

## مقایسه ایمونوهیستوشیمی بیان CD105 و Snail2 در کارسینوم سلول سنگفرشی و اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان

صفورا سیفی\*#، شهریار شفاعی\*\*، رامین فروغی\*\*\*، نصرالله ساغروانین\*\*\*\*، علی بیجانی\*\*\*\*\*، بهاره غفاری\*\*\*\*\*  
 \* استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.  
 \*\* استادیار گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.  
 \*\*\* استادیار گروه جراحی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.  
 \*\*\*\* دانشیار آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات بیماری های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.  
 \*\*\*\*\* پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری های غیر واگیردار کودکان، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.  
 \*\*\*\*\* دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران.  
 تاریخ ارائه مقاله: ۹۲/۶/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۳

### Immunohistochemical Comparison of CD105 and Snail2 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma and Dysplastic Epithelium

Safoura Seifi\*#, Shahriar Shafaei\*\*, Ramin Foroughi\*\*\*, Nasrollah Saghravanian\*\*\*\*, Ali Bijani\*\*\*\*\*,  
 Bahareh Ghaffari\*\*\*\*\*

\* Assistant Professor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

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

\*\*\* Assistant Professor, Dept of Oral & Maxillofacial Surgery, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

\*\*\*\* Associate Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, Oral & Maxillofacial Diseases Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

\*\*\*\*\* General Practitioner, Non Communicable Pediatric Diseases Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

\*\*\*\*\* Dentist, Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Received: 9 September 2013 ; Accepted: 4 December 2013

**Introduction:** CD105 is a cell membrane hemodymeric glycoprotein and the basic marker of neovascularization. Snail2 is a transcription factor and results in impaired epithelial adhesion. The purpose of this study was to compare the expression of CD105 and Snail2 in dysplastic epithelium and oral squamous cell carcinoma (SCC).

**Materials & Methods:** In this descriptive - analytical study, a total of 40 paraffinized blocks of SCC and dysplastic epithelium were subjected to immunohistochemical staining with CD105 and Snail2. Expression of CD105 and snail2 and their correlation with other and with clinicopathological parameters were evaluated. The data were analyzed by *t*, Man-Whitney, ANOVA tests.

**Results:** The mean micro-vessel density with CD105 in SCC and dysplasia were  $11.73 \pm 5.828$  and  $5 \pm 1.892$  respectively ( $P < 0.001$ ). The mean micro vessel density in intra tumoral area was  $7.75 \pm 4.329$  and in peri tumoral area was  $15.7 \pm 7.26$  ( $P < 0.001$ ). Average density of Snail2 in SCC was higher than that of dysplasia ( $P < 0.001$ ). There was no significant relationship between age, sex, tumor location and differentiation grade, and CD105 marker but a positive correlation existed between Snail2 and differentiation grade of SCC ( $P = 0.007$ ). In transformation of dysplasia to squamous cell carcinoma with increase in the expression of CD105, increased expression of Snail2 was observed. ( $P < 0.001$ ,  $r = 0.76$ )

**Conclusion:** The results of the present study showed the role of CD105 and Snail2 in the incidence of carcinogenesis. The direct relationship in the expression of CD105 and Snail2 supports the role of them in progression of the premalignant lesion to malignancy. Snail2 can be an effective factor in progression of oral carcinogenesis.

**Key words:** Squamous cell carcinoma, dysplasia, CD105, Snail2, immunohistochemistry.

# Corresponding Author: sf\_seify@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2014; 38(2): 129-38 .

## چکیده

**مقدمه:** CD105 یک گلیکوپروتئین غشایی همودیمریک است که در رگ‌سازی جدید نقش دارد. Snail2 یک فاکتور رونویسی بوده و منجر به اختلال در چسبندگی اپی‌تلیالی می‌گردد. هدف مطالعه حاضر ارزیابی بیان CD105 و Snail2 در اپی‌تلیوم دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، جمعاً ۴۰ بلوک پارافینه کارسینوم سلول سنگفرشی و اپی‌تلیوم دیسپلاستیک با نشانگر CD105 و Snail2 به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ آمیزی شدند. بیان CD105، Snail2 و ارتباط آنها با یکدیگر و نیز فاکتورهای بالینی-پاتولوژیک بررسی شد و نتایج با آنالیزهای آماری  $t$ -test، من ویتنی و ANOVA تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** میانگین تراکم کلی عروق خونی در کارسینوم سلول سنگفرشی  $11/73 \pm 5/828$  و در اپی‌تلیوم دیسپلاستیک  $5 \pm 1/892$  بود ( $P < 0/001$ ). تراکم عروق خونی در ناحیه مرکزی تومور  $7/75 \pm 4/329$  و در ناحیه محیطی  $15/7 \pm 7/26$  بود ( $P < 0/001$ ). میانگین تراکم Snail2 در کارسینوم سلول سنگفرشی بیشتر از دیسپلازی اپی‌تلیالی بود ( $P < 0/001$ ). ارتباط معنی‌داری بین سن، جنس، محل ضایعه و درجه تمایز با نشانگر CD105 دیده نشد؛ اما ارتباط مثبتی در بیان Snail2 با درجه تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی وجود داشت ( $P = 0/007$ ). در تبدیل دیسپلازی به کارسینوم سلول سنگفرشی با افزایش بیان CD105، افزایش بیان Snail2 مشاهده شد. ( $P < 0/001$ ,  $r = 0/76$ )

**نتیجه‌گیری:** این گونه به نظر می‌رسد که CD105 و Snail2 در آغاز کارسینوژنز مؤثرند. ارتباط مستقیم در بیان CD105 و Snail2 از نقش آنها در تبدیل ضایعه پیش بدخیم به بدخیمی حمایت می‌کند. Snail2 می‌تواند یکی از عوامل دخیل در پیشرفت سرطان دهان باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کارسینوم سلول سنگفرشی، دیسپلازی، CD105، Snail2، ایمونوهیستوشیمی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۳ دوره ۳۸ / شماره ۲: ۳۸-۱۲۹.

## مقدمه

سلول‌های اندوتلیال در بافت تومورال حدود ۲۰ تا ۲۰۰۰ برابر بیشتر از بافت نرمال می‌باشد، بنابراین Endoglin به عنوان مارکر اصلی رگ‌سازی جدید معرفی شده است<sup>(۱)</sup> و در ارزیابی تراکم عروق خونی در ضایعات دهانی به کار می‌رود.<sup>(۲)</sup>

Snail2 (slug) فاکتور رونویسی بوده و دارای انواع Snail 1,2 است که Snail2 (slug) در پرولیفراسیون سلول‌های اپی‌تلیالی در طی ترمیم زخم و مهاجرت سلول‌های عصبی نقش دارد. Slug به عنوان ممانعت‌کننده عملکرد E-cadherin بوده و عملکرد آن مرتبط با روی است و منجر به اختلال در چسبندگی و از دست دادن اتصال دسموزومی می‌گردد. عقیده بر آن است که اعضا خانواده Snail نقش مهمی در افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز و تهاجم سرطان دارند.<sup>(۳)</sup> Snail2 (slug) در اثر القای اپی‌تلیوم بر مزانشیم، حفظ عملکرد سلول بنیادی، تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست، رگ‌سازی و مقاومت به رادیوشیمی درمانی نقش دارد.<sup>(۴)</sup> اگر چه نقش Snail1

سرطان دهان ۲-۳٪ کل بدخیمی‌های بدن را تشکیل می‌دهد و کارسینوم سلول سنگفرشی بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های حفره دهان را شامل می‌شود. این سرطان دارای درجه بالایی از تهاجم موضعی و متاستاز بوده و باعث افزایش مرگ و میر بیماران مبتلا می‌شود.<sup>(۱)</sup> با وجود پیشرفت‌های درمانی مانند جراحی، کموتراپی و رادیوتراپی در دهه‌های اخیر هنوز میزان بقا در بیماران مبتلا بهبودی نیافته است.<sup>(۲)</sup> جهت تعیین پیش‌آگهی سرطان دهان از سیستم TNM و نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌شود. استفاده از Stage در تعیین پیش‌آگهی با ارزش‌تر از Grade سرطان دهان مطرح شده است.<sup>(۳)</sup>

Endoglin (CD105) یک گلیکوپروتئین غشایی همودیمریک با وزن مولکولی تقریباً ۱۸۰KD است و یک پروتئین فرعی بوده که با گیرنده‌های غشایی خانواده بزرگ TGF- $\beta$  واکنش می‌دهد. این پروتئین برای تکامل عروق خونی ضروری است. از آن جا که پرولیفراسیون

میکرونی بود که با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شد و مجدداً جهت تأیید تشخیص و تعیین درجه تمایز بر طبق کتاب Neville<sup>(۹)</sup> مورد بررسی قرار گرفت و یک برش ۳ میکرونی که جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی تهیه شد و به روش Avidin Biotin peroxidase رنگ آمیزی گردید.

ابتدا بافت‌های برش داده شده ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند، سپس ۲۰ دقیقه در حرارت ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده، وارد گزلیل سرد شده و به مدت ۵ دقیقه بعد از آن در الکل با درجات مختلف (۱۰۰ درجه - ۹۶ درجه - ۸۰ درجه - ۷۰ درجه) عبور داده شدند و سپس جهت شست‌وشو وارد آب مقطر شدند. بافت‌های آبدی شده جهت بازیافت آنتی‌ژن داخل یک ظرف حاوی بافر سیترات (Dako, Denmark) وارد اتوکلاو بادمای بین ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد و فشار ۲ اتمسفر به مدت ۱۰ دقیقه شدند و بعد از خاموش کردن اتوکلاو، نمونه‌ها از آن خارج شدند تا دمای آن‌ها به زیر ۵۰ درجه سانتی گراد برسد. بعداً به مدت ۵ دقیقه وارد بافر سیترات شده، سپس از بافر در آورده شدند و بعد از خشک کردن اطراف، زیر و دور بافت با قلم خط کشی شد. دو قطره محلول Dual Endogen Enzyme block روی بافت، به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه ریخته شد، سپس در داخل آب مقطر شست و شو داده، در داخل بافر سیترات به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و با مورب کردن اسلاید بدون شست و شو، محلول رویی خارج شد و با یک دستمال روی آن به آهستگی خارج شد. یک تا دو قطره آنتی بادی اولیه Anti-Slug polyclonal Antibody Clone (D-19, santa cruz Biotechnology, Incosanta cruz, DAKO, Carpenteria, CA) با رقت  $\frac{1}{100}$  و CD105 (Clone SN6h.

در تومورزایی، متاستاز، رشد و تهاجم تومور شناخته شده است؛ اما در بررسی مقالات، مطالعات کمی در زمینه نقش و عملکرد Snail2 در کارسینوم سلول سنگفرشی صورت گرفته است<sup>(۷،۸)</sup> و تا به حال در مطالعه‌ای ارتباط بیان Snail2 (slug) و CD105 در سرطان دهان بررسی نشده است. لذا با توجه به نقش Snail2 (slug) در کاهش بیان نشانگرهای اپی‌تلیالی و ارتباط آن با رگ‌سازی<sup>(۷،۸)</sup>، هدف مطالعه حاضر ارزیابی مقایسه‌ای بیان Snail2 و CD105 در دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ارتباط آنها با یکدیگر و فاکتورهای بالینی-پاتولوژیک بود.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی به روش مقطعی، نمونه‌های بایگانی گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل در سال‌های ۹۱-۸۲ مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌ها با تشخیص دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی انتخاب شدند. همچنین جهت تکمیل نمونه‌ها از بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی سایر مراکز آموزشی درمانی (دانشکده دندان پزشکی مشهد) استفاده گردید. جمعاً ۴۰ نمونه بلوک پارافین انتخاب شد که شامل ۲۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی (۱۲ مورد Grade I، ۶ مورد Grade II، ۲ مورد Grade III) و ۲۰ مورد دیسپلازی اپی‌تلیالی، (۱۰ مورد دیسپلازی اندک، ۸ مورد دیسپلازی متوسط و ۲ مورد دیسپلازی شدید) بودند.

از پرونده‌های بیماران اطلاعات بالینی شامل سن، جنس و محل ضایعه خارج شد و در جداولی ثبت گردید. نمونه‌های مرتبط با عود ضایعات، خونریزی فراوان، فیکساسیون نامناسب و بیوپسی اینسیژنال از مطالعه خارج شدند. از هر بلوک دو برش تهیه شد که شامل یک برش ۴

صورتی که رنگ پذیری با Slug در بیشتر از ۱۰٪ سلول‌های اپی‌تلیالی مشاهده می‌شد مثبت و کمتر از ۱۰٪، منفی در نظر گرفته می‌شد.<sup>(۱۲)</sup> برای بررسی بیان Snail2 از Proportion score مقیاس Alred استفاده شد که یک مقیاس نیمه کمی می‌باشد و Score بندی آن به صورت ذیل می‌باشد.

Score0 = هیچ سلولی رنگ نگرفته است.

Score1 = ۱٪ < سلول‌های رنگ گرفته.

Score2 = ۱۰٪ < سلول‌های رنگ گرفته ≤ ۱٪

Score3 = ۳۳٪ < سلول‌های رنگ گرفته ≤ ۱۰٪

Score4 = ۶۶٪ < سلول‌های رنگ گرفته ≤ ۳۳٪

Score5 = سلول‌های رنگ گرفته ≤ ۶۶٪

Score بین ۰-۲، منفی و Scoreهای بالاتر از ۲، مثبت در نظر گرفته شد.<sup>(۱۳)</sup> اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با ویرایش ۱۷ و آزمون‌های آماری تجزیه و تحلیل شد.  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی گردید. حجم نمونه با توجه به مقالات مشابه تعیین شد.

لازم به ذکر است نمونه‌ها توسط دو پاتولوژیست با میکروسکوپ نوری (Olympus (BX41, Japan) مشاهده گردید. تصاویر مربوط به اسلایدهای میکروسکوپی با دوربین (Olympus, DP12, Japan) و متصل به میکروسکوپ نوری گرفته شده است.

جهت مقایسه بیان CD105 و Snail2 در کارسینوم سلول سنگفرشی و برای مقایسه بیان تراکم عروق خونی با نشانگر CD105 در نواحی داخل تومور و Invasive front آزمون آماری ANOVA, *t*-test، من ویتنی به کار برده شد. برای بررسی ارتباط بیان CD105 و Snail2 در درجات مختلف تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی اپی‌تلیالی و جهت بررسی ارتباط بیان CD105 و Snail2 از ضریب همبستگی پیرسون و اسپیرمن استفاده شد.

(Neomarkers, DAKO, DENMARK) با رقت  $\frac{1}{100}$  به مدت ۳۰ دقیقه روی بافت ریخته شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دو ظرف بافر فسفات وارد شد. بعد از آن تحت تأثیر آنتی بادی ثانویه (۳ دقیقه) کروموژن DAB، همتوکسیلسین مایرز قرار داده شد و با فسفات شست‌وشو داده شد. آبگیری با الکل و گزلیل انجام شد و چسب و لامل زده شد.

کنترل مثبت، برای CD105، Snail2، کارسینوم مجرای پستان و کنترل منفی حذف آنتی بادی اولیه و جایگزینی آن با سرم غیرایمونیزه موش بود. همچنین از مخاط نرمال دهان اطراف هیپرکراتوز به عنوان گروه شاهد استفاده شد. رنگ‌پذیری قهوه‌ای غشاء سلول‌های اندوتلیال عروق خونی با نشانگر CD105 مثبت در نظر گرفته شد. عروق خونی با دیواره عضلانی حذف شد و نواحی نکروز، خونریزی و اسکروزه جهت شمارش عروق خونی استفاده نشد. همچنین تک سلول اندوتلیال در شمارش عروق خونی استفاده نگردید و تنها عروق خونی دارای لومن در محاسبه منظور شدند. مطابق روش Weidner و همکاران<sup>(۱۰)</sup> نواحی با بیشترین تعداد عروق خونی Hot spots انتخاب شد (x۱۰) و متوسط تعداد عروق خونی در ۴ فیلد میکروسکوپی (x۴۰۰) همچنین در نواحی مجاور تومور Intra tumoral و در ناحیه Invasive Front محاسبه به صورت Mean±SD گزارش شد.<sup>(۵)</sup> Invasive tumor front به همان گروه از سلول‌های جدا شده در محل گسترش و پیشرفت تومور (در حاشیه آن) اطلاق می‌گردد.<sup>(۱۱)</sup>

Snail2 (slug) رنگ‌پذیری قهوه‌ای هسته سلول اپی‌تلیالی در ۱۰ فیلد میکروسکوپی در ۱۰۰ سلول ارزیابی شده و میانگین آن به صورت درصد گزارش شد. در

## یافته‌ها

## (جدول ۲) (تصاویر ۱-۲)

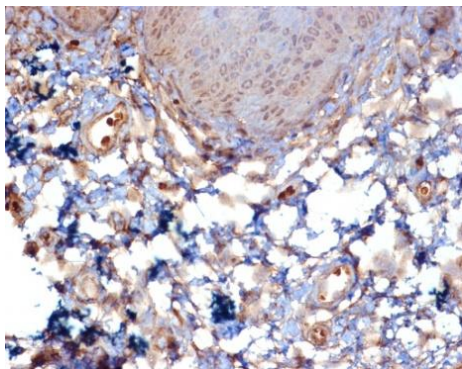
در این مطالعه، ۲۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی وجود داشت که ۶ نمونه در جنس مذکر و ۱۴ مورد در جنس مونث با میانگین سنی  $69/20 \pm 11/588$  سال دیده شد. از ۲۰ نمونه دیسپلازی ۱۵ نمونه در جنس مذکر و ۵ مورد در جنس مونث با میانگین سنی  $52/40 \pm 19/964$  سال بود. از نظر محل درگیری نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است.

میانگین تراکم کلی عروق خونی در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان  $11/73 \pm 5/828$  و دیسپلازی اپی‌تلیالی  $5 \pm 1/892$  بود. تراکم کلی عروق خونی در کارسینوم سلول سنگفرشی بیشتر از دیسپلازی اپی‌تلیالی بود و اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/001$ ).

جدول ۱: توزیع فراوانی محل ضایعه به تفکیک نمونه‌های

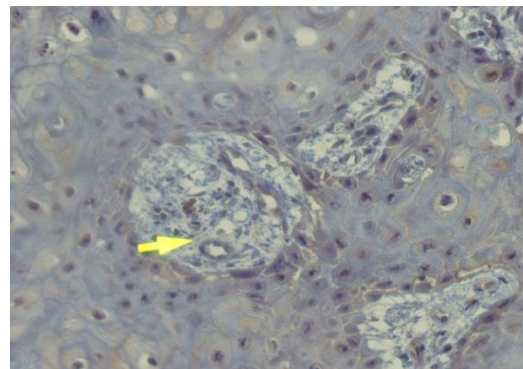
دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

| محل ضایعه   | دیسپلازی اپی‌تلیالی<br>(درصد) تعداد | کارسینوم سلول<br>سنگفرشی دهان<br>(درصد) تعداد |
|-------------|-------------------------------------|---|
| مخاط باکال  | ۶(۳۰/۰)                             | ۱۰(۵۰/۰)                                      |
| زبان        | ۶(۳۰/۰)                             | ۱(۵/۰)  |
| ریج آلونولر | ۳(۱۵/۰)                             | ۶(۳۰/۰)                                       |
| وستیبول     | ۲(۱۰/۰)                             | ۱(۵/۰)  |
| کام         | ۰(۰/۰)                              | ۱(۵/۰)  |
| کف دهان     | ۱(۵/۰)                              | ۰(۰/۰)  |
| لب          | ۲(۱۰/۰)                             | ۰(۰/۰)  |
| لثه         | ۰(۰/۰)                              | ۱(۵/۰)  |
| کل          | ۲۰ (۱۰۰/۰)                          | ۲۰ (۱۰۰/۰)                                    |



تصویر ۲: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر CD105 در

دیسپلازی متوسط (X10)



تصویر ۱: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر CD105 در

کارسینوم سلول سنگفرشی (Grade I)(X40)

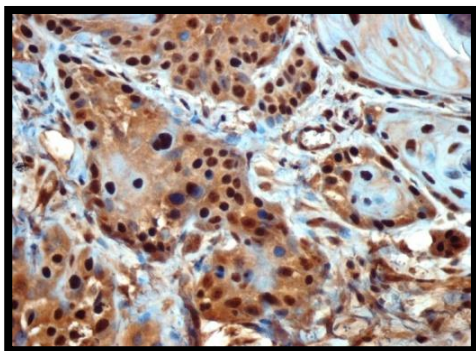
جدول ۲: میانگین و انحراف معیار تراکم کلی عروق خونی در دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی

| نوع ضایعه                  | تراکم کلی عروق خونی (Total MVD) | میانگین تراکم slug       |
|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| دیسپلازی اپی‌تلیالی        | $5 \pm 1/892$                   | $1/8 \pm 0/616$          |
| کارسینوم سلول سنگفرشی دهان | $11/73 \pm 5/828$               | $3/5 \pm 0/688$          |
| نتیجه آزمون                | $t=4/91, df=38, P<0/001$        | $t=8/23, df=38, P<0/001$ |

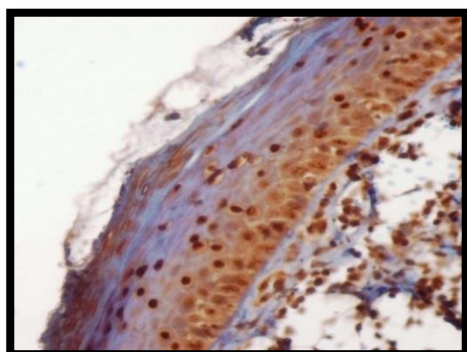
دیسپلازی  $P=0/60$  جنس و محل ضایعه  $P=0/90$  و  $P=0/69$  مشاهده نشد.

در کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی اپی تلیالی ارتباط آماری معنی داری بین Snail2 با سن  $P=0/45$  و  $P=0/87$ ، با جنس مشاهده شد. همچنین بین کارسینوم سلول سنگفرشی  $P=0/76$  و دیسپلازی اپی تلیالی  $P=0/81$  با محل ضایعه ارتباط معنی داری یافت نشد.

ارتباط مستقیم و معنی داری در بیان Snail2 و CD105 در پیشرفت پیش بدخیمی به بدخیمی مشاهده شد به طوری که با افزایش بیان CD105، افزایش بیان Snail2 (slug) مشاهده گردید ( $r=0/76$  و  $P<0/001$ ).



تصویر ۳: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر Snail2(slug) در کارسینوم سلول سنگفرشی (Grade I) Score4 (X40)



تصویر ۴: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر Snail2(slug) در دیسپلازی متوسط (Score3) (X40)

در مقایسه میانگین تراکم عروق خونی در نواحی داخل تومور و Invasive front در کارسینوم سلول سنگفرشی اختلاف آماری معنی داری مشاهده شد به طوری که در ناحیه invasive front تراکم عروق خونی بیشتر از داخل تومور بود ( $P<0/001$ ) (جدول ۳).

در بررسی بیان Snail2 (slug) در کارسینوم سلول سنگفرشی ۱۲ مورد Score4، ۶ مورد Score3 و ۲ مورد Score2 داشتند و در دیسپلازی اپی تلیالی، ۲ مورد Score3 و ۱۲ مورد Score2 را نشان دادند اما ۶ مورد Score1 بودند. در مقایسه تراکم Slug در کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی اپی تلیالی اختلاف آماری معنی داری مشاهده شد؛ به طوری که در کارسینوم سلول سنگفرشی بیشتر از دیسپلازی اپی تلیالی بود ( $P<0/001$ ) (جدول ۴) (تصاویر ۴-۳)

میانگین تراکم Snail2 (slug) در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بیشتر از دیسپلازی اپی تلیالی بود ( $P<0/001$ ).

در مقایسه بیان CD105 و درجات مختلف تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی، اختلاف آماری معنی داری یافت نشد ( $P=0/203$ )، اما رابطه معنی داری بین بیان Snail2 و درجات مختلف کارسینوم سلول سنگفرشی مشاهده شد ( $P=0/007$ )، به طوری که با افزایش درجات تمایز (Grade) بیان Snail2 افزایش یافت.

اختلاف آماری معنی داری در بیان CD105 ( $P=0/63$ ) و Slug2 ( $P=0/36$ ) با درجات مختلف دیسپلازی یافت نشد (جدول ۴).

در کارسینوم سلول سنگفرشی  $P=0/59$  و دیسپلازی  $P=0/98$ ، ارتباط آماری معنی داری بین بیان CD105 با سن و نیز بین کارسینوم سلول سنگفرشی  $P=0/296$  و

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار تراکم عروق خونی در نواحی داخل تومور و Invasive front در کارسینوم سلول سنگفرشی

| آزمون                    | Invasive front   | Intra tumoral    | نوع ضایعه                  |
|--------------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| $t=7/72, df=19, P<0/001$ | $15/7 \pm 7/726$ | $7/75 \pm 4/329$ | کارسینوم سلول سنگفرشی دهان |

جدول ۴: ارتباط بیان CD105 و Snail2 با Grade (درجه تمایز) در کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی اپی تلیالی

| Slug               | CD105              | درجه تمایز | نوع ضایعه                  |
|--------------------|--------------------|------------|----------------------------|
| $2/5 \pm 0/707$    | $13/50 \pm 6/460$  | Grade I    | کارسینوم سلول سنگفرشی دهان |
| $3/17 \pm 0/753$   | $8/25 \pm 1/754$   | Grade II   |                            |
| $3/83 \pm 0/389$   | $11/50 \pm 7/778$  | Grade III  |                            |
| $F=6/800, P=0/007$ | $F=1/75, P=0/203$  | P-value    |                            |
| $1/6 \pm 0/516$    | $4/60 \pm 0/843$   | اندک       | دیسپلازی اپی تلیالی        |
| $2/00 \pm 0/756$   | $5/50 \pm 2/828$   | متوسط      |                            |
| $2/00 \pm 0/000$   | $5/00 \pm 1/414$   | شدید       |                            |
| $F=1/062, P=0/367$ | $F=0/475, P=0/630$ | P-value    |                            |

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده بیان بالای Snail2 (slug) و CD105 (Endoglin) در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نسبت به دیسپلازی بوده و به نوعی تأییدکننده نقش این نشانگرها در آغاز سرطان و تبدیل ضایعه پیش‌بدخیمی به بدخیمی است. Schimming و همکاران<sup>(۴)</sup> و Bondar و همکاران<sup>(۱۴)</sup> بیان بالای CD105 را در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و حنجره نسبت به مخاط نرمال گزارش کردند. Li و همکاران<sup>(۱۵)</sup> و Margaritescu و همکاران<sup>(۶)</sup> نیز بیان بالای CD105 را در بافت تومورال نسبت به مخاط نرمال بیان کرده و مطرح نمودند که CD105 در فعال‌سازی رگ‌سازی در بافت تومور نقش دارد.

می‌رسد که پرولیفراسیون سلول‌های اندوتلیال در بافت تومورال بیشتر از بافت نرمال بوده به طوری که با افزایش اندازه تومور نیاز به رگ‌سازی جدید افزایش نشان می‌دهد.<sup>(۵)</sup>

Snail2 (Slug) به عنوان ممانعت‌کننده عملکرد E-cadherin بوده و منجر به اختلال در چسبندگی و از دست دادن اتصال دسموزومی می‌گردد. عقیده بر آن است که اعضا خانواده Snail منجر به افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز شده و در اثر القایی اپی تلیوم بر مزانشیم مؤثر بوده و منجر به تهاجم، تکثیر سلولی و پیشرفت سرطان می‌گردد.<sup>(۷)</sup> در ارتباط با نقش Snail در سرطان دهان مطالعاتی انجام شده است ولی عملکرد Snail2 شناخته شده نیست.

Katafiasz و همکاران<sup>(۷)</sup> بیان بالای Slug در کارسینوم سلول سنگفرشی را مرتبط با عود آن دانستند،

Endoglin گلیکوپروتئین غشایی همودیمریک بوده و برای تکامل عروق خونی ضروری است. این گونه به نظر

سنگفرشی ریه موثر گزارش کردند. Patel و همکاران<sup>(۲۰)</sup> نیز Slug را مؤثر در عود و فنوتیپ بدخیمی در کارسینوم سلول سنگفرشی موثر دانسته و این گونه بیان نمودند که افزایش بیان Slug با کاهش مرگ سلولی در سرم همراه بود. اما در مطالعه Jethwa و همکاران<sup>(۲۱)</sup> ارتباطی بین Snail، درجه تمایز و مرحله بالینی تومور گزارش نشد.

در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که Snail2 نقش برجسته تری نسبت به CD105 در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی داشته باشد؛ ولی بدین معنا نیست که CD105 نقشی در پیشرفت سرطان نداشته باشد. بلکه شاید با بررسی Stage (مرحله بالینی) تومور ارتباط مثبتی در بیان CD105 دیده شود. از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم دسترسی به Stage بالینی تومور بود.

اگرچه مطالعاتی در زمینه بیان Slug و CD105 به طور جداگانه در سرطان‌های سرو گردن وجود دارد<sup>(۲۰، ۱۹، ۱۶ و ۷)</sup>، اما تاکنون در مطالعه‌ای ارتباط بیان Slug و CD105 مشاهده نشده است. در مطالعه حاضر ارتباط مثبت و مستقیمی در بیان Slug و CD105 در پیشرفت دیسپلازی به کارسینوم سلول سنگفرشی مشاهده شد، به طوری که با افزایش بیان Slug و کاهش چسبندگی سلول‌ها، افزایش بیان CD105 رؤیت شد. نتایج مطالعه ما در توافق با مطالعاتی است که نقش Snail2 را در رگ‌سازی و مقاومت به شیمی درمانی تأیید کردند.<sup>(۸)</sup>

از آنجا که یک تومور از نظر ساختاری هتروژن می‌باشد، بنابراین تراکم عروق خونی در نواحی مختلف آن متفاوت است. در این مطالعه تراکم عروق خونی در نواحی محیطی بیشتر از نواحی مرکزی در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان گزارش شده است. یافته مطالعه حاضر در توافق با نتایج Margaritescu و همکاران<sup>(۶)</sup> بوده که در مطالعه آنها بیشترین تراکم عروق خونی در نقاط Invasive

Mendelsohn و همکاران، ارتباط مثبت بیان Snail و متاستاز را گزارش کرده و مطرح نمودند که تومورهای Snail مثبت دارای پیش‌آگهی ضعیف بودند.<sup>(۱۶)</sup>

در مطالعه حاضر در بررسی بیان CD105 و Slug با فاکتورهای بالینی (سن، جنس، محل ضایعه) اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. مطالعه Schimming و همکاران<sup>(۴)</sup> و نیز Margaritescu و همکاران<sup>(۶)</sup> تأییدکننده مطالعه حاضر می‌باشد. اما مطالعه Zvrko و همکاران<sup>(۱۷)</sup>، رابطه مثبتی در بیان CD105 و سن گزارش نمودند، که در تضاد با نتایج مطالعه مذکور است.

در این مطالعه ارتباط بیان CD105 با درجه تمایز در کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی معنی‌دار نبود. در مطالعه Siar و همکاران<sup>(۱۸)</sup>، تراکم عروق با نشانگر CD105 در دیسپلازی شدید و متوسط به طور مشخصی بالاتر از دیسپلازی خفیف و مخاط نرمال بود که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر است. اگرچه مطالعه مذکور تأییدکننده نقش Snail2 و CD105 در آغاز کارسینوژنز است ولی این که آیا این دو نشانگر در پیشرفت کارسینوژنز نقش دارند یا نه، جای سؤال است.

در این مطالعه این گونه به نظر می‌رسد که Snail علاوه بر آغاز بدخیمی در پیشرفت سرطان نقش داشته باشد به طوری که با افزایش درجه بدخیمی، بیان Snail افزایش نشان می‌دهد و چسبندگی اپی‌تلیالی کاهش یافته و احتمال متاستاز بیشتر می‌شود. نتایج مطالعه ما در توافق با مطالعه Joseph و همکاران<sup>(۱۹)</sup> بوده و تأییدکننده نقش Snail در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی است. Uchikado و همکاران<sup>(۱۲)</sup> بیان E-cadherin و Slug را به عنوان فاکتورهای مستقل در پیش‌آگهی تومور مطرح کردند. Li و همکاران<sup>(۸)</sup> بیان Slug را با Stage تومور مرتبط بیان کرده‌اند و در متاستاز کارسینوم سلول



استروما و فاکتورهای ترشح شده درون آن در تراکم عروق خونی در نواحی مختلف ضایعات موثر باشد. تفاوت‌هایی در نتایج مطالعه حاضر با تحقیقات دیگر به چشم می‌خورد که به نظر می‌رسد، در ارتباط با CD105، عدم وجود یک روش واحد جهت سنجش تراکم عروق خونی باشد. همچنین تفاوت مشاهده گران، انتخاب Hot spots در روش ایمونوهیستوشیمی، انتخاب بلوک پارافینه و زمان فیکساسیون اولیه نمونه، برش‌های تهیه شده از نمونه‌ها و روش شمارش وجود دارد. این گونه به نظر می‌رسد که سیستم سنجش Slug و درجه بندی آن در مطالعات مختلف، متفاوت باشد. همچنین برخی از مطالعات از روش چشمی و دیگران از کامپیوتر جهت سنجش تراکم نشانگرهای فوق استفاده کردند؛ همچنین ممکن است حجم نمونه بر نتایج نهایی مؤثر باشد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که CD105 و Snail2 (slug) در آغاز کارسینوژنز مؤثرند. ارتباط مستقیم در بیان CD105 و Snail2 (slug) از نقش آنها در تبدیل ضایعه پیش بدخیم به بدخیمی حمایت می‌کند. Snail2 می‌تواند یکی از عوامل دخیل در پیشرفت سرطان دهان باشد. بیشترین فعالیت رگ سازی در کارسینوم سلول سنگفرشی در ناحیه Invasive front مشاهده شد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی و پایان نامه دانشجوی خانم بهاره غفاری به شماره ۵۲۹ می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مادی و معنوی معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

front یافت شد. Schimming و همکاران<sup>(۴)</sup> نیز در مطالعه‌ای بیان داشتند که هرچه از نقاط Invasive front تومور دور می‌شویم بیان Endoglin کاهش می‌یابد که به نوعی تأییدکننده نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. Eshghyar و همکاران<sup>(۵)</sup> نیز به این نتیجه رسیدند که میانگین تراکم عروق خونی به دست آمده با نشانگر CD105 در هر دو گروه با یا بدون درگیری عقده لنفاوی در Invasive front بالاتر از نواحی داخل توموری می‌باشد. برخی از مطالعات، نقش Invasive front را بررسی کرده و مطرح نمودند که قسمتی از تومور بوده که بیشترین تأثیر در رفتار و نتایج را دارد.<sup>(۵)</sup>

در مطالعه Yu و همکاران<sup>(۲۲)</sup> در کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن تراکم عروق لنفی در نواحی مرکزی بیشتر از محیطی گزارش شده و مرتبط با پیش‌آگهی بدتر تومور مطرح شده است. ایشان ارتباطی در تراکم عروق خونی با طول عمر ۵ ساله بیماران مطرح نکردند. نتایج مطالعه ما متفاوت از مطالعه Yu و همکاران<sup>(۲۲)</sup> می‌باشد.

البته به نظر می‌رسد که تراکم عروق خونی در نواحی محیطی و مرکزی بسته به نوع تومور و استرومای آن متفاوت باشد. در مطالعه Chou و همکاران<sup>(۲۳)</sup>، تفاوت معنی‌داری در تراکم عروق خونی در ناحیه مرکزی و محیطی موکوپیدرموئید کارسینوما یافت نشد. از نتایج مطالعه مذکور حدس زده می‌شود که نواحی محیطی کارسینوم سلول سنگفرشی فعالیت رگ سازی بیشتری جهت تهاجم از خود نشان می‌دهد. این گونه می‌توان بیان کرد از آنجا که فرمانده اصلی جهت رگ سازی در ضایعات تومورال، سلول‌های پارانشیم تومور هستند لذا ویژگی‌های این سلول‌ها و ماهیت ژنتیک آنها و ویژگی‌های

## منابع

1. Yu-Jen J, Chia-Der L, Chin-Ho L, Chih-Hsin T, Su-Hua H, Ming-Hsui T, et al. Salivary zinc finger protein 510 as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma early stages. *Clin Chimica Acta* 2011; 412(15-16): 1357-65.
2. Yu-Jen J, Chia-Der L, Chin-Ho L, Chao-Hsien CH, Jung-Yie K, Shih-Yin CH, et al. Proteomic identification of salivary transferin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Analytica Chimica Acta* 2010; 681(1-2): 41-8.
3. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis G. Advances in biology of oral cancer. *Oral Oncol* 2007; 43(6): 523-34.
4. Schimming R, Marme D. Endoglin (CD 105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002; 24(2): 151-6.
5. Eshghyar N, Mohammdi N, Rahrotaban S, Motabbary P, Vahedi SM. Endoglin (CD 105) positive microvessel density and it's relationship with lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of tongue. *Arch Iran Med* 2011; 14(4): 276-80.
6. Margaritescu CL, Simionescu C, Mogoanta L, Badea P, Pirici D, Stepan A, et al. Endoglin (CD 105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom Morphol Embryol* 2008; 49(3): 321-6.
7. Katafiasz D, Smith LM, Wahl JK 3rd. Slug (snail2) expression in oral squamous cell carcinoma cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility. *Cell Adh Migr* 2011; 5(4): 315-22.
8. Li R, Zhang D, Cai C, Dong J. The clinical significance of claudin -7 and slug expression in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Zhangguo Fei Aiza Zhi* 2011; 14(6): 492-6.
9. Neville BW, Dam DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2009, P. 409-21.
10. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1): 1-8.
11. Sharma M, Sah P, Sharma SS, Radhakrishnan R. Molecular changes in invasive front of oral cancer. *Oral Maxillofac Pathol* 2013; 17(2): 240-7.
12. Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, et al. Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3): 1174-80.
13. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11(2): 155-68.
14. Bodnar M, Szyberg L, Kaźmierczak W, Marszałek A. Evaluation of micro vessel density (MVD) in laryngeal squamous cell carcinoma. *Przegl Lek* 2012; 69(10): 726-30.
15. Li Q, Zhang B, Peng P. Relevance of Endoglin (CD105), VEGF and p53 with invasion metastasis and prognosis of laryngeal carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49(3): 321-6.
16. Mendelsohn A, Lai CH, Shintaku P, Fishbein M, Brugman K, Elashoff D, et al. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* 2012; 33(1): 6-13.
17. Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L. Clinicopathologic significance of CD105-assessed microvessel density in glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2010; 37(1): 77-83.
18. Siar CH, Nagatsuka H, Nakano K, Kawakami T. Angiogenic squamous dysplasia like phenomenon in oral epithelial precursor lesion. *Eur J Med Res* 2009; 14(1): 315-9.
19. Joseph MJ, Dangi-Garimella S, Shields MA, Diamand ME, Sun L, Koblinski JE, et al. Slug is a downstream mediator of transforming growth factor-beta1-induced matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of oral cancer cells. *J Cell Biochem* 2009; 108(3): 726-36.
20. Patel K, Kademani A, Gaffney P. Role of slug in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Oral Oncol* 2013; 49(1): S41.
21. Jethwa P, Naqvi M, Hardy RG, Hotchin NA, Roberts S, Spychal R. Overexpression of slug is associated with malignant progression of esophageal adeno carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(7): 1044-52.
22. Yu M, Liu L, Liang C, Li P, Ma X, Zhang Q, et al. Intratumoral vessel density as prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis of literature. *Head Neck* 2013; 10.
23. Chou KC, Chang LC, Su HC, Lee SH, Lee HS, Lee JW, et al. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in mucoepidermoid carcinoma. *J Med Sci* 2005; 25(6): 285-90.