

## بررسی نقش فاکتور کمپلمان I با کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

دکتر نغمه رنجی سرای<sup>۱</sup>، دکتر مجید شریبتاران<sup>۲</sup>، مهندس همت قلی نیا<sup>۳</sup>، دکتر حمیدعباس زاده<sup>۴\*</sup>

۱- دندانپزشک

۲- دانشیار 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:** با توجه به تحقیق انجام شده در کارسینوم سلول سنگفرشی پوست، فاکتور کمپلمان I ممکن است در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نیز نقش داشته باشد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی فاکتور کمپلمان I در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه ی موردی- شاهدی، جامعه مورد مطالعه شامل بلوک های پارافینه مربوط به ۳۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ۳۰ نمونه مخاط نرمال دهانی بود. مقاطع ۴ میکرونی از بلوک ها تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی فاکتور کمپلمان I 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 ۵ مورد از نمونه های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با این آنتی بادی رنگ نگرفتند. میانگین درصد سلول های رنگ گرفته در مخاط نرمال ۰/۱۵ و در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۰/۶۰ بود. ( $P < 0.01$ ) بین مخاط نرمال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ میانگین درصد سلول های رنگ شده، تفاوت آماری معناداری وجود داشت ( $P = 0.0$ ) طبقه بندی نیمه کمی درصد سلول های رنگ گرفته نیز تفاوت آماری معنی داری بین کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و مخاط نرمال دهان نشان داد ( $P = 0.0$ ) به لحاظ شدت رنگ پذیری نیز تفاوت آماری معنی داری بین کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و مخاط نرمال دهان مشاهده شد. ( $P = 0.0$ )

**نتیجه گیری:** به نظر می رسد که فاکتور کمپلمان I در بروز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نقش داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** کارسینوم سلول سنگفرشی، مخاط دهان، فاکتور کمپلمان I

وصول مقاله: ۹۵/۶/۲۲ اصلاح نهایی: ۹۵/۹/۷ پذیرش مقاله: ۹۵/۹/۱۸

### مقدمه:

مایعات بدن حازرند. منبع اصلی پروتئین های 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 می دهند.<sup>(۱)</sup> سیستم کمپلمان از طریق سه مسیر مجزا فعال می شود که منجر به تشکیل Membrane attack Complex و لیز سلول هدف می شوند. فعالیت سیستم کمپلمان به شدت توسط مهارکننده های متصل به سطح سلول و محلول تنظیم می شود که سلول ها را در مقابل لیز با واسطه کمپلمان حفاظت می کند.<sup>(۲)</sup>

کارسینوم سلول سنگفرشی squamous cell carcinoma یا SCC شایعترین نئوپلاسم بدخیم حفره دهانی است که بیش از ۹۰ درصد کانسره های دهانی را شامل می شود. تغییرات ژنی با تاثیر گذاری بر بروز پروتئین ها در ایجاد کانسر دهان دخیل دانسته شده اند که این عدم تنظیم پروتئینی می تواند منجر به تکثیر سلولی کنترل نشده، تهاجم بافتی و متاستاز شود.<sup>(۱)</sup>

سیستم کمپلمان متشکل از تعداد زیادی اجزاء پروتئینی است که بر روی غشاء سلول ها، پلاسما و به میزان کمتری در سایر

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 فیکساسیون نامناسب بود، از مطالعه خارج شدند. نمونه‌هایی مورد بررسی در این مطالعه مربوط به بیماری‌هایی بود که تحت درمان قرار نگرفته بودند. معیار ما برای تشخیص SCC، 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.<sup>(۵)</sup> 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 زمینه میکروسکوپی به عنوان hot spot (زمینه میکروسکوپی که در آن‌ها سلول‌های تومورال بیشترین رنگ پذیری را داشته باشند)، انتخاب و در آنها 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:

منفی (کمتر یا مساوی ۲۵٪ سلول‌ها)، مثبت ضعیف (۲۶٪ تا ۵۰٪ سلول‌ها)، مثبت (۵۱٪ تا ۷۵٪ سلول‌ها) و قویا مثبت (بیشتر از ۷۵٪).

همچنین جهت بررسی شدت رنگ‌پذیری، در بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰×، پنج زمینه میکروسکوپی به عنوان hot spot انتخاب و در آنها سلول‌های رنگ گرفته با بزرگنمایی ۴۰۰× مشاهده شده و شدت رنگ‌پذیری سلول

شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که هم کاهش فعال شدن و هم فعال شدن بیش از حد کمپلمان به پروسه‌های پاتولوژیک منجمله کانسر 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 آنتی‌ژن، سود می‌برند. با در نظر گرفتن اینها با همدیگر، نقش کمپلمان در پاتوژنز کانسر ظاهراً نسبت به آنچه در ابتدا تصور می‌شد، پیچیده تر بوده و احتمالاً بین انواع مختلف و stage‌های متفاوت کانسر فرق 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)</sup> کمپلمان فاکتور I یا CFI یا complement factor I 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.<sup>(۵)</sup> بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی مقایسه‌ای بیان ایمونوهیستوشیمیایی فاکتور کمپلمان I بین کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و مخاط نرمال دهان بود.

#### مواد و روش‌ها:

تحقیق با طراحی موردی-شاهدی انجام گرفت. جامعه مورد مطالعه شامل ۳۰ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی بوده که از بین بلوک‌های پاراتینه موجود در آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی بابل و دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی تهران، بازیابی شدند. همچنین ۳۰ مورد مخاط نرمال دهانی (بافت لثه ای حاصل از جراحی افزایش طول تاج با

میانگین درصد سلول های رنگ گرفته در مخاط نرمال  $0/41 \pm 0/15$  و در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان  $0/32 \pm 0/60$  بود. بین مخاط نرمال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ درصد سلول های رنگ شده، تفاوت آماری معناداری وجود داشت ( $P=0/00$ ).

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 کارسینوم سلول سنگفرشی و مخاط نرمال دهان نشان داد ( $P=0/00$ ).

جدول ۱- توزیع فراوانی سلول های رنگ گرفته برای فاکتور کمپلمان I بر حسب طبقات و به تفکیک گروههای مورد مطالعه

P	طبقه بندی گروه			
	قویا مثبت n (%)	مثبت n (%)	مثبت ضعیف n (%)	منفی n (%)
0.00	۰(-)	۰(-)	۵(۱۶/۷)	۲۵ (۸۳/۳)
	۱۱(۳۶/۶)	۹(۳۰)	۵(۱۶/۷)	۵(۱۶/۷)

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 کارسینوم سلول سنگفرشی و مخاط نرمال دهان مشاهده شد ( $P=0/00$ ).

جدول ۲- مقایسه شدت رنگ پذیری برای نشانگر فاکتور کمپلمان I در مخاط نرمال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

P value	Mean Rank	حجم	شدت رنگ پذیری گروه			
			۳	۲	۱	۰
0.00	۰/۱۷	۳۰(۱۰۰)	۰(-)	۰(-)	۵ (۱۶/۷%)	۲۵ (۸۳/۳%)
	۲/۱	۳۰(۱۰۰)	۱۵(۵۰%)	۷ (۲۳/۳%)	۳(۱۰%)	۵ (۱۶/۷%)

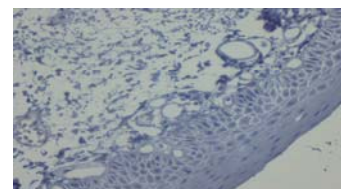
ها ارزیابی شد. شدت رنگ پذیری سلول ها نیز به صورت نیمه کمی به چهار گروه طبقه بندی شدند:

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.<sup>(۴،۵)</sup>

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 کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بودند. ۲۵ مورد از نمونه های مخاط نرمال و ۵ مورد از نمونه های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با آنتی بادی فاکتور کمپلمان I رنگ نگرفتند (تصویر ۱).

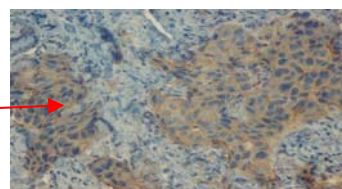


شکل ۱- عدم بروز فاکتور کمپلمان I در مخاط نرمال دهان

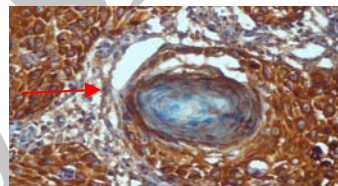
## بحث:

در مطالعه ما، بین مخاط نرمال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ درصد سلول‌های رنگ گرفته برای فاکتور کمپلمان I و شدت رنگ پذیری سلول ها، تفاوت آماری معناداری وجود داشت که نشاندهنده اینست که کمپلمان فاکتور I در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان احتمالاً نقش ایفا می‌کند. در مطالعه ی Okroj و همکاران، فاکتور مهار کننده کمپلمان I (FI یا factor I) را در سلول‌های non-small cell cancer (NSCLC) بررسی نمودند. آنها گزارش نمودند که سلول‌های NSCLC تولید FI می‌کنند. آنها نتیجه گیری نمودند که مهار کننده محلول FI تولید شده توسط سلول‌های NSCLC ممکن است حفاظت بیشتری در مقابل سیستم کمپلمان فراهم کند و به فنوتیپ مهاجم سلول‌های این کانسر ریه کمک کند.<sup>(۷)</sup> یافته‌های مطالعه آنها در زمینه کمک کمپلمان فاکتور I به پیشرفت کانسر ریه تا حدودی موافق با یافته‌های حاصل از مطالعه ما در زمینه کمک کمپلمان فاکتور I به پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان است. Riihila و همکاران در مطالعه‌ای، نقش فاکتور کمپلمان H (CFH) یا complement factor H (یک مهارکننده مسیر آلترناتیو کمپلمان و یک کوفاکتور برای فاکتور کمپلمان I) را در کارسینوم سلول سنگفرشی پوست (CSCC) یا cutaneous squamous cell carcinoma) مهاجم، in situ و ضایعه پیش بدخیم اکتینیک کراتوزیس (یک ضایعه همراه با دیسپلازی) بررسی نمودند. یافته‌های آنها بروز بیش از حد CFH را توسط سلول‌های CSCC با استفاده از آنالیز Affymetrix نشان داد. آنالیز ایمونوهیستوشیمی نشان داد که این مارکر به طور اختصاصی توسط سلول‌های تومورال در CSCC بیان شدند و شدت رنگ پذیری در CSCC نسبت به in situ CSCC و اکتینیک کراتوزیس قویتر بود. بعلاوه یافته‌ها نشان داد که CFH تکثیر و مهاجرت رده‌های سلولی CSCC را افزایش می‌دهد. آنها نتیجه‌گیری نمودند که این یافته‌ها CFH را به عنوان بیومارکر مرتبط با سلول تومورال برای پیشرفت SCC پوست شناسایی می‌نماید.<sup>(۳)</sup> یافته‌های مطالعه آنها تا حدودی با یافته‌های مطالعه ما مطابقت دارد چرا که در

از میان نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان که برای فاکتور کمپلمان I رنگ گرفتند، ۳ نمونه دارای شدت رنگ پذیری مثبت ضعیف (Score 1+) و ۷ نمونه دارای شدت رنگ پذیری مثبت متوسط (Score 2+) و ۱۵ نمونه دارای شدت رنگ پذیری مثبت قوی (Score 3+) بودند (شکل ۲ و ۳)

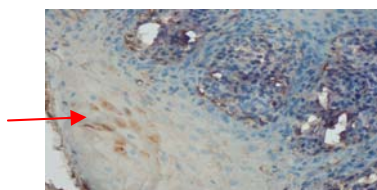


شکل ۲- رنگ پذیری با شدت ضعیف فاکتور کمپلمان I در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (بزرگنمایی ۴۰۰×)



تصویر ۳- رنگ پذیری با شدت قوی فاکتور کمپلمان I در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (بزرگنمایی ۴۰۰×)

۵ نمونه مخاط نرمال رنگ گرفته برای این فاکتور نیز دارای شدت رنگ پذیری مثبت ضعیف (Score 1+) بودند (شکل ۴).



شکل ۴- رنگ پذیری با شدت ضعیف فاکتور کمپلمان I در مخاط نرمال دهان (بزرگنمایی ۴۰۰×)

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> در مطالعه قبلی ما بروز فاکتور کمپلمان I بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان مقایسه شد.<sup>(۸)</sup> در آن مطالعه بروز این فاکتور بین مخاط دیسپلاستیک و نرمال دهان تفاوت معنی داری نشان نداد. اما به نظر می رسد با آغاز تهاجم OSCC به یافت هم بند و تبدیل دیسپلازی مخاط به کارسینوم مهاجم دهانی بروز فاکتور کمپلمان I نیز افزایش می یابد.

#### نتیجه گیری:

با توجه به وجود تفاوت معنی دار در بروز کمپلمان فاکتور I بین مخاط نرمال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، به نظر می رسد که این فاکتور در پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان دخیل باشد.

#### References:

1. Regezi JA, sciubba JJ, Jorden RCK. Oral pathology, clinical pathologic correlations. 7th ed. Missouri: WB sanders; 2016. P: 48-53.
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. Riihila 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. 4th ed. St. Louis: Sunders Elsevier; 2016. p: 361.
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. Afsharnejat A, SHarbatdaran M, GHolinia H, Abbaszadeh H. Comparative evaluation of complement factor I in dysplastic and normal oral mucosa using immunohistochemistry. J Res Dent Sci 2016; 13 (3) :117-121

مطالعه آنها CFH (بعنوان یک مهارکننده سیستم کمپلمان) در SCC پوست بروز یافت و به عنوان یک بیومارکر در پیشرفت SCC شناخته شد و در مطالعه ما نیز مهارکننده کمپلمان CFI (complement factor I) در SCC دهان بروز معنی داری داشت و به عنوان یک بیومارکر در پیشرفت SCC دهان شناخته شد. "Riihila" و همکاران در مطالعه ای دیگر، 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 CSCC *in situ*. 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 زئونگرفت 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 SCC پوست تفاوت معنی داری با پوست نرمال داشت و در مطالعه ما نیز تفاوت بروز این مارکر بین SCC دهان و مخاط نرمال دهان معنی دار شد. Okroj و همکاران در مطالعه ای، بروز فاکتور کمپلمان I (CFI) 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