Original Article

10.18502/ijds.v18i4.12096

Crossref

Journal of Isfahan Dental School

2022; 18(4): 388-97

Immunohistochemical Expression of Alpha Smooth Muscle Actin Positive Myofibroblast and Laminin 5 gamma 2 in Squamous Cell Carcinoma and Verrucous Carcinoma of the Oral Cavity

Homeyra Mardani[1]
Bahareh Rashnavadi[2]
Noshin Afshar Moghadam[3]

1. **Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
Email: mardanihomeyra@gmail.com
2. Specialist, Oral Pathology, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. Professor, Department of Pathology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Squamous cell carcinoma is the most common type of oral cancer that shows certain tissue changes. Laminin-5γ2 is a protein that plays a central role in migration of the neoplastic cells during tumor invasion. Expression of this protein in cells and stroma adjacent to tumor can confirm the cellular invasion. The aim of this study was to evaluate stroma in verrucous carcinoma and squamous cell carcinoma of the mouth using two markers α SMA and laminin 5 gamma 2.

Materials & Methods: In this retrospective descriptive-analytical study, 60 samples were selected with the diagnosis of squamous cell carcinoma and verrucous oral carcinoma. Then, two markers of α SMA and laminin 5 gamma 2 were examined in epithelium and mesenchymal stroma by immunohistochemistry. The vasculature was used as a positive immunoreactivity control for alpha-smooth muscle and the normal mucosa was used to control the positive immunoreactivity of laminin 5 gamma 2. The results were analyzed using Chi-square and Spearman correlation tests ($\alpha = 0.05$).

Results: Out of 31 SCC samples, 80.6% showed laminin 5 gamma 2 and 90.3% showed alpha smooth and out of 9 samples of varocus carcinoma, 66.7% showed laminin 5 gamma 2 and 77.8% showed alpha smooth actin. The higher the positive percentage of laminin, the higher the percentage of positive α SMA.

Conclusion: Expression of alpha smooth muscle actin and lamminin 5 gamma 2 was significantly higher in oral squamous cell carcinoma and there exists a correlation between expression of alpha smooth muscle actin and the increase in myofibroblasts takes place during the carcinogenesis process.

Key words: Carcinoma; Squamous cell; Verrucous carcinoma; Laminin-5 gamma 2 protein.

Received: 06.08.2022 **Revised**: 01.11.2022 **Accepted:** 06.12.2022

How to cite: Mardani H, Rashnavadi B, Afshar Moghadam N. Immunohistochemical Expression of Alpha Smooth Muscle Actin Positive Myofibroblast and Laminin 5 gamma 2 in Squamous Cell Carcinoma and Verrucous Carcinoma of the Oral Cavity. J Isfahan Dent Sch 2022; 18(4): 388-97.

مقاله اصیل پژوهشی

10.18502/ijds.v18i4.12096
Crossref

مجله دانشکده
دندان‌پزشکی اصفهان
۱۴۰۱؛ ۱۸(۴): ۳۸۸ تا ۳۹۷

تظاهر میوفیبروبلاست‌های آلفا اسموت ماسل اکتین مثبت و لامینین ۵ گاما ۲ در استرومای اسکواموس‌سل کارسینوم مهاجم و وروکوس کارسینومای دهان

حمیرا مردانی [۱]
بهاره رشنوادی [۲]
نوشین افشار مقدم [۳]

۱. **نویسنده مسؤول:** استادیار، گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران. Email: mardanihomeyra@gmail.com
۲. متخصص آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
۳. استاد، گروه آناتومیکال کلینیکال پاتولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: اسکواموس سل‌کارسینوما، شایع‌ترین نوع سرطان دهان است که تغییرات بافتی خاصی را نشان می‌دهد. لامینین ۵ گاما ۲، پروتئینی است که نقش مهمی در جابه‌جایی سلول‌های نئوپلاستیک در طول تهاجم تومور ایفا می‌کند و بیان آن در سلول‌ها و استرومای مجاور تومورال می‌تواند تهاجم سلولی را تأیید کند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی استروما در وروکوس کارسینوما و اسکواموس کارسینومای دهان با استفاده از دو مارکر α SMA و لامینین ۵ گاما ۲ بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی گذشته‌نگر، تعداد ۶۰ نمونه با تشخیص اسکواموس‌سل کارسینوما و وروکوس کارسینومای دهانی انتخاب شدند. سپس دو نشانگر αSMA و لامینین ۵ گاما ۲ در بخش‌های اپی‌تلیوم و استرومای مزانشیمال با روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. از عروق به عنوان کنترل رنگ‌پذیری مثبت جهت آلفا اسموت ماسل اکتین و از مخاط طبیعی جهت کنترل رنگ‌پذیری مثبت لامینین ۵ گاما ۲ استفاده گردید. یافته‌ها با استفاده از آزمون‌های Chi-square و Spearman تجزیه و تحلیل شدند ($\alpha = ۰/۰۵$).

یافته‌ها: از ۳۱ نمونه‌ی SCC (Squamous cell carcinoma)، ۶/۸۰ درصد لامینین ۵ گاما ۲ و ۳/۹۰ درصد آلفا اسموت ماسل اکتین و از ۹ نمونه‌ی وروکوس کارسینوما، ۷/۶۶ درصد لامینین ۵ گاما ۲ و ۸/۷۷ درصد آلفا اسموت ماسل اکتین را نشان دادند. هرچه درصد مثبت بودن لامینین بیشتر می‌شود، درصد مثبت بودن αSMA (Alpha smooth muscle actin) نیز افزایش می‌یابد و بر عکس.

نتیجه‌گیری: رابطه‌ی مستقیمی بین بروز $αSMA^{+}$ و لامینین ۵ گاما ۲ وجود دارد. با افزایش αSMA میزان لامینین ۵ گاما ۲ نیز بالا می‌رود و این افزایش تعداد میوفیبروبلاست‌ها در طی فرایند کارسینوژنزیس صورت می‌گیرد.

کلید واژه‌ها: اسکواموس‌سل کارسینوما؛ وروکوس کارسینوما؛ پروتئین لامینین ۵ گاما ۲.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۵/۱۵ **تاریخ اصلاح:** ۱۴۰۱/۸/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۹/۱۵

استناد به مقاله: مردانی حمیرا، رشنوادی بهاره، افشار مقدم نوشین. تظاهر میوفیبروبلاست‌های آلفا اسموت ماسل اکتین مثبت و لامینین ۵ گاما ۲ در استرومای اسکواموس‌سل کارسینوم مهاجم و وروکوس کارسینومای دهان. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۱۴۰۱؛ ۱۸(۴): ۳۹۷-۳۸۸.

مقدمه

اسکواموس سل کارسینوما (Squamous cell carcinoma) SCC بیشتر از ۹۰ درصد سرطان‌های سر و گردن را تشکیل می‌دهد و از لایه‌ی اسکواموس پوشاننده‌ی مخاط در نواحی فوقانی دستگاه گوارش مثل دهان، حلق، حنجره و سینونازال تراکت نشأت می‌گیرد (۱). محیط اطراف تومور اسکواموس سل کارسینوما از فیبروبلاست‌های درگیر تومور، سلول‌های التهابی و میوفیبروبلاست‌ها تشکیل شده‌اند که همگی در فرایند چند مرحله‌ای کارسینوژنزیس نقش دارند. تغییرات ژنتیکی در سلول‌های سرطانی مثل اختلال در TP53 و Notch1 باعث به‌هم ریختگی سلول‌ها و محیط اطراف تومور و باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و تولید بیش از حد سایتوکاین‌ها از جمله (Transforming Growth Factor β1) TGFβ1 می‌شود که در تبدیل اپی‌تلیالی به مزانشیمی نقش دارد (۲).

وروکوس کارسینومای VC شکل (Verrucous carcinoma) درجه‌ی پایین SCC دهانی است که به عنوان بدخیمی مرتبط با تنباکوی جویدنی گزارش شده است (۱). رشد اندوفیتیک آن به دلیل غشاء پایه‌ی انعطاف‌پذیر آن است که مانع رشد کارسینوماتوز آن می‌گردد (۳). وروکوس کارسینوما در تشخیص افتراقی وروکوس هایپرپلازی و اسکواموس سل کارسینوما قرار می‌گیرد. وروکوس کارسینوما مهاجم موضعی می‌باشد و متاستاز به لنف نود را نشان نمی‌دهد (۴).

لامینین ۵ گاما ۲ یکی از پروتئین‌های غشاء پایه می‌باشد که از سه رشته به نام‌های a3، b3 و y3 تشکیل شده است که از طریق پروتئولیز غشاء پایه و یا با سنتز در سیتوپلاسم سلول‌های نئوپلاستیک ساخته می‌شود (۵، ۶).

اگرچه تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در سیتوپلاسم سلول‌های تومور تشخیص داده شده است، اما وجود لامینین ۵ گاما ۲ در ماتریکس برون‌سلولی که در مجاورت سلول‌های تومور قرار دارند نباید نادیده گرفته شود زیرا این سلول‌ها در تماس نزدیک با استروما تومور قرار دارند. برخی مطالعات تنها ایمونوهیستوشیمی سیتوپلاسمی لامینین ۵ گاما ۲ را در OSCC (Oral squamous cell carcinoma) گزارش نموده‌اند (۷، ۸)، اما تشخیص استروما لامینین ۵ گاما ۲ مجاور سلول‌های تومورال در قسمت تهاجمی نیز گزارش شده است که نشان می‌دهد لامینین ۵ گاما ۲ از طریق سنتز یا پروتئولیز لامینین ۵ گاما ۲ در OSCC تشکیل می‌شود (۹).

آلفا اسموت ماسل اکتین αSMA (Alpha smooth muscle actin) ایزوفرم اکتینی است که بیشتر اوقات داخل سلول‌های عضله‌ی صاف عروق حضور دارد و نقش مهمی در فیبروژنزیس دارد (۹). تجمع آلفا اسموت ماسل اکتین اشاره به جایگزین شدن فیبروبلاست‌ها با میوفیبروبلاست‌ها به صورت پیوسته و دائمی دارد. فعال شدن فیبروبلاست‌ها غالباً با حضور آلفا اسموت ماسل اکتین، زخم و واکنش دسموپلازی و پیشرفت سرطان همراه است. آلفا اسموت ماسل اکتین در انقباض ماتریکس خارج سلولی دخیل می‌باشد. بروز آلفا اسموت ماسل اکتین با فعال شدن میوفیبروبلاست‌ها در ارتباط است (۱۰).

سلول‌های فیبروبلاست مرتبط با سرطان به طور معمول در استرومای تومور دیده می‌شود و باعث تولید متغیرهای رشدی، کموکاین، سایتوکاین، ماتریکس متالوپروتئیناز و مدیاتورهای التهابی می‌شود و از مهم‌ترین المان‌هایی است که در تبدیل اپی‌تلیالی به مزانشیمی و در پرولیفراسیون و تهاجم و متاستاز نقش دارد (۱۱).

میوفیبروبلاست‌ها از اجزاء سلولی واکنش استروما هستند (۱۲) و سلول‌های کلیدی جهت بازسازی بافت همبند در حین ترمیم زخم و ایجاد بافت فیبروزه می‌باشند (۱۳). در استرومای تومورال، میوفیبروبلاست‌های فعال آنزیم‌های پروتئولیتیک ترشح می‌کنند که باعث لیزماتریکس و تهاجم سلول‌های سرطانی و متاستاز می‌گردد (۱۴).

بعضی از مطالعات گزارش کردند که در رشد و پیشرفت تومورهای اپی‌تلیالی، استرومای احاطه‌کننده‌ی تومورال نقش مهمی دارد. استرومای سلولی تومورال شامل سلول‌های آماسی، آندوتلیالی، فیبروبلاست‌ها و

میوفیبروبلاست‌ها و اجزاء واکنش ایمنی استروما بوده که همگی ممکن است در فرایند چند مرحله‌ای کارسینوژنزیس و فنوتیپ بدخیمی نقش داشته باشند (۱۵).

Paral و همکاران در بررسی تظاهر αSMA و CD34 در SCC و وروکوس کارسینوما، که از αSMA جهت تفکیک VC از VH (Verrucous hyperplasia) استفاده کردند به این نتیجه رسیدند که ۱۰۰ درصد نمونه‌های SCC و ۹۳ درصد نمونه‌های VC، αSMA مثبت را نشان دادند و هیچ یک از نمونه‌های VH، αSMA را نشان ندادند (۱۶).

Miyazaki در بررسی اهمیت بیولوژیک خاص لامینین ۵ گاما ۲ و نقش آن در رشد تهاجم تومورال به این نتیجه رسید که لامینین ۵ گاما ۲ غشاء پایه‌ی یک مولکول اتصالات مهم است که در چسبندگی سلولی و مهاجرت آن‌ها از مؤثرترین پروتئین‌های ECM (Extra Cellular matrix) محسوب می‌شود (۵).

با توجه به این‌که مطالعات اندکی در زمینه‌ی تهاجم موضعی وروکوس کارسینوما در مقایسه با SCC صورت گرفته است و از آن‌جایی که پاتوژنز تهاجم یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین مباحث می‌باشد در این مطالعه به بررسی استروما در وروکوس کارسینوما و اسکواموس کارسینومای دهان با استفاده از دو مارکر آلفا اسموت ماسل اکتین و لامینین پرداخته شد. بر اساس فرضیه‌ی صفر بین بروز αSMA مثبت و لامینین ۵ گاما ۲ ارتباطی وجود ندارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی گذشته‌نگر، پرونده‌های بیماران آرشیو بخش آسیب‌شناسی بیمارستان امام خمینی تهران و دانشکده‌ی دندان‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) بین سال‌های ۸۳-۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌ها با تشخیص SCC و وروکوس کارسینوما انتخاب شدند. اطلاعات بالینی شامل سن، جنس، محل ضایعه از پرونده‌ی بیماران استخراج شد و پس از هر بلوک پارافینه برش ۴ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسین- ائوزین رنگ‌آمیزی شده و بلوک‌های مناسب از هر ضایعه انتخاب شد و از هر کدام یک برش ۳ میکرونی تهیه گردید و مجدداً توسط پاتولوژیست دهان مورد بررسی قرار گرفت. ضایعاتی که جراحی آن‌ها به صورت کامل انجام شده بود و خصوصیات میکروسکوپی داشتند، همراه با تشخیص قطعی وارد مطالعه شدند و نمونه‌های بافتی با فیکساسیون نامناسب، مناطق وسیع خونریزی از مطالعه خارج شدند (۱). در نهایت ۳۱ نمونه از SCC و ۹ نمونه از وروکوس کارسینوما، ۹ نمونه از دیسپلازی و ۸ نمونه‌ی مخاط سالم مورد بررسی قرار گرفتند و ایمنوهستیوشیمی با روش استاندارد استرپتداویدین- بتوتین پراکسید از LSAB (Labeled Streptavidin–Biotin) با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال αSMA و لامینین ۵ گاما ۲ (Dako Denmark) انجام گرفت. تظاهر αSMA و لامینین ۵ گاما ۲ با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با روش Envision، تظاهر ایمونوهیستوشیمیایی موارد فوق با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال αSMA (۲ کلون 4G1 غلظت ۱/۵۰) (Dako, Denmark) و آنتی‌بادی مونوکلونال لامینین ۵ گاما ۲ (۲ کلون 4G1 غلظت ۱/۵۰) (Dako, Denmark) انجام شد.

جهت رنگ‌آمیزی، ابتدا برش‌های سه میکرونی از بلوک‌ها تهیه شد. سپس در مرحله‌ی دپارافینه و آب‌دهی، لام‌ها در فور حرارتی قرار گرفته و در نهایت در دو ظرف گزیلول به مدت ۵ دقیقه و سه ظرف الکل نزولی (به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۸۰ درصد و ۶۵ درصد) جهت آب‌دهی بافت‌ها قرار داده شدند. بعد لام‌ها در آب اکسیژنه‌ی ۳ درصد (صدراشیمی، ایران) قرار داده شده و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. برای لامینین ۵ گاما ۲، بافر تریس با pH = ۹ در ماکروویو قرار داده شد. آنتی‌بادی اولیه و لامینین ۵ گاما ۲ را روی بافت ریخته و پس از ۶۱ دقیقه انکوباسیون (بهداد انکوباتور- ایران) در دمای محیط، لام‌ها با بافر فسفات‌سالین (آرکا طب، روهام، ایران) شستشو داده شدند. Envision روی لام‌ها ریخته و سپس با بافر

فسفات‌سالین شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد، برای رنگ‌آمیزی از کروموژن دی‌آمینوبنزیدین استفاده شد و سپس با آب مقطر شستشو داده شد. نواحی بافتی که مارکر مورد نظر در آن‌ها بیان می‌شد در زیر میکروسکوپ نوری (Nikon E200, Japan) به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شد. از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین به عنوان رنگ زمینه استفاده شد. سپس لام‌ها زیر میکروسکوپ نوری (Nikon E200, Japan) رؤیت شدند. برای تمام آنتی‌بادی‌ها مراحل کنترل مثبت و کنترل منفی انجام شد.

تظاهر αSMA در اپی‌تلیوم و استرومای مجاور اپی‌تلیوم و استرومای دور از اپی‌تلیوم با استفاده از روش ارائه شده توسط Jayaraj و همکاران (۱۷) و تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در اپی‌تلیوم، غشاء پایه و ماتریس خارج سلولی با استفاده از روش ارائه شده توسط Hamasaki و همکاران (۱۸) به صورت چهار Score مشخص شد.

SCORE 0: فاقد تظاهر می‌باشد؛

SCORE +1: تا ۲۵ درصد سلول‌ها مثبت می‌باشند؛

SCORE +2: ۲۵ تا ۵۰ درصد سلول‌ها مثبت می‌باشند؛

SCORE+3: ۵۰ تا ۷۵ درصد سلول‌ها مثبت می‌باشند؛

SCORE+4: بیش از ۷۵ درصد سلول‌ها مثبت می‌باشند؛

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون‌های Chi-square و Spearman's correlation در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۶۰ نمونه با تشخیص اسکواموس سل‌کارسینوما و وروکوس کارسینومای دهانی انتخاب شدند. بین مثبت بودن لامینین و αSMA^{+} رابطه‌ی مستقیم و معنی‌داری وجود داشت یعنی هر چه درصد مثبت بودن لامینین بیشتر می‌شود، درصد مثبت بودن αSMA نیز افزایش می‌یابد و بر عکس.

میزان تظاهر نشانگر αSMA در ۷۰/۶ درصد نمونه‌های SCC در استروما مثبت و در ۱۹/۴ درصد نمونه‌ها منفی بود. میزان تظاهر نشانگر αSMA در ۴۴/۴ درصد نمونه‌های وروکوس کارسینوما در استروما منفی و در ۸۷ درصد نمونه‌های مخاط نرمال و ۷۷/۸ درصد نمونه‌های دیسپلازی منفی بود و فراوانی رتبه‌ی سه و چهار αSMA بین انواع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p value = ۰/۰۲۸، p value = ۰/۰۴۳) (جدول ۱).

میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی‌تلیوم نمونه‌های SCC در ۶۱/۳ درصد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۶۶/۷ درصد، در مخاط نرمال ۱۰۰ درصد و در دیسپلازی ۷۷/۸ درصد منفی بود. فراوانی رتبه‌ی صفر لامینین بین انواع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p value = ۰/۰۲) ولی فراوانی رتبه‌ی یک، دو و سه‌ی لامینین بین انواع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۱: میزان تظاهر نشانگر αSMA در استرومای مجاور تومور

		SCORE				
		٤ (درصد)	۳ (درصد)	۲ (درصد)	۱ (درصد)	۰ (درصد)
نوع ضایعه	SCC	۴ (۱۲/۹)	۱۱ (۳۵/۵)	۵ (۱۶/۱)	۵ (۱۶/۱)	۶ (۱۹/۴)
	VC	۰ (۰)	۱ (۱۱/۱)	۲ (۲۲/۲)	۲ (۲۲/۲)	۴ (۴۴/۴)
	Normal	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۱۲/۵)	۷ (۸۷/۵)
	Displasia	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۱۱/۱)	۱ (۱۱/۱)	۷ (۷۷/۸)
p value		۰/۰۴۳	۰/۰۲۸	۰/۱۲	۰/۹۷	۰/۰۸۹

جدول ۲: میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی‌تلیوم

		SCORE			
		(درصد) ۳	(درصد) ۲	(درصد) ۱	(درصد) ۰
نوع ضایعه	SCC	۷ (۲۲/۶)	۶ (۱۹/۴)	۶ (۱۹/۴)	۱۲ (۳۸/۷)
	VC	۱ (۱۱/۱)	۰ (۰)	۲ (۲۲/۲)	۶ (۶۶/۷)
	Normal	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۸ (۱۰۰/۰)
	Displasia	۰ (۰)	۰ (۰)	۲ (۲۲/۲)	۷ (۷۷/۸٪
p value		۰/۰۵۶	۰/۰۵۹	۰/۰۷۸	۰/۰۲۰

میزان تظاهر نشانگر لامینین در ناحیه‌ی غشاء پایه‌ی نمونه‌های SCC در ۵۱/۶ درصد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۵۵/۶ درصد، در مخاط نرمال ۷۵ درصد و در دیسپلازی ۶۶/۷ درصد منفی بود. فراوانی رتبه‌ی یک لامینین بین گروه‌های مختلف نوع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p value = ۰/۰۴۸) ولی فراوانی رتبه‌ی دو و سه‌ی لامینین بین گروه‌های مختلف نوع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳).

میزان تظاهر نشانگر لامینین در ناحیه‌ی ECM نمونه‌های SCC در ۱۶/۱ درصد موارد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما، مخاط نرمال و دیسپلازی در ۱۰۰ درصد موارد منفی بودند و فراوانی رتبه‌ی یک لامینین بین گروه‌های مختلف نوع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p value = ۰/۰۴۲) ولی فراوانی رتبه‌ی دو و سه‌ی لامینین بین گروه‌های مختلف نوع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۴).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، میوفیبروبلاست‌ها درست زیر جزایر تومورال قرار داشتند و جاهایی که تومور نداشت میوفیبروبلاستی هم وجود نداشت. این نزدیکی بین سلول‌های تومورال و میوفیبروبلاست‌ها را شاید بتوان به این دلیل دانست که میوفیبروبلاست‌ها می‌توانند از تبدیل اپی‌تلیوم به مزانشیم به وجود بیاید و میوفیبروبلاست‌ها تونلی را ایجاد می‌کنند که سلول‌های تومورال بتوانند تهاجم کنند. در این پژوهش وروکوس کارسینوما میوفیبروبلاستی دیده نشد که شاید بتوان گفت وروکوس کارسینوما نوع کم تهاجم‌تر SCC می‌باشد که از نظر هیستوپاتولوژی، یکپارچگی غشاء پایه حفظ شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمال دارد یک شکستی در غشاء پایه ایجاد شود تا واکنش میوفیبروبلاستی به وجود آید. دیگر این‌که سلول‌های التهابی شدید موجود در وروکوس کارسینوما به محل تومور نفوذ می‌کند و می‌تواند حضور میوفیبروبلاست به طور عکس با حضور سلول‌های التهابی ارتباط داشته باشد. محتمل است این دو یافته نبود فیبروبلاست در استرومای برخی از وروکوس کارسینوماها و رفتار کم تهاجمی آن را توجیه می‌کند.

جدول ۳: بیان نشانگر لامینین در ناحیه‌ی غشاء پایه

		SCORE			
		(درصد) ۳	(درصد) ۲	(درصد) ۱	(درصد) ۰
نوع ضایعه	SCC	۰ (۰)	۱ (۳/۲)	۱۶ (۵۱/۶)	۱۴ (۴۵/۲)
	VC	۱ (۱۱/۱)	۰ (۰)	۳ (۳۳/۳)	۵ (۵۵/۶)
	Normal	۰ (۰)	۱ (۱۲/۵)	۱ (۱۲/۵)	۶ (۷۵/۰)
	Displasia	۰ (۰)	۰ (۰)	۳ (۳۳/۳)	۶ (۶۶/۷)
p value		۰/۰۹۶	۰/۰۹۹	۰/۰۴۸	۰/۰۸۰

جدول ۴: بیان نشانگر لامینین در ECM

		SCORE			
		۳ (درصد)	۲ (درصد)	۱ (درصد)	۰ (درصد)
نوع ضایعه	SCC	۱ (۳/۲)	۰ (۰)	۴ (۱۲/۹)	۲۶ (۸۳/۹)
	VC	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۹ (۱۰۰/۰)
	Normal	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۸ (۱۰۰/۰)
	Displasia	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۹ (۱۰۰/۰)
p value		۰/۰۹۹	۰/۰۸	۰/۰۴۳	۰/۰۸۳

با رد فرضیه‌ی صفر و بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر تعداد میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت در اپی‌تلیوم و استرومای نزدیک تومورال افزایش یافته است. در مطالعه‌ی Rao و همکاران، تعداد میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت یک افزایش تدریجی از فیبروز زیر مخاطی به سمت فیبروز زیر مخاطی به همراه دیسپلازی تا اسکواموس سل کارسینوما را نشان داد (۱۴).

در پژوهش Vered و همکاران، بروز αSMA در هایپرپلازی دیسپلازی متوسط تا شدید و کارسینوم زبان در کارسینوما افزایش پیدا کرده بود که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشتند (۱۹). ولی در مطالعه‌ی Kellermann و همکاران (۱۵)، وجود میوفیبروبلاست‌ها استرومای مخاط دهان و دیسپلازی اپی‌تلیالی به جز در سلول‌های دیواره‌ی عروق خونی در هیچ سلولی αSMA یافت نشد اما تقریباً در ۶۰ مورد کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهان میزان زیادی از میوفیبروبلاست‌های αSMA مشاهده شد.

در مطالعه‌ی Etemad- Moghadam و همکاران که از نشانگرهای αSMA، ویمنتین، دسمین جهت تشخیص میوفیبروبلاست‌های استروما استفاده کردند، رنگ‌پذیری با هر سه نشانگر فوق در سرطان دهان دیده شد، اما در دیسپلازی و اپی‌تلیوم نرمال رنگ‌پذیری منفی بود، بنابراین نتیجه گرفتند وجود میوفیبروبلاست‌ها در استرومای سرطان دهان، نقش مهمی در فرایند کارسینوژنزیس دارد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (۲۰).

در بررسی میزان تظاهر نشانگر αSMA در ۴۴/۴ درصد نمونه‌های وروکوس کارسینوما در استروما منفی و در ۸۷ درصد نمونه‌های مخاط نرمال و ۷۷/۸ درصد نمونه‌های دیسپلازی منفی بود و بیان αSMA در چهار ضایعه تفاوت آماری معنی‌داری داشت که با نتایج مطالعات Kellermann و همکاران (۱۵) و Etemad-Moghadam و همکاران (۲۰) مغایرت داشت که دلیل این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در نمونه‌گیری باشد و یا این‌که بیماران مورد بررسی در مرحله‌ی پیشرفته‌تر بیماری بودند و یا به جهت تفاوت در روش ایمونوهیستوشیمی باشد.

در مطالعه‌ی Paral و همکاران (۱۶)، در بررسی تظاهر αSMA و CD34 در SCC و وروکوس کارسینوما، ۱۰۰ درصد نمونه‌ها SCC و ۹۳ درصد نمونه‌ها VC، αSMA مثبت را نشان دادند و هیچ یک از نمونه‌های VH، αSMA را نشان ندادند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در بررسی میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی‌تلیوم نمونه‌های SCC در ۶۰/۴ درصد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۳۳/۳ درصد مثبت، در دیسپلازی ۲۲/۲ درصد مثبت و در مخاط نرمال ۱۰۰ درصد منفی بود و فراوانی رتبه‌ی صفر لامینین بین انواع ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان داد که با مطالعات Fukushima و همکاران (۲۱) و Masuda و همکاران (۲۲) همخوانی داشت.

در بررسی میزان تظاهر نشانگر لامینین در ناحیه‌ی ماتریکس خارج سلولی نمونه‌های SCC در ۱۶/۱ درصد موارد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما، مخاط

نرمال و دیسپلازی بیان نشانگر لامینین در ۱۰۰ درصد موارد منفی بود.

در بررسی میزان تظاهر نشانگر لامینین در غشاء پایه‌ی نمونه‌های SCC در ۴۵/۲ درصد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۴۴/۴ درصد، در مخاط نرمال ۲۵ درصد و در دیسپلازی ۳۳/۳ درصد تظاهر ضعیف نشان داد.

Fukushima و همکاران در مطالعه‌ی خود که به بررسی نقش لامینین ۵ گاما ۲ در تومورهای مهاجم پرداختند به این نتیجه رسیدند که در ۸۰ تا ۱۰۰ درصد موارد آدنوکارسینوم همراه با تهاجم میکروسکوپی و داکتال آدنوکارسینوهای مهاجم لامینین ۵ گاما ۲ مثبت بوده است و در گروه‌های آدنوما و آدنوکارسینومای بدون تهاجم لامینین ۵ گاما ۲ مشاهده نشد (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، بیان لامینین ۵ گاما ۲ در وروکوس کارسینوما و دیسپلازی نسبت SCC کمتری داشت که ممکن است بیان لامینین ۵ گاما ۲ در ارتباط با فنوتیپ تهاجمی باشد که در بررسی SCC مهاجم نسبت به ورکوس و دیسپلازی بیان بالاتری از لامینین ۵ گاما ۲ را نشان داد که با مطالعات دیگر مطابقت داشت (۵، ۱۸، ۲۲، ۲۳).

در بررسی لامینین در سلول‌های کارسینوم ریه در سلوهای تومورال، ECM و BM توسط Maatta و همکاران (۲۳)، در غشاء پایه بروز لامینین منفی، در ECM منفی، اما بروز لامینین در سلول‌های تومورال مثبت بود.

در مطالعه‌ی حاضر، نشانگر لامینین ۵ گاما ۲ علاوه بر سیتوپلاسم سلول‌های تومورال در غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی نیز مشاهده گردید. تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در اپی‌تلیوم، غشاء پایه و در ماتریکس خارج سلولی، سلول‌های تومور و به طور عمده در سلول‌های منفرد یا در پیرامون تشکیل تومور تشخیص داده شد. در مطالعه‌ی Junior و همکاران (۲۴) و Lindberg و همکاران (۲۵)، آنتی‌بادی منوکلونال لامینین ۵ گاما ۲ با غشاء پایه واکنش نداده و فقط واکنش سیتوپلاسمی مشاهده گردید. مطالعات مشابه با آنتی‌بادی‌های اولیه‌ی متفاوت برای لامینین ۵ گاما ۲ نیز گزارش شده است.

بنابراین می‌توان گفت که هر چه بروز لامینین ۵ گاما ۲ افزایش پیدا می‌کند تومور رشد بیشتری می‌کند و می‌تواند یک نشانگر جهت نشان دادن قدرت تهاجم سلول‌های تومورال باشد. بنابراین لامینین ۵ گاما ۲ می‌تواند یک مارکر سودمند برای تعریف تفاوت‌های بیولوژیکال و تشخیص OVC (Oral verrucous carcinoma) از OSCC خوب تمایز یافته خصوصاً در موارد مشکوک باشد (۲۶).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به دشواری در جمع‌آوری نمونه‌ها و هزینه‌ی بالای آزمایشگاه اشاره کرد و در انتها پیشنهاد می‌شود به مطالعات بیشتری در زمینه‌ی ژنتیک و کشت سلولی جهت روشن شدن نقش این سلول‌ها در ضایعات بدخیم و پیش‌بدخیم شود، همچنین در ارتباط با لامینین غشاء پایه و عوامل تأثیرگذار بر روی آن مطالعات گسترده‌تری صورت گیرد که بتوان از آن در جهت جلوگیری از گسترش ضایعات بدخیم و پیش‌بدخیم و همچنین اهداف درمانی مورد استفاده قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

رابطه‌ی مستقیمی میان بروز αSMA مثبت و لامینین ۵ گاما ۲ وجود دارد به طوری که با افزایش αSMA میزان لامینین ۵ گاما ۲ نیز بالا می‌رود و این افزایش تعداد میوفیبروبلاست‌ها در طی فرایند کارسینوژنزیس صورت می‌گیرد که به نوعی تأییدکننده‌ی نقش آن‌ها در خاصیت تهاجمی تومورال است.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پایان‌نامه شماره ۲۳۸۱۰۲۰۱۹۳۱۰۳۴ خانم دکتر بهاره رشنوادی از دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) می‌باشد. بدین وسیله از اساتید گروه مذکور و نیز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه قدردانی کرده و متذکر می‌گردد که منابع مالی این تحقیق از هزینه‌های شخصی پژوهشگر تامین گردیده است.

References

1. Neville B, Damm DD, Allen CM, Bouquuot J. Oral and maxillofacial pathology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders. 2008; p. 178-9.
2. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. Semin Oncol 2014; 41(2): 217-34.
3. Prioleau PG, Santa Cruz DJ, Meyer JS, Bauer WC. Verrucous carcinoma: A light and electron microscopic, autoradiographic, and immunofluoresence study. Cancer 1980; 45(11): 2849-57.
4. Alkan A, Bulut E, Gunhan O, Ozden B. Oral verrucous carcinoma: A study of 12 cases. Eur J Dent 2010; 4(2): 202-7.
5. Miyazaki K. Laminin-5 (Laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion. Cancer Sci 2006; 97(2): 91-8.
6. Andersson S, Hellström A-C, Angström T, Stendahi U, Auer G, Wallin K-L. The clinicopathologic significance of laminin-5 g2 chain expression in cervical squamous carcinoma and adenocarcinoma. Int J Gynecol Cancer 2005; 15(6): 1065-72.
7. Ono Y, Nakanishi Y, Ino Y, Niki T, Yamada T, Yoshimura K, et al. Clinicopathologic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in squamous cell carcinoma of the tongue: immunohistochemical analysis of 67 lesions. Cancer 1999; 85(11): 2315-21.
8. Gasparoni A, Della Casa M, Milillo L, Lorenzini G, Rubini C, Urso R, et al. Prognostic value of differentialexpression of Laminin-5 gamma2 in oral squamous cell carcinomas: correlation with survival. Oncol Rep 2007; 18(4): 793-800.
9. Franz M, Hansen T, Borsi L, Geier C, Hyckel P, Schleier P, et al. A quantitative colocalization analysis of largeunspliced tenascin-CL and laminin-5/c2-chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma byconfocal laser scanning microscopy. J Oral Pathol Med 2007; 36(1): 6-11.
10. Storch KN, Taatjes DJ, Bouffard NA, Locknar S, Bishop NM, Langevin HM. Alpha smooth muscle actin distribution in cytoplasm and nuclear invaginations of connective tissue fibroblasts. Histochem Cell Biol 2007; 127(5): 523-30.
11. Nakatani T, Honda E, Hayakawa S, Sato M, Satoh K, Kudo M, et al. Effects of decorin on the expression of alpha-smooth muscle actin in a human myofibroblast cell line. Mol Cell Biochem 2008; 308(1-2): 201-7.
12. Adegboyega PA, Mifflin RC, Dimari JF, Saada JI, Powell DW. Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps and adenomatous colorectal polyps. Arch Pathol Lab Med 2002; 126(7): 829-36.
13. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: A key player in the control of tumor cell behavior. Int J Dev Biol 2004; 48(5-6): 509-17.
14. Rao K B, Malathi N, Narashiman S, Rajan ST. Evaluation of myofibroblasts by expression of alpha smooth muscle actin: a marker in fibrosis, dysplasia and carcinoma. J Clin Diagn Res 2014; 8(4): ZC14-7.
15. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation andmodulation of tumor cell proliferation. Oral Oncol 2008; 44(5): 509-17.
16. Paral KM, Taxy JB, Lingen MW. CD34 and α SMA muscle actin distinguish verrucous hyperplasia from verrucous carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2014; 117(4): 477-82.
17. Jayaraj G, Sherlin HJ, Ramani P, Premkumar P, Natesan A. Stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. Indian J Cancer 2015; 52(1): 87-92.
18. Hamasaki H, Koga K, Aoki M, Hamasaki M, Koshikawa N, Seiki M, et al. Expression of laminin 5-g2 chain in cutaneous squamous cell carcinoma and its role in tumour invasion. Br J Cancer 2011; 105(6): 824-32.
19. Vered M, Shohat I, Bucner A, Dayan D. Myofibroblastsin stroma of odontogentic cysts and tumors can contribute to variation in the biological behavior of lesion. Oral oncol 2005; 41(10): 1028-33
20. Etemad-Moghadam S, Khalili M, Tirgary F, Aleaddini M. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2009; 38(8): 636-43.
21. Fukushima N, Sakamoto M, Hirohashi S. Expression of Laminin-5-γ-2 chain in intraductal papillary-mucinous and invasive ductal tumors of the pancreas. Mod Pathol 2001; 14(5): 404-9.
22. Masuda R, Kijima H, Imamura N, Aruga N, Nakamura Y, Masuda D, et al. Tumor budding is a significant indicator of poor prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. Mol Med Report 2012; 6(5): 937-43.

23. Määttä M, Soini Y, Pääkkö P, Salo S, Tryggvason K, Autio-Harmainen H. Expression of the laminin gamma2 chain in different histological types of lung carcinoma. A study by immunohistochemistry and in situ hybridization. J Pathol 1999; 188(4), 361-8.
24. Junior HM, Rocha VN, Leite CF, de Aguiar MCF, Souza PEA, Horta MC. Laminin-5 gamma 2 chainexpression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2014; 43(3): 199-204.
25. Lindberg P, Larsson A, Nielsen BS. Expression of plasminogen activator inhibitor-1, urokinase receptor andlaminin gamma-2 chain is an early coordinated event in incipient oral squamous cellcarcinoma. Int J Cancer 2006; 118(12): 2948-56.
26. Mardani H, Rashnavadi B, Afshar moghadam N. Laminin-5, gamma-2 chain expression in oral squamous cell carcinoma, verrucous carcinoma, and dysplastic mucosa [in Persian]. J Mash Dent Sch 2018; 42(3): 247-58.