

## مقایسه بروز فاکتور کمپلمان I (CFI) در مخاط دیسپلاستیک و مخاط طبیعی دهان به روش

### ایمونوهیستوشیمی

دکتر امیرافشارنجات<sup>۱</sup>، دکتر مجید شربتداران<sup>۲</sup>، مهندس همت قلی نیا<sup>۳</sup> دکتر حمیدعباس زاده<sup>۴\*</sup>

۱- دندانپزشک

۲- استادیار گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳- کارشناس ارشد آمار، مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴- استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

#### خلاصه:

**سابقه و هدف:** اهمیت دیسپلازی دهان از این جهت است که درصدی از این ضایعات می توانند به سمت سرطان پیشروی کنند. با توجه به تحقیق انجام شده در سرطان پوست، به نظر می رسد فاکتور کمپلمان I در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی نقش دارد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی فاکتور کمپلمان I بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه موردی-شاهدی، جامعه مورد مطالعه شامل بلوک های پارافینه مربوط به ۳۰ نمونه مخاط دیسپلاستیک دهانی و ۳۰ نمونه مخاط نرمال دهانی (به عنوان گروه کنترل) بود. مقاطع ۴ میکرونی از بلوکها تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی فاکتور کمپلمان I در آزمایشگاه پاتولوژی رنگ آمیزی شدند. در این بررسی درصد سلولهای رنگ شده و شدت رنگ پذیری آنها مورد توجه قرار گرفت. و با آزمون MANN-U-WHITNEY مورد قضاوت آماری قرار گرفت. سطح معنی داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** ۲۵ مورد از نمونه های مخاط نرمال و ۲۰ مورد از نمونه های مخاط دیسپلاستیک با این آنتی بادی رنگ نگرفتند. میانگین درصد سلول های رنگ گرفته در مخاط نرمال  $11.5 \pm 4.1$  درصد و در مخاط دیسپلاستیک  $41.6 \pm 6.7$  درصد بود. ( $P < 0.01$ ) بین مخاط نرمال و دیسپلاستیک دهان به لحاظ میانگین درصد سلول های رنگ شده، تفاوت آماری معناداری وجود نداشت. طبقه بندی نیمه کمی درصد سلول های رنگ گرفته نیز تفاوت آماری معنی داری بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان نشان نداد. به لحاظ شدت رنگ پذیری نیز تفاوت آماری معنی داری بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** به نظر می رسد در شروع تغییرات پیش بدخیم در سلولهای مخاطی نقش فاکتور کمپلمان I محدود است. این امر در سایر ضایعات فکی- صورتی با قابلیت رشد فزاینده و تخریب موضعی نیز توسط سایر مارکرها به اثبات رسیده است.

واژه های کلیدی: دیسپلازی، مخاط دهان، فاکتور کمپلمان I

وصول مقاله: ۹۵/۳/۱۰ اصلاح نهایی: ۹۵/۴/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۵/۵/۱

#### مقدمه:

سمت کانسر از ۶ تا ۳۶ درصد متغیر است.<sup>(۱)</sup> سیستم کمپلمان متشکل از تعداد زیادی اجزاء پروتئینی است که بر روی غشاء سلولها، پلاسما و به میزان کمتری در سایر مایعات بدن حاضرند. منبع اصلی پروتئینهای کمپلمان کبد است. به علاوه سایر بافتها پروتئین های کمپلمان را به صورت موضعی تولید می کنند. اعتقاد بر این است که اجزاء کمپلمان به طور موضعی تولید شده، برخی عملکردهای مهم در سطح بافتی انجام

دیسپلازی دهان یک وضعیت پیش بدخیم نسبتا شایع است که ۲/۵ تا ۵ نفر را در هر ۱۰۰۰ نفر مبتلا می کند. در دیسپلازی دهان، سلول های اپی تلیوم نرمال دهان توسط سلول هایی با تمایز نابالغ یا نامناسب و شبیه به سلول های دیده شده در بدخیمی، جایگزین می شوند. اهمیت دیسپلازی دهان از این جهت است که درصدی از این ضایعات می توانند به سمت کانسر پیشروی کنند. گزارشات در مورد خطر پیشرفت به

### مواد و روش‌ها:

تحقیق با طراحی موردی- شاهدی انجام گرفت. جامعه مورد مطالعه شامل ۳۰ مورد مخاط دیسپلاستیک دهانی (متشکل از انواع دیسپلازی خفیف و متوسط) بوده که از بین بلوک‌های پارافینه موجود در آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی بابل و دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی تهران، بازیابی شدند. همچنین ۳۰ مورد مخاط نرمال دهانی (بافت لته ای حاصل از جراحی افزایش طول تاج با حداقل التهاب از دید بالینی) به عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌هایی که بافت آنها برای مطالعه کافی نبوده یا دارای کیفیت یا فیکسسیون نامناسب بود، از مطالعه خارج شدند. نمونه‌هایی مورد بررسی در این مطالعه مربوط به بیماران بود که تحت درمان قرار نگرفته بودند. معیار ما برای تشخیص دیسپلازی کتاب مرجع نویل و همکاران بود.<sup>(۶)</sup> از هر بلوک، مقاطع ۴ میکرونی تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی فاکتور کمپلمان I (Abcam Liquid Rabbit polyclonal anti-factor I antibody; Abcam, Cambridge, United Kingdom, Product Code: ab82703, Ig Class: IgG) در آزمایشگاه پاتولوژی رنگ آمیزی شدند. بافت به دست آمده از کلیه یک فرد مبتلا به poststreptococcal glomerulonephritis برای کنترل مثبت استفاده شد و کنترل منفی با حذف آنتی بادی اولیه صورت گرفت.<sup>(۵)</sup> لام‌های رنگ آمیزی شده توسط دو پاتولوژیست مستقل با میکروسکوپ نوری Olympus CX21 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند و از اعداد گزارش شده توسط آن‌ها میانگین گرفته شد. در این بررسی درصد سلول‌های رنگ شده و شدت رنگ پذیری سلول‌ها مورد توجه بودند. در بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰، پنج فیلد به عنوان hot spot (فیلدهایی که در آن‌ها سلول‌های اپیتلیال بیشترین رنگ پذیری را داشته باشند)، انتخاب و در این فیلد‌ها سلول‌های رنگ گرفته با بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش شده و درصد سلول‌های رنگ گرفته محاسبه شد. در پایان درصد سلول‌های رنگ شده به طور نیمه کمی به صورت زیر طبقه بندی شدند:

می‌دهند.<sup>(۳)</sup> سیستم کمپلمان از طریق سه مسیر مجزا فعال می‌شود که منجر به تشکیل Complex Membrane attack و لیز سلول هدف می‌شوند. فعالیت سیستم کمپلمان به شدت توسط مهارکننده‌های متصل به سطح سلول و محلول تنظیم می‌شود که سلول‌ها را در مقابل لیز با واسطه کمپلمان حفاظت می‌کند.<sup>(۳)</sup>

شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که هم کاهش فعالیت و هم فعال شدن بیش از حد کمپلمان به پروسه‌های پاتولوژیک منجمله بروز سرطان کمک می‌کند. سلول‌های تومورال با منشاءهای متفاوت سیستم کمپلمان را فعال می‌کنند و مدتها تصور بر این بود که این مسئله تنها به نفع میزبان عمل می‌کند. با این وجود گزارشات جدید نشان دادند که سلول‌های تومورال از تحریک فعال سازی کمپلمان، به علت فراخوانی وابسته به C5a سلول‌های ساپرسور یا القاء آنژیوژنز، سود می‌برند. با در نظر گرفتن این موارد نقش کمپلمان در پاتوژنز سرطان ظاهراً نسبت به آنچه در ابتدا تصور می‌شد، پیچیده تر بوده و احتمالاً بین انواع مختلف و stage های متفاوت سرطان در این زمینه تفاوت وجود خواهد داشت.<sup>(۴)</sup>

سلولهای تومورال اغلب از کشته شدن بوسیله سیستم کمپلمان توسط بروز بیش از حد مهارکننده‌های کمپلمان فرار می‌کنند.<sup>(۴،۳)</sup> کمپلمان فاکتور I یک سرین پروتئاز محلول ۸۸ کیلو دالتونی است که نقش مهمی در تنظیم فعال سازی کمپلمان دارد بخاطر اینکه می‌تواند فعال شدن هر سه مسیر را توسط شکستن C4b و C3b فعال شده مهار کند.<sup>(۵)</sup> با توجه به تحقیق انجام شده در SCC پوست (cutaneous squamous cell carcinoma)، فاکتور کمپلمان I ممکن است در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی نقش داشته باشد. همانگونه که ممکن است فاکتور کمپلمان I در پیشرفت سرطان دارای اهمیت باشد، می‌تواند در شروع کارسینوژنز نیز نقش ایفا نماید.<sup>(۵،۶)</sup> بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی مقایسه ای بیان ایمونوهیستوشیمیایی فاکتور کمپلمان I بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان بود.

جدول ۱- توزیع نمونه های مورد بررسی بر حسب درصد سلول های رنگ شده به تفکیک نوع مخاط

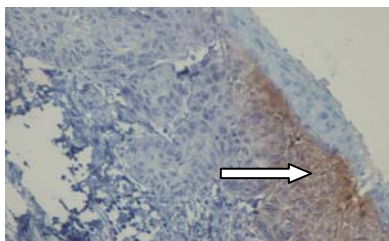
P value	طبقه بندی نیمه کمی درصد سلولهای رنگ شده			طبقه بندی نیمه کمی نوع مخاط
	مثبت قویا مثبت	مثبت ضعیف	منفی	
۰/۲۳	۰	۵	۲۵	نرمال
	٪۰	٪۱۶/۷	٪۸۳/۳	
۰	۰	۱۰	۲۰	دیسپلاستیک
	٪۰	٪۳۳/۳	٪۶۶/۷	

جدول ۲ طبقه بندی نیمه کمی شدت رنگ پذیری سلول ها برای فاکتور کمپلمان I را نشان می دهد. به لحاظ شدت رنگ پذیری نیز تفاوت آماری معنی داری بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان مشاهده نشد. ( $P=0/11$ )

جدول ۲- توزیع نمونه ها بر حسب شدت رنگ پذیری به تفکیک نوع مخاط

P value	Mean±SD	Mean Rank	شدت رنگ پذیری				طبقه بندی نوع مخاط
			۳	۲	۱	۰	
۰/۱۱	۰/۱۶±۰/۳۷	۲۷/۸۳	۰	۰	۵	۲۵	نرمال
			(/۰)	(/۰)	(/۱۶/۷)	(/۸۳/۳)	
۰/۱۱	۰/۴۰±۰/۶۲	۳۳/۱۷	۰	۲	۸	۲۰	دیسپلاستیک
			(/۰)	(/۶/۷)	(/۲۶/۷)	(/۶۶/۷)	

از میان نمونه های مخاط دیسپلاستیک که برای فاکتور کمپلمان I رنگ گرفتند، ۸ نمونه دارای شدت رنگ پذیری مثبت ضعیف ( $Score 1+$ ) و ۲ نمونه دارای شدت رنگ پذیری مثبت متوسط ( $Score 2+$ ) بودند. (شکل ۱)



شکل ۱- رنگ پذیری با شدت متوسط فاکتور کمپلمان I در مخاط دیسپلاستیک دهان (بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ الکترونیکی)

منفی (کمتر یا مساوی ۲۵٪ سلول ها)، مثبت ضعیف (۲۶٪ تا ۵۰٪ سلول ها)، مثبت (۵۱٪ تا ۷۵٪ سلول ها) و قویا مثبت (بیش تر از ۷۵٪)

همچنین جهت بررسی شدت رنگ پذیری، در بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰، پنج فیلد به عنوان hot spot (فیلدهایی که در آن ها سلول های اپیتلیال بیشترین رنگ پذیری را داشته باشند)، انتخاب و در این فیلد ها سلول های رنگ گرفته با بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده شده و شدت رنگ پذیری سلول ها ارزیابی می شد. شدت رنگ پذیری سلول های اپی تللیال نیز به صورت نیمه کمی به چهار گروه طبقه بندی شدند:

منفی (score 0): عدم رنگ پذیری؛ مثبت ضعیف ( $score 1+$ ): رنگ پذیری ضعیف به زحمت قابل احساس در اکثریت سلول های تومور؛ مثبت متوسط ( $score 2+$ ): رنگ پذیری متوسط در اکثریت سلول های تومور و مثبت قوی ( $score 3+$ ): رنگ پذیری قوی اکثریت سلول های تومور. (۴،۵)  
در پایان اطلاعات وارد نرم افزار SPSS V.20 شد و توسط تستهای آماری Mann-U-Whitney و Chi-square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری ( $P<0/05$ ) تلقی گردید.

#### یافته ها:

در مجموع ۶۰ بلوک پارافینه مورد مطالعه قرار گرفتند که ۳۰ مورد مخاط نرمال و ۳۰ مورد مخاط دیسپلاستیک داشتند. ۲۵ مورد از نمونه های مخاط نرمال و ۲۰ مورد از نمونه های مخاط دیسپلاستیک با آنتی بادی فاکتور کمپلمان I رنگ نگرفتند میانگین درصد سلول های رنگ گرفته در مخاط نرمال  $1/5 \pm 4/1$  درصد و در مخاط دیسپلاستیک  $4/16 \pm 6/7$  درصد بود. بین مخاط نرمال و دیسپلاستیک دهان به لحاظ درصد سلول های رنگ شده، تفاوت آماری معناداری وجود نداشت. ( $P=0/1$ )

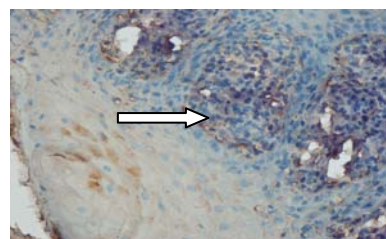
جدول ۱ طبقه بندی نیمه کمی درصد سلول های رنگ گرفته برای فاکتور کمپلمان I را نشان می دهد. طبقه بندی نیمه کمی درصد سلول های رنگ گرفته نیز تفاوت آماری معنی داری بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان نشان نداد. ( $P=0/23$ )

اختصاصی توسط سلول های تومورال در CSCC بیان شدند و شدت رنگ پذیری در CSCC نسبت به کارسینوم *in situ* پوست و اکتینیک کراتوزیس قویتر بود. بعلاوه یافته ها نشان داد که CFH تکثیر و مهاجرت رده های سلولی CSCC را افزایش می دهد. آنها نتیجه گیری نمودند که این یافته ها CFH را به عنوان بیومارکر مرتبط با سلول تومورال برای پیشرفت SCC پوست شناسایی می نماید.<sup>(۳)</sup> یافته های مطالعه آنها تا حدودی با یافته های مطالعه ما مطابقت دارد چرا که در مطالعه آنها CFH بعنوان یک مهارکننده سیستم کمپلمان در ضایعات دیسپلاستیک پوستی اکتینیک کراتوزیس بروز چندان زیادی نداشت و در مطالعه ما نیز مهارکننده کمپلمان CFI بروز کمی در مخاط دیسپلاستیک نشان داد.

Riihila<sup>۲</sup> و همکاران در مطالعه ای، نقش کمپلمان فاکتور I (CFI) را در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی پوست (CSCC) بررسی نمودند. یافته های آن ها افزایش قابل توجه بروز CFI را توسط رده های سلولی CSCC در محیط کشت و توسط سلول های تومور در CSCC های مهاجم به صورت *in vivo* نشان داد. آنالیز ایمونوهیستوشیمیایی کمپلمان فاکتور I شدت رنگ پذیری قویتری برای سلول های تومورال در CSCC های اسپورادیک مهاجم و CSCC های همراه با اپیدرمولیز بولوزای دیستروفیک مغلوب نسبت به کارسینوم *in situ* پوست، ضایعات پیش بدخیم اپیدرمال (اکتینیک کراتوزیس)، ضایعه خوش خیم اپیدرمال (سبورئیک کراتوزیس) و پوست نرمال نشان داد.

بعلاوه یافته ها نشان داد که CFI، تکثیر و مهاجرت سلول های CSCC را تنظیم می کند و رشد زونگرفت های CSCC انسانی به صورت *in vivo* را افزایش می دهد. آنها نتیجه گیری نمودند که این یافته ها شواهدی برای نقش CFI در پیشرفت CSCC فراهم می کند و آن را به عنوان یک هدف درمانی بالقوه در این تومورهای بدخیم پوستی شناسایی می نماید.<sup>(۵)</sup> یافته های مطالعه آنها تا حدودی با یافته های مطالعه ما مطابقت دارد چرا که در مطالعه آنها رنگ پذیری سلول ها برای CFI در ضایعات دیسپلاستیک پوستی اکتینیک کراتوزیس

۵ نمونه مخاط نرمال رنگ گرفته برای این فاکتور نیز دارای شدت رنگ پذیری مثبت ضعیف (Score 1+) بودند (شکل ۲).



شکل ۲- رنگ پذیری با شدت ضعیف فاکتور کمپلمان I در مخاط نرمال دهان (بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری)

#### بحث:

در مطالعه ما، بین مخاط نرمال و دیسپلاستیک دهان به لحاظ درصد سلول های رنگ گرفته برای فاکتور کمپلمان I و شدت رنگ پذیری سلول ها، تفاوت آماری معناداری وجود نداشت که نشاندهنده اینست که کمپلمان فاکتور I در شروع کارسینوزن (تبدیل مخاط نرمال به مخاط دیسپلاستیک) احتمالاً نقش ایفا نمی کند.

در مطالعه ی Okroj<sup>۶</sup> و همکاران، فاکتور مهارکننده کمپلمان I را در سلول های کانسر ریه (non-small cell (NSCLC بررسی نمودند. آنها گزارش نمودند که سلول های NSCLC کمپلمان I تولید می کنند. آنها نتیجه گیری نمودند که مهارکننده محلول کمپلمان I تولید شده توسط سلول های NSCLC ممکن است حفاظت بیشتری در مقابل سیستم کمپلمان فراهم کند و به فنوتیپ مهاجم سلول های این سرطان کمک کند.<sup>(۷)</sup>

Riihila<sup>۲</sup> و همکاران در مطالعه ای، نقش فاکتور کمپلمان H یا CFH یک مهارکننده مسیر آلترناتیو کمپلمان و یک کوفاکتور برای فاکتور کمپلمان I را در کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم پوست (CSCC)، کارسینوم *in situ* پوست و ضایعه پیش بدخیم اکتینیک کراتوزیس بررسی نمودند. یافته های آن ها بروز بیش از حد CFH را توسط سلول های CSCC با استفاده از آنالیز Affymetrix نشان داد. آنالیز ایمونوهیستوشیمی نشان داد که این مارکر به طور

## References:

- 1-Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2009;31(12):1600-9.
- 2-Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res*. 2010;8(11):1453-65.
- 3-Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-aho R, Kallajoki M, Grénman R, Meri S, et al. Complement Factor H: A Biomarker for Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* 2014;134(2):498-506.
- 4-Okroj M, Holmquist E, Nilsson E, Anagnostaki L, Jirstrom K, Blom AM. Local expression of complement factor I in breast cancer cells correlates with poor survival and recurrence. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64(4):467-78.
- 5-Riihila P, Nissinen L, Farshchian M, Kivisaari A, Ala-aho R, Kallajoki M, et al. Complement factor I promotes progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2015;135(2):579-88.
- 6-Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot J. *Oral and maxillofacial pathology*. 4nd ed. St. Louis: Sunders Elsevier; 2015
- 7-Okroj M, Hsu Y-F, Ajona D, Pio R, Blom AM. Non-small cell lung cancer cells produce a functional set of complement factor I and its soluble cofactors. *Mol immunol* 2008;45(1):169-79.
- 8-D Sadri, M Hejazi, J Jahanbani, A Forouzandeh. Quantitative analysis of argyrophilic nuclear organizer regions ingiant cell lesions of jaws. *Journal of pathology medicine* 2010;9(5):431-4
- 9- Sina M, Abdal K, GHertasi S, Mahmoodi M, Aghbali M. Correlation between mast cell concentration and microvascular density with grade and stage of Oral Squamous cell carcinoma. *J Res Dent Sci*. 2016; 12 (4) :202-207.

تفاوت چندانی با پوست نرمال نداشت و در مطالعه ما نیز تفاوت بروز این مارکر بین مخاط دیسپلاستیک و مخاط نرمال دهان معنی دار نشد.

Okroj و همکاران در مطالعه ای، بروز فاکتور کمپلمان I را در چند رده سلولی کانسر پستان و نیز tissue microarray های مربوط به کانسر پستان بررسی نمودند. آنها بروز CFI را در رده سلولی آدنوکارسینومای پستان یافتند و نیز بروز CFI در سطح mRNA و پروتئین، در سلول های تومورال و استرومای تومور تایید شد. بروز بالای پروتئین CFI در سلول های تومورال با بقای مختص کانسرو بقای بدون عود کوتاهتر مرتبط بود. بروز بالای CFI به طور مثبتی با اندازه تومور و grade هیستولوژیک مرتبط بود. آنها نتیجه گیری نمودند که فاکتور کمپلمان I در کانسر پستان بیان می شود و با نتایج بالینی نامطلوب همراه است.<sup>(۴)</sup>

### نتیجه گیری:

به نظر می رسد در شروع تغییرات پیش بدخیم در سلولهای مخاطی نقش فاکتور کمپلمان I محدود است. این امر در سایر ضایعات فکی - صورتی با قابلیت رشد فزاینده و تخریب موضعی نیز توسط سایر مارکرها به اثبات رسیده است.<sup>(۸،۹)</sup>