

## بررسی رابطه تراکم عروق خونی کوچک توسط نشانگر CD34 با متاستاز به غدد لنفاوی گردنی در اسکواموس سل کارسینومای زبان

دکتر نصرت اله عشقیار\* - دکتر پوریا مطهری\*\* - دکتر صدیقه رهرو تابان\*\*\*†

\*دانشیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

\*\*استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران  
\*\*\*استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی قزوین

**Title:** Evaluation of microvascular density by CD34 in squamous cell carcinoma of the tongue and its relationship with cervical lymph node metastasis

**Authors:** Eshghyar N. Associate Professor \*, Motahhary P. Assistant Professor \*, Rahrotaban S. Assistant Professor\*\*

**Address:** \*Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

\*\* Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences

**Background and Aim:** Angiogenesis plays a central role for development and progression of malignant tumors. It is considered as an important factor for predicting of malignant tumor's behavior such as metastasis to lymph nodes and other clinicopathologic factors. However, it is still a controversial factor especially in oral squamous cell carcinoma. The aim of this study was to evaluate the correlation between angiogenesis and clinicopathologic parameters such as presence of metastatic cervical lymph node in the tongue squamous cell carcinoma.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study, 40 cases of squamous cell carcinoma of the tongue were selected from the archive of cancer institute of Tehran University of Medical Science. Sections were prepared from paraffin blocks and immunohistochemically stained with antibody against CD34. Stained vessels were counted in 4 fields, the most vascular areas at low magnification, in each areas of intratumoral, peritumoral and nontumoral adjacent tissue in two groups with metastatic lymph nodes (N+) and without (N-). The average counts from the four most vascular areas were recorded as the mean microvascular density (MVD). Data were analyzed by 3wayANOVA and Independent T- test with  $p < 0.05$  as the level of significance.

**Results:** High mean MVD-CD34 was significantly correlate with positive cervical lymph node metastasis in intra tumoral and peritumoral areas but there was no significant correlation between mean MVD-CD34 and age, gender, and differentiation of tumor.

**Conclusion:** Based on the results of this study, CD34 can help us to determine the presence of cervical lymph node metastasis and may also determine the outcome of a primary squamous cell carcinoma of the tongue.

**Key Words:** CD34; Immunohistochemistry; Squamous cell carcinoma; Tongue

### چکیده

**زمینه و هدف:** آنژیوژنز در رشد و گسترش تومورهای بدخیم و همچنین مشی تومور نقش محوری دارد. نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که تراکم عروق خونی کوچک و microvascular density (MVD) در اغلب تومورهای بدخیم در تعیین تظاهرات کلینیکی و پیش آگهی تومور دخیل است. در مورد کارسینوم سلول سنگفرشی ناحیه سر و گردن با وجود مطالعات اندک، نتایج بسیار متفاوت است و به وجود رابطه قطعی بین MVD و سایر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک از جمله بروز متاستاز به غدد لنفاوی ناحیه‌ای دست نیافته‌اند. هدف این مطالعه بررسی رابطه MVD با برخی فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک و مهم‌تر از همه، بروز متاستاز در غدد لنفاوی گردنی می‌باشد.

† مؤلف مسؤول: نشانی: قزوین- بلوار شهید باهنر- دانشگاه علوم پزشکی قزوین دانشکده دندانپزشکی- گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت  
تلفن: ۰۹۱۱۳۳۷۷۴۶۵ نشانی الکترونیک: savata5@yahoo.com

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی مقطعی تعداد ۴۰ بلوک پارافینی اسکواموس سل کارسینومای زبان، از آرشیو انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب و مقاطع تهیه شده از آنها به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی CD34 رنگ آمیزی شدند. در هر نمونه در هر یک از نواحی داخل، حاشیه و بافت سالم اطراف تومور، ۴ ناحیه با رنگ پذیری بیشتر انتخاب و میانگین MVD در این نواحی در دو گروه واجد متاستاز به غدد لنفاوی (N+) و فاقد آن (N-) شمارش و محاسبه شد. آنالیزهای آماری 3wayANOVA و Independent t-test انجام و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** MVD-CD34 بالاتر در ناحیه داخل و حاشیه تومور با بروز متاستاز به غدد لنفاوی گردنی رابطه آماری معنی دار دارد ولی با سن و جنس و تمایز تومور از لحاظ آماری بی ارتباط بوده است.

**نتیجه گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهد افزایش بروز نشانگر CD34 که بصورت میانگین MVD عنوان می‌شود نشانه بروز متاستاز در غدد لنفاوی گردنی است و در نتیجه شاید قادر به تعیین پیش آگهی در اسکواموس سل کارسینومای اولیه زبان باشد.

**کلیدواژه‌ها:** CD34؛ ایمونوهیستوشیمی؛ اسکواموس سل کارسینوما؛ زبان

وصول: ۸۶/۰۹/۱۲ اصلاح نهایی: ۸۷/۰۵/۱۵ تأیید چاپ: ۸۷/۰۸/۱۲

## مقدمه

سرطان‌ها نشان می‌دهد، اسکواموس سل کارسینومای دهان (SCC) نیز از این امر مستثنی نیست (۱۴-۲۰).

علل متعددی می‌تواند منشأ اختلاف در نتایج بدست آمده باشد از آن جمله استفاده از آنتی‌بادی‌های مختلف به عنوان مارکر سلول‌های اندوتلیالی، استفاده از تکنیک‌های متفاوت جهت شمارش عروق و وجود عوامل غیر آنژیوژنیک (قرارگیری سلول‌های تومورال بصورت رگ خونی) قابل ذکر است (۲۱، ۲۲).

CD34 گلیکوپروتئین غشایی گلیکوزیلات تیپ I از خانواده سیالوموسین با وزن ملکولی ۱۲۰-۱۰۵ kDs است (۲۳). آنتی‌بادی Anti-CD34 به سیالوپروتئین غشایی متصل می‌شود و قادر به مشخص کردن سلول‌های اندوتلیالی از حالت پیش‌ساز تا تمایز یافته است (۳، ۲۴).

با توجه به اهمیت نقش آنژیوژنز در تعیین مشی سرطان در ارگان‌های مختلف و نتایج متفاوت حاصله و نیز محدود بودن مطالعات در این زمینه بر روی SCC دهان به خصوص به طور انحصاری بر روی زبان و توسط آنتی‌بادی معمول آزمایشگاهی، CD34 نیاز به مطالعه بیشتری در این مبحث احساس می‌شود تا شاید با شیوه‌ای قابل دسترس‌تر مشی و مراحل درمان سرطان اولیه تعیین گردد.

در مطالعه حاضر با استفاده از تظاهر آنتی‌بادی CD34، شمارش عروق خونی و محاسبه میانگین تراکم عروق خونی کوچک (MVD) در SCC زبان انجام و رابطه آن با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک، سن، جنس، تمایز تومور و به خصوص بروز متاستاز به غدد لنفاوی گردنی پرداخته شده است.

تشکیل عروق خونی مانند آنچه در شرایط فیزیولوژیک در بافت رخ می‌دهد در رشد و گسترش سلول‌های تومورال و سرطانی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند به گونه‌ای که رشد توده تومورال بدون حضور و تشکیل عروق خونی، بیش از ۱ تا ۲ میلی‌متر امکان‌پذیر نیست (۱). برای نخستین بار Algire و سپس Folkman مطالعاتی در زمینه تشکیل عروق خونی در داخل تومور انجام دادند و تأثیر این فرایند را بر رشد تومور بررسی کردند (۱-۳).

یکی از عوامل مؤثر در شکل‌گیری عروق خونی (آنژیوژنز) در تومورها، تولید فاکتور رشد توسط سلول‌های تومورال است و این پروسه در بسیاری از بدخیمی‌ها از جمله سرطان ریه، پروستات و پستان اثبات شده است (۴-۶). از سوی دیگر آنژیوژنز در بسیاری از سرطان‌ها می‌تواند تعیین‌کننده مشی تومور و مرتبط با عوامل تضعیف‌کننده پیش‌آگهی، از جمله بروز متاستاز به غدد لنفاوی ناحیه‌ای به عنوان یک فاکتور تضعیف‌کننده پیش‌آگهی باشد.

بررسی آنژیوژنز و تشخیص سلول‌های اندوتلیالی و عروق ساخته شده در بافت تومورال از سلول‌های تومورال و نیز افتراق عروق خونی از عروق لنفی همواره امری دشوار بوده است که به مدد آنتی‌بادی‌های ایمونوهیستوشیمیایی نشان‌گر سلول‌های اندوتلیالی، قابل تشخیص شده‌اند و در مطالعات بصورت محاسبه میانگین تراکم عروق خونی کوچک (MVD) رنگ پذیرفته، عنوان و مقایسه می‌شوند (۷-۱۳). با این وجود نتایج بدست آمده از مطالعات موجود تفاوت‌هایی را در زمینه ارتباط بین آنژیوژنز و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک و مشی

## روش بررسی

در این مطالعه توصیفی مقطعی، پرونده ۶۰ بیمار مبتلا به اسکواموس سل کارسینوما اولیه زبان که تحت همی گلسکتومی و جراحی رادیکال غدد لنفاوی گردنی قرار گرفته بودند. از بایگانی انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران در طی سال‌های ۱۳۷۵-۱۳۸۵ استخراج شد و در نهایت ۴۰ مورد شرایط ورود به مطالعه را دارا بودند.

اطلاعات درج شده در پرونده بیماران شامل اطلاعات بالینی، سن، جنس و وجود غدد لنفاوی متاستاتیک نگارش شد. ابتدا از هر بلوک پارافینی یک برش تهیه شد و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین بر روی آن انجام گرفت. بررسی لام‌ها توسط یکی از اساتید بخش آسیب‌شناسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت تأیید تشخیص و دارا بودن معیارهای مورد نظر مطالعه، صورت گرفت. Grading نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از طبقه‌بندی Broder انجام شد (۲۵). در نهایت از بلوک‌ها مقاطعی تهیه و توسط نشان‌گر ایمونوهیستوشیمی (CD34) بررسی شدند.

## رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

ایمونوهیستوشیمی با استفاده از روش streptavidin-biotin complex انجام گرفت. ابتدا برش‌های ۴µm از بلوک‌های پارافینی تهیه و روی اسلایدهای پوشیده شده از poly-L-lysine قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در xylene پارافین زدایی و در درجات مختلف اتانول دهیدراته شدند. سپس جهت مهار فعالیت پروکسیداز داخلی نمونه‌ها در متانول حاوی هیدروژن پراکساید ۰/۳٪ برای ۱۵ دقیقه قرار گرفته و با phosphate-buffered saline (PBS) شستشو داده شدند.

برای غیرفعال کردن اپی‌توپ‌های باقیمانده در بافت از حرارت ماکروویو استفاده شد و سپس آنتی‌بادی منوکلونال CD34 (Nu-4A1, ready-to-use; Nichirei Corp., Tokyo, Japan) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی بافت قرار گرفت.

مقاطع بافت به مدت یک ساعت با PBS انکوبه شدند و بعد از آن از سیستم Streptavidin-biotin-peroxidase استفاده شد. برای رنگ گرفتن سلول‌ها مقاطع بافتی مجاور 3.3 Diamino Benzidine Hydrochloride (DAB, DAKO, Denmark) قرار گرفتند. پس از

این مرحله نمونه‌ها با هماتوکسیلین Harris به عنوان Counterstain رنگ‌آمیزی و سپس آبگیری شده و لامل بر روی اسلایدها قرار داده شد.

در رنگ‌آمیزی حاصله هسته و سیتوپلاسم سلول‌های اندوتلیال به رنگ قهوه‌ای در آمدند. از رنگ‌آمیزی فاقد آنتی‌بادی اولیه و مجاورسازی با non-immune mouse serum به عنوان کنترل منفی و از نمونه همانژیوم به عنوان کنترل مثبت در این مطالعه استفاده شد.

## ارزیابی رنگ آمیزی عروق خونی

شمارش و ارزیابی عروق با استفاده از روش Weidner و Van Hoef انجام شد (۶،۲۶). ابتدا با بزرگنمایی  $\times 100$ ، چهار ناحیه در هر کدام از نواحی داخل تومور، حاشیه تومور و بافت فاقد تومور اطراف که واجد بیشترین رنگ‌پذیری (hot spot) بودند انتخاب شدند. سپس در هر یک از این نواحی hot spot شمارش عروق با بزرگنمایی  $\times 400$  انجام شد. هر سلول تکی، تجمع سلولی و لومن فاقد عضله صاف که رنگ قهوه‌ای گرفته بود و قابل افتراق از سلول‌های تومورال و بافت مزانشیمی اطراف بودند به عنوان یک رگ خونی شمارش شد. نواحی واجد نکروز، خونریزی و اسکروز از نواحی قابل شمارش حذف شدند (۲۸،۲۷،۳). سپس میانگین عروق شمرده شده در چهار ناحیه، به عنوان MVD در هر یک از نواحی سه گانه در آنالیز آماری محاسبه شد.

## آنالیز آماری

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS version 11.5 انجام شد. تست‌های بکار رفته در این محاسبات Independent t-test و ANOVA 3 way بودند. در تمامی موارد  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

## یافته‌های بالینی

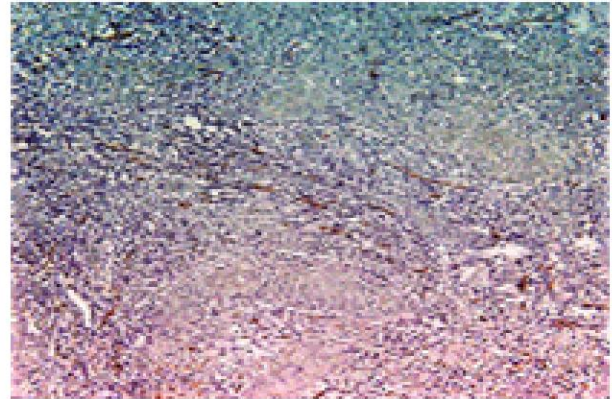
در مجموع تعداد ۴۰ نمونه SCC زبان با طیف سنی ۸۴-۱۹ سال و میانگین ۵۹/۲۲ سال مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد ۲۲ مورد مرد (طیف سنی ۱۹ تا ۸۰ سال، میانگین ۵۹/۰۴ سال) و ۱۸ مورد زن (طیف سنی ۳۱ تا ۸۳ سال، میانگین ۵۹/۲۲ سال) بودند.

## یافته‌های ایمونوهیستوشیمی

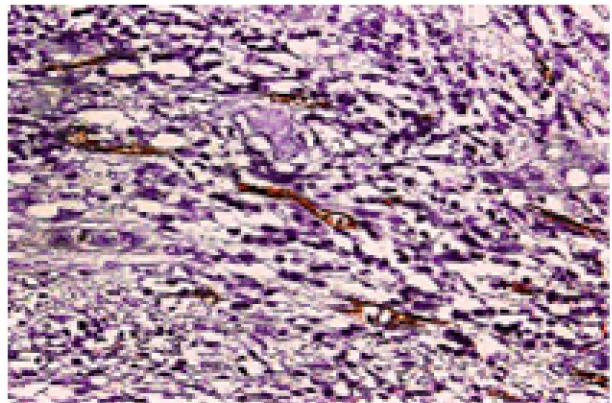
میانگین عروق خونی رنگ پذیرفته در ۴ فیلد شمارش شده در هر

با توجه به نتایج منعکس شده در جدول ۱ میزان MVD در هر سه ناحیه داخل تومور، حاشیه تومور و بافت فاقد تومور اطراف با بروز متاستاز به غدد لنفاوی گردنی ( $p < 0.05$ , Independent t-test) و فقط در ناحیه حاشیه تومور با درجه تمایز تومور رابطه آماری معنی دار داشت (رابطه اخیر معکوس می باشد) (جدول ۱). در این مطالعه بین MVD و سایر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک از جمله سن، جنس، تمایز تومور رابطه ای دیده نشد. در بررسی منحنی ROC (نمودار ۱) در ناحیه حاشیه تومور cut off با  $sensitivity = 80\%$  و  $specificity = 60\%$  MVD برابر ۱۵ تعیین گردید. یعنی MVD بالاتر از ۱۵ در ناحیه حاشیه تومور در بررسی با آنتی بادی CD34 می تواند با بروز متاستاز به غدد لنفاوی گردنی در SCC اولیه زبان مرتبط باشد.

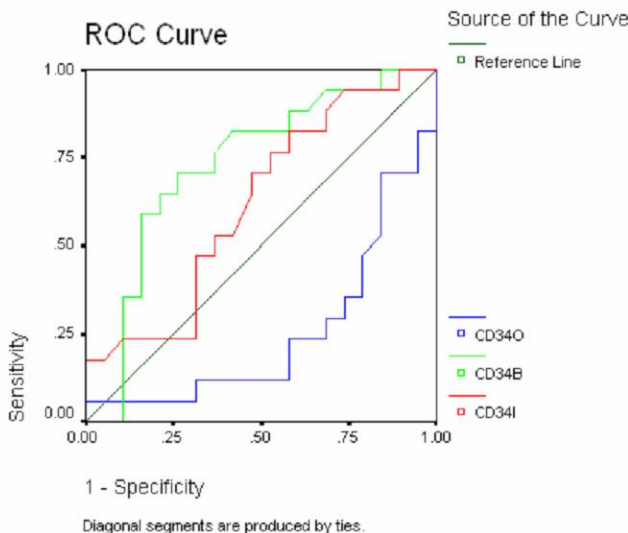
یک از نواحی داخل تومور، حاشیه تومور و بافت فاقد تومور اطراف بصورت میانگین MVD محاسبه شد (شکل ۱).



A



B



نمودار ۱ - سطح زیر منحنی ROC

شکل ۱ - رنگ پذیری عروق خونی داخل تومور با آنتی بادی CD34؛  
A - بزرگنمایی ۱۰۰، B - بزرگنمایی ۴۰۰

جدول ۱ - دانسیته عروق خونی کوچک در نواحی داخل و حاشیه تومور و بافت فاقد تومور اطراف در دو گروه N+ و N-

نود	تعداد	میانگین	انحراف معیار	خطای معیار	p value
N+ داخل تومور	۱۸	۲۰/۵۰۰۰	۵/۹۲۰۴۲	۱/۳۹۵۴۶	* / ۰.۴۷
N- داخل تومور	۲۰	۱۶/۹۵۰۰	۵/۶۴۱۴۷	۱/۲۶۱۴۷	
N+ حاشیه تومور	۱۹	۱۹/۰۶۵۸	۵/۳۱۶۹۳	۱/۲۱۹۷۹	* / ۰.۳۱
N- حاشیه تومور	۲۰	۱۵/۰۶۲۵	۵/۷۹۶۹۳	۱/۲۹۶۲۳	
N+ بافت فاقد تومور اطراف	۱۹	۲۱/۷۸۹۵	۸/۴۱۸۴۳	۱/۹۳۱۳۲	* / ۰.۰۷
N- بافت فاقد تومور اطراف	۲۰	۲۹/۵۱۲۵	۸/۴۳۸۸۲	۱/۱۸۸۶۹۸	

N+ لنف نود واجد متاستاز  
N- لنف نود فاقد متاستاز  
\* از لحاظ آماری معنی دار است.

## بحث و نتیجه‌گیری

نقش آنژیوزنز در تومور و گسترش و متاستاز آن در سرطان‌های مختلف (۱۳، ۲۹-۳۱) و از آن جمله در SCC سر و گردن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۳۲، ۳۳).

نخستین مطالعه‌ای که به واسطه شمارش عروق به بررسی رابطه آنژیوزنز با بروز متاستاز پرداخت بر روی ملانومای پوست توسط Srivastava و همکاران انجام شد. در این مطالعه ۲۰ مورد ملانومای پوست بر اساس فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک مشابه با پیگیری ۹ ماهه انتخاب شدند و به دو گروه فاقد عود و واجد عود سیستمیک و موضعی تقسیم شدند. رنگ‌آمیزی عروق خونی توسط مارکر I (UEA) ulex europaeus agglutinin انجام شد. نتیجه مطالعه حضور عروق خونی بیشتری را در گروه واجد عود عنوان می‌دارد و این فرضیه را مطرح می‌کند که حضور عروق خونی بیشتر با پیش‌آگهی ضعیف‌تر مرتبط است (۹). سپس این ایندسته مطالعات بر روی تومورهای ارگان‌های مختلف صورت پذیرفت و نتایج متفاوتی بدست آمد از آن جمله در مطالعه Kumar و همکاران بر روی ۱۰۶ مورد مبتلا به سرطان پستان با استفاده از دو مارکر CD105 و CD34، بقای کمتری را در نمونه‌های با MVD بالاتر نشان دادند. البته این نتایج فقط در مورد مارکر CD105 بدست آمد به همین دلیل، این مارکر را نشانگر اختصاصی‌تری برای عروق خونی کوچک (تازه تشکیل یافته) مطرح کردند. البته پیشنهاد کردند تعداد نمونه بیشتر و زمان پیگیری طولانی‌تری جهت رد و تأیید این فرضیات نیاز است. این مطالعه در مقایسه با مطالعه حاضر در ناحیه‌ای متفاوت انجام شده و نتایج حاصله در مورد MVD نشانگر CD34 بر خلاف مطالعه Kumar با بروز متاستاز به غدد لنفاوی گردنی به عنوان فاکتوری مهم در تعیین پیش‌آگهی مرتبط بوده است. البته پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی به مقایسه این نشانگر با نشانگر CD105 و بر روی حجم بیشتر نمونه و با پیگیری بقای بیمار پرداخته شود. در مطالعه Saad و همکاران بر روی ۵۵ نمونه سرطان اندومتريوم، ۱۰ مورد هیپرپلازی همراه آتی‌پی و ۱۰ مورد فاقد آن توسط مارکرهای CD31، CD105 و VEGF نشان دادند که CD105 عروق خونی کوچک بیشتری را نسبت به CD31 رنگ می‌کند ولی MVD هر دو مارکر مذکور با میزان تمایز تومور و عمق تهاجم آن رابطه معنی‌دار مستقیمی را نشان

دادند، ولی فقط MVD-CD105 با بروز متاستاز به غده لنفی و stage تومور مرتبط بود که این نتایج مشابه نتایج حاصل از مطالعه ما است با این تفاوت که مارکر بکار رفته متفاوت است. در حالیکه CD31 رابطه‌ای با این دسته عوامل کلینیکوپاتولوژیک نشان نداد. در مطالعه دیگری که توسط Lindmark و همکاران بر روی ۱۸ مورد سرطان کولورکتال انجام شد از مارکرهای CD31، UEA و ون ویلبراند استفاده شد در هر سه مورد تراکم عروق خونی کوچک با میزان بقای بیمار مرتبط بود ولی با میزان تمایز و stage تومور رابطه‌ای بدست نیامد. نکته جالب اینکه تراکم عروق هر چه بیشتر، میزان بقا بالاتر بود (۳۴-۳۸). این نتیجه بر خلاف نتایج حاصله از مطالعه ما و اکثر مطالعات است نیز در مطالعه حاضر بین تمایز تومور و MVD فقط در ناحیه حاشیه تومور رابطه آماری معنی‌دار بدست آمد. این اختلافات می‌تواند ناشی از مصرف مارکرهای مختلف و یا حجم کم نمونه باشد. در مطالعه‌ای (۱۱) روی ۴۵ بیمار مبتلا به کارسینوم کیسه صفرا و بررسی عروق خونی کوچک به کمک مارکر CD31 و شمارش به روش Chalky، تراکم عروق خونی کوچک با stage و تمایز این سرطان فاقد ارتباط بود ولی در تعیین میزان بقا و پیش‌آگهی نقش تعیین‌کننده داشت.

در تومورهای سر و گردن نیز در یافتن رابطه بین فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک و پیش‌آگهی تومور پراکندگی نتایج و یافته‌ها به علت روش‌های متفاوت شمارش عروق و محاسبه کمی یا کیفی MVD و استفاده از مارکرهای مختلف بسیار است، به طور مثال در مطالعه Zatterstrom و همکاران بررسی ۴۸ مورد بیوپسی SCC سر و گردن با استفاده از مارکر فاکتور ۸ و شمارش عروق رنگ‌پذیرفته به کمک آنالیز تصویری کامپیوتری انجام شد. نمونه‌ها به دو گروه high MVD و low MVD تقسیم شدند. در اینجا برخلاف اکثر نتایج در گروه low MVD میزان بقای کمتری دیده شد، مشابه آنچه در مطالعه Lindmark بدست آمد ولی هیچ ارتباطی با سایر فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک مشاهده نشد (۸). در مطالعه Martone و همکاران بر روی ۱۲۷ مورد SCC سر و گردن با استفاده از دو مارکر CD34 و CD105 میانگین MVD بالاتر در رابطه با هر دو مارکر با stage کلینیکی بالاتر و T3-T4 تومور دیده شد. از طرفی بروز متاستاز در غدد لنفاوی و میزان بقای کمتر، فقط با MVD-CD105 بالاتر دارای رابطه آماری

روتین بودن آن، کمک ارزنده‌ای به تشخیص سریع‌تر مشی یک تومور SCC اولیه می‌شود. در مطالعاتی بر روی SCC سروگردن (۳۲) و نیز سرطان پستان (۳۴) نتایج نشان داده شد که تعیین MVD توسط CD34 با فاکتورهای تضعیف‌کننده پیش‌آگهی تومور به جز بروز متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط است (۲۱). ولی از آنجاییکه پاره‌ای از مطالعات بین MVD و بروز متاستاز وجود رابطه را ذکر می‌کنند پس بررسی مجدد آن توسط مارکر CD34 قابل تأمل است (۳، ۲۱، ۴۳).

نتایج منعکس شده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بین MVD محاسبه شده و بروز متاستاز به غدد لنفاوی گردنی رابطه آماری معنی‌دار وجود دارد که این مطلب در تأیید و یا رد مطالعات فوق‌الذکر است. از طرف دیگر هرچه میزان تمایز فقط در ناحیه حاشیه تومور کمتر باشد MVD بالاتر است، شاید علت این امر ناشی از آزادسازی بیشتر مدياتورهای رگ‌ساز توسط سلول‌های تومورال، سلول‌های استرومای مجاور و سلول‌های التهابی ناحیه باشد و همانطور که حاشیه مهاجم تومور در مشی تومور نقش تعیین‌کننده‌ای دارد در نتیجه تشکیل عروق بیشتر در این ناحیه باعث بروز متاستاز بیشتر و پیش‌آگهی بدتر در تومورهای تمایز نیافته‌تر شود. این نتایج در تعیین پیش‌آگهی و نحوه درمان یک SCC اولیه می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد. با توجه به شایع بودن استفاده از CD34 در آزمایشگاه‌های پاتولوژی در این مطالعه از این مارکر استفاده شد تا شاید بتوان در آینده به سهولت پیش‌آگهی یک SCC اولیه را تعیین کرده و بهبود بخشید. از طرف دیگر در مطالعه ما به علت محدود کردن محل آناتومیک مورد بررسی و نیز بررسی و مقایسه نواحی مختلف بافت تومورال که انتظار می‌رود در هر ناحیه ویژگی بافتی منحصر بفردی داشته باشند دقت بالاتری وجود دارد.

مطالعه کنونی مانند مطالعه Nagatsuka به بررسی ظریف‌تری پرداخته (۳) یعنی شمارش میانگین عروق خونی در سه ناحیه جداگانه از بافت سرطانی (SCC زبان) موجود در یک بلوک پارافینی انجام شده است. در این بررسی، در ناحیه حاشیه تومور افزایش MVD با تمایز پایین‌تر تومور مرتبط است درحالی‌که در مطالعات قبلی MVD افزایش یافته در حاشیه تومور صرفاً با بروز متاستاز مرتبط بوده است (۶).

SCC دهان و بروز متاستاز به غدد لنفاوی ناحیه‌ای، همچنان یکی از علل مرگ بخصوص در کشورهای آسیای شرقی است (۴۴). وجود

معنی‌دار بود. در این مطالعه برخلاف نتایج حاصل از مطالعه ما -MVD CD34 با N+ رابطه‌ای نشان نداد. شاید علت این امر جدا نکردن محل نمونه از هم و نیز عدم بررسی نواحی مختلف بافت به طور اختصاصی باشد (۳۲). Schimming و همکاران به بررسی میانگین MVD بوسیله مارکر CD105 روی ۵۱ مورد مبتلا به SCC دهانی پرداختند. نتایج نشان داد که MVD با Stage و حضور متاستاز به غده لنفی و تمایز تومور نسبت به مخاط نرمال اطراف آن رابطه معنی‌دار دارد. در این مطالعه مانند مطالعه کنونی ارتباط بین میانگین MVD با بروز N+ بدست آمد با این تفاوت که از مارکر CD105 استفاده شده است (۳۳). Dray و همکاران در بررسی ۱۰۶ بیمار مبتلا به SCC سر و گردن با پیگیری ۳ تا ۱۵ سال با استفاده از مارکر ون ویلبراند رابطه آماری معنی‌دار بین MVD و تمایز، متاستاز، عود و میزان بقا بدست نیاوردند. نحوه محاسبه MVD در این مطالعه متفاوت از اکثر مطالعات و تحقیقات حاضر است و بصورت تعیین score برای بیان تراکم عروق خونی کوچک می‌باشد (۳۹).

علل این اختلافات را می‌توان به تفاوت در جمعیت مورد مطالعه و نواحی مورد بررسی درمان‌هایی که ممکن است پیش از جراحی صورت گرفته باشد، استفاده از آنتی‌بادی‌های متفاوت جهت نشان دادن عروق و نیز تکنیک‌های متفاوت شمارش عروق عنوان کرد (۱۳، ۳۴، ۳۶).

بعضی آنتی‌بادی‌های عروق خونی مانند CD105 و Von Willberand، CD34 توانایی نشان دادن عروق تازه شکل یافته و عروق کوچک و بزرگ را دارند درحالی‌که CD31 فقط عروق بزرگ را مشخص می‌کند و قابلیت رنگ کردن سلول‌های تومورال را نیز دارد. در مورد Von Willberand نیز علاوه بر عروق خونی، عروق لنفی را نیز مشخص می‌کند (۴۰-۴۲).

گروهی از مطالعات عنوان می‌دارند از آنجاکه CD34 به طور اختصاصی عروق جدید را مشخص نمی‌کند پس موارد مثبت کاذب در شمارش تعداد عروق افزایش یافته و نیاز به وجود مارکر جدیدتری در این خصوص احساس می‌شود (۱۵، ۱۹، ۲۰). از این روی CD105 به عنوان نشان‌گری که صرفاً عروق تازه شکل یافته را نشان می‌دهد بسیار مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است در صورتیکه اگر این نتایج در مورد CD34 هم بدست آید، به لحاظ روش کاربردی راحت‌تر و کم‌هزینه‌تر (بکارگیری روش حرارتی بجای مصرف آنزیم) این مارکر و نیز

ما قرار می‌دهد.

در نهایت انجام بررسی‌های بیشتر همراه با پیگیری طولانی مدت بیمار و استفاده و مقایسه مارکرهای مختلف جهت تشخیص عروق خونی در مراحل مختلف تکامل در SCC و بکارگیری حجم نمونه بیشتر پیشنهاد می‌شود. بخصوص مقایسه دو نشانگر CD34 و CD105 که در اکثر مطالعات سرطان‌های ارگان‌های مختلف انجام شده است و علاوه بر آن استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی هم‌زمان توسط CD34 و نشانگرهای پرولیفراسیون سلولی جهت تعیین دقیق کاربرد و نقش CD34 در تشخیص سلول‌های تازه تشکیل یافته اندوتلیالی در قیاس با CD105. همچنین انجام مطالعه مشابه بر روی بیوپسی اولیه در تومور مشابه پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران به شماره ۴۲۸۲ می‌باشد. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و زحمات جناب آقای دکتر خرازی‌فرد مشاور محترم آمار قدردانی می‌گردد.

- 1- Algire GH, Chalkey HW. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945; 6: 73-85.
- 2- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med* 1971; 285: 1182-6.
- 3- Nagatsuka H, Hibi K, Gunduz M, Tsujigiwa H, Tamamura R, Sugahara T, et al. Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and endoglin and their relationship with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005;34(2):70-6.
- 4- Verheul H, Voest E, Schlingemann R. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol* 2004; 202: 5-13.
- 5- Wakui S, Furusato M, Itoh T, et al. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168:257-62.
- 6- Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
- 7- Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Hsiao YC, Wu SL, et al. Clinicopathologic significance of CD105 expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Head Neck*. 2006;28(5):441-6.
- 8- Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellén E,

غدد لنفاوی متاستاتیک ناحیه‌ای، عود موضعی و پیش‌آگهی SCC تحت تاثیر ویژگی‌های پاتولوژیکی مثل ضخامت تومور، وجود تهاجم به اعصاب و عروق است و ایندسته اطلاعات بدنبال جراحی حادث می‌شود که همزمان با آن غدد لنفاوی با جراحی انتخابی خارج می‌شوند. مطالعه حاضر بین افزایش MVD با بروز متاستاز به غدد لنفاوی ناحیه‌ای ارتباط معنی‌داری را بیان می‌کند که در تعیین مشی سرطان و نحوه انتخاب درمان SCC اولیه زبان عاملی یاری دهنده است و شاید بتوان با یافتن داروهای آنتی‌آنژیوژنیک و کاهش تعداد عروق، در بهبود پیش‌آگهی این سرطان به راه حلی نوین دست یافت. از طرفی اگر این نتایج در نمونه بیوپسی SCC اولیه زبان بررسی شود و نتایج مشابه بدست آید روش درمان تغییر خواهد یافت و شاید نیاز به خارج کردن انتخابی غدد لنفی که در کلینیک قابل لمس نیستند برطرف گردد.

از طرف دیگر در بررسی منحنی ROC در ناحیه حاشیه تومور قابلیت تعیین cut off با  $sensitivity=80\%$  و  $specificity=60\%$  MVD برابر ۱۵ نشان داد، یعنی MVD بالاتر از ۱۵ در ناحیه حاشیه تومور در بررسی با آنتی‌بادی CD34 می‌تواند با بروز متاستاز (N+) در SCC اولیه زبان مرتبط باشد، این نتیجه مقیاس سهیل‌تری را در اختیار

### منابع:

- Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1995;17:312-8.
- 9- Srivastava, A., Laidler, P., Davies, R., Horgan, K., and Hughes, L. E. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76 - 4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histological study. *Am. J. Pathol* 1988; 133:419 - 423.
- 10- Macchiarini P, Fontani G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularization to metastasis of nonsmall cell lung cancer. *Lancet* 1992;340:145-6.
- 11- Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinoma. *Br J Urol* 1994;74:762-6.
- 12- Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995;56:353-6.
- 13- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:541-7.
- 14- Barnhill RL, Busam KJ, Berwick M, et al. Tumour vascularity is not a prognostic factor for cutaneous

- melanoma. *Lancet* 1994; 344: 1237–8.
- 15-** Bossi P, Viale G, Lee AK, et al. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55: 5049–53.
- 16-** Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, et al. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *J Pathol* 2000;191: 368–75.
- 17-** Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, et al. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol* 2001; 54: 940–4.
- 18-** Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, et al. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 417–22.
- 19-** Tahan SR, Stein AL. Angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma of the lip: tumor vascularity is not an indicator of metastatic risk. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 236–40.
- 20-** Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, et al. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33: 369–74.
- 21-** Shieh Yi-S, Lee H Sh, Shiah S G, Chu Y W, Wu Ch W, Chang L Ch. Role of angiogenic and non-angiogenic mechanisms in oral squamous cell carcinoma: correlation with histologic differentiation and tumor progression. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 601–6.
- 22-** Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739–52.
- 23-** Stella C C, Cazzola M, Fabritiis P D, et al. CD34-positive cells: Biology and clinical relevance. *Haematologica* 1995; 80:367-387. Review
- 24-** Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221–8.
- 25-** Bryen M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1989;18: 432-473.
- 26-** van Hoef MEHM, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1141-1145.
- 27-** Zeng Y, Opeskin K, Horvath L G, Sutherland R L, Williams E D. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *The prostate* 2005; 65: 222-230.
- 28-** Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005;46(5):481-9. Review.
- 29-** Kirschner CV, Alanis-Amezcuca JM, Martin VG, Luna N, Morgan E, Yang JJ, et al. Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator? *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1879–84.
- 30-** Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL. Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinoma?. *Oncol Res* 1999;11:205–12.
- 31-** Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A: 2474–84.
- 32-** Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L, Bellone G, Cortesina G, Pruneri G. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol* 2005;41(2):147-155.
- 33-** Schimming R, Marme D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2002;24(2):151-6.
- 34-** Kumar S, Hellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):856-61.
- 35-** Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22:248–253.
- 36-** Fox, S. B., Gatter, K. C., and Harris, A. Tumor angiogenesis. *J. Pathol* 1996; 179:232–237.
- 37-** Page, D., and Jensen, R. Angiogenesis in human breast carcinoma; what is the question? *Hum. Pathol* 1995; 26: 1173–1174.
- 38-** Lindmark, G., Gerdin, B., Sundberg, C., Paplan, L., Bergstrom, R., and Gimelius, B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol* 1996; 14: 461–466.
- 39-** Dray TG, Hardin NJ, Sofferan RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:724–9.
- 40-** Mietinnen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, BNH9 antibody to H- and Y-antigens: evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol* 1994;7:82–90.
- 41-** Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumors. *J Clin Pathol* 1992;45:143–8.
- 42-** Lindenmayer AE, Mietinnen M. Immunophenotypic features of uterine stromal cells. CD34 expression in endocervical stroma. *Virchows Arch* 1995;426:457–60.
- 43-** Yamada K. Quantification of angiogenesis. *Rinsho Kensa* 2000; 44: 1634–7 (abstracts).

44- Takes RP Staging. of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: Imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol* 2004;40(7):656-67.