

بررسی حضور ماست سل ها و بروز ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در استرومای ضایعه‌ی اسکواموس سل کارسینومای دهانی

عاطفه طاهری بروجنی^۱، معصومه بهداروندی^{۲*}، زهرا ساجدی^۳

^۱ استادیار گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

^۲ دستیار تخصصی گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ دستیار تخصصی گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۳۰

Evaluation of Mast Cell Density and Expression of Immunohistochemistry Matrix Metalloproteinase-9 Oral Squamous Cell Carcinoma

Atefeh Taheri Boroujeni¹, Masoumeh Behdarvandi^{2*}, Zahra Sajedi³

¹ Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Postgraduate Student, Department of Endodontics, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Postgraduate Student, Department of Periodontics, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 10 May 2021; Accepted: 21 September 2021

Introduction: Squamous cell carcinoma is one of the most common malignancies in the oral cavity. The number and distribution of mast cells affect the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Mast cells can produce enzymes, such as matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that can affect OSCC growth and the aggressive behavior of tumors. This study investigated the mast cell density and immunohistochemical expression of MMP9 in OSCC.

Materials and Methods: In this descriptive study, 10 paraffin blocks of OSCC were selected from the pathology department archive in the Dentistry College of Jundishapur University of Medical Sciences and Imam Khomeini Hospital in Ahvaz, Iran. Afterward, 4- μ m sections were cut from paraffin blocks and stained using the immunohistochemical method for MMP9 expression and using toluidine blue for mast cell count. The expression of MMP9 in the epithelium and connective tissue was investigated, and the number of mast cells was counted in five high-power fields.

Results: In this study, MMP9 was expressed (over 50%) in eight cases in the epithelium and nine cases in connective tissue. In one case, MMP9 was not expressed in the epithelium. No statistically significant association was observed between immunohistochemical expression of MMP9 in connective tissue and the mean number of mast cells in OSCC connective tissue. One of the specimens was excluded from this study due to the low amount of tumor tissue.

Conclusion: Expression of MMP9 in the connective tissue of all cases may indicate the aggressive behavior of OSCC; however, this expression may not be related to mast cell density or may be suppressed with a high number of mast cells.

Key words: Squamous cell carcinoma, Oral cavity, Matrix metalloproteinase-9, Mast cell

Corresponding Author: masbhdad@gmail.com

J Mash Dent Sch 2022; 46(2): 148-58.

چکیده

مقدمه: اسکواموس سل کارسینوما شایع‌ترین بدخیمی در حفره‌ی دهان است. تعداد و توزیع ماست سل‌ها بر پاتوژنز اسکواموس سل کارسینومای دهانی تأثیر دارد. از جمله آنزیم‌هایی که ماست سل‌ها می‌توانند تولید کنند، ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP9) است که ممکن است رشد و رفتار تهاجمی این سرطان را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعه حاضر تعداد ماست سل‌ها و بروز ایمونوهیستوشیمی MMP9 را در ضایعات اسکواموس سل کارسینومای دهانی بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰ بلوک پارافینی از ضایعه‌ی اسکواموس سل کارسینومای دهانی از آرشیو بخش پاتولوژی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز و بیمارستان امام اهواز انتخاب شدند. از بلوک‌های پارافینی مربوط به این ضایعات برش‌هایی به

* مؤلف مسؤل، نشانی: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دندانپزشکی، گروه اندودانتیکس، دندانی، تلفن: ۰۹۱۶۶۰۹۳۱۴۹

E-mail: masbhdad@gmail.com

ضخامت ۴ میکرون تهیه شد و به روش ایمونوهیستوشیمی برای MMP9 و تولوئیدن بلو برای ماست سل رنگ آمیزی شدند. بروز MMP9 در اپی تلیوم و بافت همبند بررسی و تعداد ماست سل ها در HPF ۵ (High power field) شمرده شد و متوسط تعداد آن ها گزارش شد. یافته ها: MMP9 در ۸ نمونه در اپی تلیوم و ۹ نمونه در بافت همبند (بالای ۵۰٪) بروز پیدا کرد. در ۱ نمونه MMP9 در اپی تلیوم بروز پیدا نکرد، ارتباط معناداری بین بروز ایمونوهیستوشیمی MMP9 و متوسط تعداد ماست سل در بافت همبند اسکواموس سل کارسینومای دهانی یافت نشد. به دلیل آن که یکی از نمونه ها از نظر بافت تومور بسیار اندک بود، از مطالعه ی ما خارج شد. نتیجه گیری: بروز MMP9 در بافت همبندی تمام نمونه ها ممکن است در رفتار تهاجمی اسکواموس سل کارسینومای دهانی تعیین کننده باشد؛ اما این حضور ممکن است با تعداد ماست سل ها مرتبط نباشد و یا ممکن است با حضور تعداد بالای ماست سل ها در تضاد باشد. کلمات کلیدی: اسکواموس سل کارسینوما، حفره ی دهان، ماست سل، ماتریکس متالوپروتئیناز

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۱ دوره ۴۶ / شماره ۲: ۵۸-۱۴۸.

مقدمه

التهابی و عروق خونی را هم در بر می گیرد. ارتشاح سلول های التهابی در بافت های نئوپلاستیک را اولین بار Rudolf Virchow در سال ۱۸۶۳ گزارش نمود.^(۸)

ماست سل ها (mast cell) از جمله سلول های التهابی هستند^(۹-۱۶) که در بافت همبند حضور دارند. گرانول های ماست سل محتوی گروه وسیعی از ترکیبات پاراکرین از جمله کیمازها و تریپتازها هستند که جنبه های گوناگون یک پاسخ التهابی موضعی را پیش می برند.^(۱۰) دانسته ی بالای ماست سل ها با پروگنوز بد، افزایش آنژیوژنز و متاستاز در ضایعات بدخیم ناحیه سینه، ریه و SCC مرتبط است.^(۱۱،۱۲) ماتریکس متالوپروتئینازها عضوی از خانواده ی آنزیم های پروتئولیتیک وابسته به کلسیم و روی هستند،^(۱۳،۱۴) که به طور کلی ماتریکسین ها نامیده میشوند^(۱۵،۱۶) و به عنوان آنزیم کلیدی برای تخریب پروتئولیتیک ماتریکس خارج سلولی، پروسه ی تهاجمی و متاستاز تومورها معرفی شده اند.^(۱۷-۲۱) ماتریکس متالوپروتئینازها در انسان براساس ساختمان و محتویات درون آن ها به ۴ گروه تقسیم بندی می شوند:

- ۱- گروه کلاژناز، شامل MMP1,8,13,18 می باشند.
- ۲- گروه ژلاتیناز، شامل ژلاتینا (MMP9-92KDA) B و ژلاتیناز A (MMP2-72KDA) می باشند.
- ۳- گروه Stromlynsins، شامل MMP3,10 می باشند.

کارسینوم سلول سنگفرشی دهان Oral squamous cell carcinoma (OSCC) یکی از شایع ترین بدخیمی های حفره دهان است^(۱-۳) که حداقل ۹۲/۸٪ از سرطان های این ناحیه را شامل می شود.^(۴) اثرات مایوس کننده این تومور را، در درجه اول می توان مربوط به ویژگی های ذاتی این سرطان دهانی دانست چرا که دارای میزان بالایی از درجه تهاجم به بافت های احاطه کننده مجاور و متاستاز به گره های لنفاوی گردنی می باشد^(۵) بنابراین درک درست از مکانیسم های مولکولی رشد این سرطان دهانی و پیدا کردن شاخص تعیین کننده پیش آگهی جهت درمان مهاجمانه تر یا محافظه کارانه تر در موارد مختلف ضروری است.^(۶،۷) از لحاظ هیستوپاتولوژی شاخصه ی SCC، جزایر و طنابی از سلول های مهاجم اپی تلیوم سنگفرشی بدخیم است. تهاجم توسط گسترش غیرنرمال اپی تلیوم به درون غشاء پایه و بافت همبند زیر اپی تلیالی مشخص می شود. اغلب یک روند التهابی قوی به همراه سلول های ایمنی در پاسخ به تهاجم اپی تلیوم و همچنین کانون هایی از نکروز بروز می کند. یک تومور توپر (solid tumor) فقط از سلول های تومورال تشکیل نشده است، بلکه طیفی از سلول های استرومال شامل فیبروبلاست ها، سلول های

MMP9 را در ضایعات اسکواموس سل کارسینومای دهانی بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مقطعی است. این مطالعه در کمیسیون اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به شماره IR.AJUMS.REC.1390.123 به تصویب رسیده است. برای انجام این مطالعه نمونه‌های بایگانی آزمایشگاه آسیب‌شناسی دهان و دندان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز در فاصله سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ و بیمارستان امام اهواز در فاصله سال‌های ۹۰-۱۳۸۷ مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌های با تشخیص اسکواموس سل کارسینومای دهانی انتخاب شدند. تمام نمونه‌های اسکواموس سل کارسینوما، تومورهای اولیه با درجه‌ی هیستوپاتولوژیک مختلف از مخاط دهان با سایز زیر ۲ سانتی متر بودند. مارژین‌های بافتی عاری از تومور بودند. درگیری لنف نودها و متاستاز دوردست نیز وجود نداشت. سپس اطلاعات بالینی در مورد سن، جنس، محل ضایعه از پرونده بیماران استخراج گردید. برش‌های ۴ میکرونی از بلوک‌های پارافینی مربوط به این نمونه‌ها تهیه و به روش H&E رنگ‌آمیزی شد و لام‌های تهیه شده از لحاظ کیفیت و کمیت بافت بررسی شدند. ضایعاتی که دارای خونریزی زیاد بافتی بودند از مطالعه خارج شدند، در نهایت تعداد ۱۰ اسکواموس سل کارسینومای دهانی انتخاب شد. پس از انتخاب نمونه‌های مناسب، به روش استاندارد ایمونوهیستوشیمی برای ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ و تولوئیدن بلو برای ماست سل رنگ‌آمیزی شدند. جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی از بلوک‌های پارافینی انتخاب شده برش‌های چهار میکرونی تهیه شد و بر روی اسلایدهای شیشه‌ای پوشیده شده با محلول ۲٪ از 3-aminopropyltriethoxysilane در استون مانت شدند.

۴- گروه Membrane type MMP، شامل MMP14- 17,24,25 می‌باشند. (۱۶و۲۲و۲۳)

از بین انواع ماتریکس متالوپروتئینازها، ژلاتیناز (MMP9)B بدلیل داشتن توالی فیبرونکتین تایپ II تمایل بالایی برای اتصال با کلاژن تایپ IV موجود در غشای پایه دارد. (۱۷و۲۳) میزان ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در سطح رونویسی تنظیم می‌شود و بیان آن به وسیله‌ی انواع تحریکات شامل سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشدی، تداخلات سلول-سلول و سلول-ماتریکس تعدیل می‌شود. (۲۲) MMP9 اولین بار در نوتروفیل‌ها یافت شد، بعدها مشخص شد که ماست سل‌ها به‌عنوان منبع اصلی ماتریکس متالوپروتئینازها از جمله MMP1,3,9 هستند. (۱۴و۱۶و۲۲)

نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که محیط استرومایی در پیشرفت تومور نقش کلیدی دارد، تریپتاز موجود در ماست سل‌ها به‌طور غالب در استروما یافت می‌شود که برای آنژیوژنز، بقا و تکثیر سلول‌های توموری ضروری است. (۱۴و۱۵و۲۲و۲۳)

محققان پیشنهاد می‌کنند بیان بالای MMP9 در اسکواموس سل کارسینومای دهانی می‌تواند ناشی از تریپتاز موجود در ماست سل‌ها باشد، این تریپتاز با فعال سازی این ماتریکس متالوپروتئیناز، تخریب اجزای ماتریکس خارج سلولی و پیشرفت تومور را سبب می‌شود. (۱۴و۱۵و۲۰و۲۳)

با توجه به رفتار بالینی تهاجمی اسکواموس سل کارسینومای دهانی و همچنین نقش مهم و بسزای اجزای استرومای همبندی، از جمله ماست سل‌ها و ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در پیشرفت و گسترش بسیاری از تومورها بر آن شدیم که حضور ماست سل‌ها و بروز

شسته شدند و برای رنگ‌آمیزی پس زمینه به مدت ۲۰ دقیقه در رنگ تولوئیدن بلو قرار گرفت. جهت آماده‌سازی رنگ تولوئیدن بلو یک گرم پودر آن در ۵۰ cc الکل ۷۰ درجه حل گردید، سپس با استفاده از بافر با PH بین ۲/۵-۲، آن را به غلظت ۲۵٪ رسانده و برای مصرف روزانه استفاده شد. ۵ گرم NaCl را در ۲۵۰ cc آب مقطر (نصف حجم مورد نظر) حل کرده سپس اسید استیک را به صورت قطره قطره به آن اضافه کرده تا PH مناسب (بین ۲-۲/۵) بدست آید. سپس با اضافه کردن آب مقطر حجم بافر را به ۵۰۰ cc رساندیم. برای حذف رنگ اضافی آب شهر شسته شده و به صورت لحظه‌ای در الکل‌های ۹۶ و ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. به منظور شفاف‌سازی لام‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه در گزلیول قرار گرفته و در نهایت کامل بر روی لام‌ها چسبانده شد. در این مطالعه از بافت کبد به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. هم چنین به منظور بررسی وضعیت کنترل منفی، با حذف آنتی‌بادی اولیه و استفاده از PBS به جای آن رنگ‌آمیزی صورت گرفت. نمونه‌های کنترل مثبت واکنش مثبت شدید نشان دادند ولی در نمونه‌های کنترل منفی رنگ‌پذیری مشاهده نشد.

مراحل رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو: لام‌های حاوی برش بافتی در فور یا آون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا پارافین آن ذوب شود. برای پارافین‌زدایی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول گزلیول قرار گرفتند. پس از آن در محلول‌های الکل با درجه غلظت‌های نزولی (۳۰-۵۰-۷۵-۱۰۰) هر کدام به مدت ۱۸ دقیقه رطوبت‌گیری شدند، سپس با محلول آب مقطر شسته شدند. پس از آن به مدت ۱۸ دقیقه لام‌ها در مجاورت رنگ تولوئیدن بلو قرار گرفته و سپس با آب مقطر شستشو داده شده و به مدت ۱ دقیقه در فور قرار داده شدند. پس از آن کامل بر روی لام‌ها چسبانده شد.

لام‌های حاوی مقاطع بافتی در انکوباتور به مدت حداقل ۱۲ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس لام‌های حاوی برش بافتی در فور یا آون به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا پارافین آن ذوب شود. برای پارافین‌زدایی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول گزلیول قرار گرفتند. پس از آن در محلول‌های الکل با درجه غلظت‌های نزولی (۷۰-۹۶-۱۰۰) هر کدام به مدت ۵ دقیقه رطوبت‌گیری شدند؛ سپس شستشو با محلول آب مقطر انجام گرفت. جهت انجام بازیابی آنتی ژن (antigen retrieval)، مقاطع بافتی در محلول ۱۰ میلی‌مولار بافر سیترات با PH حدود ۶/۵ قرار داده و به همان صورت (قرار گرفته در ظرف بافر) اتوکلاو شدند. پس از اتمام زمان اتوکلاو و پس از اینکه دمای محلول بافر حاوی لام‌ها به دمای محیط رسید، مراحل رنگ‌آمیزی انجام شد. (برای این کار از محفظه در بسته chamber استفاده شد) به منظور خنثی‌سازی پراکسیداز درون بافتی لام‌های حاوی مقاطع بافتی در محلول پراکسید هیدروژن ۶٪ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس لام‌ها را در ظرف حاوی محلول فسفات بافر سالین با PH ۷/۵-۸ به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم تا محلول پراکسید هیدروژن شسته شود. پس از آن با آنتی‌بادی مورد نظر که در اینجا MMP9 بود، به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس مقاطع بافتی با PBS شستشو داده شدند. محلول post primary Detection sys از Novolink را به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت لام‌ها قرار داده و سپس با PBS شستشو داده شدند پس از آن محلول polymer به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت لام‌ها قرار داده و دوباره با PBS شستشو داده شدند و با ماده رنگ‌زای 3'Diamino Benzedine Hydrochloride3(DAB) که منجر به بروز یک محصول قهوه‌ای رنگ می‌شود، به مدت ۱۰ دقیقه مجاور گشتند. بعد از آن لام‌ها با آب شهر

بسیار اندک بود، از مطالعه‌ی ما خارج شد. ۴ مرد و ۵ زن در محدوده سنی ۴۳ تا ۹۰ سال با میانگین سنی ۶۴ سال مورد بررسی قرار گرفتند. ۵ نمونه در لثه، ۳ نمونه در زبان و ۱ نمونه در لب پایین اتفاق افتاده بود. نتایج حاصل از رنگ آمیزی به طور خلاصه در جدول ۱ آمده است.

نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بروز MMP9 را در اپی تلیوم اسکواموس سل کارسینومای دهانی در ۸ مورد از نمونه‌ها مثبت (بیشتر از ۵۰٪) نشان داد. بروز MMP9 در بافت همبند اسکواموس سل کارسینومای دهانی در تمام نمونه‌ها (۹ نمونه) بالای ۵۰٪ گزارش شد (تصاویر ۱ تا ۷).

در سکشن‌های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری و با بزرگ نمایی $\times 400$ متوسط تعداد ماست سل‌ها در ۵HPF محاسبه شد.^(۲۴)

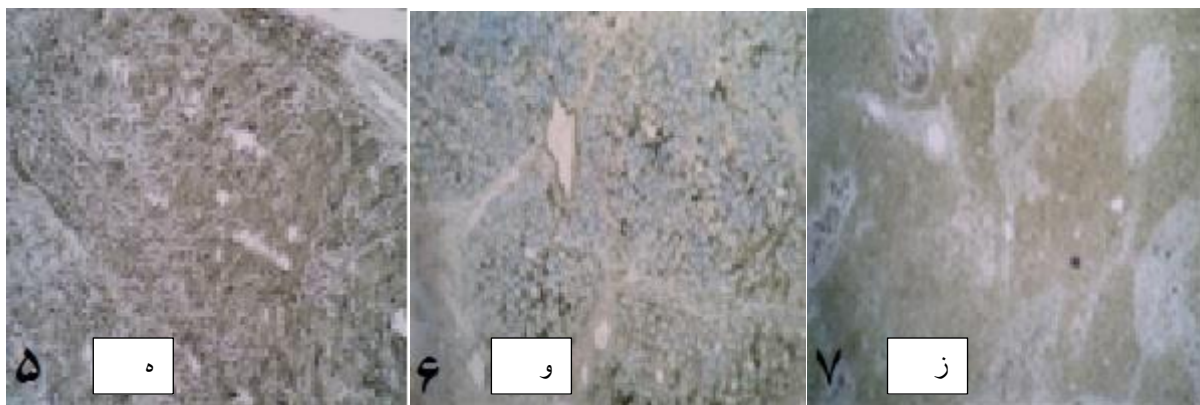
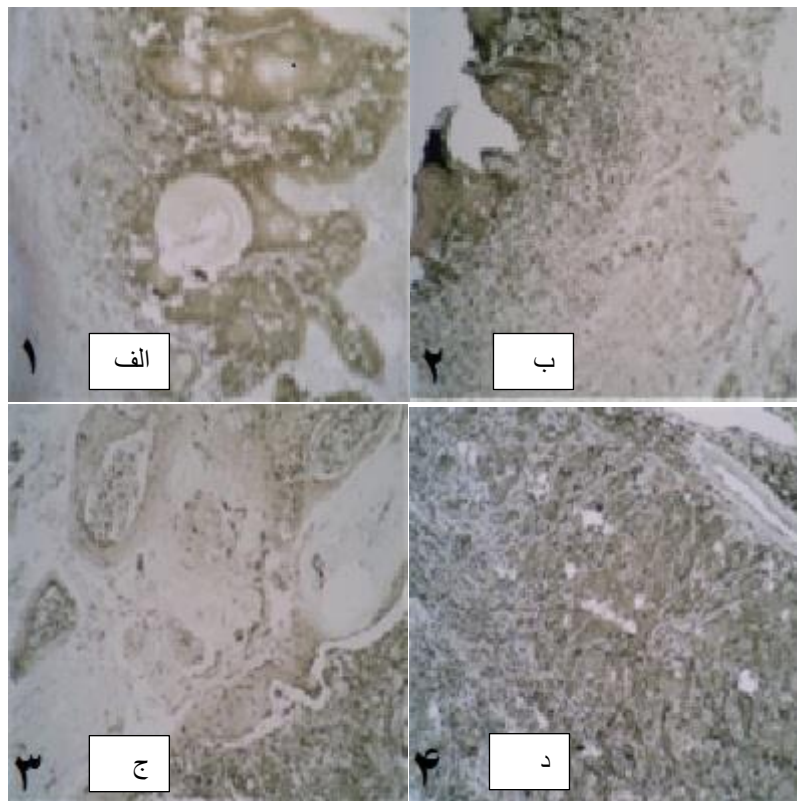
در سکشن‌های رنگ آمیزی شده میزان بروز MMP9 در اپی تلیوم و بافت همبند اسکواموس سل کارسینومای دهانی به صورت بروز کمتر از ۵۰٪ (منفی) و بیشتر از ۵۰٪ (مثبت) مشخص شد.^(۲۵)

یافته‌ها

این مطالعه روی ۱۰ نمونه‌ی اسکواموس سل کارسینومای دهانی و ۷ نمونه بافت نرمال از مارژین یا بافت نرمالی که طی جراحی افزایش طول تاج بدست آمد، انجام شد. به دلیل آن که یکی از نمونه‌ها از نظر بافت تومور

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار ماست سل به تفکیک بروز MMP9، درجه تمایز و جنس

P-value	انحراف معیار \pm میانگین ماست سل‌ها		
۰/۰۹	۲/۲ \pm ۰/۶	بیشتر از ۵۰ درصد	بروز MMP9
	۱/۵ \pm ۰/۵۵	کمتر از ۵۰ درصد	
۰/۱۲	۳ \pm ۰/۷	Undifferentiated	درجه تمایز
	۴ \pm ۰/۶۵	Moderate differentiated	
	۲ \pm ۰/۶	Well differentiated	
۰/۰۷	۲ \pm ۰/۶۵	زن	جنس
	۳ \pm ۰/۷۵	مرد	



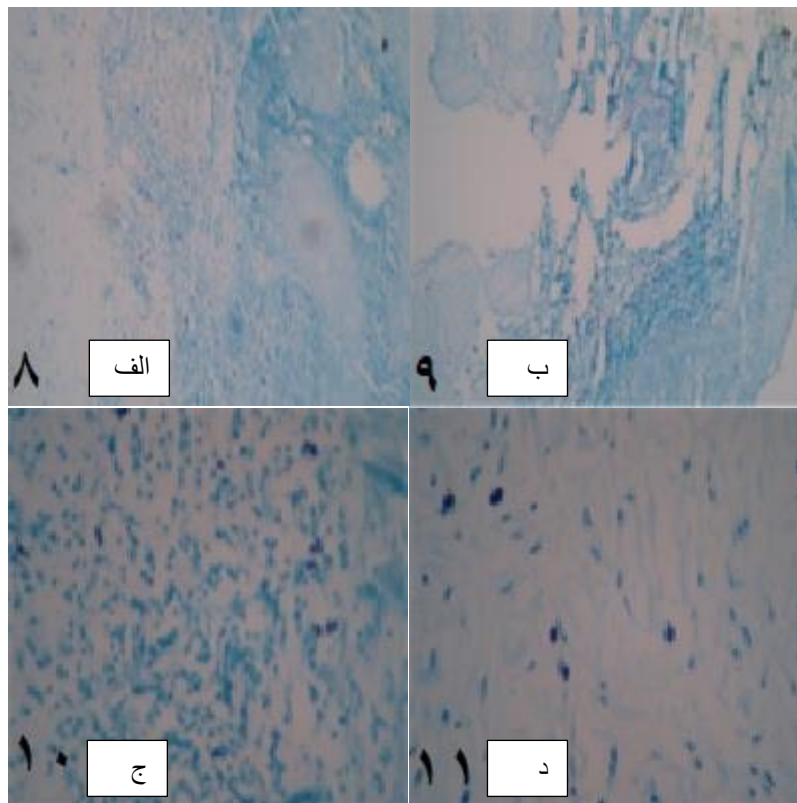
شکل ۱ : الف) بروز MMP9 در اپی تلیوم بیشتر در حاشیه ی جزایر سلولی و در بافت همبند درست در مجاورت کانون های تهاجم نشان داده شده است. ب) بروز MMP9 در اپی تلیوم به صورت پراکنده و در بافت همبند درست در مجاورت کانون های تهاجم نشان داده شده است. ج) بروز MMP9 در اپی تلیوم منفی بوده است. در بافت همبند به صورت موضعی درست در مجاورت جزایر سلولی نشان داده شده است. د) بروز MMP9 در اپی تلیوم توسط تمام سلول های اپی تلیالی و در بافت همبند به صورت منتشر، بیشتر در مجاورت مراکز تهاجم نشان داده شده است. ه) بروز MMP9 در اپی تلیوم توسط تمام سلول های اپی تلیالی و در بافت همبند به صورت منتشر، بیشتر در مجاورت مراکز تهاجم نشان داده شده است. و) جزایر کوچک اپی تلیالی و غدد بزاقی که رنگ نگرفته اند در اپی تلیوم نشان داده شده است. ز) بافت کبد جهت کنترل مثبت MMP9 رنگ آمیزی شده است.

و از این نظر تفاوت معناداری با میزان آن در اسکواموس سل کارسینوماهای دهانی یافت نشد. در این مطالعه رابطه بین ماست سل و سن، با استفاده از همبستگی پیرسون بررسی شد و ارتباط معناداری یافت نشد ($r = ۰/۱$ و $P = ۰/۰۸$).

بحث

اگرچه طی ۲۰ سال اخیر توجه فراوانی به تشخیص زود هنگام سرطان‌های دهانی صورت گرفته است، اما همچنان نیاز به فهم اصول پایه‌ای و مولکولی ایجاد سرطان و شناخت مارکرهای مولکولی بالقوه که می‌توانند پروگنوز و بقا را تحت تاثیر قرار دهند، احساس می‌شود.^(۳۶)

تصاویر ۸ تا ۱۱ حضور ماست سل‌ها را در نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. رابطه بین بروز MMP9 با تعداد ماست سل طبق روش من ویتنی بررسی شد و ارتباط معناداری یافت نشد ($P = ۰/۰۹$). بیشترین میانگین تعداد ماست سل‌ها در درجه‌ی تمایز متوسط گزارش شد (۴/۰۰). رابطه بین ماست سل و درجه‌ی تمایز نیز طبق روش کروسکال والیس بررسی شد و رابطه معناداری یافت نشد ($P = ۰/۱۲$). ارتباط بین ماست سل و جنس نیز از طریق من ویتنی بررسی شد و ارتباط معناداری یافت نشد ($P = ۰/۰۷$). رابطه‌ی بین تعداد ماست سل و بروز MMP9 با استفاده از من ویتنی در بافت نرمال $۲/۵ \pm ۲/۱$ برآورد شد



شکل ۲: ماست سل‌ها را در رنگ آمیزی تولوئیدن بلو نشان می‌دهد.

سلولهای اندوتلیال کمک می کنند، همچنین هپارین موجود در آن ها به واسطه ی تهاجم عروقی در فرایند تشکیل متاستاز شرکت می کنند.^(۲۸)

در مطالعه حاضر متوسط تعداد ماست سل ها در سه گرید مختلف از نظر تمایز تومور ارزیابی شد، مطابق با آنچه که Carolina و همکاران^(۲۸) به آن اشاره کرد و برخلاف Balica^(۲۹) و Muzio^(۴) هیچ گونه ارتباط معناداری بین درجه تمایز SCC دهان و متوسط تعداد ماست سل ها یافت نشد. این یافته بر خلاف نتایج برخی دیگر از مطالعات^(۲۹، ۴) می باشد.

در مطالعه ی حاضر با ارزیابی صورت گرفته در مورد جنس افراد مبتلا به OSCC (۵ نمونه زن و ۴ نمونه مرد) مطابق مطالعات انجام شده توسط Balica و همکاران^(۲۹) ارتباط معناداری بین متوسط تعداد ماست سل ها و گروه های جنسی مختلف یافت نشد؛ در حالیکه در مطالعه دیگری که Carolina و همکارانش^(۲۸) در آن بیماران مبتلا به SCC پوست و دهان را مورد ارزیابی قرار داده بودند، مشخص شد که میزان تراکم ماست سل ها در بیماران زن مبتلا به SCC پوست و دهان به مراتب بیشتر بود.

مطالعات امروزه بر این امر صحه گذاشته اند که انواع مختلف ماتریکس متالوپروتئینازها در سرطان های مختلفی از جمله OSCC بیان شده و فعالیت می کنند. بیان MMP9 توسط گروهی از سلول های سرطانی انسانی و در انواعی از تومورهای انسانی نظیر کبد، سینه، پوست، حفره ی دهان، سروگردن، سرویکس و ریه گزارش شده است.^(۳۰)

در مطالعه ی حاضر مطابق آنچه Impola و همکارانش^(۲۵) بیان کرده بودند، MMP9 هم در اپی تلیوم (۸ نمونه ی OSCC) و هم در بافت همبند (۹ نمونه ی OSCC) به میزان بیشتر از ۵۰٪ بروز پیدا کرده بود؛ در ۱ نمونه ی اسکواموس سل کارسینومای دهانی MMP9 در

هدف از این مطالعه ارزیابی میزان حضور ماست سل و بروز ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در اسکواموس سل کارسینومای دهانی بود. سلول های سرطانی انواع گوناگونی از کموکاین ها را ترشح می کنند. این مواد قادرند سلول های ایمنی ذاتی مانند ماست سل ها، گرانولوسیت ها و ماکروفاژها را جذب کنند. این سلول های ایمنی ذاتی گروهی از ایترلوکین ها، کموکاین ها و ماتریکس متالوپروتئینازها مانند MMP9 را ترشح می کنند؛ این فاکتورها قادرند آنژیوژنز، پرولیفراسیون، رشد و تهاجم تومور را تنظیم کنند.^(۲۷) در OSCC سطح سایتوکاین های چندکاره (Multifunctional) و $TGF\beta$ به میزان بالایی می رسد. این فرایند منجر به افزایش بیان Snail می شود. Snail یک فاکتور نسخه برداری است که بیان MMP9 را افزایش می دهد.^(۲۷) مطالعات انجام شده دانشمندان را به سمت این فرضیه سوق داد که ارتشاح و دگرانوله شدن ماست سل ها طی مکانیسم کارسینوژنز SCC پوست رخ می دهد و بر این اساس آن ها بیان کردند که بین فعالیت ماست سل ها و انواع فازهای هایپرکراتوزیس، دیس پلازی، کارسینومای Insitu و تهاجم OSCC ارتباط وجود دارد.^(۲۸)

در مطالعه حاضر متوسط تعداد ماست سل ها را در ۹ نمونه OSCC مورد ارزیابی قرار دادیم. ارتشاح ماست سل ها در استرومای تومور به میزان زیادی مشاهده شد (بیشترین میزان تعداد ماست سل ها در نمونه های با تمایز متوسط بود). Jaafari Ashkavandi و همکاران^(۲۴) نیز با انجام مطالعات مشابه در OSCC به نتایج مشابه دست یافت، در حالیکه Croolina و همکارانش^(۲۸) به خلاف آنچه در بالا گفته شد دست یافتند. آن ها مشاهده کردند که تعداد ماست سل ها در ضایعات بدخیم حفره ی دهان کاهش پیدا کرده است.^(۲۸) پروتئازهای موجود در ماست سل شامل کیماز و تریپتاز با تخریب ماتریکس خارج سلولی به تسهیل مهاجرت

متالوپروتئیناز-۹ چه در اپی تلیوم و چه در بافت همبند مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر وجود ارتباط بین میزان فعالیت MMP9 و جنس افراد مبتلا نیز بررسی شد و هیچ گونه رابطه‌ی معناداری بین آن‌ها مشاهده نشد، Patel و همکاران^(۳۳) هم در مطالعه‌ی خود به نتایج مشابه ما دست یافت در هیچ یک از مطالعات پیشین حضور و ارتباط مارکرها به تفکیک متغیرهایی مثل سن و محل ضایعه گزارش نشده است.

امروزه پژوهشگران اظهار می‌کنند که ماست سل‌ها نقش دوگانه‌ای در سرطان‌ها ایفا می‌کنند، بدین معنی که حضور این سلول‌ها در بافت تومور ممکن است هر دو پروگنوز مثبت و منفی را تحت تاثیر قرار دهد، اینکه ماست سل‌ها به رشد تومور کمک می‌کنند یا ساپرس کننده‌ی آن هستند تاکنون مشخص نشده است.^(۳۴) ماست سل‌ها با افزایش آنژیوژنز و تولید VEGF رشد انواع تومورها از جمله سرطان رکتال را افزایش می‌دهند، از طرف دیگر این سلول‌ها با آزادسازی هپارین قادر به محدود کردن رشد تومور و همچنین اندازه‌ی تومور هستند.^(۳۴) هیستامین نیز از مواد دیگری است که از رشد تومور جلوگیری می‌کند. در تحقیقات انجام شده در سرطان پانکراس مشخص شد که بلاک فعالیت ماست سل‌ها به وسیله‌ی کرومولین سدیم در درمان آن مفید واقع شده است.^(۳۴) Impola و همکارانش^(۳۵) به این موضوع پی بردند که اینتگرین $\alpha v \beta 6$ فاکتوری است که منجر به افزایش بیان MMP9 به وسیله‌ی کراتینوسیت‌های دهانی می‌شود، آن‌ها همچنین مشاهده کردند که سطح حضور این اینتگرین در OSCC به حد بالایی می‌رسد. در تغییر لکوپلاکی دهانی به بدخیمی نیز بیان $\alpha v \beta 6$ موثر است. بر همین اساس این پژوهشگران بلاک فعالیت تهاجمی MMP9 یا اینتگرین $\alpha v \beta 6$ (که در

اپی تلیوم بیان نشده بود. Tsai و همکارانش^(۳۱) نیز در تحقیقات خود به این نتیجه دست یافتند که MMP9 هم توسط سلول‌های اپی تلیالی و هم سلول‌های بافت همبند ساخته می‌شود، در حالیکه Vicente و همکاران^(۳۲) برخلاف آنچه که ما به آن دست یافتیم بیان کرد که این ماتریکس متالوپروتئیناز فقط توسط سلول‌های بافت همبند ساخته می‌شود.

ما در بررسی که در رابطه با بروز MMP9 در OSCC انجام دادیم نحوه‌ی انتشار MMP9 را در اپی تلیوم و بافت همبند مورد ارزیابی قرار دادیم، در نهایت مشاهده کردیم که بین نحوه انتشار MMP9 و بروز آن در اپی تلیوم ارتباط معناداری وجود داشت. در ۱ نمونه، MMP9 در اپی تلیوم بروز پیدا نکرده بود و از ۸ نمونه باقیمانده دیگر، در ۲ مورد آن به صورت پراکنده و در ۲ نمونه‌ی دیگر توسط تمام سلول‌های اپی تلیالی بیان شده بود. بیشترین نحوه پراکندگی MMP9 یعنی در ۴ نمونه به صورت بروز آن در حاشیه جزایر اپی تلیالی بود. اما بین بروز MMP9 در بافت همبند و نحوه انتشار آن (طبقه بندی آن به صورت موضعی و منتشر) ارتباط معناداری یافت نشد. در مطالعه‌ی حاضر مطابق آنچه Patel^(۳۰) به آن اشاره کرده بود، هنگامی که به صورت مجزا ارتباط بین بروز MMP9 در اپی تلیوم و بافت همبند را با درجه‌ی تمایز تومور مورد ارزیابی قرار دادیم هیچ گونه ارتباط معناداری یافت نشد که برخلاف نتایج Vicente و همکاران^(۳۲) بود.

مطالعات اولیه پیشنهاد کردند که تریپتاز موجود در ماست سل‌ها توانایی شرکت در پروسه‌ی بازسازی بافت از طریق فعال سازی $proMMP1,2,3,9$ را دارد. در مطالعه حاضر برخلاف آنچه Freitas^(۳۳) بیان کرده بود، ارتباط معناداری بین میزان حضور ماست سل‌ها و بروز ماتریکس

تشخیص فعالیت MMP و همچنین محل آن ها در OSCC پیشنهاد شده است.^(۳۰)

نتیجه گیری

بروز MMP9 در بافت همبندی تمام نمونه ها ممکن است در رفتار تهاجمی اسکواموس سل کارسینومای دهانی تعیین کننده باشد اما این حضور ممکن است با تعداد ماست سل ها مرتبط نباشد و یا ممکن است با حضور تعداد بالای ماست سل ها در تضاد باشد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم دکتر شیرین سراوانی بابت همکاری صمیمانه ایشان کمال تشکر را داریم.

میزان بیان MMP9 دخیل است) را به عنوان یک روش جدید در درمان اسکواموس سل کارسینومای دهانی پیشنهاد کردند. پژوهش های صورت گرفته بر این نکته تأکید داشتند که روش ایمونوهیستوشیمی به دلیل اینکه هر دو فرم فعال و غیرفعال MMP9 را نشان می دهد برای ارزیابی عملکرد آن مناسب نیست، در حالیکه آنالیز FIZ (Film Insitu Zimography) میزان فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ها همچنین تداخلات آن ها با سلول های سرطانی و سلول های استرومایی اطراف تومور را در OSCC به خوبی اندازه گیری می کند. بر همین اساس ترکیب آنالیز Zimography و FIZ به عنوان یک متد مناسب برای

منابع

1. Jamshidi SH, Zargar M, Moghimbeigi A, Delkhah M, Baghaei F. A comparison between the knowledge of dental students and general dentists about oral squamous cell carcinoma (Hamedan-iran). J Mash Dent Sch 2012; 36(1):23-36.
2. Azad A, Talatof Z, Niakan N. Evaluation of knowledge and diagnostic skills of general physicians and dentists in the city of shiraz about squamous cell carcinoma. J Mash Dent Sch 2015; 39(4):291-302.
3. Hoseinpour Jajarm H, Alle Dawood SA. Evaluation of some of the S.C.C risk factors in patients referring to dental school and Omid Hospital in Mashhad from September 2002 to September 2003. J Mash Dent Sch 2006; 29(3-4):193-8.
4. Lo Muzio L, Santarelli A, Panzarella V, Campisi G, Carella M, Ciavarella D, et al. Oral squamous cell carcinoma and biological markers: An update on the molecules mainly involved in oral carcinogenesis. Minerva Stomatol 2007; 56(6):341-7.
5. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin 2002; 52(4):195-215.
6. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82(1):4-7.
7. Liotta LA, Kleinerman J, Sidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. Cancer Res 1974; 34(5):997-1004.
8. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 2001; 357(9255):539-54.
9. Diaconu NC, Kosma VN, Turunen H, Grohn O. Mast cell in epithelial cancer. J Med Pathol 2012; 42:21-48.
10. Mescher L. Connective tissue. In: Mescher L, Editor. Junqueira's Basic Histology, 12thed. Philadelphia: Williams; 2010. P. 90-3.
11. Lamaroon A, Pongsiriwet S, Jittidecharaks S, Pattanaporn K, Prapayasatok S, Wanachantararak S. Increase of mast cell and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2003; 32(4):195-9.
12. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, et al. Decrease in mast cell in oral squamous cell carcinoma: Possible Failure in the migration of these cells. Oral Oncol 2007; 43(5):484-90.
13. Netto JN, Pires FR, Fonseca EC, Silva LE, Lourenco S. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. J Oral Pathol Med 2012; 41(8):45-53.
14. Zhong M, Wang J, Yue Y. Expression of matrix metalloproteinases in human ameloblastoma. Int Chin J Dent 2004; 4:19-26.
15. Henriques ACG, Vasconcelos MMG, Galvão HC, de Souza LB, de Almeida Freitas A. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112(41):468-75.
16. Shen LC, Chen YK, Hsue SS, Shaw SY. Expression of osteonectin / secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. J Oral Pathol Med 2010; 39(3):242-9.

17. Kridel SJ, Chen E, Kotra LP, Howardi EW, Mobashery S, Smith JW. Substrate Hydrolysis by Matrix Metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2001; 276(23):20572-8.
18. Bjorklund M, Kiovunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cell. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755(1):37-69.
19. Xu D, Mckee CH, Cao Y, Ding Y, Kessler BM, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 Regulates Tumor cell Invasion through cleavage of proteinase Nexin-1. *Cancer Res* 2010; 70(171):6988-98.
20. Kubota Y, Shirasuna K. Roles of IL-1 α in the Growth of keratocysticodontogenic tumor. *Oral SciInt* 2007; 4(1):19-27.
21. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral maxillofacial pathol.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2009. P. 683-7,702-10.
22. Di Girolamo N, Indoh I, Jakson N, Wakefield D, McNeil H, Yan W, et al. Human mast cell-driven Gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflamentory cytokines role in cell migration. *J Immonol* 2006; 177(4):2638-50.
23. Freitas SV, de Andrade Santos P, de Almeida Freitas R, Pinto LP, de Souza LB. Mast cell and matrix metalloproteinase-9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112(3):342-5.
24. Ashkavandi ZJ, Moshref M, Mashhadi S, Sargolzaie S, Taghavi N. Evaluation of CD₃₁ expression and mast cell count in dysplastic lesion and squamous cell carcinoma of oral cavity. *Iran Red Crescent Med J* 2010; 12(3):272-6.
25. Impola U, Vitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H, et al. Differential expression of matrilysin -1 (MMP-7), 92 KD gelatinase (MMP-9) and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004; 202(1):14-22.
26. Ch'ng S, Sullivan M, Yuan L, Davis P, Tan ST. Mast cell dysregulate apoptotic and cell cycle genes in mucosal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int* 2006; 6:1-7.
27. Hong SD, Hong SP, Lim CY, Lee JI. Expression of matrix metalloproteinas -2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000; 36:207-13.
28. Parizi ACG, Barbosa RL, Parizi JLS, Nai GA. A comparison between the concentration of mast cell in squamous cell carcinoma of the skin and oral cavity. *An Bras Dermatol* 2010; 85(6):811-8.
29. Balica N, Raica M, Cotulbea S, Doros C. Mast cell reaction in malignant laryngeal neoplasm. *J Morphol Embryol* 2007; 48(4):395-401.
30. Kato K, Hara A, Kuno T, Kitaori N, Huilan Z, Mori H. Matrix metalloproteinas -2 and -9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. *J Res Clin Oncol* 2005; 131:340-6.
31. Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY, Chang YC. Matix metalloproteinase -2 and Matrix metalloproteinase -9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase c inhibitors: preliminary observation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95(6):710-6.
32. Vicente JC, Frenso MF, Villalail L, Verga JA. Expression and clinical significance of matix metalloproteinase -2 and matix metalloproteinase -9 inoral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41:283-93.
33. Patel B, Shah PM, Rawal UM. Activation of MMP -2 and MMP -9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 90:81-8.
34. Diaconu NC, Kosma VN, Turunen H, Grohn O. Mast cell in epitheliel cancer. *J Med Pathol* 2012; 4221-48.