بررسی حضور مارکرهای میواپی‌تلیالی در تعیین هیستوژنز پلئومورفیک آدنوما و موکواپی‌درموئید کارسینومای غدد بزاقی[□]

دکتر پرویز دیهیمی[*]، دکتر پروین محزونی[**]، دکتر نکیسا ترابی‌نیا[***]

چکیده

زمینه و هدف: امروزه بکارگیری ایمونوهیستوشیمی به یک ابزار مکمل برای تشخیص نئوپلاسم‌ها در کنار رنگ‌آمیزی‌های H&E تبدیل شده است. در نئوپلاسم‌های غدد بزاقی هنوز آنتی‌ژن‌های اختصاصی شناسایی نشده و تعدادی از ایمونومارکرهای کمتر اختصاصی در تشخیص و طبقه‌بندی این نئوپلاسم‌ها به کار می‌روند که به خصوص در مورد نقش سلول‌های میواپی‌تلیال کمک‌کننده است. هدف از این مطالعه بررسی ایمونوهیستوشیمی مارکرهای سلول‌های میواپی‌تلیال (GFAP، اکتین، ویمنتین و S100) در پلئومورفیک آدنوما و موکواپی درموئید کارسینومای غدد بزاقی جهت تشخیص افتراقی این تومورها و تعیین هیستوژنز آنها است.

مواد و روشها: در این تحقیق توصیفی – تحلیلی با استفاده از روش نمونه‌گیری آسان، تعداد ۲۵ نمونه پلئومورفیک آدنوما و ۲۵ نمونه موکواپی‌درموئید کارسینومای غدد بزاقی که با فرمالین فیکس و در پارافین غوطه‌ور شده بودند، برای بررسی حضور پروتئین‌های GFAP، muscle. Specific - Actin، ویمنتین و S100 به روش استاندارد بیوتین – استرپتاویدین و Antigen Retrival رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی شدند. سپس واکنش ایمنی در سلول‌های میواپی‌تلیال و ناحیهٔ کندرومیگزوئیدی پلئومورفیک آدنوما و سلول‌های موکوسی، اپی‌درموئیدی و حد واسط موکواپی‌درموئید کارسینوما ارزیابی و با کمک روش Regezi، scoreبندی شد.

(۰: منفی، ۱+ : رنگ‌پذیری پراکنده و کانونی، ۲+ : کمتر از ۲۵٪ سلول‌ها مثبت، ۳+ : بین ۲۵٪ـ۵۰٪ سلول‌ها مثبت، ٤+ : بیشتر از ۵۰٪ مثبت) اطلاعات به دست آمده با به کارگیری آزمون آماری Chi - square و با سطح معنی‌دار ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در هر ۲۵ نمونه پلئومورفیک آدنوماها تمامی سلول‌های غیرلومینال و ناحیهٔ کندرومیگزوئیدی برای GFAP و ویمنتین واکنش ٤+ نشان دادند در حالی که در مورد اکتین واکنش ۳+ ← ۰ دیده شد (۱۲ مورد منفی، ۱۲ مورد ۱+، ۱ مورد ۳+) و برای S100 واکنش ٤+ ←۱+ دیده شد (۳ مورد ۱+، ۳ مورد ۲+، ۱۸ مورد ۳+ و ۱ مورد ٤+). اما در هر ۲۵ مورد موکواپی‌درموئیدکارسینوماها سلول‌های تومورال بدون توجه به درجه هیستوپاتولوژی برای تمام مارکرهای ذکر شده منفی گزارش شد و تنها استرومای همبندی با آنتی بادی‌های GFAP و ویمنتین رنگ گرفتند. مقایسه فراوانی این پروتئین‌ها در دو تومور از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). در مورد هر دو تومور واکنش ایمنی در غدد بزاقی فرعی و غدد بزاقی اصلی تفاوتی نشان نداد.

نتیجه‌گیری: حضور مارکرهای سلولهای میواپی‌تلیال در پلئومورفیک‌آدنوما، تأکیدی بر حضور و نقش سلولهای میواپی‌تلیال در هیستوژنز این تومور می‌باشد و عدم تظاهر یا تظاهر حداقل این آنتی‌ژنها در موکواپی‌درموئیدکارسینوما نشان‌دهنده عدم تمایز سلولهای میواپی‌تلیال در هیستوژنز این تومور است. در حقیقت بررسی مارکرهای سلولهای میواپی‌تلیال می‌تواند در تشخیص افتراقی تومورهای غدد بزاقی با تمایز سلولهای میواپی‌تلیال و همچنین، در تعیین هیستوژنز این تومورها مؤثر باشد.

کلید واژگان: موکواپی‌درموئیدکارسینوما، پلئومورفیک‌آدنوما، GFAP، muscle-specific actin، ویمنتین، S100، ایمونوهیستوشیمی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/٤ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۳/۹/۲۸ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۳/۱۱/۳

□ طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

[*]نویسنده مسئول: استادیار گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. E-mail:Deihimy@dnt.mui.ac.ir

[**]دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

[***]متخصص پاتولوژی دهان، فک و صورت.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه استفاده از روشهای ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص دقیق‌تر هیستوپاتولوژیک نئوپلاسم‌ها و تعیین هیستوژنز و پاتوژنز ایجاد نئوپلاسم‌ها و حتی پیش‌آگهی آنها، اهمیت بسزایی دارد. اخیراً ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص‌های افتراقی تومورهای غدد بزاقی نیز بکار گرفته می‌شود اما تاکنون آنتی‌ژن‌های اختصاصی برای نئوپلاسم‌های غدد بزاقی پیدا نشده است و بطور معمول پانل‌هایی از ایمونومارکرهای کمتر اختصاصی برای این منظور استفاده می‌شوند(۱). از آنجا که سلولهای نئوپلاستیک، آنتی‌ژنهایی را نمایان می‌سازند که بر روی معادل نرمال این سلولها پیدا می‌شوند، بنابراین اطلاع از فنوتیپ سلولهای غدد بزاقی و به ویژه سلولهای میواپی‌تلیال می‌تواند در تعیین سطح شرکت و تمایز این سلولها در نئوپلاسم‌های غدد بزاقی کمک‌کننده باشد (۲). تومور پلئومورفیک آدنومای غدد بزاقی بعنوان شایعترین تومور خوش‌خیم غدد بزاقی و موکواپی‌درموئیدکارسینوما بعنوان شایعترین تومور بدخیم غدد بزاقی هدف مطالعه بسیاری از محققین بوده است؛ بخصوص در مورد شرکت و نقش سلولهای میواپی‌تلیال در این دو تومور تحقیقات زیادی صورت گرفته است. در مطالعات انجام شده بر روی غدد بزاقی نرمال و تومورهای غدد بزاقی برای شناسایی سلولهای میواپی‌تلیال مشخص شده است که سلولهای میواپی‌تلیال نقش مهمی در هسیتوژنز پلئومورفیک آدنوما ایفا می‌نمایند(۳،۴). در برخی مطالعات نیز عنوان شده که سلولهای میواپی‌تلیال ممکن است نقش مشخصی در ایجاد موکواپی‌درموئیدکارسینوما داشته باشند (۱،۵). با این حال هنوز سؤالات بسیاری در این زمینه بدون پاسخ مانده‌اند.

تحقیقات بسیاری در مورد حضور مارکرهای S100، اکتین، ویمنتین و GFAP در پلئومورفیک آدنوما و موکواپی‌درموئید کارسینوما صورت گرفته است. در مطالعات Baumal و Kahn (۱۹۸۵) مشاهده شد که سلولهای میواپی‌تلیال در غدد بزاقی نرمال با آنتی‌بادیهای CK، S100، اکتین و ویمنتین رنگ گرفتند و سلولهای میواپی‌تلیال تغییر یافته در پلئومورفیک آدنوما نیز با تمام آنتی‌بادیهای ذکر شده رنگ‌آمیزی مثبت شدند(۶). همچنین در تحقیقات انجام شده توسط Nakazato و Ishida (۱۹۸۵)، Regezi و Zarbo (۱۹۸۶)، Campbell و Crocker (۱۹۸۸)، Huang (۲۰۰۰) و White و Curran (۲۰۰۱)، حضور و توزیع پروتئین S100 و GFAP در غدد بزاقی نرمال و نئوپلاستیک بررسی و مشخص شد S100 و GFAP در هسته و سیتوپلاسم نواحی سلولار و ناحیه کندرومیگزوئید پلئومورفیک آدنوما حضور دارند(۱۱ـ۷). در سال ۱۹۹۰، VC Araujo و NS Araujo پیشنهاد دادند که ویمنتین یکی از نشانگرهای اولیه برای تمایز نئوپلاستیک سلولهای میواپی‌تلیال می‌باشد(۱۲). همچنین VC Araujo و Carvalho (۱۹۹۴) و Takai و Dardic (۱۹۹۵)، طی مطالعه‌ای بیان نمودند که سلولهای غیرلومینال در پلئومورفیک آدنوما واکنش ایمنی مثبتی برای ویمنتین نشان می‌دهند، در حالیکه سلولهای غیرلومینال در پلئومورفیک‌آدنوما با muscle-specific actin هیچگونه واکنشی نداشته و اکتین تنها در جدار عروق مثبت می‌شود، بنابراین پیشنهاد شد که در سلولهای میواپی‌تلیال نئوپلاستیک، ویمنتین تا حدی جایگزین اکتین می‌شود (۱۳،۱۴). به علاوه طی تحقیقات انجام شده توسط Furukawa و Nishimura (۱۹۹۱) و Makino، Murakami (۱۹۹۳) گزارش شد که پروتئین GFAP، S100 و ویمنتین در غدد بزاقی طبیعی منفی بوده در حالیکه در پلئومورفیک آدنوما واکنش دارد، بنابراین آنها نتیجه گرفتند که حضور این پروتئین‌ها با انکوژنزیس ارتباط دارد(۱۵،۳).

در مورد تومور موکواپی‌درموئیدکارسینومای غدد بزاقی، Ghosh و Hassanin (۱۹۸۹) مشاهده کردند که سلولهای حد

Archive of SID

www.SID.ir

واسط این تومور دارای واکنش مثبتی برای اکتین، ویمنتین و S100 هستند بنابراین بیان کردند سلولهای حدواسط موکواپی درموئیدکارسینوما دارای خصوصیات مشابه سلولهای میو اپی‌تلیال غدد بزاقی طبیعی هستند(۱۶) ولی در تحقیقات انجام شده توسط Batsakis و Zarbo، Regezi (۱۹۹۱) و Sousa و Loyola (۱۹۹۸) موکواپی‌درموئیدکارسینوما برای اکتین، ویمنتین، GFAP و S100 منفی گزارش شد(۱۸،۱۷،۱) همچنین در مطالعه Regezi (۱۹۹۱) بیان شد که درجات مختلف موکواپی‌درموئیدکارسینوما باعث تغییر مشخصی در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نمی‌شوند. در نهایت در سال ۲۰۰۲، Marucci و Foschini، حضور تعدد زیادی سلولهای اپی‌تلیالی کراتین مثبت را در موکواپی‌درموئیدکارسینوما گزارش کردند در حالیکه smooth-muscle actin که نشان‌دهنده تمایز سلولهای میواپی‌تلیال است منفی بود. همچنین با مشاهده حضور آنتی‌بادی‌های آنتی‌میتوکندریال در این تومور، ایمونوپروفایل سلولی مشابه مجاری مخطط نرمال را برای موکواپی‌درموئیدکارسینوما پیشنهاد دادند(۱۹).

بنابراین هدف از این تحقیق ارزیابی حضور مارکرهای مربوط به سلول‌های میواپی‌تلیال (GFAP، اکتین، ویمنتین و S100) در پلئومورفیک آدنوما و موکواپی درموئید کارسینومای غدد بزاقی و بررسی نقش سلول‌های میواپی‌تلیال در هیستوژنز این دو تومور است.

مواد و روشها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی ـ تحلیلی و بدون جهت بوده، جمعیت مورد مطالعه، بلوک‌های پارافینی مربوط به تومورهای موکواپی‌درموئیدکارسینوما و پلئومورفیک آدنومای غدد بزاقی بیماران مراجعه کننده به بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی اصفهان و بخش پاتولوژی بیمارستان‌های کاشانی و الزهرای اصفهان و بیمارستان‌های امیراعلم و امام خمینی تهران در حد فاصل سال‌های ۱۳۸۲ـ۱۳۷۲ بودند. نمونه‌های فاقد کیفیت لازم از مطالعه حذف شدند. روش نمونه‌گیری آسان انجام شد و حجم نمونه برای هر تومور ۲۵ عدد محاسبه گردید. بررسی میکروسکوپیک نمونه‌ها توسط دو پاتولوژیست در بخش پاتولوژی دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و بخش پاتولوژی بیمارستان الزهرا اصفهان به طور جداگانه و مستقل از یکدیگر انجام پذیرفت.

در این مطالعه اطلاعات بدست آمده از طریق مشاهده میکروسکوپیک نمونه‌ها، با به کارگیری آزمون آماری Chi - square با سطح معنی‌دار ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تعداد ۵۰ عدد از بلوک‌های پارافینی مربوط به ۲۵ عدد تومور پلئومورفیک آدنوما (۱۴ غده بزاقی اصلی و ۱۱ غده بزاقی فرعی) و ۲۵ عدد مربوط به تومور موکواپی‌درموئید کارسینوما (۱۷ غده بزاقی اصلی و ۸ غده بزاقی فرعی) جمع‌آوری شده و برشهای جدیدی برای رنگ‌آمیزی H&E به منظور تأیید تشخیص‌های قبلی و نیز اطمینان از کافی بودن نمونه به عمل آمد. همچنین برشهایی برای رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS (Periodic Acid Schiff) از بلوک‌های مربوط به تومور موکواپی‌درموئیدکارسینوما انجام شد و درجه تمایز تومورهای موکواپی‌درموئیدکارسینوما در لام‌های H&E تعیین گردید.

به منظور تشخیص وجود آنتی‌ژنهای خاص در بافت‌های مورد نظر از روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی که اساس آن نشان دادن واکنش آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژنهای ویژه به کمک مواد رنگی می‌باشد استفاده گردید(۲۰).

در این تحقیق از روش بیوتین استرپتاویدین (B-SA) به علت حساسیت و دقت بالای آن و همچنین مقرون به صرفه بودن نسبت به سایر روشها استفاده شد.

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده به شرح زیر بودند:

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده مستقیم (RTU)

CN:08-0052, Clone:V9, Zymed Vimentin, USA.

استفاده مستقیم (RTU)

CN: 08-1262, Clone:HHF3, Zymed Actin (muscle - specific) USA.

با رقت ۱۰۰ : ۱

CN: 13-0300 Clone:2-2B10 Zymed GFAP, USA.

با رقت ۱۰۰ : ۱

CN:18-0046 Clone: Zy44, Zymed S100, USA.

نمونه‌ها توسط دو پاتولوژیست بطور جداگانه بررسی و طبق معیارهای تعریف شده زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند:

در هر یک از تومورها ابتدا واکنش ایمنی برای سلولهای مختلف بررسی شد.

در تومورهای پلئومورفیک آدنوما رنگ‌پذیری سلولهای میواپی‌تلیال، سلولهای داکتال پوشش مجاری و ناحیه میگزوئیدی و در تومورهای موکواپی‌درموئیدکارسینوما رنگ‌پذیری سلولهای موکوسی، سلولهای اسکواموس، سلولهای clear و سلولهای حدواسط مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین واکنش ایمنی نمونه‌ها براساس روش معرفی شده توسط Regezi، در بزرگنمایی ۴۰۰ scoreبندی شد (۱،۱۱).

درجهٔ صفر: بدون واکنش (منفی)، ۱+: رنگ‌پذیری پراکنده و کانونی، ۲+: حداکثر ۲۵٪ سلولها مثبت، ۳+: بین ۵۰٪ ـ ۲۵٪ سلولها مثبت، ۴+: بیشتر از ۵۰٪ سلولها مثبت.

اطلاعات به دست آمده با بکارگیری آزمون آماری Chi-square و با سطح معنی‌دار ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

نمونه‌های ارزیابی شده شامل ۲۵ تومور پلئومورفیک‌آدنوما (۱۴ تومور غده بزاقی اصلی و ۱۱ غده بزاقی فرعی) و ۲۵ تومور موکواپی‌درموئیدکارسینوما (۱۷ غده بزاقی اصلی و ۸ غده بزاقی فرعی) بود.

هیستوپاتولوژی

ساختمان میکروسکوپیک پلئومورفیک‌آدنوماهای بررسی شده بطور کلی شامل هر دو جزء مزانشیمی بصورت زمینه کندرومیگزوئیدی و اپی‌تلیالی به فرم صفحات سلولی و تشکیلات مجاری دو لایه که سلولهای میواپیتلیالی در قاعده سلولهای داکتال قرار داشتند مشاهده شد

ساختمان ریزبینی موکواپی‌درموئید کار سینوماهای بررسی شده بطور کلی شامل یک الگوی رشدی infiltrative شامل سلولهای موکوسی و سلولهای اپی‌درموئیدی و سلول‌های حد واسط و روشن بوده و فضاهای microcystic در نمونه‌های تمایز یافته مشاهده شدند. ۸ مورد از نمونه‌ها به عنوان ضایعات low grade طبقه‌بندی شده که شامل سلولهای موکوسی +PAS فراوان و فضاهای کیستیک بودند و ۱۴ نمونه در گروه ضایعات intermediate grade قرار گرفتند که سلولهای موکوسی کمتری داشته و الگوی رشدی solid بیشتری با میزان کمی دیسپلازی نشان می‌دادند. ۳ مورد از نمونه‌ها بعنوان نمونه‌های High grade تشخیص داده شدند که دارای حداقل سلولهای موکوسی و دیسپلازی فراوان بودند.

ایمونوهیستوشیمی

پس از مشاهده و بررسی نمونه‌ها از نظر رنگ‌پذیری برای آنتی‌بادیهای به کار گرفته شده (GFAP، اکتین، ویمنتین و S100) مشخص شد که در تمام غدد بزاقی نرمال سلولهای میواپی‌تلیال در قاعده آسینی‌های سروزی و موکوسی برای آنتی‌بادی‌های GFAP ، اکتین و ویمنتین مثبت بوده در حالیکه در مورد S100 واکنشی ضعیف دیده شد.

همچنین در تمام نمونه‌های پلئومورفیک‌آدنوما، سیتوپلاسم سلولهای میواپی‌تلیال و ناحیه کندرومیگزوئیدی با آنتی‌بادیهای GFAP و ویمنتین واکنش مثبت نشان دادند (۴+)

Archive of SID
www.SID.ir

درحالیکه در مورد اکتین میزان رنگ‌پذیری بین ۳+ ← ۰ دیده شده (۱۲ مورد منفی، ۱۲ مورد ۱+ و ۱ مورد ۳+) و در مورد S100 میزان رنگ‌پذیری بین ۴+ ← ۱+ متغیر بود (۳ مورد ۱+، ۳ مورد ۲+، ۱۸ مورد ۳+ و ۲ مورد ۴+). در نمونه‌های مربوط به موکواپی‌درموئیدکارسینوما، سلولهای تومورال با هیچیک از آنتی‌بادیهای به کار رفته واکنش نشان نداده و تنها استرومای همبندی تومور با آنتی‌بادیهای GFAP و ویمنتین رنگ گرفت. در مورد S100 استرومای همبندی واکنشی نشان نداد و اکتین در دو مورد در استرومای همبندی مثبت شد. در مورد هر دو تومور پلئومورفیک‌آدنوما و موکواپی‌درموئید کارسینوما مقایسهٔ واکنش ایمونوهیستوشیمی در غدد بزاقی فرعی و غدد بزاقی اصلی تفاوتی نشان نداد.

در مورد مقایسه فراوانی پروتئین GFAP، نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی نسبی پروتئین GFAP در تومورهای پلئومورفیک‌آدنوما و موکواپی‌درموئیدکارسینوما غدد بزاقی متفاوت بوده، این تفاوت از نظر آماری معنی‌داری است (P<۰/۰۰۱). جدول (۱).

در مورد فراوانی پروتئین اکتین، نتایج این مطالعه نشان داد که تظاهر این پروتئین در تومورهای پلئومورفیک‌آدنوما و موکواپی درموئیدکارسینومای غددبزاقی متفاوت است و این تفاوت از نظرآماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱) جدول(۲).

در مورد فراوانی تظاهرات پروتئین ویمنتین، نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی نسبی پروتئین ویمنتین در تومورهای پلئومورفیک‌آدنوما و موکواپی‌درموئیدکارسینومای غدد بزاقی متفاوت می‌باشد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود(P<۰/۰۰۱) جدول (۳).

در ارتباط با فراوانی پروتئین S100 ، نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی نسبی پروتئین S100 در تومورهای پلئومورفیک آدنوما و موکواپی‌درموئیدکارسینومای غدد بزاقی متفاوت است که‌این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود(P<۰/۰۰۱) جدول (۴).

جدول ۱- مقایسه فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین GFAP در تومورهای موکواپی درموئید کارسینوما و پلئومورفیک آدنوما (P<۰/۰۰۱)

نوع تومور	فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین GFAP					مجموع
	ـ	+	++	+++	++++	
پلئومورفیک‌آدنوما	ـ	ـ	ـ	ـ	۲۵	۲۵
موکواپی‌درموئیدکارسینوما	۲۵	ـ	ـ	ـ	ـ	۲۵
مجموع	۲۵	ـ	ـ	ـ	۲۵	۵۰

ـ : مواد رنگ‌نگرفته، ۱+: رنگ‌پذیری کانونی، ۲+: حداکثر ۲۵٪ سلولها مثبت، ۳+: بین ۵۰٪ ـ۲۰٪ سلولها مثبت، ۴+: بیشتر از ۵۰٪ سلولها مثبت

جدول ۲- مقایسه فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین اکتین در تومورهای موکواپی درموئید کارسینوما و پلئومورفیک آدنوما (P<۰/۰۰۱)

نوع تومور	فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین Actin					مجموع
	ـ	+	++	+++	++++	
پلئومورفیک‌آدنوما	۱۲	۱۲	ـ	۱	ـ	۲۵
موکواپی‌درموئیدکارسینوما	۲۵	ـ	ـ	ـ	ـ	۲۵
مجموع	۳۷	۱۲	ـ	۱	ـ	۵۰
مجموع	۲۵	ـ	ـ	ـ	۲۵	۵۰

ـ : مواد رنگ‌نگرفته، ۱+: رنگ‌پذیری کانونی، ۲+: حداکثر ۲۵٪ سلولها مثبت، ۳+: بین ۵۰٪ ـ۲۰٪ سلولها مثبت، ۴+: بیشتر از ۵۰٪ سلولها مثبت

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین ویمنتین در تومورهای موکواپی‌درموئید کارسینوما و پلئومورفیک آدنوما (P<۰/۰۰۱)

نوع تومور	فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین Vimentin					مجموع
	-	+	++	+++	++++	
پلئومورفیک‌آدنوما	-	-	-	-	۲۵	۲۵
موکواپی‌درموئیدکارسینوما	۲۵	-	-	-	-	۲۵
مجموع	۲۵	-	-	-	۲۵	۵۰

ـ : مواد رنگ‌نگرفته، ۱+: رنگ‌پذیری کانونی، ۲+: حداکثر ۲۵٪ سلولها مثبت، ۳+: بین ۵۰٪ ـ۲۰٪ سلولها مثبت، ۴+: بیشتر از ۵۰٪ سلولها مثبت

جدول ٤- مقایسه فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین S100 در تومورهای موکواپی‌درموئید کارسینوما و پلئومورفیک آدنوما (P<۰/۰۰۱)

نوع تومور	فراوانی رنگ‌پذیری پروتئین S100					مجموع
	-	+	++	+++	++++	
پلئومورفیک‌آدنوما	-	۲	۳	۱۸	۲	۲۵
موکواپی‌درموئیدکارسینوما	۲۵	-	-	-	-	۲۵
مجموع	۲۵	۲	۳	۱۸	۲	۵۰

ـ : مواد رنگ‌نگرفته، ۱+: رنگ‌پذیری کانونی، ۲+: حداکثر ۲۵٪ سلولها مثبت، ۳+: بین ۵۰٪ ـ۲۰٪ سلولها مثبت، ۴+: بیشتر از ۵۰٪ سلولها مثبت

بحث

همان طور که ذکر شد نتایج مطالعه حاضر رنگ‌پذیری کامل و یکنواختی را با مارکرهای GFAP و Vimentin (۴+) در پلئومورفیک‌آدنوما نشان داد. شدت و میزان این رنگ‌پذیری در مورد S100 کمتر بوده (۳+) و در مورد اکتین تظاهر غیریکنواخت و ناقصی بطور پراکنده دیده شد. بنابراین نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعات انجام شده توسط Nakazato و Ishida (۱۹۸۵)، Batsakis و Regezi (۱۹۸۶)، Campbell و Crocker (۱۹۸۸)، Hunag (۲۰۰۰) و White و Curran (۲۰۰۱) در مورد حضور پروتئین S100 و GFAP یکسان است (۱،۷،۸،۱۰،۱۱). همچنین در مطالعه حاضر مانند مطالعه Baumal و Kahn (۱۹۸۵) حضور پروتئین‌های S100 و ویمنتین در پلئومورفیک‌آدنوما و نیز سلولهای میواپی‌تلیال غدد بزاقی نرمال گزارش شد(۶) ولی در مطالعه فعلی تظاهر اکتین بصورت کامل دیده نشد و همانگونه که VC Araujo و NS Araujo (۱۹۹۰)، Carvalho (۱۹۹۴) و Takai و Dardic (۱۹۹۵) نشان دادند (۱۴-۱۲). تظاهر اکتین (muscle-specific-actin) در پلئومورفیک‌آدنوما به صورت غیریکنواخت و ناقص بوده و در بیشتر موارد، واکنش مثبت برای اکتین تنها در جدار عضلانی عروق مشاهده شد.

با توجه به گزارشات Furukawa و Nishimura (۱۹۹۱) و Makino و Murakami (۱۹۹۴)، پروتئین GFAP، S100 و ویمنتین در غدد بزاقی طبیعی حضور ندارند ولی در پلئومورفیک‌آدنوما میزان آنها مثبت است(۳،۱۵). در حالیکه در مطالعه حاضر GFAP، ویمنتین و S100 هم در غدد بزاقی طبیعی و هم در پلئومورفیک‌آدنوما دیده شدند، بنابراین براساس شواهد به دست آمده نتیجه‌گیری اولیه این بود که این پروتئینها با انکوژنزیس در پلئومورفیک‌آدنوما ارتباطی ندارند. مطالعه Araujo و Carvaho نیز که در آن عنوان شده بود در

Archive of SID

www.SID.ir

سلولهای نئوپلاستیک میواپی‌تلیال، ویمنتین تا حدی جایگزین اکتین می‌شود، با مطالعهٔ حاضر که در آن واکنش مثبت با ویمنتین در غدد بزاقی طبیعی و تومور پلئومورفیک‌آدنوما مشاهده شد متفاوت می‌باشد.

البته باید به این نکته توجه داشت که در مطالعه حاضر، غدد بزاقی طبیعی مجاور ضایعات مورد بررسی قرار گرفته بودند. بنابراین اگرچه GFAP، ویمنتین و S100 در غدد بزاقی طبیعی مانند پلئومورفیک آدنوما، حضور دارند ولی به دلیل اینکه امکان بررسی غدد بزاقی طبیعی جداگانه در شخص سالم فراهم نبوده و احتمال تغییرات انکوژنزیس در غدد بزاقی ظاهراً طبیعی مجاور تومور حداقل در سطح فراساختاری (Ultrastructural) و هیستوشیمیایی وجود دارد، نمی‌توان با قاطعیت گفت که حضور این پروتئین‌ها به طور یکسان در غدد بزاقی طبیعی و تومور پلئومورفیک آدنوما، دلیل بر نداشتن ارتباط این پروتئین‌ها با انکوژنزیس است. بالتبع این موضوع نیازمند تحقیقات گسترده‌تر و در صورت امکان، بررسی غدد بزاقی طبیعی در یک شخص سالم و عاری از تومور پلئومورفیک آدنوما می‌باشد.

پس بطور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که مارکرهای مخصوص سلولهای میواپی‌تلیال بخصوص GFAP و ویمنتین و پس از آن S100 در نواحی کندرومیگزوئیدی و سلولهای غیرلومینال‌پلئومورفیک‌آدنوما به فراوانی حضور دارند که این تأییدی بر حضور و نقش سلولهای میواپی‌تلیال در هیستوژنز پلئومورفیک آدنوما می‌باشد و بررسی این مارکرها می‌تواند در تشخیص افتراقی پلئومورفیک‌آدنوما از بعضی نئوپلاسم‌های غدد بزاقی که سلولهای میواپی‌تلیال نقشی در ایجاد آنها ندارند کمک نماید.

همانگونه که ذکر شد در مورد پروتئین اکتین رنگ‌آمیزی منفی یا رنگ‌آمیزی ضعیفی در پلئومورفیک‌آدنوماها مشاهده شد، در حالیکه در غدد بزاقی طبیعی اکتین در قاعدهٔ آسینی‌ها مثبت بود و از آنجا که در مطالعات فراساختاری (ultrastructural) مشخص شده است که سلولهای میو اپی تلیال نئوپلاستیک معمولاً برخی از خصوصیات سلولهای میواپی‌تلیال طبیعی مانند میوفیلامانها، همی‌دسموزوم‌ها و وزیکولهای micropinocytotic را دارا می‌باشد(۱۴،۱۷)، شاید تظاهر ناقص اکتین در پلئومورفیک‌آدنوما چنین توجیه شود که سلولهای میواپی‌تلیال در پلئومورفیک‌آدنوما تمایز کامل نداشته و ظهور اکتین به مرحله و سطح تمایز در این سلولها برمی‌گردد.

همچنین باید به این نکته توجه داشت که در این مطالعه تفاوتی در ظهور این پروتئین‌ها (GFAP، اکتین، ویمنتین و S100) در تومورهای غدد بزاقی اصلی و فرعی مشاهده نشد، بنابراین می‌توان گفت که علیرغم تفاوتهای هیستولوژیکی که گاهی در پلئومورفیک‌آدنوماهای غدد بزاقی اصلی و فرعی وجود دارد، تفاوت ایمونولوژیک مشخصی دیده نمی‌شود.

اما در مورد موکواپی‌درموئید کارسینوما نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای تومورال درموکواپی‌درموئیدکارسینوما با هیچیک از ۴ آنتی‌بادی به کار گرفته شده واکنشی نشان نداد و تنها اجزاء استرومای همبندی تومور با آنتی‌بادی ویمنتین و GFAP واکنش نشان دادند که یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج مطالعات Batsakis، Zarbo و Regezi (۱۹۹۱)، همچنین Loyola و Sousa (۱۹۹۷) (۱۸) و نیز Marucci و Foschini (۲۰۰۲) (۱۹) یکسان بود. البته با توجه به اینکه در این مطالعه از آنتی‌بادی آنتی‌میتوکندریال استفاده نشده است در مقایسه با مطالعه Foschini و Marucci (۲۰۰۲) (۱۹) تعیین دقیق منشاء ایجاد موکواپی‌درموئیدکارسینوما و ارتباط آن با مجاری مخطط نرمال امکان‌پذیر نبود.

نتیجه تحقیق حاضر با نتیجه‌ای که Ghosh و Hassanin (۱۹۸۹) (۱۶) به دست آوردند، یکسان نبود ولی با توجه به همخوانی با اکثر مطالعات شاید این اختلاف به علت متفاوت بودن تکنیک در مطالعه Hassanin و Ghosh (۱۹۸۹) باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

بنابراین می‌توان چنین بیان نمود که مارکرهای اختصاصی سلولهای میواپی‌تلیال (GFAP، اکتین، ویمنتین و S100) در موکواپی‌درموئیدکارسینوما مشاهده نمی‌شوند و عدم تظاهر یا تظاهر حداقل این آنتی‌ژنها در موکواپی‌درموئیدکارسینوما نشان‌دهنده عدم تمایز و یا تمایز بسیار کم سلولهای میواپی‌تلیال در هیستوژنز این تومور می‌باشد. در حقیقت غیاب مارکرهای سلولهای میواپی‌تلیال می‌تواند در تشخیص افتراقی این تومور از کارسینوماهای با تمایز سلولهای میواپی‌تلیال مؤثر باشد. همچنین در مطالعه حاضر تأیید شد که درجات مختلف موکواپی‌درموئیدکارسینوما در حضور این پروتئین‌ها تأثیری نداشته و در حقیقت مارکرهای بکار گرفته شده ارزشی در طبقه‌بندی این ضایعات ندارند.

با توجه به فقدان نسبی سلولهای میواپی‌تلیال، در مجاری خارج‌کننده (excretory) و مخطط (striated) و منفی شدن واکنش‌های ایمونوهیستوشیمی با مارکرهای سلولهای میواپی‌تلیال (S100 و Vimentin و Actin و GFAP) به نظر می‌رسد تومور موکواپی‌درموئیدکارسینوما از سلولهای مجاری خارج‌کننده یا مخطط نشأت می‌گیرد.

اما در مقابل، مثبت شدن آنتی‌ژنهای سلولهای میواپی‌تلیال در پلئومورفیک‌آدنوما نشان‌دهنده آن است که این تومور از سلولهای مجاری Intercalated یا سلولهای Undifferentiated مجاری رابط و به احتمال کمتر آسینی‌ها نشأت می‌گیرد، بنابراین منشاء این دو تومور متفاوت می‌باشد و پلئومورفیک‌آدنوما از قسمتهای ابتدایی مجاری و موکواپی درموئیدکارسینوما از قسمتهای میانی یا انتهایی مجاری غدد بزاقی نشأت می‌گیرند. بر این اساس شاید نقش عوامل محیطی کارسینوژن در بروز موکواپی‌درموئیدکارسینوما مؤثرتر از پلئومورفیک‌آدنوما باشد که البته نیازمند تحقیقات بیشتری است.

نتیجه‌گیری

۱- بروز پروتئین‌های GFAP، ویمنتین و S100 بطور یکنواخت در تمامی موارد پلئومورفیک‌آدنوما و تظاهر پروتئین اکتین بطور ناقص در نیمی از موارد پلئومورفیک‌آدنوما مشاهده می‌شود، در حالیکه بروز این پروتئین‌ها در تومور موکواپی‌درموئیدکارسینوما مشاهده نمی‌شود.

۲- بروز پروتئین‌هایGFAP، ویمنتین و S100 در پلئومورفیک آدنوما محدود به سلولهای غیرلومینال و ناحیه کندرو میگزوئیدی یعنی سلولهای میواپی‌تلیال می‌باشد.

۳- در مطالعه حاضر تفاوتی در بروز این پروتئین‌ها در تومورهای غدد بزاقی اصلی و غدد بزاقی فرعی مشاهده نشد.

۴- درجه‌های متفاوت موکواپی‌درموئیدکارسینوما تفاوتی از نظر رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان ندادند، بنابراین مارکرهای فوق الذکر ارزشی در طبقه‌بندی این ضایعات ندارند.

۵- با توجه به غیاب مارکرهای (GFAP، اکتین، ویمنتین و S100) درموکواپی‌درموئیدکارسینوما، نقش سلولهای میواپی‌تلیال در هیستوژنز موکواپی‌درموئیدکارسینوما رد می‌شود.

۶- پلئومورفیک‌آدنوما از قسمتهای ابتدایی مجاری غدد بزاقی یا مجاری رابط و موکواپی‌درموئیدکارسینوما از قسمتهای میانی یا انتهایی مجاری غدد بزاقی یعنی از مجاری مخطط یا خارج کننده نشأت می‌گیرند.

پیشنهادات

با توجه به نتایج بدست آمده توصیه می‌شود از مارکرهای آنتی‌میتوکندریال برای تعیین دقیق‌تر منشاء موکواپی درموئید کارسینوما استفاده شود. همچنین برای تعیین تأثیر عوامل کارسینوژن بر بروز موکواپی‌درموئیدکارسینوما مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گیرد. در مورد آنتی‌ژنهای انکوژنیک این تومورها و یا بطور کلی تومورهای غدد بزاقی تحقیقات بیشتری

Archive of SID
www.SID.ir

لازم است. همچنین در مورد نقش سلولهای میواپی‌تلیال در ایجاد تومورهای غدد بزاقی از نظر مارکرهای ایمونو هیستوشیمی دیگر مانند P_{63} و با کمک روشهای فراساختمانی با میکروسکوپ الکترونی باید مطالعات بیشتری صورت گیرند. به علاوه پیشنهاد می‌شود برای تعیین دقیق هیستوژنز این تومورها از کشت سلولی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

در پایان از خانم فرزانهٔ محمودی تکنسین محترم بخش آسیب‌شناسی دانشکده دندانپزشکی که تهیه نمونه‌های ایمونوهیستوشیمی این پژوهش را انجام دادند تشکر می‌نماییم.

References:

1. Regezi JA, Zarbo RJ, Batsakis JG: Immunoprofile of mucoepidermoid carcinomas of minor salivary glands. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991;71:189-92.
2. Eissa S: Tumor markers. 2nd Ed. Chapman & Hall: USA. 1996:Chap3:295-98.
3. Nishimura T, Furukawa F: Differential diagnosis of pleomorphic adenoma by immunohistochemical means. J Laryngol Otol 1991;105:1057-60.
4. Cawson RA, Binnie WH, Speight PM, Barrett AW, Weright JM: Lucas's pathology of tumors of the oral tissue. 4th Ed. Churchill Livingstone: London. 1998;Chap7:370-385.
5. Dardic I, Rippstein P, Skimming L: Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of the ducts of human major salivary glands. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987;64:703-15.
6. Kahn HJ, Baumal R, Marks A, Dardic I: Myoepithelial cells in salivary gland tumors. An immunohistochemical study. Arch Pathol Lab Med 1985;109:190-5.
7. Campbell JB, Crocker J, Shenoi PM: S100 protein localization in minor salivary gland tumors: an aid to diagnosis. J Laryngol Otol 1988;102:905-8.
8. Nakazato Y, Ishida Y, Takahashi K, Suzuki K: Immunohistochemical distribution of S100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and neoplastic salivary glands. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1985; 405:299-310.
9. Zarbo RJ, Regezi JA, Batsakis JG: S100 Protein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study of 129 cases. Head and Neck Surg 1986;8:268-75.
10. Huang J: Expression of S100 proteins and intermediate proteins in pleomorphic adenoma. Zhonghua Kou Qiang, 2000;35:191-3.
11. Curran AE, White DK: Polymorphous low grade adenocarcinoma versus pleomorphic adenoma of minor salivary glands: Resolution of a diagnostic dilemma by immunohistochemical analysis with glial fibrillary acidic protein. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:194-9.
12. Araujo VC, Araujo NS: Vimentin as a marker of myoepithelial cells in salivary gland tumors. Eur Arch Otorhinolaryngol 1990;247:252-5.
13. Takai Y, Dardic I, Mackay A: Diagnostic criteria for neplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas: Immunohistochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin14, Vimentin and glial fibrillary acidic protein. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995;79:330-4.

Archive of SID
www.SID.ir

14. Araujo VC, Carvalho YR, Araujo NS: Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994;77:387-91.
15. Murakami M, Makino I, Nin F: Immunohistological investigation of the histological origin and differentiation of pleomorphic adenoma of the parotid gland. Nippon Jibin Koka 1993;96:1235-42.
16. Hassanin MB, Ghosh L, Das AK: Immunohistochemical and fluorescent microscopic study of histogenesis of mucoepidermoid carcinoma J Oral Pathol Med 1989;18:291-8.
17. Dabbs DI: Diagnostic immunohistochemistry. 1st Ed. Churchill livingstone: USA 2002;Chap1:7-27.
18. Loyola AM, Sousa SO, Araujo NC, Araujo VC: Study of minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma differentiation based on immunohistochemical expression of cytokeratins, vimentin and muscle-specific actin. Oral Oncology 1998;34:112-18.
19. Foschini MP, Marucci G, Eusebi V: Low grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. Virchows Arch 2002;440:536-542.
20. Jordan RC, Daniels TE, Greenspan J, Regezi JA: Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: Immunohistochemical and immuno- fluorescent methods. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2002;93:56-74.

Archive of SID

www.SID.ir