بررسی میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت در استرومای کارسینوم سلول سنگفرشی، دیسپلازی و هیپرکراتوزیس دهان

دکتر صفورا سیفی*#، دکتر شهریار شفایی، دکتر انسیه شفیق**، دکتر سید مهدی صحابی***، حمیدرضا قاسمی*****

* استادیار آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات سلولی – مولکولی و دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

** استادیار گروه آسیب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

*** پزشک عمومی

**** دانشجوی دندانپزشکی

تاریخ ارائه مقاله : ۸۸/۴/۱۳ – تاریخ پذیرش : ۸۸/۷/۱۵

Evaluation the αSMA Positive Myofibroblasts in Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Epithelial Dysplasia and Hyperkeratosis

Safoura Seifi*#, Shahriar Shafahi, Ensieh Shafigh**, SayedMahdi Sahabi***, HamidReza Ghasemi******

** Assistant Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, Dental Research Center of Cellular and Molecular Research and Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.*

*** Assistant Professor, Dept of Pathology, Medical School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.*

**** General Practitioner*

***** Dental Student*

Received: 4 Jul 2009; Accepted: 7 October 2009

Introduction: Tumoral stroma has a main role in gross and aggressive behavior of different neoplasms. Myofibroblasts are key cells in stroma and in carcinogenesis process. The purpose of this study was immunochistochemistry evaluation of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma (SCC) compared with oral epithelial dysplasia and hyperkeratosis in carcinogenesis process.

Materials & Methods: In this descriptive cross sectional study 18 paraffinized blocks of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), 18 samples of oral epithelial dysplasia and, 18 samples of hyperkeratosis and five normalflora samples were immunostained for alpha SMA detection. Number of αSMA positive myofibroblasts in 100 cells (x40) was evaluated. Results were reported as the percent of immunostained cells. Statistical tests included Kruskal-Wallis, ANOVA and Chi-Square test.

Results: In OSCC, 8 cases had score3 (++) and 4 cases had score2 (+). In epithelial dysplasia, one case had Score3 (++) and 3 cases had score2 (+). Score2 (+) was showed in one case of hyperkeratosis. αSMA detection was observed just in vascular endothelium of oral normal mucosa. Significance difference was found in alpha SMA positive myofibroblsts among OSCC, epithelial dysplasia and hyperkeratosis (P=0.000).

Conclusion: Number (percent) of alpha SMA positive myofibroblasts increase in carcinogenesis process which could approve their role in tumoral invasive behavior.

Key words: Squamous cell carcinoma, dysplasia, hyperkeratosis, alpha SMA protein.

 # Corresponding Author: sf_seify@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2010; 33(4): 321-30.

چکیده

مقدمه: استرومای تومورال نقش مهمی در رشد و پیشرفت نئوپلاسم‌های مختلف دارد. از اجزاء سلولی واکنش استروما میوفیبروبلاست‌ها هستند که در طی فرآیند کارسینوژنزیس در استروما نمایان می‌گردند. هدف مطالعه حاضر ارزیابی وجود میوفیبروبلاست‌ها در استرومای کارسینوم سلول سنگفرشی و مقایسه آن با دیسپلازی و هیپرکراتوزیس دهان به روش ایمونوهیتوشیمی بود.

مولف مسؤول، آدرس : بابل، دانشکده دندانپزشکی، گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، تلفن: ۰۹۱۱۲۱۷۶۸۷۳

E-mail: sf_seify@yahoo.com

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی به تعداد ۱۸ بلوک پارافینه کارسینوم سلول سنگفرشی، ۱۸ نمونه دیسپلازی اپی‌تلیالی و ۱۸ مورد هیپرکراتوزیس و ۵ نمونه مخاط نرمال دهان (به عنوان شاهد) جهت نشانگر αSMA با روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. تعداد میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت با بزرگنمایی ٤٠ برابر در ۱۰۰ سلول شمارش گردید و نتایج به صورت درصد سلول‌های رنگ پذیری شده مطرح و Score بندی شد. آزمون‌های آماری مورد استفاده کروسکال والیس، ANOVA و Chi-square test بود.

یافته‌ها: در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۸ مورد (++) Score 3 و ٤ مورد Score 2 (+) داشتند و در دیسپلازی اپی‌تلیالی ۱ مورد (++) Score 3 و ۳ مورد Score 2 (+) داشتند. در هیپرکراتوزیس (+) ۲ Score در ۱ نمونه مشاهده شد. رنگ پذیری با αSMA فقط در سلول‌های آندوتلیال دیواره عروق خونی مخاط نرمال دهان نمایان بود. اختلاف آماری معنی داری در بیان میوفیبر و بلاست‌های αSMA مثبت بین کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی اپی‌تلیالی و هیپرکراتوزیس دیده شد (P=۰/۰۰۰).

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد که افزایش تعداد (درصد) میوفیبروبلاست‌ها در طی فرآیند کارسینوژنزیس صورت می‌گیرد که به نوعی تاییدکننده نقش آن‌ها در خاصیت تهاجمی تومورال است.

واژه‌های کلیدی: کارسینوم سلول سنگفرشی، دیسپلازی، هیپرکراتوزیس، پروتئین αSMA.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۸۸ دوره ۳۳ / شماره ۴ : ۳۰-۳۲۱.

مقدمه

میوفیبروبلاست‌ها از اجزاء سلولی واکنش استروما هستند[۱] و سلول‌های کلیدی جهت بازسازی بافت همبندی در حین ترمیم زخم و ایجاد بافت فیبروزه می‌باشند.[۲] میوفیبروبلاست‌ها، سلول‌هایی با خاصیت سلول‌های عضلانی صاف و فیبروبلاست‌ها هستند اگرچه دارای توانایی ترشح سیتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، پروستوگلاندین‌ها، فاکتورهای رشدی و اجزاء ماتریکس می‌باشند، همچنین نقش‌های کلیدی در فرآیندهای التهاب، رشد، ترمیم و سرطان دارند.[۳] ارگان‌های مختلفی دارای فیبروبلاست‌ها می‌باشد.[٤] در انسان و حیوانات میوفیبروبلاست‌ها در بافت‌های نرمال مانند عقده لنفاوی، عروق خونی، زیر مخاط رحم، استرومای بیضه و شش[۵] و در شرایط پاتولوژیک در ضایعات واکنشی، تومورهای خوش‌خیم، فیبروماتوزهایی با خاصیت تهاجم موضعی و سارکوماها یافت می‌شوند.[٦] در بسیاری از شرایط پاتولوژیک مخاط دهان و استخوان‌های فکی میوفیبروبلاست‌ها مشاهده می‌شوند که شامل فیبرومای سلول ژانت[۷]، گرانولومای سلول ژانت محیطی[۸] و هیپرپلازی القاء شده باسیکلوسپورین A می‌باشد.[۹]

در حفظ بافت‌های اپی‌تلیالی به استروما نیاز است. هنگامی که اپی‌تلیوم تغییر می‌یابد به دنبال آن استروما دچار تغییر می‌شود. در سرطان ایجاد تغییرات در استروما در تهاجم و متاستاز نقش دارد که علامت عمده بدخیمی می‌باشد. تغییرات استرومایی که در محل تهاجم ایجاد می‌شود شامل، تبدیل فیبروبلاست‌ها به میوفیبروبلاست و افزایش تعداد عروق خونی، کاهش بیان نشانگرهای اپی‌تلیالی مانند (کادهرین) و افزایش بیان نشانگرهای مزانشیمی مانند (ویمنتین) می‌باشد.[۱۰] تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست توسط سایتوکاین‌های حاصل از سلول‌های سرطانی مانند ($TGFB_1$) یا فاکتور رشدی تغییر شکل‌دهنده B_1 انجام می‌شود.[۱۱] تاکنون مطالعات اندکی در زمینه نقش عوامل استرومایی و اهمیت آنها در طی فرآیند کارسینوژنزیس دهان صورت گرفته و همچنین بر طبق مطالعات گذشته نقش میوفیبروبلاست‌ها در تسهیل رفتار تهاجمی تومورال مطرح شده است.[۱۰و۲] از آنجا که بیان αSMA[1] (اکتین اختصاصی عضله صاف نوع α) بیانگر حضور میوفیبروبلاست‌ها در استرومای بافت‌های مختلف

1. α Smooth Muscle Actin

می‌باشد، لذا برآن شدیم تا با روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر αSMA وجود میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت را در طی فرآیند کارسینوژنزیس کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی کرده و با هیپرکراتوزیس و دیسپلازی اپی‌تلیالی مقایسه کنیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی می‌باشد. برای انجام مطالعه حاضر نمونه‌های بایگانی گروه آسیب شناسی فک و دهان و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل در سال‌های ۸۷-۸۲ مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌ها با تشخیص دیسپلازی، کارسینوم سلول سنگفرشی و هیپرکراتوزیس دهان در نظر گرفته شدند همچنین جهت تکمیل تعداد نمونه‌ها از بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل در فاصله سال‌های ۸۷-۷۰ استفاده شد و جمعاً ٥٤ بلوک پارافینه انتخاب شد که شامل ۱۸ مورد از هر ضایعه بودند. در ٦ نمونه دیسپلازی خفیف، ٦ مورد متوسط و ٦ مورد شدید دیده شد. کارسینوم سلول سنگفرشی دارای درجه تمایز خوب تا متوسط (Grade1,2) بود و درجه تمایز ضعیف (Grade3) مشاهده نشد. همچنین بدلیل Incisional بودن برخی از بیوپسی‌های مربوط به کارسینوم سلول سنگفرشی تعیین دقیق درجه تمایز و مقایسه آنها امکان‌پذیر نبود. اطلاعات بالینی شامل سن، جنس، محل ضایعه از پرونده بیماران استخراج شد و سپس از هر بلوک پارافینه برش ٤ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شده و مجدداً مورد بررسی قرار گرفت و بلوک‌های مناسب از هر ضایعه انتخاب شده و از هر یک برش ۳ میکرونی تهیه گردید و مجدداً توسط پاتولوژیست دهان مورد بررسی قرار گرفت. ایمونوهیستوشیمی با روش استاندارد Avidin biotine peroxidase انجام شد.

روش رنگ‌آمیزی: ابتدا بافت‌های برش داده شده را ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری کردیم، سپس ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده و بعداً آنها را در گزیلل دپارافینه کرده و بعد از آن از الکل‌ها با درجات مختلف عبور دادیم. به منظور بازیافت آنتی ژنی، ابتدا آنها را در محلول سیترات وارد اتوکلاو با دمای بین ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد (به مدت ۳۰ دقیقه) کرده، بعد از خاموش کردن اتوکلاو نمونه‌ها را از آن خارج نمودیم. سپس آنها را به مدت (۵ دقیقه) وارد بافرسیترات کردیم و از بافر در آورده و بعد از خشک کردن، اطراف، زیر و دور بافت را با قلم خط کشی نمودیم. پس از آن به ترتیب در محلول‌های Dual Endogen Enzyme Block (جهت حذف اتصالات غیر اختصاصی) (به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه)، یک تا دو قطره آنتی بادی اولیه (clone 1A4, DAKO, A/S Glostrup, Denmark) αSMA با محلول غلیظ آنتی‌هیومن پلی کلونال خرگوش و با رقت $\frac{1}{100}$ به مدت ۳۰ دقیقه، استرپتاویدین،کروموژن DAB (جهت مشاهده محصولات واکنش)، هماتوکسیلین مایرز (جهت رنگ‌آمیزی زمینه) قرار دادیم و در بین هر یک از مراحل فوق به مدت ۵ دقیقه آنها را در آب مقطر شست و شو دادیم سپس آبگیری را با الکل و گزیلل انجام داده و چسب انتلان چسباندیم. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوب نوری Olympus (BX51) با بزرگنمایی ٤٠ برابر تحت مطالعه قرار گرفت و جهت ارزیابی صحت مطالعه از کنترل مثبت کارسینوم مجرایی پستان (αSMA مثبت) و کنترل منفی (سرم غیرایمینیزه موش با حذف آنتی‌بادی اولیه) در کنار مقاطع استفاده شد و رنگ پذیری سلول‌های آندوتلیال دیواره عروق خونی با αSMA به عنوان کنترل مثبت داخلی بود. همچنین ۵ نمونه مخاط نرمال دهان

جهت رنگ پذیری αSMA به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سیتوپلاسم میوفیبروبلاست‌های رنگ گرفته با αSMA در کارسینوم سلول سنگفرشی در مجاورت جزایر و صفحات تومورال و در دیسپلازی و هیپرکراتوزیس در زیر مخاط قرار گرفته و به تعداد ۱۰۰ سلول در ۱۰HPF با بزرگنمایی ٤۰ برابر شمرده شده و میانگین آن به صورت درصد رنگ پذیری مطرح شد. سلول‌های آندوتلیال دیواره عروق خونی در صورت رنگ‌پذیری با αSMA در محاسبه منظور نشدند. هر مقطع دوبار شمرده شده و متعاقب آن، شمارش توسط پاتولوژیست دیگر کنترل گردید. Score بندی نتایج به صورت ذیل انجام شد.[۱۲]

(Negative) (-) Score1: درصورت عدم رنگ پذیری میوفیبروبلاست‌ها با αSMA و یا در صورتی که کمتر از ۱٪ میوفیبروبلاست‌ها با αSMA رنگ پذیر شده باشند.

(scanty) (+) Score2: در صورتی که بیشتر از ۱٪ و کمتر از ۵۰٪ میوفیبروبلاست‌ها با αSMA رنگ پذیر شده باشند.

(Abundant) (++) Score3: در صورتی که بیشتراز از ۵۰٪ میوفیبروبلاست‌ها با αSM4A رنگ پذیر شده باشند.

نتایج مطالعه در مورد هر ضایعه در (SPSS ۱۷) ثبت شده و توسط آنالیزهای آماری ANOVA، Chi-Square test، کروسکال- والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در همه آزمون‌ها سطح معنی دار ۰/۰۵ بود.

یافته‌ها

نتایج مربوط به اطلاعات بالینی (سن، جنس، محل ضایعه) در جداول ۱ و ۲ خلاصه شده است. از نظر ایمونوهیستوشیمی، رنگ پذیری سیتوپلاسمی (قهوه ای) با نشانگر αSMA در میوفیبروبلاست‌های استروما مثبت در نظر گرفته شد. در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۸ مورد Score 3 (++) و ٤ مورد Score 2 (+) داشته و Score 1(-) در ٦ نمونه مشاهده شد (تصویر ۱ و ۲ و ۳). در دیسپلازی اپی‌تلیالی ۱ مورد Score 3 (++) و ۳ مورد Score 2 (+) را نشان دادند اما ١٤ مورد Score 1 (-) دیده شد (تصویر ٤). در هیپرکراتوزیس Score 2 (+) در ۱ نمونه مشاهده شد و ۱۷ نمونه Score 1(-) داشتند (تصویر ۵) (جداول ۳ و ٤). در تمامی ضایعات رنگ پذیری قهوه‌ای با αSMA در سلول‌های آندوتلیال دیواره عروق خونی دیده شد. در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در برخی موارد توزیع پراکنده و اکثراً غالب سلول‌های αSMA مثبت مشاهده شد. در لام‌هایی که به عنوان واکنش استرومایی افزایش ارتشاح سلول‌های آماسی را نشان دادند، بیان αSMA کاهش می یافت. تومورهایی با فقدان جزایر تومورال در برخی نواحی، فقدان بیان αSMA را نشان دادند. بیان αSMA بیشتر در بین و اطراف جزایر نئوپلاستیک مشاهده شد. ارتباط آماری معنی داری در بیان αSMA در هیپرکراتوزیس، دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی دیده شد ($P<۰/۰۰۱$).

جدول ۱ : توزیع فراوانی جنس و میانگین سن به تفکیک نمونه‌های هیپرکراتوزیس، دیسپلازی اپی تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

		هیپوکراتوزی	دیسپلازی اپی‌تلیالی	کارسینوم سلول سنگفرشی	*P*-value
سن (انحراف معیار ± میانگین)		۳٦/۰٦ ± ۱۰/۳	٤۷/٤۹ ±۱۱/۱	٤۵/۰٦ ± ۱٦/۳	۰/۰۱
جنس	مذکر (درصد) تعداد	٦ (٪۳۳/۳)	۱۱ (٪٦۱/۱)	۱۲ (٪٦٦/۷)	۰/۰۹۹
	مونث (درصد) تعداد	۱۸ (٪٦٦/۷)	۷ (٪۳۸/۹)	٦ (٪۳۳/۳)	

جدول ۲ : توزیع فراوانی محل ضایعه به تفکیک نمونه‌های هیپرکراتوزیس، دیسپلازی اپی‌تلیالی، کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

	هیپرکراتوزیس (درصد) تعداد	دیسپلازی اپی‌تلیالی (درصد) تعداد	کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (درصد) تعداد
مخاط باکال	۸ (٪۴۴/۴)	۶ (٪۳۳/۳)	۲ (٪۱۱/۱)
زبان	۳ (٪۱۶/۷)	۵ (٪۲۷/۸)	۸ (٪۴۴/۴)
ریج آلوئر	۳ (٪۱۶/۷)	۴ (٪۲۲/۲)	۲ (٪۱۱/۱)
لثه	۴ (٪۲۲/۲)	۰ (٪۰)	۴ (٪۲۲/۲)
رتروملر	۰ (٪۰)	۱ (٪۵/۶)	۱ (٪۵/۶)
کف دهان	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۱ (٪۵/۶)
لب پایین	۰ (٪۰)	۲ (٪۱۱/۱)	۰ (٪۰)
کل	**۱۸ (٪۱۰۰/۰)**	**۱۸ (٪۱۰۰/۰)**	**۱۸ (٪۱۰۰/۰)**

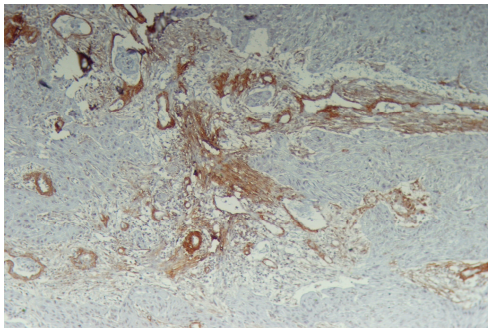
جدول ۳ : نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر αSMA در هیپرکراتوزیس، دیسپلازی اپی تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

نوع نمونه	Score1(-)	Score2(+)	Score3(++)
هیپرکراتوزیس	۱۷ (٪۹۴/۴)	۱ (٪۵/۶)	۰ (٪۰/۰)
دیسپلازی اپی‌تلیالی	۱۴ (٪۷۷/۸)	۳ (٪۱۶/۷)	۱ (٪۵/۵)
کارسینوم سنگفرشی دهان	۶ (٪۳۳/۳)	۴ (٪۲۲/۲)	۸ (٪۴۴/۵)

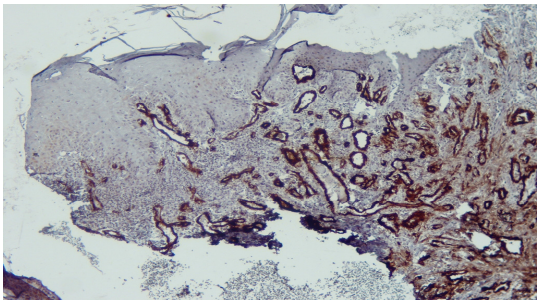
$P<۰/۰۰۱$

جدول ۴ : فراوانی درجه بندی میوفیبروبلاست αSMA مثبت در گروه‌های تحت مطالعه

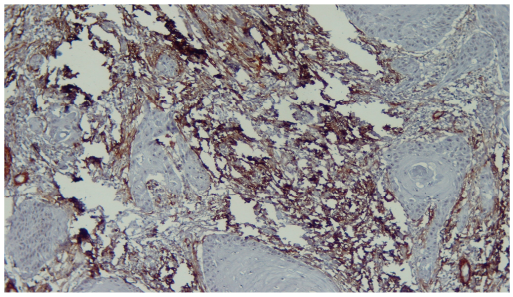
درجه بندی		هیپرکراتوزیس	دیسپلازی اپی تلیالی	کارسینوم سلول سنگفرشی	کل
−	تعداد	۱۷	۱۴	۶	۳۷
	درصد	(٪۹۴/۴)	(٪۷۷/۸)	(٪۳۳/۳)	(٪۶۸/۵)
+	تعداد	۱	۳	۴	۸
	درصد	(٪۵/۶)	(٪۱۶/۷)	(٪۲۲/۲)	(٪۱۴/۸)
++	تعداد	۰	۱	۸	۹
	درصد	(٪)	(٪۵/۵)	(٪۴۴/۵)	(٪۱۶/۷)
کل	تعداد	۱۸	۱۸	۱۸	۵۴
	درصد	(٪۱۰۰)	(٪۱۰۰)	(٪۱۰۰)	(٪۱۰۰)

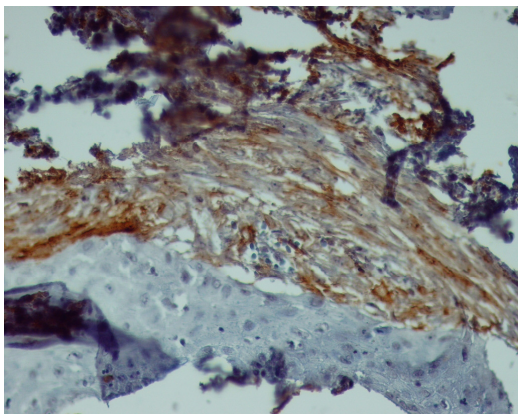


تصویر ۱ : رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در کارسینوم سلول سنگفرشی (X ۱۰)، رنگ پذیری سیتوپلاسم میوفیبروبلاست‌ها با نشانگر αSMA (+)(Score2)

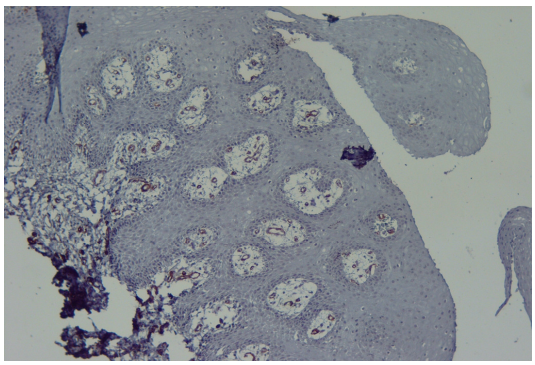


تصویر ٤ : رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در دیسپلازی اپی تلیالی (X ۱۰)، رنگ پذیری سیتوپلاسم میوفیبروبلاست‌ها با نشانگر αSMA (+)(Score2)





تصویر ۳ و ۲ : رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در کارسینوم سلول سنگفرشی (X ۱۰)(x40)، رنگ پذیری سیتوپلاسم میوفیبروبلاست‌ها با نشانگر αSMA (++)(Score۳)



تصویر ۵ : رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در هیپرکراتوزیس (X ۱۰)، رنگ پذیری سلول‌های آندوتلیال دیواره عروق خونی با نشانگر αSMA (-)(Score1)

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان αSMA در استرومای کارسینوم سلول سنگفرشی بیشتر از دیسپلازی اپی‌تلیالی و هیپرکراتوزیس دهان است که به نوعی تأییدکننده نقش میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت در رفتار تهاجمی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان می‌باشد. در مطالعات مختلف وجود میوفیبروبلاست‌ها در استرومای

سرطان‌های مهاجم پستان، حلق و حنجره گزارش شده است.[۱۵-۱۳] در هیپرکراتوزیس بیان میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت تقریباً غیرقابل تشخیص بود و فقط در یک مورد رنگ پذیری مثبت با این نشانگر دیده شد.

استروما نقش عمده ای در پیشرفت سرطان دهان دارد. بعضی از تحقیقات رخدادهای استرومایی مانند رگسازی، فعالیت فیبروبلاست و تمایز آن به میوفیبروبلاست و وجود پروتئین‌های استرومایی اختصاصی مانند آنزیم‌های پروتئولیتیک، فیبرونکتین، لامینین ۵ را به عنوان ویژگی‌های اصلی استرومای تومورال گزارش کردند اما امروزه در مورد اهمیت بیوفیزیک استرومای تومورال مطالعات اندکی صورت گرفته[۱۶] و اکثر مطالعات بر روی نقش اپی‌تلیوم و عوامل موثر اپی‌تلیالی تحقیق کرده اند.[۱۷] در سال ۲۰۰۸ Kellerman و همکاران وجود میوفیبروبلاست‌ها را با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با پروتئین αSMA در ۸۳ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی زبان و ۳٤ نمونه گروه کنترل و (۸ مورد مخاط نرمال دهان و ۱٦ نمونه دیسپلازی) بررسی کردند و گزارش نمودند که استرومای مخاط دهان و دیسپلازی اپی‌تلیالی، به جز در سلول‌های دیواره عروق خونی در هیچ سلولی αSMA یافت نشد اما تقریباً در ٦۰٪ موارد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (N=٤۰ نمونه) میزان زیادی از میوفیبروبلاست‌های αSMA مشاهده شد.[۱۸] نتایج این مطالعه به نوعی در توافق با نتایج مطالعه ما می‌باشد. در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۸ مورد (++) Score 3 و ٤ مورد (+) Score 2 داشته و (–) Score 1 در ٦ نمونه دیده شد و در ٦۷/٦٪ موارد (n=12) رنگ پذیری مثبت با نشانگر αSMA دیده شد.

Cimpean و همکاران بر روی اهمیت بیان نشانگرهای αSMA و CD۳٤ در تومورهای خوش‌خیم و بدخیم پستان در ۱۱۲ بیمار خانم مبتلا به توده‌های پستانی با روش ایمونوهیستوشیمی تحقیق کردند و گزارش نمودند که در بافت نرمال پستان و تومورهای خوش‌خیم αSMA منفی ولی CD۳٤ مثبت بود و در نهایت مطرح کردند که استفاده از نشانگرهای فوق در تمایز تومورهای خوش‌خیم و بدخیم پستان در برخی از موارد مشکل مفید واقع می‌گردد.[۱۹] فعالیت استرومای میزبان مرحله اصلی در رشد و تهاجم سرطان محسوب می‌گردد اما مکانیسم‌های اختصاصی فعالیت استروما توسط سلول‌های تومورال به خوبی شناخته نشده است. از اجزاء اصلی فعالیت استروما میوفیبروبلاست‌ها هستند.[۱] در زمانی که اپی‌تلیوم دچار تغییرات نئوپلاستیک می‌گردد به دنبال آن تغییراتی در استروما ایجاد می‌شود که ناشی از فاکتورهای مترشحه حاصل از سلول‌های تومورال شامل PDGF (فاکتور رشدی حاصل شده از پلاکت‌ها) و $TGFB_1$ استرومایی بوده و موجب تبدیل فیبروبلاست به میوفیبروبلاست می‌گردد.[۱۰] در مطالعه حاضر در استرومای بدون تومورال در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان هیچ میوفیبروبلاست αSMA مثبتی یافت نشد و تجمع میوفیبروبلاست‌ها با آرایش فاسیکولر و رتیکولر در اطراف جزایر سلولی تومورال مشاهده شد که این مورد به نوعی نشان دهنده نقش میوفیبروبلاست‌های استروما در رفتار تهاجمی تومورال می‌باشد. همچنین بیان کننده آن است که در طی فرآیند کارسینوژنزیس تعداد میوفیبروبلاست‌های استروما افزایش می‌یابد. Adegboyega و همکاران با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر روی میوفیبروبلاست‌های αSMA و Vimentin مثبت در مخاط نرمال کولون، پولیپ هیپرپلاستیک و آدنوماتوزکولورکتال تحقیق کردند. در مخاط کولون فیبروبلاست‌های αSMA منفی و Vimentin مثبت مشاهده شدند اما در پولیپ هیپرپلاستیک و نئوپلاستیک فیبروبلاست‌های Vimentin و αSMA مثبت

وجود داشتند و نتیجه گرفتند که در شرایط نئوپلاستیک فیبروبلاست‌های بینابینی توسط میوفیبروبلاست‌ها جایگزین شده و ارتباطی در میزان بیان αSMA و Stage تومورال مشاهده کردند.[۱]

وجود میوفیبروبلاست‌ها در استرومای تومورال نشان‌دهنده آن است که شاید فاکتورهای ترشح شده از سلول‌های تومورال از طریق غشاء پایه به بافت همبندی زیرین نفوذ کرده و در تبدیل فیبروبلاست‌ها به میوفیبروبلاست‌ها نقش داشته باشد.[۱۷]

Verred و همکاران وجود میوفیبروبلاست‌ها را در استرومای کیست‌ها و تومورهای ادنتوژنیک با روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی تحقیق کردند و گزارش نمودند که بیان αSMA در استرومای آملوبلاستومای (Solid) و ادنتوژنیک کراتوسیست پاراکراتینیزه بیشتر از کیست دنتی ژروسی و آملوبلاستومای تک کیستی و آملوبلاستیک فیبروادنتوما بود و بیان کردند که میزان بیان میوفیبروبلاست‌ها αSMA مثبت نشان دهنده رفتار تهاجمی ضایعات ادنتوژنیک بوده و استفاده از درمان مولکولی هدف به عنوان روش کمکی ممکن است در درمان ضایعات تهاجمی‌تر مفید واقع شود.[۱۱] تبدیل فیبروبلاست به میوفیبروبلاست توسط سایتوکاین TGFB ترشح شده از سلول‌های سرطانی باعث پیشرفت سرطان از طریق اثرات پاراکرین می‌گردد که باعث تحریک رگ‌سازی شده ولی اثرات اتوکرین موجب موتاسیون ژن Ras و تولید سیگنال‌های پیش تهاجمی می‌گردد.[۱۰] در سال ۲۰۰۹ اعتماد مقدم و همکاران بر روی ۴۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی، ۱۵ مورد دیسپلازی و ۱۵ نمونه ابی‌تلیوم نرمال دهان از نشانگرهای αSMA، ویمنتین، دسمین جهت تشخیص میوفیبروبلاست‌های استروما استفاده کردند. رنگ‌پذیری با هر سه نشانگر فوق در سرطان دهان دیده شد اما رنگ پذیری منفی در دیسپلازی و ابی‌تلیوم نرمال مطرح گردید. آنها نتیجه گرفتند وجود میوفیبروبلاست‌ها در استرومای سرطان دهان، نقش مهم آنها را در فرآیند کارسینوژنزیس مطرح می‌کند[۲۰] که نتایج مطالعه آنها به نوعی موید نتایج این تحقیق می باشد.

بعضی از مطالعات گزارش کردند که در رشد و پیشرفت تومورهای اپی‌تلیالی، استرومای احاطه کننده 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 فرآیند چندمرحله‌ای کارسینوژنزیس و فنوتیپ بدخیمی نقش داشته باشند.[۱۲] نقش عوامل ایمونولوژیکی، التهابی و سلول‌های آندوتلیال و تشکیل عروق خونی جدید شناخته شده اما تا به امروز تحقیقات کمی در زمینه میوفیبروبلاست‌ها و نقش آنها در کارسینوم سلول سنگفرشی صورت گرفته لذا مطالعه حاضر به نوعی بیانگر نقش و اهمیت میوفیبروبلاست‌ها در سرطان سلول سنگفرشی دهان می‌باشد. اختلاف آماری معنی داری در بیان میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت از هیپرکراتوزیس تا دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی مشاهده شد و شاید بتوان در صورت افزایش بیان میوفیبروبلاس‌ها در بافت همبندی دیسپلازی اپی‌تلیالی جهت پیش گویی رفتار تهاجمی و افزایش احتمال تبدیل آن به کارسینوم سلول سنگفرشی و درمان تهاجمی تر آن استفاده کرد.

نتیجه گیری

از نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که تعداد میوفیبروبلاست‌های αSMA مثبت در طی فرآیند کارسینوژنزیس دهان افزایش می‌یابد که به نوعی تاییدکننده نقش آنها در رفتار تهاجمی تومورال می باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی بابل است که در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام گرفته و بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. از همکاران گروه آمار و بیومتریک دانشگاه جهت بررسی آماری مطالعه سپاسگزاریم. از خانم سحر گوران جهت انجام آزمایش ایمونوهیستوشیمی متشکریم.

منابع

1. 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.
2. 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.
3. Muchaneta-Kubara EC, el Nahas AM. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. Nephrol Dial Transplant 1997; 12(5): 904-15.
4. Varayoud J, Ramos JG, Joazerio PP, Montes GS, Munoz De Toro MM, Luque EH. Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term. Biol Reprod 2001; 65(2): 375-83.
5. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3(5): 349-63.
6. Fletcher CD. Myofibroblastic tumors: An update. Verh Dtsh Ges pathol 1998; 82: 75-82.
7. Wheathers DR, Campbell WG. Ultrastructure of the giant-cell fibroma of the oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1974; 38(4): 550-61.
8. Dayan D, Buchner A, David R. Myofibroblasts in peripheral giant cell granuloma. Light and electron microscopic study. Int J Oral Maxillofac Surg 1989; 18(5): 258-61.
9. Yamasaki A, Rose GG, Pinero GJ, Mahan CJ. Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporine A induced gingival hyperplasia. J Oral Pathol 1987; 16(3): 129-34.
10. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. Oral Oncol 2005; 41(10): 1028-33.
11. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol 2003; 200(4): 429-47.
12. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma is associated with poor prognosis. Histopathology 2007; 51(6): 849-53.
13. Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W. Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. Tumour Biol 2004; 25(5-6): 290-5.
14. Kojc N, Zidar N, Vodopivec B, Gale N. Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor beta in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. Hum Pathol 2005; 36(1): 16-21.
15. Kbarth PJ, Schenck ZU, Schvinberg T, Ramaswany A, Moll R. CD 34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. Virchows Arch 2004; 444(3): 231-4.
16. Nielsen JD, Moeslund M, Wandall HH, Dabelsteen S. Influences of tumor stroma on the malignant phenotype. J Oral pathol Med 2008; 37 (7): 412-6.

17. Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinoma. Br J Cancer 2009; 100(7); 1128-34.
18. 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 myofibroblasts transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. Oral Oncol 2008; 44 (5): 509-17.
19. Cimpean AM, Raica M, Narita D. Diagnostic significance of the immunoexpression of CD34 and smooth muscle cell actin in benign and malignant tumors of the breast. Rom J Morphol Embryol 2005; 46(2): 123-9.
20. Etemad-Moghadam S, Khalili M, Tirgary F, Alaeddini M. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2009; 38(8): 639-43.