

Investigating the presence of *Helicobacter Pylori* in Oral Squamous Cell Carcinoma

Khaleghi Fatemeh¹, Ranaee Mohammad², Bijani Ali³, Kamrani Ghodsieh⁴, Bijani Fatima⁵

1. Dentist, Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. ORCID ID: 0009-0001-0146-008X.

2. Associate Professor, Clinical Research Development unit of Ayatollah Rouhani Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7583-489X.

3. Associate Professor, Social Determinants of Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2233-8726.

4. Assistant Professor, Clinical Research Development Center of Shahid Beheshti Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6553-4693.

5. Assistant Professor, Oral Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran, (Corresponding Author), Tel: 011-32291408, Email: fatimahb56@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-5557-6643.

ABSTRACT

Background and Aim: The effect of *Helicobacter pylori* on the occurrence of oral squamous cell carcinoma has been associated with contradictory findings. Therefore, in this study, we examined the presence of *Helicobacter pylori* in tissue blocks with oral squamous cell carcinoma and compared it with normal marginal tissue.

Materials and Methods: In this laboratory study, 29 paraffin blocks with the diagnosis of oral squamous cell carcinoma, along with a margin of normal tissue, were taken from the archives of the pathology department of Babel Shahid Beheshti Hospital. For more accuracy, two types of immunohistochemistry and Giemsa staining were used to determine the presence of bacteria. Data analysis was done using Fisher's exact test, Chi-square, McNemar, and Wilcoxon, and $P < 0.05$ was considered significant.

Results: By combining two diagnostic methods, 12 cases (41%) were positive, and 17 cases were reported negative in tumoral tissues. Two positive responses were seen in normal tissues. We did not have positive normal tissue and negative tumoral tissue in the same case. The results of McNemar's test showed a statistically significant difference between the response of healthy and tumoral tissues to the presence of *Helicobacter Pylori*, and tumoral tissues were more likely to contain this bacterium than normal tissues ($P = 0.002$).

Conclusion: The results of the present study support the presence of *Helicobacter pylori* as a risk factor for oral squamous cell carcinoma. So, by preventing and controlling this infection, the risk of oral squamous cell carcinoma may be reduced to some extent.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Squamous cell carcinoma, Immunohistochemistry, Giemsa stain.

Received: July 19, 2023

Accepted: Sep 14, 2024

How to cite the article: Khaleghi Fatemeh, Ranaee Mohammad, Bijani Ali, Kamrani Ghodsieh, Bijani Fatima. Investigating the presence of *Helicobacter Pylori* in Oral Squamous Cell Carcinoma. SJKU 025;30(3):33-44.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی حضور هلیکوباکتریلوری در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

فاطمه خالقی^۱، محمد رعنائی^۲، علی بیژنی^۳، قدسیه کامرانی^۴، فاطمه بیژنی^۵

۱. دندان پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۹-۰۰۰۱-۰۱۴۶-۰۰۸X

۲. دانشیار، واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان آیت اله روحانی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۷۵۸۳-۴۸۹X

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۲۳۳-۸۷۲۶

۴. استادیار، واحد توسعه تحقیقات بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۵۵۳-۴۶۹۳

۵. استادیار، مرکز تحقیقات سلامت و بهداشت دهان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک:

fatimahb56@gmail.com، تلفن ثابت: ۰۱۱-۳۲۲۹۱۴۰۸ کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۵۵۷-۶۶۴۳

چکیده

زمینه و هدف: تأثیر هلیکوباکتریلوری بر بروز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با یافته‌های متناقضی همراه بوده است؛ لذا در این مطالعه به بررسی حضور هلیکوباکتریلوری در بلوک بافتی کارسینوم سلول‌های سنگفرشی دهانی و مقایسه آن با بافت حاشیه نرمال پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۲۹ بلوک پارافینه با تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به همراه حاشیه بافت سالم از بایگانی بخش آسیب‌شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل گرفته شد. جهت دقت بیشتر، از دو نوع رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و گیمسا برای تعیین حضور باکتری استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از تست دقیق فیشر، مجذور کای، مک نمار و ویل کاکسون انجام شد و $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها: با تجمع دو روش تشخیصی، در بافت‌های تومورال ۱۲ مورد مثبت (۴۱٪) و ۱۷ مورد منفی گزارش شد. در بافت‌های سالم دو مورد مثبت دیده شد. هم‌زمانی بافت نرمال مثبت و بافت تومورال منفی وجود نداشت. نتایج آزمون مک نمار اختلاف آماری معناداری بین پاسخ بافت‌های سالم و تومورال به وجود هلیکوباکتریلوری نشان داد و در بافت‌های تومورال احتمال وجود این باکتری بیشتر از بافت‌های سالم بود ($P = 0/002$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر از حضور هلیکوباکتریلوری به عنوان عامل خطر برای ابتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان حمایت می‌نماید. پس با پیشگیری و کنترل این عفونت ممکن است تا حدی خطرات مربوط به بروز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان کاهش یابد.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتریلوری، کارسینوم سلول سنگفرشی، ایمونوهیستوشیمی، رنگ آمیزی گیمسا

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۴/۲۸ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۲/۲ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۲۴

مقدمه

هلیکوباکتریلوری باکتری گرم منفی خمیده مارپیچی شکل است که با بررسی میکروسکوپی ابی تلیوم معده بیماران مبتلا به گاستریت مزمن فعال در سال ۱۹۸۳ توسط Warren و Marshal شناخته شد. این باکتری، شایع ترین عامل عفونت مزمن و همچنین عامل اصلی ایجاد زخم معده در دنیا به شمار می رود (۱)، به گونه ای که در معده بیش از نیمی از مردم جهان حضور دارد. بروز سالیانه عفونت هلیکوباکتریلوری در کشورهای درحال توسعه بیش از ۵۰ درصد برآورد می شود که این میزان در ایران بین ۵۰ تا ۶۰ درصد گزارش شده است. این باکتری عامل خطر بالقوه سرطان معده است و خطر نسبی آن ۶۵ درصد در نظر گرفته می شود (۲). سازمان بهداشت جهانی این میکروب را به عنوان یک عامل سرطانزا از گروه یک طبقه بندی کرده است (۳).

این باکتری شایع ترین علت سرطان های مرتبط با عفونت، به ویژه سرطان معده همراه با لنفوم Maltoma در نظر گرفته می شود. تقریباً ۲۰ درصد از افرادی که آلوده به هلیکوباکتریلوری هستند در طول زندگی شان دچار اختلالات گوارشی می شوند (۴). مطالعه ای که توسط Souto و همکاران (۲۰۰۸) و Liu و همکاران (۲۰۲۰) انجام شده نشان داد هلیکوباکتریلوری مستقیماً در حفره دهان وجود دارد و نقش آن را در ایجاد التهاب پریدنتال نیز تأیید کرده است (۵ و ۶). Li Zhang و همکاران (۲۰۲۲) نیز بر این نکته تأکید می کنند که این باکتری می تواند در نواحی مختلف دهان شامل پلاک دندانی، پالپ عفونی دندان و پاکت پریدنتال حضور داشته باشد (۷). در مطالعه Li و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان داده شده که هلیکوباکتریلوری نقش قابل توجهی در پاتوژنز لیکن دهانی اروزو ایفا می کند (۸). این مشاهدات نه تنها حفره دهان را به عنوان مخزن عفونت هلیکوباکتریلوری و عامل ایجاد عفونت مجدد در معده تأیید می کند (۹)، بلکه می تواند سرخ های اولیه ای از ارتباط این عفونت با پیشرفت بیماری های دهان از

جمله کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC) که شایع ترین بدخیمی این ناحیه است، نشان دهد (۱۰).

کارسینوم سلول سنگفرشی دهان یک تومور بدخیم مهاجم است که نواحی مختلفی از حفره دهان را درگیر می کند و ۹۰ درصد از کل بدخیمی های دهانی را شامل می شود (۱۱). کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به همراه لب و حلق مجموعاً هفتمین سرطان شایع در جهان به شمار می رود و سالانه ۷۰۰۰ مرگ ناشی از آن گزارش شده است (۱۰). علی رغم پیشرفت در روش های تشخیصی و درمانی، بقای ۵ ساله بیماران OSCC حدود ۶۰٪ باقی مانده است (۱۲). این کارسینوم در مقایسه با سایر تومورهای حفره دهان تمایل بیشتری به تهاجم موضعی و متاستاز دارد و در مردان میان سال و پیر، شایع تر است. به طور کلی مصرف تنباکو و الکل، زمینه ژنتیکی، استرس و عفونت های بیماریزا به عنوان عامل شیوع کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در نظر گرفته می شوند (۱۰). در حالی که در جوامع غربی مصرف سیگار و الکل عامل مهم تری است؛ ولی نمی توان از احتمال نقش میکروارگانیسم ها در پاتوژنز این بیماری چشم پوشی کرد. تقریباً ۲۰ درصد از بدخیمی های انسانی به میکروارگانیسم ها نسبت داده می شود. در این زمینه، لازم به ذکر است که حفره دهان تقریباً ۷۰۰ گونه مختلف باکتریایی را در خود جای داده است و هلیکوباکتریلوری نیز در حفره دهان افرادی که مبتلا به التهاب یا زخم معده هستند، شناسایی شده است. از آنجایی که دهان عضوی از دستگاه گوارش محسوب می شود، ممکن است این باکتری در ایجاد کارسینوم های دهانی نیز نقش داشته باشد (۲).

برخی مطالعات گذشته، وجود هلیکوباکتریلوری را با سرطان دهان مرتبط دانسته اند (۱۳)، اما مطالعاتی هم وجود دارد که هیچ گونه ارتباط معناداری بین این باکتری و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان گزارش نکرده اند (۱۱). از آنجایی که در مطالعات مرور سیستماتیک اخیر توسط Gupta و همکاران (۲۰۱۴ و ۲۰۲۱) نیز نتایج متناقضی

به دست آمده است (۱۵ و ۱۴)، انجام مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسید؛ بنابراین هدف این پژوهش، بررسی مقایسه‌ای حضور هلیکوباکتریلوری در بافت‌های تومورال و سالم حفره دهان افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، از ۲۹ بلوک پارافینه با تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان که تحت بیوپسی اکسیژنال قرار گرفته بودند، استفاده شد. این نمونه‌ها با گزارش کارسینومای سلول سنگفرشی دهان به همراه حاشیه بافت سالم از بایگانی بخش آسیب‌شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل گرفته شد. اطلاعات بالینی شامل سن، جنس و محل ضایعه نیز از پرونده‌ی بیماران استخراج و ثبت گردید. جهت کسب نتایج دقیق‌تر از دو نوع رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و گیمسا برای تعیین حضور هلیکوباکتریلوری و به صورت کنترل مثبت و منفی استفاده شد. برای انجام رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی ابتدا بلوک‌های پارافینی از بافت تومورال به همراه حاشیه بافت نرمال فیکس شده در فرمالین با ضخامت ۳ تا ۴ میکرون برش داده و بر روی لام اکتیو شده Citoglas قرار داده شد. سپس لام‌ها در دستگاه فور و در حرارت ۶۰ درجه به مدت یک ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شود و بافت به لام متصل گردد. در مرحله بعد نمونه‌ها در گزیرلول جهت پارافین‌زدایی دو بار به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس به ترتیب با الکل اتانول مطلق و اتانول ۹۶ درجه دو بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. در مرحله بعدی با الکل ۷۰ و ۸۰ درجه هر کدام به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و سپس با آب جاری شستشو داده شدند. پس از آن بافت‌ها در بافر Tris-EDTA با pH برابر ۹ قرار داده شدند و سپس به مایکروویو منتقل شده و در حداکثر قدرت ۸۵۰ وات قرار گرفتند، پس از این که بافر به نقطه جوش رسید قدرت مایکروویو به ۴۰ درصد کاهش داده شد و بافت‌ها در این درجه به مدت ۳۰

دقیقه نگه داشته شدند. در مرحله بعد بافت‌ها به همراه بافر از مایکروویو خارج شده و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند تا خنک شوند. بعد از شستشو در آب جاری، در بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. بافت‌ها در اتاقک تاریک و مرطوب قرار داده شدند و محلول آب اکسیژنه به مدت ۱۰ دقیقه بر روی لام‌ها قرار داده شد. بار دیگر لام‌ها با آب جاری و سپس در بافر PBS به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. در مرحله‌ی بعد بافر اضافه از سطح لام‌ها پاک شد و با استفاده از قلم داکو، اطراف بافت محدود و مشخص گردید. بعد از آن بافت‌ها در اتاقک مرطوب، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سطح بافت‌ها با آنتی‌بادی اولیه‌ی هلیکوباکتریلوری (Mouse anti helicobacter pylori, Zytomed, Germany) پوشانده شده و به مدت ۳۰ دقیقه باقی ماند.

سپس آنتی‌بادی ثانویه‌ی هلیکوباکتریلوری

(Detection IRP polymer helicobacter pylori, Zytomed, Germany) اضافه شد، بعد از دو بار شستشو با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه، کروموژن (۵۰ میکرولیتر کروموژن در یک سی‌سی سوبسترا) به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه اضافه و با آب شسته شد. لام‌ها با همتاکسولین، به مدت یک دقیقه، رنگ‌آمیزی شدند. آب‌زدایی با الکل ۹۶ درصد، به مدت ۵ دقیقه و شستشو با گزیرلول به مدت ۵ دقیقه در انتها انجام شد.

برای انجام رنگ‌آمیزی گیمسا، بافت‌های برش داده شده به وسیله الکل خالص ابتدا پارافین‌زدایی و شستشو داده شده، سپس در محلول غلیظ گیمسا، به مدت ۳۰ دقیقه قرارداده شد و سپس با چند حرکت در آب جاری شستشو انجام شد. در مرحله بعدی لام‌ها به ترتیب در الکل ۹۰ و ۹۶ درصد و الکل مطلق، با ۵ حرکت سریع شست‌وشو داده شدند. در انتها لام‌ها خشک و مونته شدند.

لام‌های رنگ‌آمیزی شده به روش ایمونوهیستوشیمی توسط یک متخصص آسیب‌شناسی بالینی و یک متخصص آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت دیده شدند و در صورت

عدم توافق، با متخصص دیگری نیز مشاوره شد و نظر نهایی بر اساس آن اعلام شد. همچنین لام‌های رنگ آمیزی شده به روش گیمسا نیز توسط متخصص آسیب شناسی بالینی توسط میکروسکوپ نوری (, Labo Med, Labo America Inc , USA) بررسی شدند.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آمار توصیفی با استفاده از میانگین و انحراف معیار، فراوانی و نسبت ارائه شد. برای ارزیابی روابط موجود، از آزمون تست دقیق فیشر، معذور کای، مک نامار و ویل کاکسون استفاده شد و $P < 0/05$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

از این بیماران ۱۳ نفر (۴۴/۸ درصد) مرد و ۱۶ نفر (۵۵/۲ درصد) زن بودند. بازه سنی شرکت کنندگان بین ۲۵ تا ۸۸ سال و میانگین سنی و انحراف معیار آنان $67/14 \pm 65/68$ سال بود. ضایعات از محل‌های متفاوتی نمونه برداری شده بود که به ترتیب فراوانی شامل ۱۰ مورد (۳۴/۵ درصد) مخاط با کال، ۶ مورد (۲۰/۷ درصد) زبان، ۴ مورد (۱۳/۸ درصد)

درصد) فک بالا، فک پایین و کف دهان هر کدام ۳ مورد (۱۰/۳ درصد)، ریح آلونول ۲ مورد (۶/۹ درصد) و لب تنها ۱ مورد (۳/۴ درصد) بود.

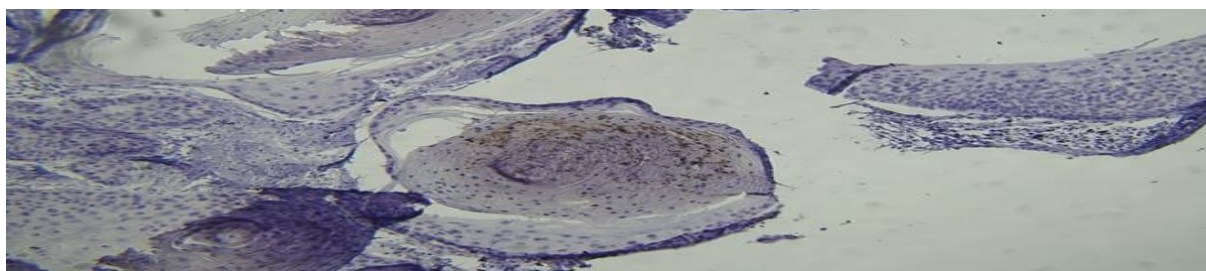
در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی از ۲۹ بلوک پارافینه، ۹ مورد از نمونه‌ها (۳۱ درصد) رنگ پذیری در بافت تومورال را نشان دادند (تصویر ۱) که از این تعداد فقط یک مورد واکنش مثبت در اپی تلیوم دیسپلاستیک غیر کارسینومی هم دیده شد (تصویر ۲) و ۸ نمونه‌ی دیگر در بافت حاشیه‌ی تومور، واکنش منفی داشتند. در ۲۰ موردی که واکنش منفی ایمونوهیستوشیمیایی در بافت تومورال داشتند، رنگ پذیری در بافت سالم هم دیده نشده بود. این اختلاف طبق آزمون مک نامار معنی دار بود ($P = 0/006$).

به علاوه در بررسی مقاطع مختلف بافتی رنگ آمیزی شده، در دو مورد از نمونه‌ها غدد بزاقی اطراف واکنش مثبت ایمونوهیستوشیمیایی نشان داده بودند که یکی از این نمونه‌ها هیچ رنگ پذیری در بافت تومورال نداشت و نمونه‌ی دیگر در قسمت بافت کارسینوماتوز نیز واکنش مثبت داشت (تصویر ۳ و جدول ۱).

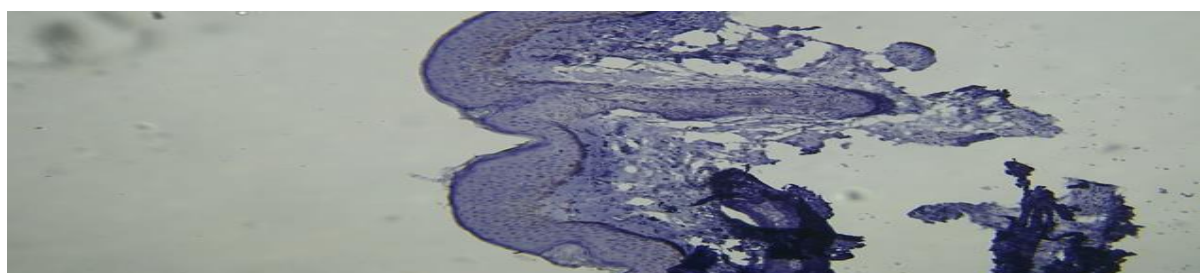
جدول ۱. مقایسه حضور هلیکوباکتری پیلوری در نمونه‌های تومورال و سالم با روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

P-Value	کل	ایمونوهیستوشیمی بافت سالم	
		مثبت	منفی
۰/۰۰۶*	۲۰	۰	۲۰ منفی
	۹	۱	۸ مثبت
	۲۹	۱	۲۸ کل

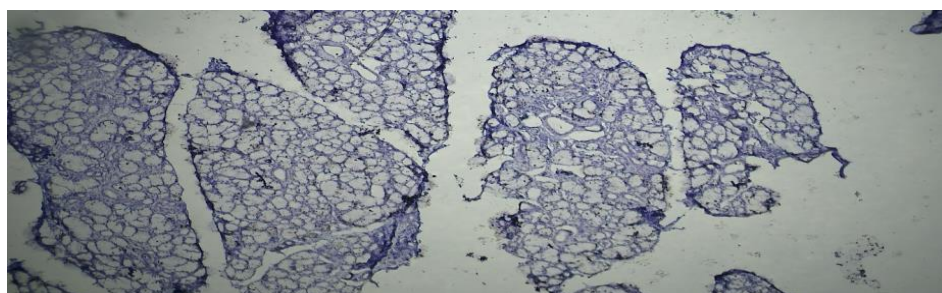
*آزمون مک نامار



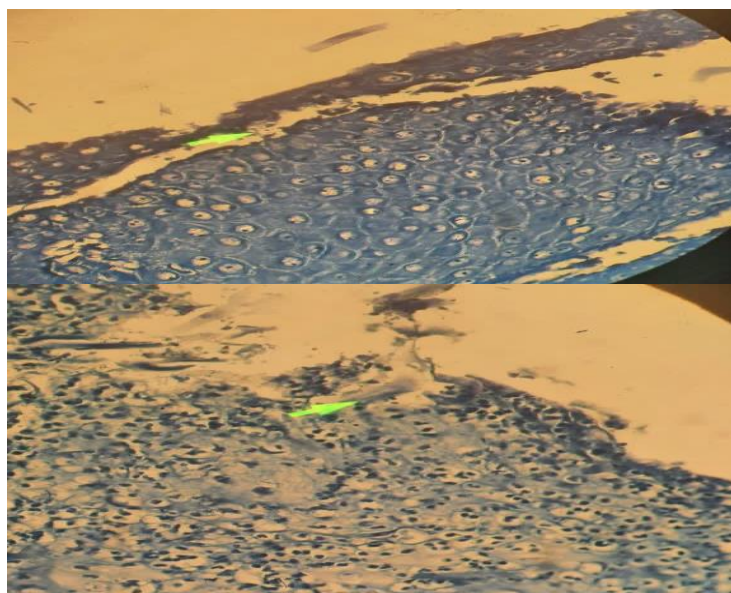
تصویر ۱. واکنش ایمنوهِستوشیمی مثبت صفحات کارسینوم سلول سنگفرشی به هلیکوباکتر پیلوری با بزرگ‌نمایی ۴۰x



تصویر ۲. رنگ آمیزی ایمنوهِستوشیمی هلیکوباکتر پیلوری. رنگ پذیری لایه بازال اپی تلیوم غیر کارسینوماتوز با بزرگ‌نمایی ۴۰x



تصویر ۳. رنگ آمیزی ایمنوهِستوشیمی هلیکوباکتر پیلوری. رنگ پذیری غدد بزاقی اطراف با بزرگ‌نمایی ۴۰x



تصویر ۴. حضور هلیکوباکتریلوری در نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با رنگ آمیزی گیمسا. با بزرگ‌نمایی $\times 100$

از ۶ موردی که رنگ‌پذیری مثبت بافت تومورال در روش گیمسا نشان دادند، در یک مورد نتیجه مثبت در حاشیه سالم هم دیده شد و در ۵ مورد دیگر در بافت سالم، باکتری حضور نداشت. از ۲۳ موردی که پاسخ منفی به رنگ‌آمیزی گیمسا در بافت تومورال نشان دادند، هیچ موردی نتیجه‌ی مثبت در بافت سالم نشان نداد. این اختلاف بر اساس آزمون مک‌نمار معنی‌دار نبود ($P = 0.063$) (جدول ۲).

همچنین در رنگ‌آمیزی به روش گیمسا از بافت‌های تومورال، در ۶ مورد از نمونه‌ها حضور باکتری در بافت تومورال دیده شد (تصویر ۴) و ۲۳ مورد ($69/3\%$ درصد) رنگ نگرفتند. از نمونه‌های رنگ‌گرفته، ۴ مورد ($13/8\%$ درصد) رنگ‌پذیری خفیف، ۱ مورد ($3/4\%$ درصد) رنگ‌پذیری متوسط و ۱ مورد ($3/4\%$ درصد) هم رنگ‌پذیری شدید را نشان داد. شدت رنگ‌پذیری گیمسا در بافت‌های سالم و تومورال بر اساس آزمون ویل کاکسون با هم اختلاف معناداری داشتند ($P = 0.02$).

جدول ۲. مقایسه حضور هلیکوباکتریلوری در نمونه‌های تومورال و سالم با روش رنگ‌آمیزی گیمسا

P-Value	کل	گیمسا بافت سالم	
		مثبت	منفی
0.063^*	۲۳	۰	۲۳ منفی
	۶	۱	۵ مثبت
	۲۹	۱	۲۸ کل

*آزمون مک‌نمار

مثبت در لایه بازال اپی‌تلیوم مجاور دیده شد که دیسپلازی خفیفی را هم نشان می‌داد. در ضمن، این دو مورد مربوط به یک نمونه‌ی یکسان نبودند. در مجموع در بافت‌های غیر

در رنگ‌آمیزی به روش گیمسا در حاشیه بافت غیرتومورال تنها یک مورد ($3/4\%$ درصد) رنگ‌پذیری خفیف را نشان داد و در روش ایمونوهیستوشیمی هم یک مورد ($3/4\%$ درصد)

کارسینومی، دو نمونه (۶/۹ درصد) به یکی از دو روش رنگ آمیزی پاسخ مثبت داده بودند. پس از مقایسه حضور هلیکوباکتریلوری در نمونه‌های تومورال بین دو روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و گیمسا، در ۲۰ مورد پاسخ هر دو روش مشابه بود که در ۱۷ مورد پاسخ هر دو رنگ آمیزی منفی و در ۳ مورد هم هر دو

رنگ آمیزی مثبت بود. در ۶ مورد پاسخ رنگ آمیزی گیمسا منفی و ایمونوهیستوشیمی مثبت بود در ۳ مورد پاسخ رنگ آمیزی گیمسا مثبت و ایمونوهیستوشیمی منفی بود و در مجموع ۹ مورد وجود داشت که گیمسا یا ایمونوهیستوشیمی آن‌ها مثبت بود. نتایج نشان داد دو روش رنگ آمیزی با هم توافق زیادی نداشتند (ضریب توافقی $\kappa=0/2$) (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه حضور هلیکوباکتریلوری در نمونه‌های تومورال بین دو روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و گیمسا

کل	ایمونوهیستوشیمی بافت تومورال			
	مثبت	منفی		
گیمسا بافت تومورال	۶	۱۷	منفی	۲۳
	۳	۳	مثبت	۶
کل	۹	۲۰		۲۹

در نهایت با تجزیه دو روش شناسایی هلیکوباکتریلوری، در بافت‌های تومورال ۱۲ مورد مثبت (۴۱ درصد) شناسایی شد که این عدد در بافت‌های سالم ۲ مورد (۶/۹ درصد) بود (جدول ۴).

جدول ۴. وجود هلیکوباکتریلوری در بافت تومورال و غیر تومورال در مجموع دو روش رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوهیستوشیمی

نوع بافت	فراوانی تومورال	فراوانی غیر تومورال	درصد تومورال	درصد غیر تومورال
منفی	۱۷	۲۷	۵۸/۶	۹۳/۱
مثبت	۱۲	۲	۴۱/۴	۶/۹
کل	۲۹	۲۹	۱۰۰	۱۰۰

در مجموع، ۱۷ نمونه از بافت تومورال با پاسخ منفی وجود داشت که تمام نمونه‌های بافت سالم آن افراد نیز پاسخ منفی را نشان دادند؛ اما در بین ۱۲ پاسخ مثبت به وجود هلیکوباکتریلوری در بافت تومورال، فقط ۲ مورد در بافت سالم پاسخ مثبت را نشان دادند و در ۱۰ مورد پاسخ منفی دیده شد. هیچ موردی که پاسخ بافت نرمال مثبت و پاسخ

بافت تومورال منفی باشد، یافت نشد. نتایج آزمون مک نمار نشان داد اختلاف آماری معناداری بین پاسخ بافت‌های سالم و تومورال به وجود هلیکوباکتریلوری وجود دارد و در بافت‌های تومورال احتمال وجود این باکتری بیشتر از بافتهای سالم بود ($P=0/002$) (جدول ۵).

جدول ۵. مقایسه وجود هلیکوباکتر پیلوری بین بافت های سالم و تومورال:

P-Value	کل	هلیکوباکتر پیلوری بافت سالم			
		مثبت	منفی		
۰/۰۰۲*	۱۷	۰	۱۷	منفی	هلیکوباکتر پیلوری بافت تومورال
	۱۲	۲	۱۰	مثبت	
	۲۹	۲	۲۷	کل	

*آزمون مک نمار

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در مجموع، ۴۱ درصد از کل نمونه ها به نحوی حضور هلیکوباکتر پیلوری را در بافت تومورال کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نشان دادند. در حالی که اپی تلایوم حاشیه‌ی تومور میزان بسیار کمتری از حضور باکتری را نشان می داد (۶/۹ درصد). با توجه به مطالعات مشابهی که در گذشته انجام شده بود نتایج ما با پژوهش های Gore و همکاران (۲۰۲۲)، Mohtasham و همکاران (۲۰۲۲)، Irani و همکاران (۲۰۱۳) و Anand و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی داشت و حضور هلیکوباکتر پیلوری را در بافت های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان تأیید می کرد (۱۸-۱۶ و ۱۳).

به علاوه، Pérez Infante و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که شواهد کافی برای اطمینان از تأثیر وجود هلیکوباکتر پیلوری بر خطر مستقیم حضور سرطان وجود ندارد با این حال به این نتیجه رسیدند که هلیکوباکتر پیلوری ممکن است بیشتر در بزاق و در بیماران مبتلا به سرطان دهان در کف دهان واقع شود (۱۹).

در پژوهش دیگر نیز Gupta و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند گرچه ارتباط هلیکوباکتر پیلوری با کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی تأیید نمی شود، اما کاهش بار میکروبی اضافی دهان، به ویژه در بیمارانی که تغییرات مخاط دهان را نشان می دهند و هیچ سابقه ای از عوامل خطر مرتبط ندارند، مهم است (۱۴).

در تحقیق حاضر، تمام نمونه ها بلوک های پارافینه ی مربوط به مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود و

به علت محدودیت هزینه و زمان، امکان بررسی حضور باکتری در افراد سالم و مقایسه ی آن با این موارد را نداشتیم؛ ولی در سایر مطالعات حضور هلیکوباکتر پیلوری در افرادی که سابقه سرطان دهان نداشتند نیز گزارش شده بود (۲۱ و ۲۰).

از آن جایی که مطالعه‌ی ما محدود به بزاق نبود و بررسی بافتی انجام شده بود، حضور باکتری به شکل قابل توجهی در بافت های کارسینوماتوز با حاشیه ی سالم بافتی متفاوت بود؛ لذا ممکن است ارتباطی بین هلیکوباکتر پیلوری و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود داشته باشد. نکته‌ی دیگری که از نتایج این مطالعه به دست آمد این بود که احتمال خطا و پاسخ منفی کاذب در رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوهیستوشیمی وجود دارد چون طبق یافته های ما دو روش با هم توافق زیادی نداشتند؛ لذا جهت تشخیص و مقایسه ی دقیق تر پیشنهاد می شود که همزمان از چند روش تشخیصی استفاده شود. در مطالعه Pandya و همکاران (۲۰۲۱) نیز به استفاده همزمان از چند روش تشخیصی جهت کسب نتایج قابل اعتمادتر اشاره شده بود (۲۲).

با توجه به این که Petersen و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیق خود نشان دادند که هلیکوباکتر پیلوری می تواند از لایه های اندوتلیال عبور کند (۲۳)، امکان حضور این باکتری در لایه های عمقی تر بافت همبندی وجود دارد.

در مطالعه‌ی ما مواردی از واکنش مثبت ایمونوهیستوشیمیایی در غدد بزاقی اطراف نمونه دیده شد که مشابه با نتایج مطالعه‌ی Irani و همکاران بود که حضور هلیکوباکتر پیلوری را در مجاری غدد بزاقی، عضلات عمقی

زبان و بافت همبند آستر مخاط برخی از نمونه ها نشان داده بودند (۱۷).

با توجه به اینکه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان شایع ترین بدخیمی این ناحیه است (۱۱) و شیوع آن در سال های اخیر در جوامع مختلف رو به افزایش است (۲۴)، روش های غربالگری کم تهاجمی و تشخیص زود هنگام و پیشگیری از بروز این بدخیمی جزء اولویت های بهداشت و درمان است. عوامل مستعد کننده گوناگونی در بروز این ضایعه معرفی شده اند که می توان به مصرف دخانیات، الککل، عفونت با پاتوژن های مختلف و التهاب مزمن اشاره کرد (۱۰).

مطالعات متعدد نقش عفونت هلیکوباکتر پیلوری را در بدخیمی های معده تأیید کردند و هم چنین با کنترل این عفونت توانسته اند در کاهش بروز این بیماری ها و تا حد زیادی پسرقت ضایعات نقش ایفا کنند (۴). با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابهی که نتایج هماهنگ با این تحقیق نشان داده اند، این باکتری می تواند در ایجاد التهاب در بافته ای مخاط دهان و در نتیجه بروز دیسپلازی و بدخیمی دخیل باشد؛ لذا بررسی های غربالگری که حضور این باکتری در حفره دهان را تأیید کند و کنترل عفونت می تواند عامل مؤثری در پیشگیری از بروز موارد جدید کارسینوم سلول سنگفرشی دهان باشد.

هم چنین در مقالات مختلفی گزارش شده که پس از درمان موفقیت آمیز هلیکوباکتر پیلوری ممکن است کلونیزاسیون مجدد این باکتری دیده شود که احتمالاً به خاطر حضور باکتری در پلاک دندان یا به علت وجود بیماری های

پریودنتال می باشد (۲۵)؛ بنابراین توصیه می شود که با رعایت بهداشت دهان (مسواک زدن، استفاده از دهان شویه، بروساژ و جرم گیری دوره ای)، کنترل پلاک و کنترل و درمان بیماری های پریودنتال، از کلونیزاسیون و عود دوباره ی این عفونت جلوگیری شود.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر از حضور هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یکی از عوامل خطر برای ابتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان حمایت می نماید؛ لذا به نظر می رسد با پیشگیری و کنترل این عفونت ممکن است بتوان تا حدی خطرات مربوط به بروز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان را کاهش داد. هم چنین با توجه به نتایج متناقضی که در پژوهش های مختلف در این زمینه به دست آمده است انجام مطالعات دیگر با حجم نمونه بیشتر و روش های آزمایشگاهی متفاوت پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با شناسه اخلاق IR.MUBABOL.HRI.REC.1400.167 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل بررسی و تصویب گردید. از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل و بخش آسیب شناسی بیمارستان های روحانی و شهید بهشتی بابل صمیمانه قدردانی می گردد. هیچ فرد یا دستگاهی تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;321(8336):1273-1275.
2. Gupta AA, Kheur S, Raj AT, Mahajan P. Association of *Helicobacter pylori* with oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma—a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest*. 2020;24(1):13-23.

- 3.Segal E, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins L. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14559-14564.
- 4.Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(11):784-789.
- 5.Souto R, Colombo AP. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *J Periodontol*. 2008;79(1):97-103.
- 6.Liu Y, Li R, Xue X, et al. Periodontal disease and *Helicobacter pylori* infection in oral cavity: a meta-analysis of 2727 participants mainly based on Asian studies. *Clin Oral Investig*. 2020;24(7):2175-2188.
- 7.Zhang L, Chen X, Ren B, Zhou X, Cheng L. *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity: Current Evidence and Potential Survival Strategies. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13646.
- 8.Li S, Zhang Y, Yang Z, et al. *Helicobacter pylori* infection is correlated with the incidence of erosive oral lichen planus and the alteration of the oral microbiome composition. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):122. u
- 9.Adler I, Muiño A, Aguas S, Harada L, Diaz M, Lence A, Labbrozzi M, Muiño JM, Elsner B, Avagnina A, Denninghoff V. *Helicobacter pylori* and oral pathology: relationship with the gastric infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9922-9935.
- 10.Meng X, Wang Q, He C, Chen M, Liu J, Liu W, et al. An inverse association of *Helicobacter pylori* infection with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(1):17-22.
- 11.Pandey S, Follin-Arbelet B, Pun CB, Gautam DK, Johannessen AC, Petersen FC, et al. *Helicobacter pylori* was not detected in oral squamous cell carcinomas from cohorts of Norwegian and Nepalese patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):8737.
- 12.Liu F, Chen F, Huang J, Yan L, Liu F, Wu J, et al. Prospective study on factors affecting the prognosis of oral cancer in a Chinese population. *Oncotarget*. 2017;8(3):4352-4359.
- 13.Gore RD, Palaskar SJ, Pawar RB, Khule SD. Detection of *Helicobacter pylori* in oral squamous cell carcinoma using modified Giemsa stain: A new diagnostic approach. *J Cancer Res Ther*. 2022;18(1):72-75.
- 14.Gupta AA, Kheur SM, Kheur M, Saner SR. *Helicobacter pylori*-possible role as biomarker for oral cancer. *Dental hypotheses*. 2014;5(1):3-6.
- 15.Gupta AA, Kheur S, Raj AT. To be or not to be: H-pylori and oral cancer. *J. OOOO*. 2021;132(1):19.
- 16.Mohtasham N, Saghravanian N, Zare R, Saghafi S, Ghazi N, Mohajertehran F, Shahabinejad M. Tumor tissue *Helicobacter pylori* and human papillomavirus infection in head and neck squamous cell carcinoma patients and association with clinicopathological indices: A cross-sectional medical survey. *Dent Res J (Isfahan)*. 2022;19:8.
- 17.Irani S, Monsef Esfahani A, Bidari Zerehpoush F. Detection of *Helicobacter pylori* in Oral Lesions. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013;7(4):230-237.
- 18.Dayama A, Srivastava V, Shukla M, Singh R, Pandey M. *Helicobacter pylori* and oral cancer: possible association in a preliminary case control study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(5):1333-1336.
- 19.Pérez-Infante D, Beltrán-Salinas B, De La Garza-Ramos M, Cabral-Romero C. *Helicobacter pylori* in patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(10):1280.

20. Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol.* 2000;49(4):349-353.
21. Jafari S, Ebrahimi-e- Daryani N, Zeinali S, Motaleb Nejad M. A Study of *helicobacter pylori* presence in patients with gastrointestinal disorder. *jdm* 2001;14(2):5-10.
22. Panda HB, Patel SH, Patel R, Patel V, Patel Sh, Patel V, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders at a tertiary care centre in Gujarat: A case-control study. *JCDR.* 2021;15(1):18-21.
23. Petersen AM, Krogh KA. *Helicobacter pylori*: An invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbial.* 2003;36:117-126.
24. Marks R. Squamous cell carcinoma. *Lancet.* 1996;347(9003):735-738.
25. Al Sayed A, Anand PS, Kamath KP, Patil S, Preethanath RS, Anil S. Oral Cavity as an Extragastric Reservoir of *Helicobacter pylori*. *ISRN Gastroenterol.* 2014;2014:261369.