

تظاهر زنجیره لامینین ۵ گاما ۲ در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و وروکوس کارسینوما و دیسپلازی مخاط دهان

حمیرا مردانی^۱، بهاره راشناودی^{۲*}، نوشین افشارمقدم^۳

^۱استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان).

خوراسگان، ایران

^۲دستیار تخصصی گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)،

خوراسگان، ایران

^۳استاد گروه پاتولوژی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، خوراسگان، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۶/۵/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۶

Laminin-5, gamma-2 Chain Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma, Verrucous Carcinoma, and Dysplastic Mucosa

Homeira Mardani¹, Bahareh Rashnavadi^{2*}, Noshin Afshar moghadam³

¹Assistant professor, Department of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Islamic Azad University, (Khorasgan), Khorasgan, Iran

²Postgraduate Student, Department of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Islamic Azad University, (Khorasgan), Khorasgan, Iran

³Professor, Department of Pathology School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 31 June 2017; Accepted: 27 May 2018

Introduction: Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is one of the most prevalent cancers of oral cavity worldwide. The main components consisting basal lamina are collagen type IV and adhesive glycoprotein lamina. Local loss of basement membrane leads to formation of laminin-5, gamma-2 (laminin-5 γ 2) through proteolysis of basement membrane or synthesis in cytoplasm of neoplastic cells. Laminin-5 γ 2 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 expression of laminin-5 γ 2 in OSCC, verrucous carcinoma (VC), and dysplastic mucosa (DM), compared to normal mucosa (NM).

Materials and Methods: 57, 31, 9,9, and 8 paraffin blocks of squamous cell, OSCC, VC, DM, and NM (as control group) were scored as laminin-5 γ 2 markers, respectively. The 10 and 40-fold magnifications were used to determine the percentage of colored cells. All the data were statistically analyzed by Chi-square and Mann-Whitney tests using SPSS version 20.

Results: the findings demonstrated that expression of laminin marker was positive in the epithelium of 61.3, 33.3, and 22.2% of the SCC, VC, and DM samples, respectively. On the other hand, it was negative in 100% of the NM samples. The distribution frequency of negative and positive laminin samples was assessed based on the type of lesions. The significance level was considered as 0.006, which is less than 0.05. There was a significant difference concerning the number of laminin positive lesions between the types of oral malignancies and normal mucosa. The SCC lesions revealed the highest positive results.

Conclusion: According to the results of this study, laminin-5 γ 2 expression in the basement membrane, extracellular matrix, and epithelium of malignant tumor tissue might indicate the invasive and metastatic behavior of the OSCC.

Keywords: Dysplasia, Laminin-5 γ 2, Squamous cell carcinoma, Verrucous carcinoma

*Corresponding Author: rehashnavadi@gmail.com

J Mash Dent Sch 2018; 42(3): 247-58.

چکیده

مقدمه: کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان (OSCC) از شایعترین سرطانهای حفره دهان در سراسر جهان می باشد. اصلی ترین اجزای تشکیل دهنده تیغه پایه، شامل کلاژن نوع ۴ و گلیکوپروتئین چسبنده لامینین می باشند. از دست رفتن موضعی ساختار غشاء پایه، باعث بروز لامینین ۵ گاما ۲ از طریق پروتئولیز غشاء پایه و یا سنتز در سیتوپلاسم سلولهای نئوپلاستیک می شود. لامینین ۵ گاما ۲ پروتئینی است که نقش مهمی در جابجایی سلولهای نئوپلاستیک در طول تهاجم تومور ایفا می کند و بیان آن در سلولها و استرومای مجاور تومورال می تواند

تهاجم سلولی را تأیید کند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (OSCC) و وروکوس کارسینوما و مخاط دیسپلاستیک در مقایسه با بافت سالم بود.

مواد و روشها: تعداد ۵۷ بلوک پارافینه سلول سنگفرشی، ۳۱ نمونه OSCC، ۹ مورد وروکوس کارسینوما، ۹ مورد دیسپلازی و ۸ مورد مخاط نرمال مجاور بافت تومورال (به عنوان گروه کنترل)، جهت نشانگر لامینین ۵ گاما ۲، اسکوربندی شد. آزمونهای آماری کای اسکوئر و من-ویتنی مورد استفاده قرار گرفت و توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی تلیوم نمونه های SCC در ۶۱/۳٪، در نمونه های وروکوس کارسینوما در ۳۳/۳٪ و در دیسپلازی در ۲۲/۲٪ مثبت و در مخاط نرمال ۱۰۰٪ منفی بود. توزیع فراوانی منفی و مثبت بودن لامینین برحسب نوع ضایعه بررسی شد. سطح معناداری برابر با ۰/۰۶+ محاسبه شد که کمتر از ۰/۰۵+ بود. در ضایعه های مختلف تعداد مثبت های لامینین تفاوت معنادار داشتند و بیشترین تعداد مثبت مربوط به ضایعه SCC بود.

نتیجه گیری: تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در غشاء پایه، ماتریکس خارج سلولی و اپیتلیوم بافت سرطان بدخیم، خبر از رفتار تهاجمی و متاستاز سرطان در OSCC می دهد.

کلمات کلیدی: کارسینوما سلول سنگفرشی، وروکوس کارسینوما، دیسپلازی، لامینین ۵ گاما ۲.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۷ دوره ۴۲ / شماره ۳: ۵۸-۲۴۷.

مقدمه

تومور در بیماران با کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم دیده شود. دیسپلازی خفیف، متوسط و شدید به ابنورمالیتی اپیتلیالی با شدت متغیر برمی گردد.^(۱،۵) دیسپلازی اپیتلیال در ضایعات مخاط دهان وجود دارد و با سرعت متفاوت (۶۶٪ تا ۳۶٪)، به کارسینوما سلول سنگفرشی مهاجم تبدیل می شود.^(۷) وروکوس کارسینوما شکل درجه پایین SCC دهانی است که توسط آکرمین به عنوان بدخیمی مرتبط با تنباکوی جویدنی گزارش شده است.^(۸)

رشد اندوفیتیک آن به دلیل غشاء پایه انعطاف پذیر آن است که مانع رشد کارسینوما توز آن می گردد.^(۹) وروکوس کارسینوما می تواند یک دیسپلازی متوسط یا مناطقی از اسکواموس سل کارسینوما را در خود نشان دهد که باید به خوبی شناخته شده و تشخیص داده شود و این نیازمند یک مطالعه پاتولوژیکی کامل با کمک ایمونوهیستوشیمی می باشد. وروکوس کارسینوما در تشخیص افتراقی وروکوس هایپرپلازی و اسکواموس سل کارسینوما قرار می گیرد. وروکوس کارسینوما دارای تهاجم موضعی می باشد و متاستاز به لنف نود را نشان نمی دهد.^(۱۰) در طی دوره تهاجم ماتریکس برون سلولی،

کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان (OSCC) از شایعترین سرطانهای حفره دهان در سراسر جهان می باشد.^(۱) نئوپلاسم اپیتلیال بدخیم، مقادیر متنوعی از تمایز بافت شناسی را نشان می دهد و تمایل زیادی به متاستاز منطقه ای دارد.^(۲)

دیسپلازی اپیتلیال دهان یک مارکر هیستولوژیک برای ضایعات پیش بدخیم در مخاط دهان است که ممکن است از نظر کلینیکی به صورت لکوپلاکیا، اریتروپلاکیا یا لکواریتروپلاکیا باشد و پیش گوئی کننده سرعت رو به افزایش تکامل در کاسینوم سلول سنگفرشی است.^(۳) بسیاری از کارسینوم های سلول سنگفرشی از طریق یک مرحله پیش بدخیمی، دیسپلازی اپی تلیالی یا کارسینوم درجا، ایجاد می شوند. دیسپلازی اپی تلیالی دهانی یک اصطلاح تشخیصی است که برای توصیف تغییرات هیستولوژیکی به کار می رود که در اختلالات پیش بدخیم مزمن و پیش رونده مخاط دهانی دیده می شود و در واقع به اپی تلیوم غیرطبیعی و رشد غیرمعمول آن اطلاق می شود در جایی که آتیپی سلولی وجود داشته باشد.^(۴) همچنین ممکن است به صورت مداوم در مخاط مجاور

بسیاری از تومورهای بدخیم اپتلیال^(۲۰،۲۱) و همچنین SCC گزارش شده است.^(۲۲،۲۳) ردیابی این مارکر به روش ایمونوهیستوشیمی می‌تواند شناسایی تهاجم‌های خیلی کوچک (میکرواینوازیون) را که تشخیص آنها در رنگ آمیزی‌های هیستوپاتولوژیک معمول مشکل است، تسهیل نماید^(۲۴،۲۵) و همچنین در افتراق بین ضایعات مهاجم و غیرمهاجم پیشنهاد شده است.^(۲۶)

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، وروکوس کارسینوما و مخاط دیسپلاستیک در مقایسه با بافت سالم بود.

مواد و روشها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی تحلیلی و مقطعی بود. برای انجام این مطالعه، نمونه‌های بایگانی گروه آسیب‌شناسی فک، دهان و صورت از دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان بین سالهای ۹۳-۱۳۸۳ مورد بررسی قرار گرفت، همچنین جهت تکمیل نمونه از بایگانی آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی تهران در سالهای ۹۳-۱۳۸۳ با تشخیص SCC و وروکوس کارسینوما، استفاده شد. نمونه‌هایی که پرونده‌هایشان ناقص بوده یا بافت کافی SCC یا تشخیص قطعی آنها در دسترس نبود، از مطالعه خارج شدند. از تعداد ۶۰ نمونه، ۳ مورد به علت بافت ناکافی حذف گردید. در مطالعه کنونی ۳۱ نمونه OSCC، ۹ مورد وروکوس کارسینوما، ۸ نمونه از اسلایدهای فاقد تومور بیماران OSCC با تشخیص مخاط نرمال (گروه کنترل ۹) و ۹ مورد از بلوکهای فاقد تومور بیماران SCC با تشخیص دیسپلازی مورد بررسی قرار گرفت. تشخیص دیسپلازی فقط براساس هیستومورفولوژی بود و هیچگونه اطلاعات کلینیکی نداشتیم. از بلوکهایی که از نمونه بیمار در طی

سلول تومور باید به اجزای خود اتصال یابد و با استفاده از آنزیمهایی مانند متالو پروتئینازها، تخریب خویش را سرعت بخشد و از طریق ماتریکس تخریب در فرایند چرخه‌ای پیش رود.^(۱۱،۱۲) لامینین (لامینین ۳۳۲)، گلیکوپروتئین heterotrimeric می‌باشد که از طریق زیر واحدهای $\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$ شکل گرفته است. لامینین ۵ توسط سلولهای اپتلیال پایه در غشای پایه مجاور سنتز و ترشح می‌گردد. عملکرد اصلی آن مشارکت در چسبندگی استاتیک میان این ساختارها می‌باشد. این چسبندگی با تعامل میان زنجیره $\alpha 3$ از لامینین ۵ گاما ۲ و اینتگرین $\alpha 6 \beta 4$ در غشاء سلولی صورت می‌گیرد.^(۱۳-۱۵) در طی هجوم تومور، توسط متالوپروتئینازها (ماتریکس متالوپروتئیناز نوع دوم و ماتریکس متالوپروتئیناز نوع غشایی) در لامینین ۵ گاما ۲ پروتئولیز روی می‌دهد و منجر به انتشار پلی پپتید شناخته شده در قالب لامینین ۵ گاما ۲ در ماتریکس برون سلولی می‌گردد.^(۱۸،۱۷) لامینین ۵ گاما ۲ به گیرنده‌های سلولی نئوپلاستیک از گروه گیرنده عامل رشد اپیدرمال (EGFR) متصل می‌باشد که به فسفوریلاسیون درون سلولی از اینتگرین $\alpha 6 \beta 4$ اختلال چسبندگی غشاء پایه سلول منجر می‌گردد. این فرایند مسئول تغییرات اسکلت سلولی است که فنوتیپ سلول تومور را از چسبندگی استاتیک به وضعیت جابجا شونده تغییر می‌دهد و در سلولهای سرطانی تحرک لازم برای هجوم را فراهم می‌سازند.^(۱۶،۱۷،۱۲) لامینین ۵ گاما ۲ زنجیره‌ای پروتئینی است که نقش مهمی در جابجایی سلولهای نئوپلاستیک در طول تهاجم تومور ایفا می‌کند^(۱۹) در تهاجم تومور، لامینین ۵ گاما ۲ بایستی از طریق پروتئولیز غشای پایه^(۱۳،۱۴،۱۸) و یا از طریق سنتز در سیتوپلاسم سلولهای نئوپلاستیک تشکیل شود. افزایش بیان آن با پیش آگهی ضعیف مرتبط می‌باشد که در

لامها در فور حرارتی ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و نهایتاً در دو ظرف گزیلول به مدت ۵ دقیقه و سه ظرف الکل نزولی (به ترتیب ۱۰۰٪، ۸۰٪، ۶۵٪) به مدت ۲ دقیقه جهت آب دهی بافتها قرار داده شدند. بعد لامها در آب اکسیژنه ۳٪ قرار داده شدند و پس از ۵ دقیقه با آب مقطر شست و شو داده شدند. برای لامینین ۵ گاما ۲ بافر تریس با pH=9 به مدت ۲۵ دقیقه در ماکروویو قرار داده شد. آنتی بادی اولیه و لامینین ۵ گاما ۲ را روی بافت ریخته و پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، لامها با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. Envision به مدت ۳۰ دقیقه روی لامها ریخته (در دمای محیط) و سپس با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. در مرحله بعد، از کروموزن دی آمینوبزیدین برای رنگ آمیزی به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و سپس با آب مقطر شستشو داده شد. نواحی بافتی که مارکر مورد نظر در آنها بیان می شد در زیر میکروسکوپ نوری به رنگ قهوه ای دیده می شد. از رنگ آمیزی هماتوکسیلین به عنوان رنگ زمینه استفاده شد. لامها با چسب انتلان مانت شد و با میکروسکوپ نوری (Nikon E200, Japan) رویت شد. برای تمام آنتی بادیها مراحل کنترل مثبت و کنترل منفی انجام شد. پس از رنگ آمیزی لامها، دو پاتولوژیست به وسیله میکروسکوپ نوری (Nikon ساخت ژاپن مدل E200) لامها را مورد ارزیابی قرار دادند.

تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ در اپیتلیوم، غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی با استفاده از متد ارائه شده توسط هامازاکی به صورت چهار اسکور که در زیر اشاره شده است، بررسی شد.

SCORE 0 ، فاقد تظاهر بود.

SCORE +1 ، تا ۲۵ درصد سلولها مثبت بود.

جراحی رادیکال برداشته شده بود، استفاده گردید. باید توجه داشت که این تغییرات هیستولوژیکی غیرنرمال بافت اطراف OSCC نقش مهمی در ایجاد تومورهای متعدد اولیه یا عود موضعی دارد. توموری که آنقدر بالغ است که به بافت منشاء خود شباهت زیادی دارد به نظر می رسد با سرعت کمتری رشد کند و دیر متاستاز دهد، چنین توموری Low grade یا کارسینوم سلول سنگفرشی کاملاً تمایز یافته می باشد. بالعکس توموری که پلئومورفیسم سلولی و هسته ای زیاد دارد و تولید کراتین نداشته یا تولید کراتین آن بسیار کم است، ممکن است آنقدر نابالغ باشد که تشخیص بافت منشاء آن مشکل باشد. چنین توموری اغلب با سرعت رشد کرده و خیلی سریع متاستاز می دهد. این تومور High grade یا تمایز اندک یا آناپلاستیک نامیده می شود و توموری که از لحاظ میکروسکوپی مابین این دو است کارسینوم با تمایز متوسط نامیده می شود.^(۸)

داده های بالینی شامل سن، جنس، محل ضایعه از پرونده بیماران استخراج شد. از هر بلوک پارافینه برش ۴ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسین-ئوزین رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفت 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. لامینین ۵ گاما ۲ با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با روش Envision و تظاهر ایمونوهیستوشیمیایی موارد فوق با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال لامینین ۵ گاما ۲ (کلون 4G1 غلظت 1/50 ساخت کارخانه Dako دانمارک) مورد بررسی قرار گرفت.

جهت رنگ آمیزی، ابتدا برشهای سه میکرونی از بلوکها تهیه شد. سپس در مرحله دیپارافینه و آب دهی،

یافته ها

این تحقیق بر روی ۳۱ بلوک پارافینی OSCC، ۹ بلوک وروکوس کارسینوما، ۹ نمونه دیسپلازی و ۸ مورد مخاط نرمال (به عنوان گروه کنترل) انجام شد. میانگین سن افراد ۶۲ سال با انحراف معیار ۱۶ سال بود. محل ضایعه اکثر بیماران زبان و بعد از آن لب پایین بود.

SCORE +2، ۲۵ تا ۵۰ درصد سلولها مثبت بودند. SCORE +3، ۷۵-۵۰ درصد سلولها مثبت بودند. SCORE +4، بیش از ۷۵ درصد سلولها مثبت بودند. میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی تلیوم در حداقل پنج ناحیه هات اسپات با بزرگنمایی ۱۰ مشخص و با بزرگنمایی ۴۰ تعیین اسکور شد. داده‌ها توسط آزمونهای آماری کای اسکوئر و من ویتنی مورد بررسی قرار گرفت و توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شد.

جدول ۱. توزیع فراوانی سن و جنس افراد تحت مطالعه

سن	(درصد)	تعداد	جنس	(درصد)	تعداد
زیر ۶۰ سال	(۴۳/۹)	۲۵	مرد	(۶۸/۴)	۳۹
بیشتر یا مساوی ۶۰ سال	(۵۶/۱)	۳۲	زن	(۳۱/۶)	۱۸
کل	(۱۰۰/۰)	۵۷	کل	(۱۰۰/۰)	۵۷

جدول ۲. توزیع فراوانی میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی تلیوم SCC، وروکوس کارسینوما، مخاط دیسپلاستیک و نرمال

میانگین رتبه ای	SCORE				نوع ضایعه
	۳	۲	۱	۰	
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
۳۵/۱۱a	۷(۲۲/۶)	۶(۱۹/۴)	۶(۱۹/۴)	۱۲(۳۸/۷)	SCC
۲۵/۸۳b	۱(۱۱/۱)	۰(۰/۰)	۲(۲۲/۲)	۶(۶۶/۷)	وروکوس کارسینوما
۱۷c	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۸(۱۰۰/۰)	Normal
۲۱/۷۸b	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۲(۲۲/۲)	۷(۷۷/۸)	مخاط دیسپلاستیک

نتیجه آزمون کروسکال-والیس $x^2=۱۳/۰۷$ و $P\text{-value}=۰/۰۰۴$

حروف یکسان نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنادار دو به دو بین گروهها بر اساس آزمون من-ویتنی با اصلاح بن-فرنی است.

داشت. بر اساس جدول بالا فراوانی رتبه‌های لامینین بین انواع ضایعه تفاوت معناداری را نشان می‌داد (سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ است). بنابراین با استفاده از آزمون من-ویتنی رتبه‌های لامینین بین گروهها به صورت دو به دویی مقایسه شد. بر این اساس میانگین رتبه‌ای بین گروه SCC با گروههای وروکوسکارسینوما، مخاط نرمال و

بر اساس جدول ۲ میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی تلیوم نمونه‌های SCC در ۶۱/۳ درصد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۳۳/۳ درصد مثبت، در مخاط دیسپلاستیک ۲۲/۲ درصد مثبت و در مخاط نرمال ۱۰۰ درصد منفی بود. در SCC تنها در ۲۲/۶ درصد بیان قوی و در وروکوسکارسینوما ۱۱/۱ درصد بیان قوی

دیسپلاستیک تفاوت معناداری وجود داشت (حروف یکسان در جدول نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار دوه دویی بین گروهها براساس آزمون من-ویتنی است).

دیسپلاستیک تفاوت معنادار داشت. همچنین میانگین رتبه‌ای بین گروه وروکوسکارسینوما با گروه نرمال تفاوت معنادار داشت. به‌علاوه بین گروه نرمال با مخاط

جدول ۳. توزیع فراوانی بیان نشانگر لامینین در ناحیه غشاء پایه به تفکیک ضایعات مورد بررسی

میانگین رتبه ای	SCORE					
	۳	۲	۱	۰		
	n(%)	n(%)	n(%)	n (%)		
۳۱/۲۱	۷(۲۲/۶)	۱(۳/۲)	۱۶(۵۱/۶)	۱۴(۴۵/۲)	SCC	نوع ضایعه
۲۹/۵۶	۱(۱۱/۱)	۰(۰/۰)	۳(۳۳/۳)	۵(۵۵/۶)	وروکوس کارسینوما	
۲۴/۳۱	۰(۰/۰)	۱(۱۲/۵)	۱(۱۲/۵)	۶(۷۵/۰)	Normal	
۲۵	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۳(۳۳/۳)	۶(۶۶/۷)	مخاط دیسپلاستیک	
x ² =۲/۲۲۴ و P-value=۰/۵۲۷					نتیجه آزمون کروسکال-والیس	

مخاط نرمال ۷۵ درصد اسکور ۰ و در غشای پایه اپتلیوم دیسپلاستیک ۶۶/۷ درصد فاقد بیان بود. بر اساس جدول بالا فراوانی رتبه های لامینین در غشای پایه بین گروههای مختلف نوع ضایعه تفاوت معناداری را نشان نمی‌داد (سطح معناداری بیشتر از ۰/۰۵ است).

بر اساس جدول ۳ میزان تظاهر نشانگر لامینین در غشاء پایه نمونه‌های SCC در ۵۱/۶ درصد اسکور ۱ و ۳/۲ درصد اسکور ۲ را نشان می‌داد. در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۵۵/۶ درصد اسکور ۰ ، ۳۳/۳ درصد اسکور ۱ و در ۱۱/۱ درصد اسکور ۳ نشان داد.

جدول ۴. توزیع فراوانی بیان نشانگر لامینین در ماتریکس خارج سلولی به تفکیک ضایعات مورد بررسی

میانگین رتبه ای	SCORE					
	۳	۲	۱	۰		
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)		
۳۱/۱۰	۱(۳/۲)	۰(۰)	۴(۱۲/۹)	۲۶(۸۳/۹)	SCC	نوع ضایعه
۲۶/۵۰	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۹(۱۰۰/۰)	وروکوس کارسینوما	
۲۶/۵۰	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۸(۱۰۰/۰)	Normal	
۲۶/۵۰	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)	۹(۱۰۰/۰)	مخاط دیسپلاستیک	
x ² =۴/۵۱۰ و P-value=۰/۲۱					نتیجه آزمون کروسکال-والیس	

داده ها بوسیله (درصد) تعداد بیان شد

۱۶/۱ درصد موارد مثبت بود و در نمونه‌های وروکوس کارسینوما، مخاط نرمال و دیسپلاستیک، بیان نشانگر

بر اساس جدول ۴ میزان تظاهر نشانگر لامینین در ناحیه ماتریکس خارج سلولی نمونه‌های SCC در

بین گروههای مختلف نوع ضایعه تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد (سطح معناداری بیشتر از ۰/۰۵ است).

لامینین در ۱۰۰ درصد موارد منفی بود. بر اساس جدول بالا، فراوانی رتبه‌های لامینین در ماتریکس خارج سلولی

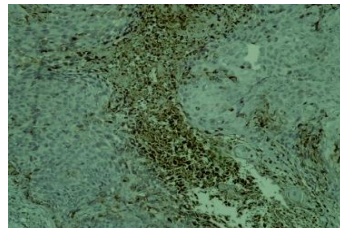
جدول ۵. توزیع فراوانی بیان نشانگر لامینین در سلولهای تومورال، غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی به تفکیک ضایعات مورد بررسی

ماتریکس خارج سلولی		غشای پایه		سلولهای تومورال		نوع ضایعه
منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	
۲۶(۸۳/۹)	۵(۱۶/۱)	۱۴(۴۵/۲)	۱۷(۵۴/۸)	۱۲(۳۸/۷)	۱۹(۶۱/۲)	SCC
۹(۱۰۰/۰)	۰(۰/۰)	۵(۵۵/۶)	۴(۴۴/۴)	۶(۶۶/۷)	۳(۳۳/۳)	وروکوس کارسینوما
۸(۱۰۰/۰)	۰(۰/۰)	۶(۷۵/۰)	۲(۲۵/۰)	۸(۱۰۰/۰)	۰(۰/۰)	Normal
۹(۱۰۰/۰)	۰(۰/۰)	۶(۶۶/۷)	۳(۳۳/۳)	۷(۷۷/۸)	۲(۲۲/۲)	مخاط دیسپلاستیک
$\chi^2=۴/۵۹۷$		$\chi^2=۲/۹۸۵$		$\chi^2=۱۲/۰۲۷$		نتیجه آزمون کروسکال-والیس
P=۰/۲۰۴		P=۰/۳۹۳		P=۰/۰۰۷		

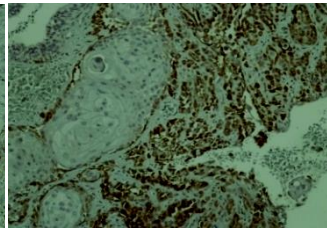
ماتریکس خارج سلولی در ضایعه SCC بیشتر از سایر ضایعه‌ها بود.

بر اساس جدول ۵، بیان لامینین فقط در سلولهای تومورال در انواع ضایعه تفاوت معنادار داشت. بیان نشانگر لامینین مثبت در سلولهای تومورال، غشاء پایه و

ب



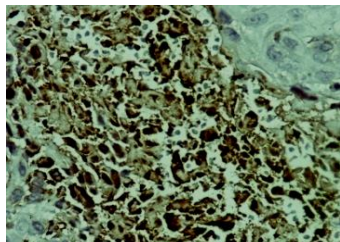
الف



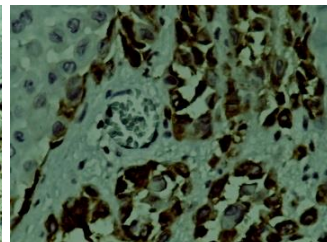
تصویر ۱. بروز نشانگر لامینین در SCC با تمایز متوسط (Score 3) (در بزرگنمایی ۱۰)

الف) در سلولهای تومورال ب) در ماتریکس خارج سلولی

ب

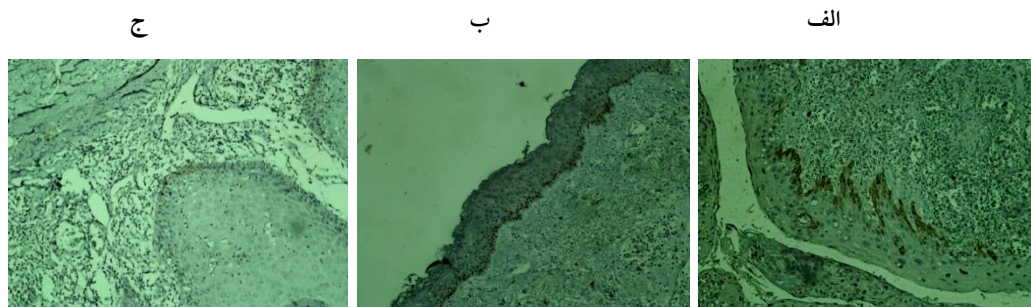


الف

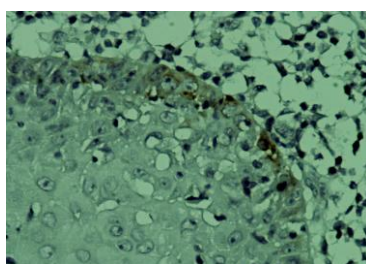


تصویر ۲. بروز نشانگر لامینین در SCC (در بزرگنمایی ۱۰)

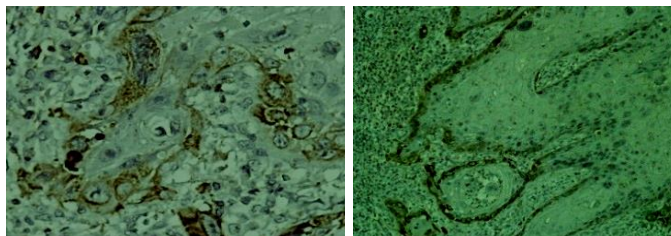
الف) تمایز متوسط (Score 3) ب) در ماتریکس خارج سلولی



تصویر ۳. بروز نشانگر لامینین در غشاء پایه اپتلیوم (در بزرگنمایی ۱۰)
الف) اپی تلیوم دیسپلاستیک (ب) مخاط نرمال (ج) وروکوس کارسینوما



تصویر ۴. بروز نشانگر لامینین در غشاء پایه اپتلیوم وروکوس کارسینوما (در بزرگنمایی ۴۰)



تصویر ۵. بروز نشانگر لامینین در غشاء پایه اپتلیوم دیسپلاستیک و جزایر تومورال

الف) در بزرگنمایی ۱۰ (ب) در بزرگنمایی ۴۰

(در تصاویر فوق سلولهای با تظاهر مثبت لامینین ۵ گاما ۲ به رنگ قهوه ای هستند)

بحث

لامینین در ناحیه غشاء پایه در کانسر دهان در ۵۴/۸ درصد، در وروکوس کارسینوما ۴۴/۴ درصد، در مخاط دیسپلاستیک ۳۳/۳ درصد و در مخاط نرمال ۱۵ درصد بود. در ناحیه ماتریکس خارج سلولی این نشانگر فقط در کانسر دهان مثبت بود و در وروکوس کارسینوما و مخاط دیسپلاستیک و نرمال منفی بود.

در بررسی حاضر، میزان تظاهر نشانگر لامینین در سلولهای تومورال کانسر دهان در مقایسه با وروکوس کارسینوما و مخاط دیسپلاستیک و نرمال بیشترین بیان را داشت و در سلولهای مخاط نرمال فاقد بیان بود و این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود. میزان تظاهر نشانگر

در غشاء پایه مثبت بود، در اپی تلیوم و ماتریکس خارج سلولی منفی بود. در بررسیهای قبلی، بیان نشانگر لامینین ۵ گاما ۲، در دیسپلازی اپیتلیال پیش بدخیم و بعضی سلولهای راکتیو اپیتلیالی در اپیتلیوم زخمی نیز مشاهده گردیده است.

بررسیهای مهمی نیز واکنش آنتی بادی برای لامینین ۵ گاما ۲ را در غشای پایه اپیتلیوم مخاط دهان^(۳۰،۳۱) و پوست^(۳۲،۳۳) نشان داده‌اند. در مطالعه حاضر نیز در غشاء پایه مخاط نرمال در ۲۵ درصد موارد بیان لامینین مثبت بود.

اهمیت بیان لامینین ۵ گاما ۲ برای رفتار تهاجمی تومور ناشناخته است. به نظر می‌رسد بیان بالای لامینین ۵ گاما ۲ یکی از شاخصهای سلولهای کارسینوما باشد.

در مطالعه Marangon و همکاران^(۳۴) و Lindberg و همکاران^(۳۶) آنتی‌بادی منو کلونال لامینین ۵ گاما ۲ با غشاء پایه واکنش نداده و فقط واکنش سیتوپلاسمی مشاهده گردید.

بر اساس مطالعه کنونی بروز لامینین در نمونه‌های SCC در سیتوپلاسم سلولهای نئوپلاستیک، با اسکور ۳ با فراوانی ۲۲/۶ درصد، و اسکور ۲، ۱۹/۴ درصد و اسکور ۱، ۱۹/۴ درصد بود (جدول ۳) که همسو با مطالعه Marangon و همکاران^(۳۴) و نتایج مطالعات دیگر می‌باشد.^(۲۴،۲۸)

در مطالعه حاضر بر اساس جدول ۳، میزان تظاهر نشانگر لامینین در اپی تلیوم نمونه‌های SCC در ۶۱/۴۶ درصد مثبت بود. در نمونه‌های وروکوس کارسینوما در ۳۳/۳ درصد مثبت، در دیسپلازی ۲۲/۲ درصد مثبت و در مخاط نرمال ۱۰۰٪ منفی بود. بر اساس جدول ۳ فراوانی رتبه صفر لامینین بین انواع ضایعه تفاوت معناداری را نشان می‌داد (سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ است). که با

در بررسی Maatta و همکاران^(۲۹) که به بررسی لامینین در سلولهای کارسینوم ریه در سلولهای تومورال، ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه پرداخت، در غشاء پایه بروز لامینین منفی، در ماتریکس خارج سلولی منفی، اما بروز لامینین در سلولهای تومورال مثبت بود.

در بررسی حاضر نشانگر لامینین در سلولهای تومورال و غشاء پایه و در ماتریکس خارج سلولی در کانسر دهان مثبت بود.

در مطالعه‌ای که توسط Fukushima و همکاران^(۳۰) صورت گرفت، آنها به نقش لامینین ۵ گاما ۲ در تومورهای مهاجم پرداختند و به این نتیجه رسیدند که در ۸۰ تا ۱۰۰ درصد کیسه‌های 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. نتایج پیشنهادی آنها این بود 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. در بررسی حاضر نیز کانسر دهان با ماهیت تهاجمی این نشانگر هم در سلولهای تومورال هم غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی مشاهده گردید که دال بر تهاجمی بودن تومور است. در وروکوس کارسینوما نیز در سه مورد بیان ضعیف در غشای پایه و یک مورد بیان قوی داشت که شاید در کیس با بیان قوی بیانگر تبدیل آن به یک کانسر مهاجم باشد.

در مخاط دیسپلاستیک نیز بیان نشانگر لامینین ۵ گاما ۲ هم در سلولهای دیسپلاستیک هم در غشاء پایه ضعیف و با اسکور ۱ بود و با اختلاف کم از وروکوس کارسینوما کمتر بود و در مخاط نرمال به جز دو مورد که

ندرت در غشاء پایه است و تظاهر آن در غشاء پایه در نمونه های فروزن مشاهده گردید.

از طرفی این اختلاف در تظاهر زنجیره لامینین ۵ گاما ۲ ممکن است در ارتباط با پروسیسینگ نمونه ها باشد تا کیفیت آنتی بادی. همچنین در روش western blot، تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ هم به فرم داخل و هم خارج سیتوپلاسمی نمایش داده شده است. به هر سوی، هردو متد، نقش زنجیره لامینین ۵ گاما ۲ در استروما را در رفتار تهاجمی موثر می دانند و موید این نکته است که لامینین ۵ گاما ۲ توسط خود سلولهای بدخیم ساخته می شود.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می کند که هر چه بروز لامینین ۵ گاما ۲ افزایش پیدا می کند تومور رشد بیشتری پیدا می کند و می تواند یک نشانگر جهت نشان دادن قدرت تهاجم سلولهای تومورال باشد (تهاجم موضعی) بنابراین لامینین ۵ گاما ۲ می تواند یک مارکر سودمند برای تعریف تفاوت های بیولوژیک و تشخیص وروکوس کارسینوما از SCC دهانی خوب تمایز یافته به خصوص در موارد مشکوک باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه شماره 23810201931034 خانم دکتر بهاره رشوادی از دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) می باشد. بدین وسیله از اساتید گروه مذکور و نیز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه قدردانی کرده و متذکر می گردد که منابع مالی این تحقیق از هزینه های شخصی پژوهشگر تامین گردیده است.

مطالعات Fukushima و همکاران^(۲۷) و Masuda و همکاران^(۲۸) همخوانی داشت.

در بررسی حاضر، بیان لامینین ۵ گاما ۲ در وروکوس کارسینوما و دیسپلازی نسبت به SCC کمتر بود. در تحقیقات قبلی نیز این مطرح شده که بیان لامینین ۵ گاما ۲ ممکن است در ارتباط با فنوتیپ تهاجمی باشد چرا که SCC مهاجم نسبت به وروکوس کارسینوما و دیسپلازی بیان بالاتری از لامینین ۵ گاما ۲ را نشان می دهد. تحقیق حاضر با مطالعه مروری Miyazaki^(۱۶) که به نقش پروتئینهای لامینین ۵ گاما ۲ در غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی در سست کردن چسبندگی سلولی و مهاجرت سلولهای مهاجم و بدخیم می پردازد و چند مطالعه دیگر^(۲۹، ۲۸، ۲۴ و ۲۲، ۱۷) همخوانی دارد.

بر اساس جدول ۵ میزان تظاهر نشانگر لامینین در ناحیه ماتریکس خارج سلولی نمونه های SCC در ۱۶/۱ درصد موارد مثبت بود و در نمونه های وروکوس کارسینوما، مخاط نرمال و دیسپلازی بیان نشانگر لامینین در ۱۰۰٪ موارد منفی بود.

با وجود این برخی مطالعات تنها ایمونوهیستوشیمی سیتوپلاسمی لامینین ۵ گاما ۲ در SCC دهانی را گزارش نموده اند^(۲۲، ۲۳)، اما تشخیص لامینین ۵ گاما ۲ در مجاور سلولهای تومورال در قسمت تهاجمی نیز گزارش شده است.^(۳۵) در ارتباط با نحوه تظاهر لامینین ۵ گاما ۲، داخل سیتوپلاسم یا غشاء پایه، نظر به اینکه از نمونه های بلوک پارافینی یا نمونه های فروزن استفاده شده باشد اختلاف نظر وجود دارد. در استفاده از بلوک پارافینی، تظاهر لامینین ۵ گاما ۲ بیشتر داخل سیتوپلاسم و به

منابع

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancerin 2008. Globocan 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12):2893-917.
2. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World health organization classification of tumours, pathology and genetics, head and neck tumours. Albany: IARC Press; 2005. P. 164-75.
3. Bouquot J, Speight PM, Farthing PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa—diagnostic problems and prognostic features. *Curr Diagn Pathol* 2006; 12(1):11-21.
4. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol* 2007; 1(1):61-6.
5. MacDonald DG, Speight PM. Tumours of the oral cavity. In: Fletcher CD, editor. *Diagnostic histopathology of tumors*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 2007. P. 215-37.
6. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(5):251-6.
7. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79(3):321-9.
8. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. *Oral and maxillofacial pathology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. P. 178-9.
9. Alkan A, Bulute E, Gunhan O, Ozden B. Oral verrucous carcinoma: a study of 12 cases. *Eur J Dent* 2010; 4(2):202-7.
10. Yorganci A, Serinsoz E, Ensari A, Sertcelik A, Ortac F. A case report of multicentric verrucous carcinoma of the female genital tract. *Gynecol Oncol* 2003; 90(2):478-81.
11. Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986; 46(1):1-7.
12. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-8.
13. Hintermann E, Quaranta V. Epithelial cell motility on laminin-5: regulation by matrix assembly, proteolysis, integrins and erbB receptors. *Matrix Biol* 2004; 23(2):75-85.
14. Marinkovich MP. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(5):370-80.
15. Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res* 2010; 339(1):259-68.
16. Miyazaki K. Laminin-5 (laminin-332): unique biological activity and role in tumor growth and invasion. *Cancer Sci* 2006; 97(2):91-8.
17. Koshikawa N, Minegishi T, Sharabi A, Quaranta V, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin γ 2 chain. *J Biol Chem* 2005; 280(1):88-93.
18. Katayama M, Seriguchiz K. Laminin-5 in epithelial tumour invasion. *J Mol Histol* 2004; 35(3):277-86.
19. Aishima S, Matsuura S, Terashi T, Taguchi K, Shimada M, Maehara Y, et al. Aberrant expression of laminin gamma 2 chain and its prognostic significance in intrahepatic cholangiocarcinoma according to growth Morphology. *Mod Pathol* 2004; 17(8):938-45.
20. Patel V, Aldridge K, Ensley JF, Odell E, Boyd A, Jones J, et al. Laminin-gamma2 overexpression in head-and-neck squamous cell Carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 99(4):583-8.
21. Kim BG, An HJ, Kang S, Choi YP, Gao MQ, Park H, et al. Laminin-332-rich tumor microenvironment for tumor invasion in the interface zone of breast cancer. *Am J Pathol* 2011; 178(1):373-81.
22. 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.

23. Gasparoni A, Della Casa M, Milillo L, Lorenzini G, Rubini C, Urso R, et al. Prognostic value of differential expression of Laminin-5 gamma2 in oral squamous cell carcinomas: correlation with survival. *Oncol Rep* 2007; 18(4):793-800.
24. Hamasaki H, Koga K, Aoki M, Hamasaki M, Koshikawa N, Seiki M, et al. Expression of laminin 5- γ 2 chain in cutaneous squamous cell carcinoma and its role in tumour invasion. *Br J Cancer* 2011; 105(6):824-32.
25. Miyazaki K. Laminin5 (laminin-332): unique biological activity and role in tumor growth and invasion. *Cancer Sci* 2006; 97(2):91-8.
26. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-8.
27. 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.
28. 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.
29. Maatta M, Soini Y, Paakko 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.
30. Thorup AK, Dabelsteen E, Schou S, Gil SG, Carter WG, Reibel J. Differential expression of integrins and laminin-5 in normal oral epithelia. *APMIS* 1997; 105(7):519-30.
31. Dabelsteen E, Grøn B, Mandel U, Mackenzie I. Altered expression of epithelial cell surface glycoconjugates and intermediate filaments at the margins of mucosal wounds. *J Invest Dermatol* 1998; 111(4):592-7.
32. Wayner EA, Gil SG, Murphy GF, Wilke MS, Carter WG. Epiligrin, a component of epithelial basement membranes, is an adhesive ligand for alpha 3 beta 1 positive T lymphocytes. *J Cell Biol* 1993; 121(5):1141-52.
33. Gil SG, Brown TA, Ryan MC, Carter WG. Junctional epidermolysis bullosis: defects in expression of epiligrin/nicein/kalinin and integrin beta 4 that inhibit hemidesmosome formation. *J Invest Dermatol* 1994; 103(5 Suppl):31S-8S.
34. Marangon Junior H, Rocha VN, Leite CF, de Aguiar MC, Souza PE, Horta MC. Laminin-5 gamma 2 chain expression 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.
35. Franz M, Hansen T, Borsi L, Geier C, Hyckel P, Schleier P, et al. A quantitative colocalization analysis of large unspliced tenascin-CL and laminin-5/c2-chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(1):6-11.
36. Lindberg P, Larsson A, Nielsen BS. Expression of plasminogen activator inhibitor-1, urokinase receptor and laminin gamma-2 chain is an early coordinated event in incipient oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 118(12):2948-56.
37. Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Rømer J, Danø K, Tryggvason K. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 1995; 55(18):4132-9.
38. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40(2):127-32.