النسيجية Microtome (LEICA RM، ألمانيا) لتقطيع  
السلاديات، كحليات متدرجة التركيز، كزيلول لإزالة  
البارافين، ملونا الهيماتوكسيلين والأيوزين، بلسم كندا، الماء  
المقطر، سواتر زجاجية لامات زجاجية عادية محم لإزالة  
البارافين، ورق نشاف، الماء العادي، سخان من نوع (LEICA  
، ألمانيا)، الايتانول النقي بتركيز 100%، والتجاري بتركيز  
95% و70% و50% قفازات، كامامات، ممص خاص  
بالتلوين المناعي من نوع (ependrof) مع رؤوس خاصة له،  
سلاديات خاصة تستخدم للتلوين المناعي، مجهر ضوئي ياباني  
الصنع من نوع NIKON للدراسة المجهرية.

### 2. مواد التلوين المناعي:

الأضداد الأولية وهي (ضد cam-ab: p21) من إنتاج شركة  
BIO SB الأمريكية المحاليل والكواشف من أجل التلوين المناعي  
من نوع EPITOMICS - الولايات المتحدة الأمريكية. (الصورة 1)



الصورة (1): الملون المناعي P21

وقد تطلب التلوين المناعي ما يلي:

الكزيلول، الايتانول بتركيز (100% - 95% - 70% - 50%)،  
المحلول الدائري للغسيل TBST جاهز للاستعمال دون تمديد  
بدرجة حموضة 7.6 من شركة Dako، المحلول المظهر  
للمستضد (ضمن كيت التلوين) الماء المقطر، مجموعة التلوين  
المناعي المفرد وتتضمن (بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3%،  
المحلول الدائري المغلق للمستقبلات، ممدد الضد الأولي)، ملون  
الهيماتوكسيلين، وسط حضن دائم.

### ثالثاً: الطرائق methods:

1- طريقة التلوين التقليدية بملون الهيماتوكسيلين - الأيوزين.

2- طريقة التلوين المناعي.

#### طريقة التلوين المناعي:

1- إزالة شمع البارافين (بعد التقطيع بالمبشرة النسيجية):

1-1- تسخين السلاديات في فرن بدرجة حرارة 65° لمدة ساعة  
واحدة.

1-2- إزالة الشمع والإمهاة باستخدام سلسلة من الحمامات  
تتضمن اثنان من الكزيلول (3 دقائق لكل واحد) ليتبع بحمامات  
من الإيتانول بتركيز 100% ليتبع بالإيتانول بتركيز 95%  
و70% و50% (3 دقائق لكل غسول) ليتبع بمحلول TBST  
(المحلول الدائري) ويتم رج السلاديات لمدة 3 دقائق.

2- مظهر المستضد: ينصح باستخدام الحرارة المظهرة  
للمستقبلات باستخدام المايكرويف.

1-2- تغمس السلاديات ضمن سلات التلوين الحاوية على  
المحلول المظهر للمستضد وتوضع ضمن المايكرويف.

2-2- تتم برمجة المايكرويف بدرجة حرارة 125° لمدة 30 ثانية  
لتتبع بدرجة حرارة 90° لمدة 10 ثواني.

2-3- ترك السلاديات لتبرد بدرجة حرارة الغرفة (من 10 حتى  
20 دقيقة).

2-4- تتم إزالة السلاديات وتغسل في TBST.



## 3-التلوين

- 1-3-تغسل السلايدات بال TBST لمدة 3 دقائق مع الرج.
- 2-3-يستخدم البيروكسيداز الداخلي من خلال تغطية النسيج ببيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% لمدة 5 دقائق.
- 3-3-تغسل السلايدات ثلاث مرات بالTBST (3 دقائق لكل مرة مع الرج).
- 4-3-يستخدم مغلق المستقبلات لمدة ساعة واحدة.
- 5-3-يتمدد الضد الأولي بممدد الضد الأولي حسب تعليمات الشركة المصنعة للضد كما يلي:  
بالنسبة لضد ال p21: يكون التركيز بنسبة 1\40.
- 6-3-يطبق الضد الأولي لكل مقطع وذلك باستخدام الممص من نوع (ependorf) ويحضن لمدة 24 ساعة في حجرة رطبة وبدرجة 4°.
- 7-3-تغسل السلايدات بال TBST (3دقائق لكل مرة مع الرج)
- 8-3-يطبق الضد المضاد والممدد في المحلول المغلق للمستقبلات بحسب تعليمات الشركة المنتجة، ويحضن لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.
- 9-3-تغسل السلايدات بال TBST (5دقائق لكل مرة مع الرج).
- 10-3-يطبق محلول ال DAB الممدد حديثاً لكل المقاطع ويبقى حتى يحصل التلوين عيانياً (والذي يكون عادة 10 ثواني).
- 11-3-تغسل المقاطع بالماء.
- 12-3-ثم يوضع الهيماتوكسيلين (10 ثوان عادة).
- 13-3-تغسل المقاطع بالماء.
- 14-3-تجفف المقاطع بوضعها بحمامين من الإيثانول بتركيز 100% (3دقائق لكل غسول) ليتبع بحمامين من الكزيلول (3دقائق لكل غسول).
- 15-3-يتم ستر السلايدات باستخدام وسط الحضان الدائم.  
الصور رقم (2-1)

## رابعاً: الدراسة النسيجية الروتينية:

تمت بعد الانتهاء من مراحل التلوين، وتكبير 40 بواسطة مجهر ضوئي خاص بالدراسة النسيجية.

## خامساً: الطرائق الإحصائية التي استخدمت في تحليل البيانات

استخدمنا لتحليل النتائج الاختبارات التالية:

1- اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة ( Independent T Test)

2- اختبار انوفا للعينات المستقلة (Anova Test)

3- اختبار Levene

احتوى التحليل الإحصائي على جداول بالإحصاءات الوصفية، وتمت معالجة البيانات باستخدام برنامج SPSS الإصدار 13.0 عند مستوى دلالة أصغر من 0.05 ومستوى ثقة 95%.

## 4- النتائج والمناقشة (Results and Discussion):

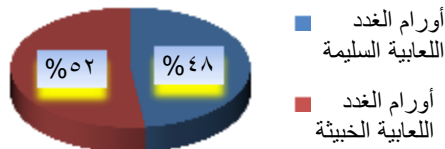
A. توزع المرضى في عينة البحث وفقاً للإصابة:

(جدول 3- و الشكل 1-)

الجدول(3): يبين توزع المرضى في عينة البحث

| الإصابة بأورام الغدد اللعابية | عدد المرضى | النسبة المئوية |
|-------------------------------|------------|----------------|
| أورام سليمة                   | 24         | 48%            |
| أورام خبيثة                   | 26         | 52%            |
| المجموع                       | 50         | 100%           |

## توزع المرضى في العينة



الشكل رقم (1): يبين النسبة المئوية لتوزع المرضى في عينة البحث



(عدد الخلايا ذات فرط تعبيرية البروتين P53 ÷ عدد الخلايا الكلي) × 100

أولاً: المعلومات الإحصائية الوصفية (جدول 5)

الجدول (5): يبين البيانات الإحصائية الوصفية في كل مجموعة وفي كامل العينة

| الانحراف المعياري | المتوسط      | العدد | الورم |                          |
|-------------------|--------------|-------|-------|--------------------------|
| 21.9749           | <u>22.24</u> | 24    | سليم  | فرط تعبيرية البروتين P21 |
| 33.09567          | <u>76.33</u> | 26    | خبيث  |                          |

ثانياً: دراسة تأثير نوع المحضر المدروس في نسبة تعبيرية

البروتين P21

نتائج تحليل T student للعينات المستقلة:

يبين الجدول (جدول 6) أن قيمة مستوى الدلالة أصغر من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق دالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين P53 ما بين مجموعة أورام الغدد اللعابية السليمة ومجموعة أورام الغدد اللعابية الخبيثة ضمن عينة البحث.

وبما إن الفروق الإحصائية تكون لصالح المتوسط الأعلى، نستنتج إن نسبة تعبيرية البروتين P21 تكون هي الأعلى في محضرات أورام الغدد اللعابية الخبيثة.

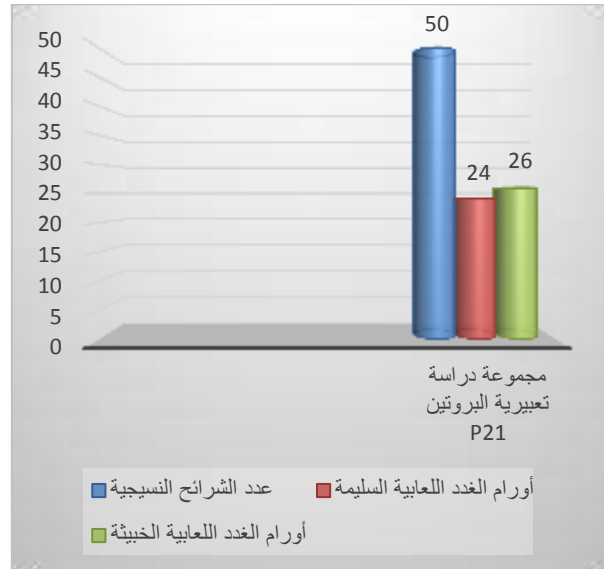
الجدول (6): نتائج تحليل T student للعينات المستقلة

| الفروق                 | مستوى الدلالة | الفرق بين الخطأين المعياريين | الفرق بين المتوسطين | قيمة T | الخطأ المعياري | الانحراف المعياري | المتوسط | العدد | نوع الخزعة  |
|------------------------|---------------|------------------------------|---------------------|--------|----------------|-------------------|---------|-------|-------------|
| توجد فروق دالة إحصائية | <u>.021</u>   | 7.87                         | -53.9               | -6.85  | 4.48           | 21.9              | 22.2    | 24    | أورام سليمة |
|                        |               |                              |                     |        | 6.47           | 33.0              | 76.2    | 26    | أورام خبيثة |

B. توزع الشرائح النسيجية في عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة المدروسة (جدول 4) و (الشكل 2-)

الجدول (4): يبين توزع الشرائح النسيجية في عينة البحث وفقاً لنوع الخزعة النسيجية

| الإيجابية التعبيرية للبروتين P21 |          |          |             |          |          |
|----------------------------------|----------|----------|-------------|----------|----------|
| النسبة المئوية                   |          |          | عدد الخزعات |          |          |
| المجموع                          | ورم سليم | ورم خبيث | المجموع     | ورم سليم | ورم خبيث |
| %100                             | %48      | %52      | 50          | 24       | 26       |



الشكل رقم (2): يبين النسبة المئوية لتوزع الشرائح النسيجية في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة ونوع الخزعة المدروسة

C. الدراسة الإحصائية التحليلية:

تم إحصاء أعداد الخلايا ذات فرط تعبيرية البروتين P21 وأعداد الخلايا السلبية في كل خزعة من مجموعة أورام الغدد اللعابية السليمة، وفي كل خزعة من مجموعة أورام الغدد اللعابية الخبيثة، ثم تم حساب النسبة المئوية لفرط تعبيرية البروتين P21 من خلال المعادلة التالية:  
نسبة الخلايا ذات فرط تعبيرية البروتين P21 في كل خزعة =

**نتائج تحليل Anova للعينات المستقلة:**

يبين الجدول (جدول -7) أنّ قيمة مستوى الدلالة أقل من 05.0 (توجد فروق معنوية) وبالتالي هناك ارتباط بين تعبيرية البروتين P21 وكون الورم سليم أو خبيث.

الجدول(7): نتائج تحليل Anova للعينات المستقلة

| مستوى الدلالة | F توزيع | المتوسط الحسابي | التابع المستقل        | التابع المتغير |
|---------------|---------|-----------------|-----------------------|----------------|
| .000          | 45.502  | 36387.360       | نوع الورم (سليم-خبيث) | الملون P21     |

**نتائج تحليل Levene:**

يبين الجدول (جدول -8) أنّ مستوى الدلالة أقل من 0.05، مما يدل على وجود عدم تجانس ما بين المجموعتين وبالتالي يوجد انحراف كبير أو اختلافات بالتباين ما بين المجموعتين.

الجدول (8): نتائج تحليل Levene

| مستوى الدلالة | df2 | df1 | F توزيع | الانحراف المعياري | المتوسط | العدد | الورم | التابع المتغير |
|---------------|-----|-----|---------|-------------------|---------|-------|-------|----------------|
| .021          | 48  | 1   | 5.698   | 21.97496          | 22.2    | 24    | سليم  | P21            |
|               |     |     |         | 33.09567          | 76.3    | 26    | خبيث  |                |

**المناقشة:**

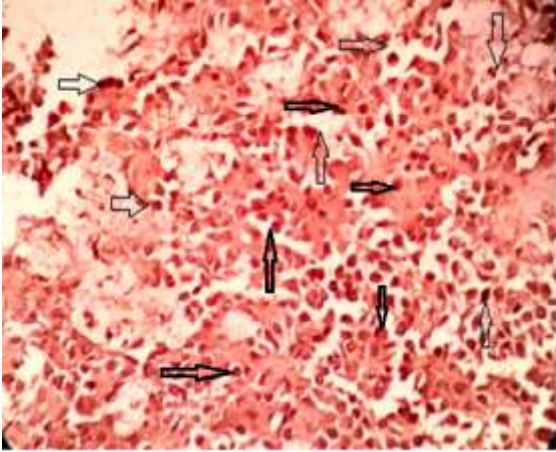
تم إجراء البحث بغرض تقييم التعبير المناعي للبروتين P21 في أورام الغدد اللمفاوية السليمة والخبيثة وذلك اعتماداً على البيولوجيا الجزيئية والتي قمنا بإجرائها مستخدمين الملون المظهر للبروتين P21 والذي يتدخل في تسهيل إكمال الخلية لدورة حياتها والهروب من الموت الخلوي المبرمج بالإضافة لدوره في تنظيم حركة الخلايا والحد من انتشارها.

ستتم المناقشة مع أبحاث أخرى قامت بدراسة التعبير المناعي لهذا البروتين في أنواع محددة من أورام الغدد اللمفاوية الخبيثة ومع دراسات أخرى قامت بدراسته مع أنواع أخرى من البروتينات التي تتدخل في الدورة الخلوية، ومن هنا تأتي أهمية بحثنا بحيث قمنا بدراسة مقارنة بين تعبيرية البروتين P21 في أورام الغدد اللمفاوية السليمة والخبيثة بغض النظر عن نوع الورم ومكان الإصابة الغذائية.

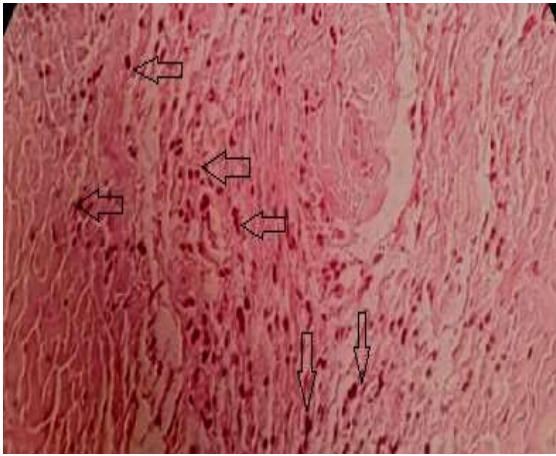
كانت التعبيرية المناعية للبروتين (P21) أعلى في مجموعة الأورام الخبيثة و بنسبة (76,2%) (تعبيرية شديدة الشدة) مقارنة مع مجموعة الأورام السليمة و التي كانت بنسبة (22,2%) (تعبيرية سلبية) ، و بذلك نتفق مع دراسة ( Tarakji and Nassani, 2010) و التي خلّصت إلى أنّ تعبيرية البروتين (P21) تزداد في الأورام الغدية الخبيثة مقارنة مع الأورام الغدية السليمة ومع دراسة (Deguchi et al., 1993) و زملائه التي وجدت أنّ التعبيرية المناعية للبروتين (P21) أعلى في مجموعة الأورام الخبيثة و بنسبة (50%) مقارنة مع مجموعة الأورام السليمة والتي كانت بنسبة (24%).

بالنسبة للأورام السليمة نتفق مع دراسة ( Marques et al., 2008) في تصنيف التعبيرية المناعية (سلبية) و تختلف معه من حيث النسبة المئوية لتعبيرية البروتين (P21) والتي كانت معدومة (0%) في جميع الأورام السليمة المدروسة ، و نعتقد هنا أنّ سبب الاختلاف يعود إلى مشاركة البروتين (PAKT) مع البروتينات (P53/MDM2/P21) في الدراسة السابقة والذي

2. فرط تعبيرية البروتين (P21) في أورام الغدد اللعابية الخبيثة يدلنا على علاقته بالتحول السرطاني.  
بعض الصور المجهرية النسيجية المنجزة خلال البحث:  
الأشكال (3-4-5-6)



الشكل (3): صورة نسيجية من ورم خبيث تبين تلون النواة بالملون المناعي P21 تكبير (40)



الشكل (4): صورة نسيجية من ورم سليم تبين تلون النواة بالملون المناعي P21 تكبير (40)

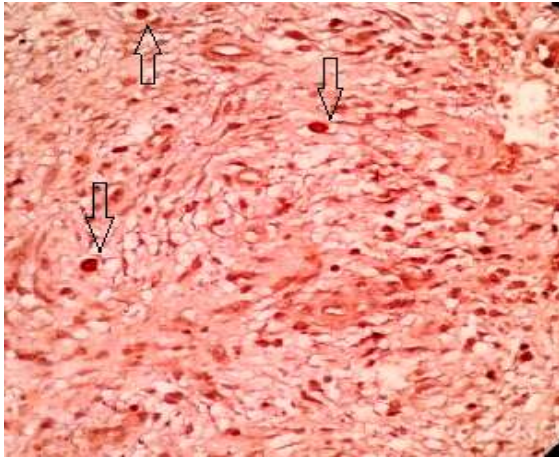
أظهر فرطاً في التعبيرية المناعية تشير بدورها إلى تعطيل في عمل البروتين (P53) وبالتالي توقف تفعيل البروتين (P21). بالنسبة للأورام الخبيثة نتفق مع دراسة (Tarakji *et al.*, 2012) وزملائه والتي وجدت أن تعبيرية البروتين (P21) كانت قوية في الخلايا السرطانية ومع دراسة (Goulart-Filho *et al.*, 2019) من حيث إيجابية التعبير ونختلف مع دراسة (Affolter *et al.*, 2005) وزملائه التي وجدت أن (72%) من العينات السرطانية أظهرت تعبيرية مناعية ضعيفة تصل إلى حدّ السلبية باستخدام الطرق المناعية التقليدية ومع دراسة (Etemad-Moghadam *et al.*, 2007) وزملائه حيث كانت تعبيرية البروتين (P21) بنسبة (8,6%) ومع دراسة (de Lima *et al.*, 2009) وزملائه حيث كانت تعبيرية البروتين (P21) معدومة و نعتقد أن مشاركة البروتين (PAKT) في الدراسة السابقة واقتصارها على نوع محدد من الأورام (السرطان الغدي الكيسي) قد يبرر هذا الاختلاف ، كما نختلف أيضاً مع دراسة (Talaat, 2013) وزملائه حيث كانت تعبيرية البروتين (P21) بنسبة (20%) ويمكننا أن نعزي الاختلاف إلى صغر حجم العينة في الدراسة السابقة (15 عينة).

نختلف مع دراسة (Taghavi *et al.*, 2019) وزملائه التي بينت وجود علاقة عكسية معنوية بين تعبيرية (P21) والدرجة النسيجية للورم ونعتقد ان اقتصارها على نوع محدد من الأورام (السرطان الغدي الكيسي) قد يبرر هذا الاختلاف.

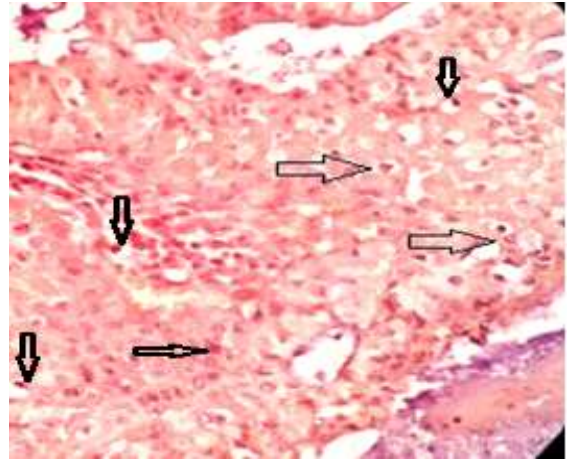
## 5- الاستنتاجات (Discussion):

نستطيع القول:

1. أن الإيجابية التعبيرية للبروتين P21 تتوافق مع درجة الخباثة النسيجية (أي كلما تطور الورم باتجاه الخبث ازدادت التعبيرية) وبالتالي يمكن اعتبار هذه التعبيرية المناعية كمؤشر إنذاري ولاسيما في أورام الغدد اللعابية السليمة القابلة للتحويل الخبيث (الورم الغدي السليم متعدد الأشكال).



الشكل (6): صورة نسيجية تظهر اللون البني المميز (p21) في النواة وبتكبير (40)



الشكل (5): صورة نسيجية لورم سليم تبين تلون النواة بالملون P21 (اللون البني) بتكبير (10)

## References:

1. Adnan, J., Jackson, R. J., Nicosia, S. V., Cantor, A. B., Pledger, W. J. & Sebt, S. M. (2000). Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model. *Oncogene*, 19, 5338.
2. Affolter, A., Helmbrecht, S., Finger, S., Hormann, K. & Gotte, K. (2005). Altered expression of cell cycle regulators p21, p27, and p53 in tumors of salivary glands and paranasal sinuses. *Oncology reports*, 13, 1089-1094.
3. Deb-Joardar, N., Thuret, G., Gavet, Y., Acquart, S., Garraud, O., Egelhoffer, H., Gain, P. (2007). Reproducibility of Endothelial Assessment during Corneal Organ Culture: Comparison of a Computer- Assisted Analyzer with Manual Methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 48: 2062–2067.
4. De lima, M. D. D. M., Marques, Y. M. F. S., De melo alves, S., Freitas, V. M., Soares, F. A., De araujo, V. C., Dos santos pinto, D. & Mantesso, A. (2009). MDM2, P53, P21 WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. *Cancer epidemiology*, 33, 142-146.
5. Deguchi, H., Hamano, H. & Hayashi, Y. (1993). c-myc, ras p21 and p53 Expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. *Pathology International*, 43, 413-422.
6. Chung, C.-J., Huang, C.-J., Pu, Y.-S., Su, C.-T., Huang, Y.-K., Chen, Y.-T. & Hsueh, Y.-M. (2008). Polymorphisms in cell cycle regulatory genes, urinary arsenic profile and urothelial carcinoma. *Toxicology and applied pharmacology*, 232, 203-209.
7. Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in cell biology*, 13, 65-70.
8. Etemad-moghadam, S., Baghaee, F., Tirgary, F., Motahhary, P., Khalili, M., Eshghyar, N., Alaedini, M. & Eslami, M. (2007). Expression of p21WAF in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and its relation to histologic grade. *International journal of surgical pathology*, 15, 6-13.
9. Giordano, C., Rovito, D., Barone, I., Mancuso, R., Bonofiglio, D., Giordano, F., Catalano, S., Gabriele, B. & Ando, S. (2017). Benzofuran-2-acetic ester derivatives induce apoptosis in breast cancer cells by upregulating p21 Cip/WAF1 gene expression in p53-independent manner. *DNA repair*, 51, 20-30.
10. Goan, Y.-G., Hsu, H.-K., Chang, H.-C., Chou, Y.-P. & Cheng, J.-T. (2005). Deregulated p21waf1 overexpression impacts on survival of surgical resected esophageal squamous cell carcinoma patients. *The annals of thoracic surgery*, Volume 80, Issue 3, September 2005, Pages 1007-1016.
11. Goulart-filho, J.A.V., Montalli, V.A.M., Passador-Santos, F. et al. (2019). Role of apoptotic, autophagic and senescence pathways in minor salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Diagn Pathol* 14, 14. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0796-2>.
12. Huang, Q. & Tao, Y. (2000). Detection of point mutations in promoter and coding sequence of p21 gene in a variety of human malignancies. *Chinese journal of medical genetics*, 17, 169-172.
13. Huo, J., Metz, S. & Li, G. (2004). p53-independent induction of p21waf1/cip1 contributes to the activation of caspases in GTP-depletion-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Cell death & differentiation*, 11, 99-109.
14. Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A. & Xiong, Y. (1994). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, 9, 2261-2268.
15. Marques, Y. M. F. S., De lima, M. D. D. M., De melo alves, S., Soares, F. A., De araujo, V. C., Dos santos pinto, D. & Mantesso, A. (2008). Mdm2, p53, p21 and pAKT protein pathways in benign neoplasms of the salivary gland. *Oral oncology*, 44, 903-908.
16. Nagao, T., Sato, E., Inoue, R., Oshiro, H., Takahashi, R. H., Nagai, T., Yoshida, M., Suzuki, F., Obikane, H. & Yamashina, M. (2012). Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta histochemica et cytochemica*, 45, 269-282.



17. Nagler, R. M., Kerner, H., Ben-eliezer, S., Minkov, I. & Ben-itzhak, O. (2003). Prognostic role of apoptotic, Bcl-2, c-erbB-2 and p53 tumor markers in salivary gland malignancies. *Oncology*, 64, 389-398.
18. Ng, I., Lam, K., Ng, M. & Regezi, J. (1999). Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas—correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral oncology*, 35, 63-69.
19. Regezi, J. A., Sciubba, J. J. & Jordan, R. C. (2016). *Oral pathology: clinical pathologic correlations*, Elsevier Health Sciences.
20. Talaat, I. M. (2013). Expression of cell-cycle regulators p53, p27, and p21 in mucoepidermoid and adenoid cystic carcinomas of the minor salivary glands. *Egyptian Journal of Pathology*, 33, 120-126.
21. Tarakji, B. & Nassani, M. Z. (2010). Immunohistochemical expression of p21 in normal tissues of salivary gland, pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma-(undifferentiated and adenocarcinoma types). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15, e697-703.
22. Tarakji, B., Baroudi, K., Hanouneh, S., Nassani, M. Z., Alotaibi, A. M., Kharma, M. Y. & Azzeghaiby, S. N. (2012). Expression of p21 is dependent on or independent of p53 in carcinoma ex pleomorphic adenoma (undifferentiated and adenocarcinoma types). *Pol J Pathol*, 63, 286-91.
23. Taghavi, N., Yadegari, Z., Yazdani, F., Mashhadiabbas, F., Baghban, A. A., & Vafadar, S. (2019). Evaluation of P21waf expression and CDKN1A exon 2 mutation in salivary adenoid cystic carcinoma. *World Cancer Research Journal*. 6: e1427.