

## بررسی رابطه میان EGFR و Laminin-5 با Stage و Grade مبتلایان به کارسینوم

### سلول سنگفرشی دهان □

دکتر شیما نفرزاده\*، دکتر محمد مشرف\*\*، دکتر فاطمه مشهدی عباس\*\*\*، دکتر زهره محمد طاهری\*\*\*\*

#### چکیده

سابقه و هدف: کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) حدود ۹۴٪ کلیه بدخیمی‌های حفره دهان را تشکیل می‌دهد. در دهه اخیر یافته‌های زیادی در زمینه تغییرات مولکولی و ژنتیکی مسئول ایجاد سرطان، بدست آمده است. بعضی از آنها ممکن است هدف‌هایی برای مواد درمانی جدید باشند. افزایش بروز EGF در بدخیمی‌ها با پروگنوز ضعیف بیماری و در تحقیقات نقش لامینین-۵ - برای افزایش شانس تبدیل ضایعات پیش بدخیم به بدخیمی مهاجم یا درجا (*in situ*) دیده شده است. با توجه به این نکات، مطالعه حاضر با هدف تعیین رابطه میان میزان EGFR و Laminin-5 با Stage و Grade میکروسکوپی مبتلایان به SCC حفره دهان انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه بر روی ۴۲ بلوک پارافینی موجود در بخش پاتولوژی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی با تشخیص SCC انجام گرفت. با روش ایمنوهِستوشیمی و استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد EGFR و Laminin-5 زیر میکروسکوپ نوری شمارش سلول‌های رنگ گرفته توسط دو پاتولوژیست صورت گرفت و از آزمون ضریب همبستگی کندال برای قضاوت آماری استفاده شد.

یافته‌ها: در این تحقیق مشاهده شد که ارتباط معناداری بین میزان بروز EGFR و Laminin-5 با Stage و Grade مبتلایان به SCC حفره دهان وجود ندارد. در حالی که ارتباط معناداری بین بروز لامینین-۵ با Stage و Grade وجود داشت ( $P < 0.01$ ).

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که Laminin-5 در بروز Stage و Grade‌های بالاتر SCC حفره دهان موثر است. اما نقش بروز EGFR همچنان مورد سؤال است و مطالعات بیشتر و دقیق‌تر برای تعیین نقش این مولکول مورد نیاز می‌باشد.

کلید واژگان: کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، Laminin-5، EGFR، Grade، Stage

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۱۶ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۱۲/۲۶ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۸/۱/۲۴

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۷، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸، ۴۷-۴۳

#### مقدمه

در پیش‌بینی نتیجه بیماری می‌تواند ارزشمند باشد. همچنین بعضی از آنها ممکن است هدف‌هایی برای مواد درمانی جدید باشند (۳). مثلاً عوامل درمانی متشکل از آنتی بادی‌های تک دودمانی ضد ErbB که یکی از اعضای خانواده گیرنده EGF (Epidermal Growth Factor) است تولید شده و در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). افزایش بروز EGF در بدخیمی‌های توموری از جمله در سر و گردن، با پروگنوز ضعیف بیماری مرتبط است (۵، ۶). اگر چه توافق کلی در مورد نقش پروگنوستیک آن در مورد

کارسینوم سلول سنگفرشی حدود ۹۴٪ کلیه بدخیمی‌های حفره دهان را تشکیل می‌دهد (۱). مرگ ناشی از سرطان دهان و اوروفارنکس در آمریکا ۹۵۰۰ در سال می‌باشد و میزان Survival این بیماری ۵۰٪ است. در برخی کشورهای آسیائی و هند سرطان دهان شایع‌ترین نوع بدخیمی است و بیش از ۵۰ درصد موارد بدخیمی را شامل می‌شود (۲). در دهه اخیر یافته‌های زیادی در زمینه تغییرات مولکولی و ژنتیکی مسئول ایجاد سرطان و رفتار بیولوژیک سلول‌ها، بدست آمده است. افزایش تعداد تغییرات ژنتیکی و مولکولی

□ طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\* نویسنده مسئول: استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات اندودنتیکس، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

E-mail: sh.nafarzadeh@mubabol.ac.ir

\*\* دانشیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\* استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\*\* استادیار گروه آسیب‌شناسی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

Proportion score نیز نسبت سلول‌های رنگ گرفته مثبت بود (۰=هیچ، ۱=کمتر از ۱۰٪، ۲=۵۰-۱۰٪، ۳=۸۰-۵۰٪ و ۴=بیشتر از ۸۰٪).

total score نیز در بازه ۰-۱۲ بوده و تومورها از نظر بروز EGFR به ۴ دسته تقسیم شدند: ۰=بدون بروز، ۱-۳=بروز اندک، ۴-۸=بروز متوسط، ۸-۱۲=بروز بالا (۸). برای محاسبه بروز Laminin-5 gamma 2، ۴ فیلد با درشتنمایی ۲۰ انتخاب و تعداد سلول‌های مثبت شده شمرده شدند (۹). (۸) از ضریب همبستگی کندال برای آزمون رابطه بین دو متغیر استفاده شد.

### یافته‌ها

این تحقیق بر روی ۴۲ بلوک پارافینی موجود در بخش پاتولوژی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی متعلق به بیماران مبتلا به SCC حفره دهان صورت گرفته است. سن بیماران ۸۸-۲۱ (میانگین  $58 \pm 18/72$ ) بوده است. ۲۴ مورد (۵۷/۱٪) زن و ۱۸ مورد (۴۲/۹٪) مرد بودند. از این تعداد، Stage‌های I و II و III هر کدام ۱۱ مورد و ۹ مورد (۲۱/۴٪) Stage IV داشتند. ۱۸ مورد (۴۲/۹٪) Grade I، ۱۷ مورد (۴۰/۵٪) Grade II و ۷ مورد (۱۶/۴٪) Grade III داشتند.

جدول ۱- میزان بروز EGFR بر اساس Stage در بررسی رابطه Ln-5 و EGFR با Grade، Stage مبتلایان به SCC

Stage	میزان بروز EGFR		
	بروز اندک	بروز متوسط	بروز بالا
I	۲	۴	۵
II	۴	۳	۴
III	۱	۴	۶
IV	۴	۱	۴
جمع	۱۱	۱۲	۱۹

برای آزمون رابطه بین این دو متغیر نیز از رابطه همبستگی استفاده شد. دو متغیر به عنوان متغیرهای رتبه‌ای در نظر گرفته شدند و از ضریب همبستگی Kendal استفاده شد. رابطه معنی‌دار بین دو متغیر دیده نشد ( $p > 0/05$ ).

کارسینوم حفره دهان وجود ندارد (۳). در تحقیقات نقش لامینین-۵ برای افزایش شانس تبدیل ضایعات پیش بدخیم به بدخیمی مهاجم یا درجا (in situ) نشان داده شده است (۷). لذا با توجه به اهمیت شناسایی نقش این عوامل در SCC دهان و از آنجا که بر اساس منابع موجود تا به حال تحقیقی در رابطه با نقش EGFR و Laminin-5 با Stage و Grade کارسینوم سلول سنگفرشی دهان صورت نگرفته، این تحقیق با هدف تعیین رابطه هر کدام از این عوامل با Stage و Grade این کارسینوم و ارتباط خود این دو عامل با یکدیگر انجام شد.

### مواد و روشها

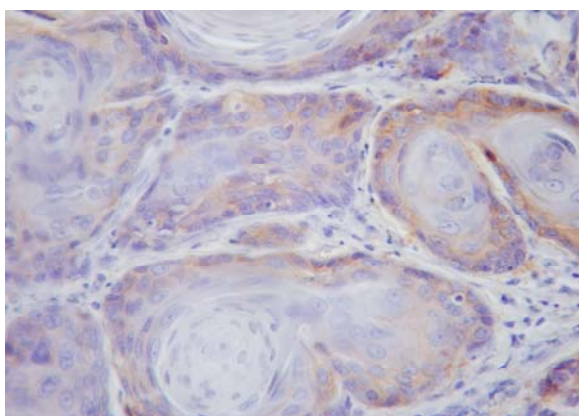
این مطالعه یک مطالعه توصیفی - تحلیلی و به صورت مقطعی می‌باشد. کلیه نمونه‌های موجود در بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی که تشخیص قطعی SCC برایشان گذاشته شده و Grade و Stage آنها مشخص بود، وارد مطالعه شدند. نمونه‌هایی که پرونده‌هایشان ناقص بوده یا تشخیص قطعی SCC برایشان گذاشته نشده یا بافت کافی آنها در دسترس نبوده است، از مطالعه خارج شدند. بعد از بررسی پرونده‌های موجود و بازبینی اسلایدهای میکروسکوپی آنها جهت تأیید Stage، Grade و تشخیص روش انجام رنگ‌آمیزی IHC Avidin-biotin بر روی بلوک‌های پارافینه در طول شب با استفاده از هیدروژن پراکساید ۰/۰۳٪ و سیستم آنزیمی برای EGFR Ag retrieval و روش حرارتی برای Laminin-5 و استفاده از بافر Tris و آنتی‌بادی منوکلونال موشی کلون شماره M7239، M7262 به ترتیب برای EGFR و Laminin-5 ساخت شرکت داکو دانمارک صورت گرفت.

برای محاسبه بروز EGFR (Epidermal Growth Factor) یک Total score که حاصل جمع Intensity score در Proportion score بود، محاسبه شد. Intensity score نشانه شدت رنگ گرفتن سلولها بود (۰=اصلاً رنگ نگرفته، ۱=ضعیف رنگ گرفته، ۲=متوسط رنگ گرفته، ۳=شدید رنگ گرفته).

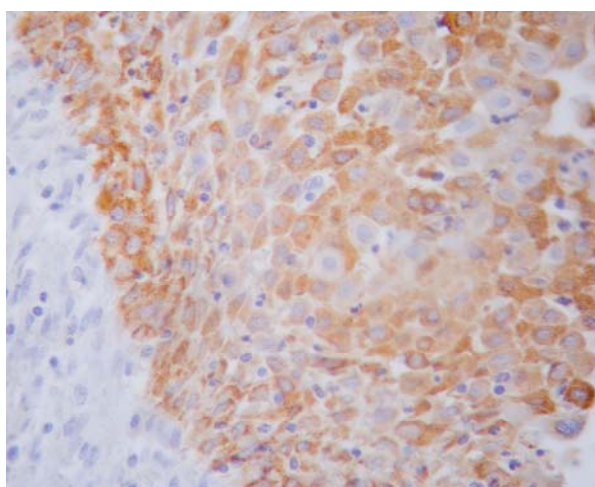
ضریب همبستگی بدست آمده برابر ۰/۵۸ بود که از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0/01$ ).

جدول ۴- میزان بروز Laminin-5 براساس Grade در بررسی رابطه Laminin-5 و EGFR با Grade, Stage مبتلایان به SCC

جمع	میزان بروز Laminin-5			Grade
	بروز بالا	بروز متوسط	بروز اندک	
۱۸	۳	۴	۱۱	I
۱۷	۳	۱۴	۰	II
۷	۶	۰	۱	III
۴۲	۱۲	۱۸	۱۲	جمع



شکل ۱- رنگ آمیزی EGFR در یک تومور SCC با Stage I و (x40) Grade I



شکل ۲- رنگ آمیزی Laminin-5 در یک تومور SCC با (x40) Grade II

جدول ۲- میزان بروز EGFR براساس Grade تومور در بررسی رابطه Laminin-5 و EGFR با Grade, Stage مبتلایان به SCC

جمع	میزان بروز EGFR			Grade
	بروز بالا	بروز متوسط	بروز اندک	
۱۸	۷	۶	۵	I
۱۷	۸	۵	۴	II
۷	۴	۱	۲	III
۴۲	۱۹	۱۲	۱۱	جمع

برای آزمون رابطه بین این دو متغیر از رابطه همبستگی استفاده شد. دو متغیر به عنوان متغیرهای رتبه‌ای در نظر گرفته شدند و از ضریب همبستگی Kendall استفاده شد. رابطه معنی‌دار بین دو متغیر دیده نشد ( $P < 0/05$ ). رابطه بین میزان بروز لامینین-۵ با Stage تومور در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- میزان بروز Laminin-5 براساس Stage تومور در بررسی رابطه Laminin-5 و EGFR با Grade, Stage مبتلایان به SCC

جمع	میزان بروز Laminin-5			stage
	بروز بالا	بروز متوسط	بروز اندک	
۱۱	۱	۲	۸	I
۱۱	۱	۸	۲	II
۱۱	۵	۵	۱	III
۹	۵	۳	۱	IV
۴۲	۱۲	۱۸	۱۲	جمع

برای آزمون رابطه بین این دو متغیر از رابطه همبستگی استفاده شد (دو متغیر به عنوان متغیرهای رتبه‌ای در نظر گرفته شدند و از ضریب همبستگی Kendall استفاده شد). ضریب همبستگی بدست آمده برابر ۰/۵۰ بود که از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0/01$ ). رابطه بین میزان بروز لامینین-۵ با Grade میکروسکوپی در جدول ۴ نشان داده شده است.

برای آزمون رابطه بین دو متغیر فوق از رابطه همبستگی استفاده شد. دو متغیر به عنوان متغیرهای رتبه‌ای در نظر گرفته شدند و از ضریب همبستگی Kendall استفاده شد.

**بحث**

شاید مربوط به نابرابری تعداد نمونه و توزیع نامناسب از نظر Staging باشد.

همانطور که نقش لامینین-۵ در مطالعات قبلی مشخص شده است، این مولکول باعث تسریع مهاجرت سلول‌های تومورال می‌شود و بنابراین انتظار می‌رود که این ماده در تومورهایی با Stage و Grade بالاتر، بروز بیشتری نشان دهد. این پیش‌فرض را Kawano و Yanagisawa نیز در سال ۲۰۰۶ اثبات کردند (۱۴).

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و مطالعات ذکر شده می‌توان بیان نمود که اگر چه در اپیتلیوم نرمال لامینین-۵ یکی از اجزاء اصلی غشاء پایه است و باعث قرارگیری منظم سلول‌های لایه بازال بر روی آن می‌شود ولی تولید این ماده در سلول‌های تومورال باعث اتصال این سلول‌ها به ماتریکس و استرومای تومور شده و در نتیجه به گسترش و تهاجم سلول‌های تومورال کمک می‌کند (۹،۱۵). درانتها پیشنهاد می‌کنیم مطالعات مشابهی بر روی ضایعات پیش بدخیم مانند لکو پلاکیا و مقایسه آن با SCC صورت گیرد.

**نتیجه‌گیری**

از بررسی یافته‌های این تحقیق نتیجه گرفته می‌شود که Laminin-5 در بروز Stage و Grade های بالاتر SCC حفره دهان موثر است. اما نقش بروز EGFR همچنان مورد سؤال است و نتایج ضد و نقیض وجود دارد و مطالعات بیشتر و دقیق‌تر برای تعیین نقش این مارکر مورد نیاز می‌باشد.

**تقدیر و تشکر**

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی با همین عنوان می‌باشد که کلیه هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأمین و پرداخت شده است، بنابراین نویسندگان تقدیر و تشکر خود را از مسئولان این معاونت اعلام می‌دارند.

در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین میزان EGFR با Stage و grade میکروسکوپی مبتلایان به SCC حفره دهان دیده نشد در حالی که ارتباط معنی‌داری بین میزان Laminin-5 با Stage و Grade دیده شد. نتایج مطالعه اخیر با نتایج مطالعات Ekberg و همکاران (۲۰۰۵)، همین‌طور Shiratsuchi و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد. در این مطالعات نیز ارتباط معناداری بین بروز مارکر EGFR با Stage و Grade میکروسکوپی SCC حفره دهان مشاهده نشد. هر چند در این مطالعات تفاوت بروز این مارکر در SCC حفره دهان در مقایسه با اپیتلیوم نرمال معنادار بود (۱۰،۱۱).

نتایج این تحقیق با تحقیق Yamada و Takagi (۱۹۹۲) که به بررسی نقش EGFR در SCC حفره دهان پرداختند، مغایرت دارد آنها ارتباط معناداری بین بروز EGFR با Stage و Grade تومور پیدا نکردند که تفاوت حاضر شاید مربوط به تعلق اکثر نمونه‌ها به کف دهان و استفاده از سیستم حرارتی برای Antigen Retrieval در تحقیق آنها باشد (۱۲).

نتایج تحقیق حاضر با تحقیق Klaus و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. آنها به بررسی ارتباط بین بروز EGFR با پروگنوز مبتلایان به SCC حفره دهان پرداختند و ارتباط معناداری بین بروز این مارکر با Stage و Grade مبتلایان پیدا نکردند که این شباهت می‌تواند مربوط به بالا بودن تعداد نمونه‌ها، استفاده از سیستم آنزیمی، یکسان بودن تعداد نمونه‌ها و تعلق داشتن اکثر نمونه‌ها به زبان در هر دو تحقیق باشد (۸).

نتایج این تحقیق با یافته‌های Nordermar و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد که نقش لامینین-۵ را در ایجاد کارسینوم مهاجم از کارسینوم در جای حفره دهان بررسی کردند و دریافتند هرچه بروز این ماده بیشتر باشد احتمال ایجاد تومور مهاجم‌تر بیشتر می‌شود (۱۳).

نتایج این تحقیق با تحقیق Lomozio و همکاران (۲۰۰۷) که به بررسی نقش پروگنوستیک Laminin-5 در SCC حفره دهان پرداختند تا حدی مغایرت دارد. آنها ارتباطی را بین تعداد سلول‌های مثبت شده و Stage تومور، انفیلتره التهابی و سائز ضایعه پیدا نکردند (۹). تفاوت مشاهده شده در نتایج

## References

1. Neville S, Damm D, Allen M, Bougot J: Oral and Maxillofacial Pathology. 2nd Ed. Philadelphia. WB Saunders Co. 2002;Chap10:356.
2. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan R: Clinical pathologic correlation. 4th Ed. Missouri St. Louis: WB Saunders Co. 2003; Chap2:52-56.
3. Ernest J, Stoter R, Bloemena E: The importance of EGFR in squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:1323-1329.
4. Robins S, Cotron R: Pathologic basis of disease. 7th Ed. Philadelphia. WB Saunders Co. 2005;Chap7:296.
5. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA: Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21: 3798-3807.
6. Dassonville O, Formento JL, Francoual M: Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:1873-1878.
7. Yukiko O, Nakanishi Y, Gotoh M: Epidermal growth factor receptor gene amplification is correlated with laminin-5 expression in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2002;175:197-204.
8. Klaus L, Gilgert S, Guenther G: High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Oral Oncol* 2007;43:193-198.
9. Lomuzio L, Della M, Milillo L: Prognostic value of differential expression of Laminin-5 gamma 2 in oral squamous cell carcinoma: correlation with survival. *Oncol Rep* 2007;18:793-800.
10. Ekberg T, Nestor M, Engstrom M: Expression of EGFR, HER2, HER3, HER4 in metastatic squamous cell carcinoma of the oral cavity and base of tongue. *Int J Oncol* 2005;26:1177-1185.
11. Shiratsuchi T, Ishibashi H: Inhibition of epidermal growth factor induced invasion by dexametasone and AP-1 in human squamous cell carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* 2002;193:340-348.
12. Yamada T, Takagi M. Evaluation of EGFR in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral surg Oral Med Oral Pthol* 1992;73:67-70.
13. Nordermar S, Hogmo A, Lindholm J: Laminin-5 gamma 2: a marker to identifying mucosal lesions at risk for tumor development. *Anticancer Res* 2003;23:4985-4989.
14. Kawano K, Yanagisawa S: Predictive value of Laminin-5 and membrane type 1-matrix metalloproteinase expression for cervical lymph node metastasis in T1 and T2 squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck* 2006;28:525-533.
15. Ryan M.C, Tizard R, Van Devanter DR: Cloning of the Lam A3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. *J Biol Chem* 1994;269:22779-22787.