

## Comparing Immunohistochemical Expression of Podoplanin between Oral Squamous Cell Carcinoma and Normal Oral Mucosa

Samareh Jazayeri<sup>1</sup>,  
Maryam Seyedmajidi<sup>2</sup>,  
Fatima Bijani<sup>3</sup>,  
Seyedali Seyedmajidi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dental Student, Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>2</sup> Professor, Dental Materials Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Oral Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Dental Materials Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received February 28, 2022 ; Accepted May 11, 2022)

### Abstract

**Background and purpose:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixth most common cancer in the world. Podoplanin is a mucin-like integral membrane glycoprotein that is expressed in the lymphatic endothelial cells but not in the blood vascular endothelial cells. The aim of the present study was to investigate the immunohistochemical expression of podoplanin and evaluating lymphangiogenesis in OSCC compared with normal oral mucosa.

**Materials and methods:** In this laboratory study, 40 paraffin blocks archived in the Department of Oral and Maxillofacial Pathology in Babol Dental School with previous diagnosis of OSCC were used. Also, 40 samples of normal oral mucosa obtained during impacted wisdom tooth surgery with minimal inflammation from histological and histopathological point of view were included. Immunohistochemical expression of podoplanin in epithelial cells and the number of lymphatic vessels were evaluated in both groups. Chi-square, Mann-Whitney, Wilcoxon, and Oneway ANOVA were applied for data analysis.

**Results:** Findings showed significant difference in the mean number of lymph vessels between the area of tumor invasion in OSCC group ( $4.43 \pm 2.02$ ) and center of the tumor ( $6.78 \pm 2.72$ ) ( $P < 0.001$ ). In the study of podoplanin expression in terms of quality, it was found that in the OSCC group, podoplanin expression was between 51% and 100% in 23 cases (57.5%), while these expression levels in the control group were seen only in four cases (10%). Podoplanin expression in epithelial cells in squamous cell carcinoma was significantly higher than normal oral mucosa ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** The present study suggests that podoplanin is involved in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma.

**Keywords:** podoplanin, oral squamous cell carcinoma, oral mucosa, immunohistochemistry

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (210): 37-47 (Persian).

**Corresponding Author:** Maryam Seyedmajidi - Dental Materials Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. (E-mail: : ms\_majidi79@yahoo.com)

## مقایسه بیان ایمونوهیستوشیمیایی پودوپلانتین بین کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و مخاط نرمال دهان

ثمره جزایری<sup>1</sup>، مریم سیدمجیدی<sup>2</sup>، فاطمه بیژنی<sup>3</sup>، سید علی سیدمجیدی<sup>4</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (OSCC)، ششمین سرطان شایع در جهان است. پودوپلانتین یک گلیکوپروتئین شبه موسینی در ضخامت غشا است که در اندوتلیوم لنفاوی بیان شده اما در اندوتلیوم عروق خونی بیان نمی‌شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی بیان ایمونوهیستوشیمیایی پودوپلانتین و بررسی لنفاژ یوژنز در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در مقایسه با مخاط نرمال دهان بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، 40 بلوک پارافینه از بایگانی بخش پاتولوژی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی بابل با تشخیص قبلی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و 40 نمونه از مخاط نرمال دهان که طی جراحی دندان عقل نهفته به دست آمده بود با حداقل التهاب از دید بافتی و هیستوپاتولوژی، وارد مطالعه شدند و بیان ایمونوهیستوشیمیایی پودوپلانتین در سلول‌های اپی‌تلیالی دو گروه و تعداد عروق لنفاوی در آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون‌های Wilcoxon، Mann-Whitney، Chi-square و Oneway ANOVA استفاده شد.

**یافته‌ها:** اختلاف میانگین تعداد عروق لنفی در ناحیه تهاجم تومور در گروه OSCC ( $4/43 \pm 2/02$ ) و در مرکز تومور ( $6/2 \pm 78/72$ ) به لحاظ آماری معنادار بود ( $P < 0/001$ ). در بررسی بیان پودوپلانتین از نظر کیفی بین دو گروه مشخص شد که در گروه OSCC بیان پودوپلانتین در 23 مورد (57/5 درصد) بین 51 تا 100 درصد بوده است. در حالی که در گروه کنترل تنها 4 مورد (10 درصد) از نمونه‌ها این میزان بیان را داشته‌اند. بیان پودوپلانتین در سلول‌های اپی‌تلیالی در کارسینوم سلول سنگفرشی به‌طور معنی‌داری بیش از مخاط نرمال دهان بود ( $P < 0/001$ ).

**استنتاج:** نتایج مطالعه حاضر نقش پودوپلانتین را در پاتوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مطرح می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** پودوپلانتین، کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، مخاط دهان، ایمونوهیستوشیمیایی

### مقدمه

پیشرفت کرده‌اند، اما نرخ بقا هنوز پایین بوده و میزان بقای 5 ساله افراد از زمان تشخیص، تقریباً 50 درصد است (2). از این رو نیاز است تا فعالیت تکثیری، درجه تمایز و ظرفیت تهاجم و متاستاز تومور بررسی شود (3).

کارسینوم سلول سنگفرشی دهان Squamous cell Oral carcinoma (OSCC) ششمین سرطان شایع در جهان است. سالانه بیش از 300000 مورد بروز OSCC در جهان گزارش می‌شود (1). اگرچه تکنیک‌های تشخیصی

E-mail: ms\_majidi79@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** مریم سیدمجیدی - بابل: دانشگاه علوم پزشکی بابل، مرکز تحقیقات مواد دندان، پژوهشکده سلامت

1. دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

2. استاد، مرکز تحقیقات مواد دندان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات سلامت دهان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

4. استادیار، مرکز تحقیقات مواد دندان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: 1400/12/9 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/1/17 تاریخ تصویب: 1401/2/21

همکاران اشاره نمود که نتیجه گرفتند پودوپلاتین با درگیری لنف نودها و گرید هیستوپاتولوژی و stage بالینی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در ارتباط است (20).

Aiswarya و همکاران نیز نتیجه گرفتند بیان زیاد پودوپلاتین در OSCC با تمایز خوب ممکن است نقش مهمی را برای پودوپلاتین در مراحل اولیه تومورزایی نشان دهد (21).

Hesse و همکاران در مطالعه خود اظهار داشتند از آنجا که لنفانژیوژنز با پیش آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان ارتباط دارد، میزان بیان بالای آن در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول سالم می‌تواند در تشخیص به موقع کمک‌کننده باشد (22). هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ایمونوهیستوشیمیایی پودوپلاتین و بررسی لنفانژیوژنز در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در مقایسه با مخاط نرمال دهان بود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی پس از اخذ مجوز انجام تحقیق از کمیته اخلاق در پژوهش (با شناسه اخلاق IR.MUBABOL.HRI.REC.1400.022) دانشگاه علوم پزشکی بابل، طبق مطالعات مشابه (23) و امکانات موجود، تعداد 40 بلوک پارافینه به روش غیر تصادفی آسان از فایل‌های آرشیو دانشکده دندانپزشکی بابل با تشخیص قبلی SCC اولیه دهان و 40 نمونه از مخاط نرمال دهان که طی جراحی دندان عقل نهفته به دست آمده بود با حداقل التهاب از دید بافتی و هیستوپاتولوژی وارد مطالعه شدند. از بلوک‌های پارافینه جهت تأیید تشخیص و ورود به مطالعه، برش‌های 4 میکرونی جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین تهیه شد و توسط پاتولوژیست دهان، فک و صورت ارزیابی گردید. معیار انتخاب هیستولوژیک، تأیید ضایعه طبق تعریف Neville از SCC دهان بوده است (24). جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر D2-40، برش‌های 4 میکرونی از بلوک‌های پارافینه تهیه شد. این برش‌ها ابتدا در گزین جهت

یکی از ویژگی‌های بارز رفتار بدخیمی، توانایی سلول‌های توموری برای متاستاز به سایر اندام‌ها است. متاستاز کارسینوماهای مختلف انسانی، از جمله OSCC دهان عمدتاً از طریق سیستم لنفاوی اتفاق می‌افتد (4).

پودوپلاتین یک گلیکوپروتئین شبه موسینی در ضخامت غشا است که در اندوتلیوم لنفاوی بیان شده اما در اندوتلیوم عروق خونی بیان نمی‌شود (6,5). پودوپلاتین به دلیل بیان شدن در پودوسیت‌های کلیه موش به این نام شناخته می‌شود (7). بیان پودوپلاتین به ندرت در مخاط نرمال دهان دیده می‌شود، اما این بیومارکر در سرطان‌های دهان معمولاً حضور دارد (8). در دیگر بافت‌های نرمال انسان، پودوپلاتین توسط سلول‌های متنوعی شامل پودوسیت‌های کلیه، سلول‌های آلوئولار نوع I در ریه، کراتینوسیت‌های اپی‌تلیوم پوست، سرویکس، مری و سلول‌های میوایی تلیال غدد پستان و غدد بزاقی بیان می‌شود (9). پودوپلاتین را به عنوان فاکتوری که در تهاجم و متاستاز تومور نقش دارد، در نظر می‌گیرند (10,11). این فرضیه عمدتاً مبتنی بر این است که میزان بالای بیان پودوپلاتین با حضور متاستاز همراه است. گزارش شده است که سلول‌های بیان‌کننده پودوپلاتین در ناحیه تهاجم، در بیش از 80 درصد موارد OSCC دیده شده‌اند (12). پودوپلاتین می‌تواند به تهاجم تومور کمک کند (13). مهم‌ترین ناحیه متاستاز به غدد لنفاوی در بیماران دارای OSCC دهانی، متاستاز به غدد لنفاوی گردنی است. در چندین مطالعه بالینی-پاتولوژیکی گفته شده است که لنفانژیوژنز برای متاستاز به ساختارهای لنفاوی در بدخیمی‌های متعددی ضروری است. هر چند هنوز مشخص نیست که سلول‌های توموری مستقیماً لنفانژیوژنز را القا می‌کنند یا خیر و نیز در SCC دهان چگونه وارد عروق لنفاوی می‌شوند (14,15). اخیراً مارکرهای مولکولی اختصاصی سلول‌های اندوتلیال لنفاوی مانند LYVE-1، Prox-1 و پودوپلاتین شناسایی شده‌اند که می‌توانند به درک این مسأله کمک نمایند (16-19).

مطالعات معدودی در زمینه نقش پودوپلاتین در OSCC انجام شده است که می‌توان به مطالعه Mello و

(حاشیه تومور) (3 ناحیه) میانگین LVD در داخل و حاشیه تومور به عنوان LVD کلی ضایعه در نظر گرفته شد. همچنین بیان D2-40 در سلول‌های تومورال و اپی تلیوم مخاط نرمال بررسی گردید. ایمونواکتیویته D2-40 به صورت سیتوپلاسمیک و غشایی به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شده و درصد حضور سلول‌های مثبت به شکل زیر مورد ارزیابی قرار گرفت:

(-): کم‌تر از 10 درصد

(+): 10-25 درصد

(++): 26-50 درصد

(+++): 51-100 درصد (25)

اطلاعات بالینی شامل سن و جنس بیمار و محل ضایعه نیز از پرونده بیماران، استخراج و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 22 تحت ویندوز انجام گرفت. ضمن ارائه داده‌ها با استفاده از شاخص‌های آمار توصیفی، جهت مقایسه تعداد عروق لنفی بین دو گروه مورد مطالعه و در گروه OSCC بین دو ناحیه‌ی مختلف تومور (مرکز و ناحیه تهاجم تومور)، با توجه به عدم احراز شرایط پارامتری به ترتیب از آزمون‌های آماری غیرپارامتری Mann-Whitney، Wilcoxon و Oneway ANOVA استفاده شد. همچنین به منظور بررسی ارتباط بیان پودوپلانین با گروه‌های مورد مطالعه از آزمون Chi-square استفاده شد. سطح معنی‌داری 0/05 در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در این پژوهش تعداد 40 بلوک پارافین با تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به عنوان گروه OSCC و 40 نمونه از مخاط نرمال دهان نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. میانگین سنی بیماران و فراوانی افراد در گروه‌های مورد مطالعه به تفکیک جنسیت در جدول شماره 1 آمده است.

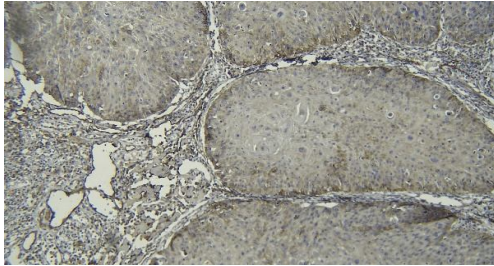
پارافین‌زدایی و سپس جهت آبگیری در الکل با درجات مختلف قرار داده شد. فرآیند بازیافت آنتی‌ژن در ماکروویو، با فشار 12 اتمسفر در 120 درجه سانتی‌گراد در ده دقیقه صورت گرفته و تحت تأثیر آنتی‌بادی اولیه D2-40 (Mouse anti-podoplanin(D2-40) IgG1, Medaysis, ) (USA, MC0329RTU7) به مدت 30 دقیقه در حرارت مرطوب قرار گرفت. بعد از آن به مدت 15 دقیقه تحت تأثیر آنتی‌بادی ثانویه از نوع 954D-40 1000.0 mL kit که در دو مرحله و با مشخصات 954D-41 HiDef Detection Amplifier(Mouse and Rabbit) 1000.0mL و 954D-42 HiDef Detection Polymer Detector 1000.0ml و DAB (جهت واکنش رنگ پذیری) و همتاکسیلین مایرز (جهت رنگ‌پذیری زمینه) قرار گرفت و پس از این مرحله در بافر فسفات سالین (Tris-Buffer Saline) TBS قرار داده شد و در نهایت لام‌ها با لامل پوشانیده شدند. کنترل مثبت برای آنتی‌بادی D2-40 براساس توصیه شرکت سازنده از نمونه عقده لنفاوی نرمال انتخاب و کنترل منفی با حذف آنتی‌بادی اولیه به دست آمد.

برای بررسی lymphangiogenesis (LVD)، واکنش D2-40 به صورت رنگ‌پذیری سیتوپلاسمیک و غشایی سلول‌های اندوتلیال لنفی مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی این واکنش مثبت به وسیله شمارش رگ‌های لنفاوی رنگ شده با D2-40 دارای لومن قابل مشاهده که به وضوح با سلول‌های اندوتلیال لنفی و سایر اجزای بافت همبندی احاطه شده باشند، صورت گرفت. تعیین LVD به وسیله میکروسکوپ نوری (LaboMed, Labo America, Inc, USA) انجام شد. جهت بررسی LVD بخش‌هایی از لام‌های هیستوپاتولوژی (6 ناحیه) با بزرگنمایی 100 برابر (3 ناحیه داخل توموری و 3 ناحیه در قسمت تهاجم تومور) که دارای حداکثر LVD (hot spots) بوده، انتخاب شده، سپس تعداد عروق لنفاوی با بزرگنمایی 400 برابر در آن نواحی بررسی و شمارش شد. پس از تعیین LVD ناحیه intratumoral (مرکز تومور) (3 ناحیه) و peritumoral

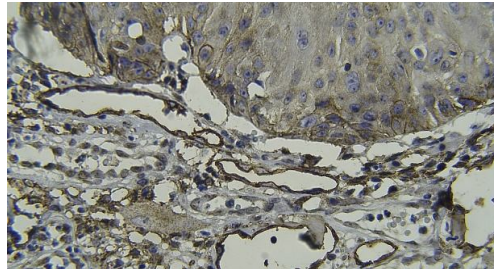
جدول شماره 2: مقایسه تعداد عروق لنفی بین مرکز و ناحیه تهاجم تومور در گروه OSCC و بین گروه OSCC و مخاط نرمال

OSCC	ناحیه تهاجم تومور		سطح معنی داری*
	انحراف معیار میانگین	مرکز تومور	
تعداد عروق لنفی	4/43±2/02	6/78±2/72	<0/001
تعداد عروق لنفی	5/6±1/97	2/42±1/43	<0/001
	گروه OSCC	گروه کنترل	

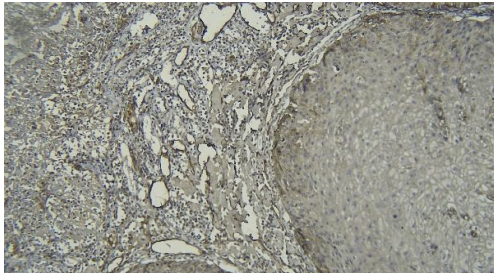
\*: با استفاده از آزمون Wilcoxon



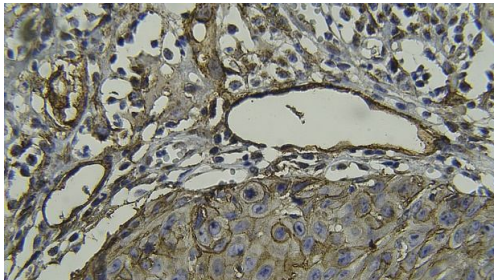
الف



ب



ج



د

تصویر شماره 1: نمای هیستوپاتولوژیکی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای نشانگر D2-40 در ارزیابی عروق لنفاوی در مرکز تومور، الف: 100 × و ب: 400 × و در ارزیابی عروق لنفاوی در ناحیه تهاجم تومور، ج: 100 × و د: 400 ×)

در بررسی محل OSCC، لته و مخاط آلونول با 16 مورد (40/0 درصد) شایع ترین محل ضایعه و مخاط باکال و زبان هر کدام با 11 مورد (27/5 درصد) در رتبه دوم جای گرفتند. در آخر نیز مخاط لبیال با 2 مورد (5/0 درصد) قرار گرفت (نمودار شماره 1).

با توجه به نتایج به دست آمده، تعداد عروق لنفی در مرکز تومور بیش از ناحیه تهاجم تومور بوده است ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره 2) (تصویر شماره 1 الف و د) (تصویر شماره 2 الف و ب).

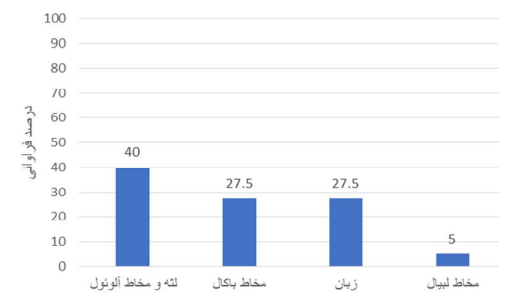
متوسط تعداد عروق لنفی در گروه OSCC بیش از مخاط نرمال بوده است ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره 2).

در بررسی بیان پودوپلاتین سلول های اپی تلیال از نظر کیفی بین دو گروه مشخص شد که در گروه OSCC بیان پودوپلاتین در 23 مورد (57/5 درصد) بین 51 تا 100 درصد بوده است. در حالی که در گروه کنترل تنها 4 مورد (10/0 درصد) از نمونه ها این میزان بیان را داشته اند. بیان پودوپلاتین در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بیش از مخاط نرمال بود ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره 3 و نمودار شماره 2).

جدول شماره 1: میانگین سن و فراوانی افراد در گروه های مورد مطالعه

به تفکیک جنسیت

گروه ها	سن	مرد	زن	کل
OSCC	انحراف معیار میانگین	61/67±13/85	73/05±11/98	67/08±14/07
	N	N=21	N=19	N=40
کنترل	انحراف معیار میانگین	46/53±16/71	52/05±13/85	49/43±15/33
	N	N=19	N=21	N=40
کل	انحراف معیار میانگین	54/48±16/91	62/03±16/66	58/25±17/71
	N	N=40	N=40	N=80



نمودار شماره 1: توزیع درصد فراوانی محل ابتلا در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

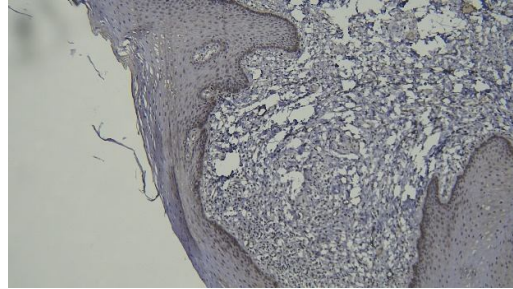
بیان پودوپلاتین به صورت کمی نیز در گروه OSCC بیش از مخاط نرمال بود ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره 4) (تصویر شماره 3).

در بررسی بیان پودوپلاتین از نظر کیفی براساس محل ضایعه مشخص شد که در لته و مخاط آلوتول بیان پودوپلاتین در 7 مورد (43/7 درصد)، در مخاط باکال و زبان نیز در 8 مورد (72/7 درصد) بین 51 تا 100 درصد بوده است. ارتباط معناداری بین بیان پودوپلاتین و محل ضایعه مشاهده نشد ( $P = 0/367$ ) (جدول شماره 5 و نمودار شماره 3). متوسط تعداد عروق لنفی نیز در بین محل های مختلف کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، تفاوت آماری معنی داری را نشان نداد ( $P = 0/852$ ) (جدول شماره 6).

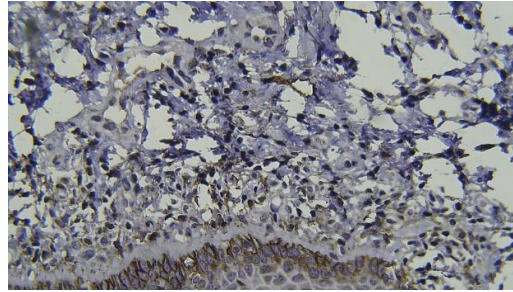
جدول شماره 4: مقایسه بیان پودوپلاتین در سلول های اپی تلیالی بین دو گروه (به صورت کمی)

گروه ها	OSCC انحراف معیار ثمنیائین	کنترل انحراف معیار ثمنیائین	سطح معنی داری *
بیان پودوپلاتین	2/37±0/81	1/40±0/67	<0/001

\*: با استفاده از آزمون Mann-Whitney test



الف



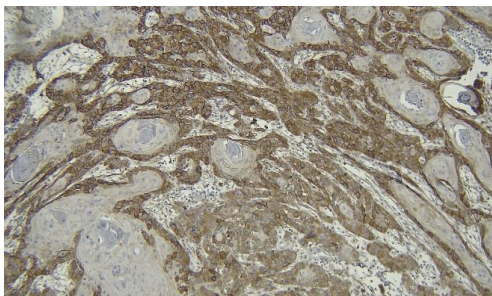
ب

تصویر شماره 2: نمای هیستوپاتولوژیکی مخاط نرمال دهان (رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای نشانگر D2-40 در ارزیابی عروق لنفاوی، الف: 100 × و ب: 400 ×)

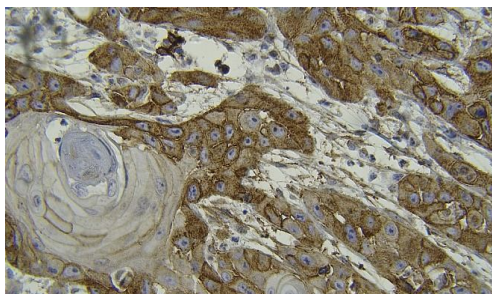
جدول شماره 3: مقایسه بیان پودوپلاتین در سلول های اپی تلیالی بین دو گروه (به صورت رتبه ای)

بیان پودوپلاتین	کنترل تعداد (درصد)	OSCC تعداد (درصد)	سطح معنی داری *
10-25 درصد	7(0/28)	2(0/8)	<0/001
26-50 درصد	2(0/8)	9(22/5)	
51-100 درصد	4(10/0)	23(57/5)	

\*: با استفاده از آزمون Chi-square

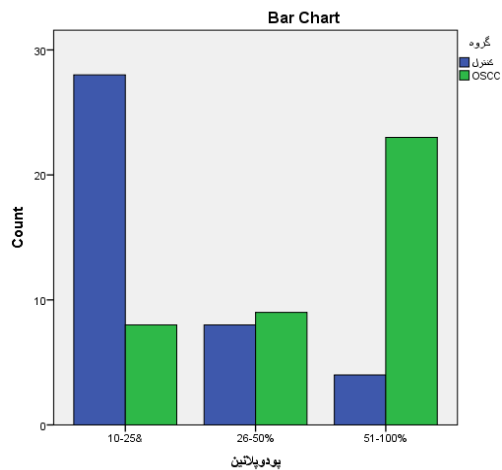


الف



ب

تصویر شماره 3: نمای هیستوپاتولوژیکی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای نشانگر D2-40 در ارزیابی سلول های اپی تلیالی توموری، الف: 100 × و ب: 400 ×)



نمودار شماره 2: بیان پودوپلاتین بین دو گروه (به صورت رتبه ای)

جدول شماره 6: مقایسه تعداد عروق لنفی بر حسب محل ضایعه

گروه ها	لته و مخاط آکروتول	مخاط باکال	مخاط لیال	زبان	سطح
لته و مخاط آکروتول	5/51 ± 2/38	5/27 ± 1/58	6/00 ± 2/12	5/98 ± 2/24	0/852

\* : با استفاده از آزمون Oneway ANOVA

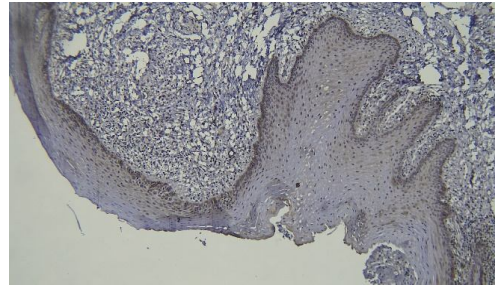
## بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که پودوپلاتین در سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نسبت به مخاط نرمال دهان به میزان بیش تری بیان شد. هم‌چنین تعداد عروق لنفاوی در OSCC بیش از مخاط نرمال دهان بوده است که این میزان در مرکز تومور بیش از ناحیه تهاجم آن بود. پودوپلاتین به‌طور گسترده در زمینه سرطان مورد مطالعه قرار گرفته است اما مطالعات اندکی در داخل کشور به بررسی میزان بیان آن در سرطان‌های دهان پرداخته است.

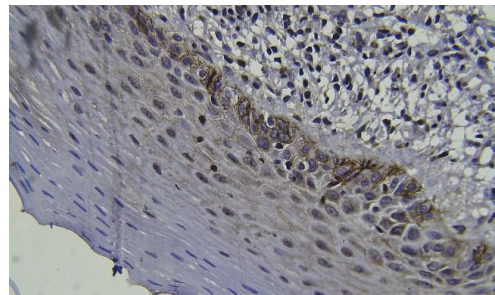
Mello و همکاران در بررسی نقش پروگنوستیک پودوپلاتین در کارسینوم سلول سنگفرشی، گزارش نمودند که ممکن است پودوپلاتین با درگیری لنف نودها و گرید هیستوپاتولوژی و stage بالینی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در ارتباط باشد (20). نتایج مطالعه Mello با یافته پژوهش حاضر همخوانی دارد. بدین صورت که در هر دو مطالعه این نتیجه به‌دست آمد که پودوپلاتین احتمالاً می‌تواند به عنوان بیومارکر در تشخیص کارسینوم دهان مفید واقع شود و از نقش احتمالی این مارکر در پاتوژنز OSCC حمایت می‌شود.

Aiswarya و همکاران نیز نتیجه گرفتند بیان زیاد پودوپلاتین در OSCC با تمایز خوب ممکن است نقش مهمی را برای پودوپلاتین در مراحل اولیه تومورزایی نشان دهد (21). یافته پژوهش فوق در راستای نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند که پودوپلاتین در سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نسبت به مخاط نرمال دهان به میزان بیش تری بیان شد و این یافته به لحاظ بالینی حائز اهمیت است.

Hesse و همکاران در مطالعه خود اظهار داشتند که پودوپلاتین یک نشانگر عروق لنفاوی خاص است و



الف



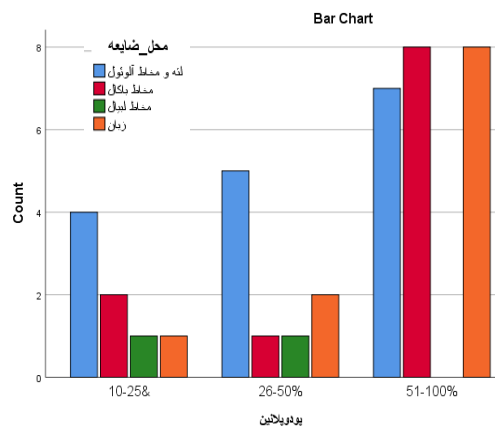
ب

تصویر شماره 4: نمای هیستوپاتولوژیکی مخاط نرمال دهان (رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای نشانگر D2-40 در ارزیابی سلول‌های اپی‌تلیالی، الف: 100 × و ب: 400 ×)

جدول شماره 5: مقایسه بیان پودوپلاتین در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به تفکیک محل ضایعه

محل ضایعه	لته و مخاط آکروتول	مخاط باکال	مخاط لیال	زبان	سطح
10-25 درصد	25/04	18/22	50/01	9/11	0/867
26-50 درصد	31/35	9/11	50/01	18/22	
51-100 درصد	43/77	72/78	-	72/78	

\* : با استفاده از آزمون Chi-square



نمودار شماره 3: مقایسه محل ضایعه براساس بیان پودوپلاتین در کارسینوم سلول سنگفرشی

است در مسیر پیام‌رسانی مربوط به رشد و تهاجم تومور دخیل باشد (30).

در مطالعه حاضر، عروق لنفی در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بیشتر از مخاط نرمال بوده است و تأییدی بر این مورد است که کارسینوم سلول سنگفرشی دهان از طریق لنف گسترش می‌یابد (31) و تشکیل عروق لنفی در رشد و گسترش سلول‌های تومورال و سرطانی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند (32).

Kalra و همکاران نیز در مطالعه خود اشاره نمودند که تومورهای کارسینوم سلول سنگفرشی، رشد عروق خونی و لنفی میزبان را تحریک می‌کنند که برای رشد مداوم تومور و متاستاز لازم است (33) که با یافته پژوهش حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد بیش‌تر بودن تعداد عروق لنفی در مطالعه حاضر در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی نسبت به مخاط نرمال دهان را می‌توان به این مورد نسبت داد.

از دیگر نتایج مطالعه حاضر، افزایش تعداد عروق لنفاوی مرکز تومور نسبت به ناحیه تهاجم تومور بوده است. در مطالعه‌ای مشابه پژوهش حاضر، Yu و همکاران اظهار داشتند که در کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن، تراکم عروق لنفی در نواحی مرکزی بیش‌تر از ناحیه تهاجم تومور می‌باشد و این نتیجه مرتبط با پیش‌آگهی بدتر تومور مطرح شده است (34). البته از آن‌جا که یک تومور از نظر ساختاری هتروژن می‌باشد، بنابراین تراکم عروق خونی و لنفاوی در نواحی مختلف، می‌تواند متفاوت باشد (35).

Zhao و همکاران در پژوهشی دریافتند که افزایش تراکم عروق لنفی داخل تومور در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با احتمال بالاتر بروز تهاجم و عود تومور همراه است (36). یافته مطالعه آن‌ها با نتایج پژوهش حاضر در تشابه است. چرا که در هر دو مطالعه تراکم عروق لنفی در ناحیه مرکزی تومور بیش‌تر از ناحیه تهاجم تومور بود.

در پژوهش De Sousa و همکاران تراکم عروق لنفاوی در غدد لنفاوی متاستاتیک بیش‌تر از غدد لنفاوی

از آن‌جا که سطوح لنفانژیوژنز با پیش‌آگهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان ارتباط دارد، میزان بیان آن در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول سالم می‌تواند در تشخیص به موقع کمک‌کننده باشد (22). یافته به دست آمده در مطالعه فوق، مشابه نتایج مطالعه ما بود که حاکی از آن است که افزایش بیان پودوپلاتین در سلول‌های سرطانی می‌تواند نقش این مارکر را در تشخیص و درمان به موقع OSCC نشان دهد.

Ciurea و همکاران نیز گزارش نمودند که افزایش بیان پودوپلاتین با لنفانژیوژنز در تومور، مکانیسم تهاجمی تومور و پیش‌آگهی بدتر ارتباط دارد (26). در مطالعه حاضر نیز لنفانژیوژنز بیش‌تری در تومور نسبت به مخاط نرمال دیده شد.

بیان پودوپلاتین با درجه تمایز تومورها در پژوهش Pradhan و همکاران در ارتباط بود و نتیجه گرفتند که آنالیز این مارکرهای زیستی می‌تواند به تعیین پروگنوز و درمان SCC دهان کمک‌کننده (27). نتایج مطالعه Pradhan با یافته پژوهش de Vicente و همکاران و مطالعه حاضر مطابقت دارد. مطالعه حاضر به همراه پژوهش de Vicente نشان دادند که پودوپلاتین در سلول‌های کارسینوم سنگفرشی به میزان بیشتری نسبت به مخاط نرمال دهان بیان می‌شود. همچنین de Vicente افزود که بیان پودوپلاتین با افزایش ریسک کانسر دهان در بیماران با لکوپلاکیای دهان نیز همراه است (28).

Rolim و همکاران دریافتند که بیان پودوپلاتین با الگوی تهاجمی کارسینوم سلول سنگفرشی زبان و لب تحتانی در ارتباط است (29). براساس نتایج مطالعه Deepa و همکاران، ارزیابی بیان پودوپلاتین در سلول‌های اپی‌تلیال ضایعات دیسپلاستیک دهان ممکن است اطلاعات ارزشمندی برای پیش‌بینی خطر استحالتهی بدخیمی در اختیار ما قرار دهد (23).

یافته‌های Inoue و همکاران نیز نشان داد که پودوپلاتین از طریق فرآیند تبدیل دیسپلازی به کارسینوم دهان با تکامل تومور در ارتباط بوده و ممکن

مرکز و ناحیه تهاجم تومور، احتمال بروز متاستازهای لنفاوی و هم‌چنین stage و گرید تومور را پیش‌بینی نمود(38).

از دیگر نتایج پژوهش می‌توان به بررسی محل ضایعه و ارتباط آن با بیان پودوپلانین و تعداد عروق لنفی اشاره نمود که بیان پودوپلانین و تعداد عروق لنفی از نظر محل ضایعه با یکدیگر تفاوتی نداشته‌اند. نتایج مطالعه حاضر از نقش پودوپلانین در پاتوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان حمایت می‌نماید.

غیرمتاستاتیک بود(37). در مطالعه حاضر متاستاتیک بودن غدد لنفاوی مورد ارزیابی قرار نگرفت اما بیان این مطالعه در بحث به جهت پیشنهاد پژوهش جدید در زمینه تراکم عروق خونی در غدد لنفاوی متاستاتیک و غیرمتاستاتیک کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بوده است. با توجه به این که فرایند آنژیوژنز و لنف آنژیوژنز در سرطان کارسینوم سلول سنگفرشی، تعیین‌کننده رفتار تومور و بیانگر بروز متاستاز به غدد لنفاوی می‌باشد. به نظر می‌رسد بتوان با بررسی تعداد عروق لنفاوی در

## References

- Boutayeb A, Boutayeb S. The burden of non communicable diseases in developing countries. *Int J Equity Health* 2005; 4(1): 2-11.
- Weigum SE, Floriano PN, Christodoulides N, McDevitt JT. Cell-based sensor for analysis of EGFR biomarker expression in oral cancer. *Lab Chip* 2007; 7(8): 995-1003.
- Chandolia B, Basu SK, Kumar M. Can MMP-9 be a prognosticator marker for oral squamous cell carcinoma? *J Clin Diagn Res* 2016; 10(1): ZC09-ZC13.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(3): 127-133.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999; 154(2): 385-394.
- Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol* 2005; 18(1): 97-106.
- Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 2007; 96(1): 1-8.
- Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan Y-H, Feng L, et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol* 2008; 26(3): 354-360.
- Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res* 2008; 28(5B): 2997-3006.
- Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol* 2006; 111(5): 483-486.
- Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, et al. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol* 2007; 170(4): 1337-1347.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion

- in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006; 9(4): 261-272.
13. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007; 98(10): 1512-1520.
  14. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7(2): 192-198.
  15. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(20): 7344-7353.
  16. Hirakawa S, Hong Y-K, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 575-586.
  17. Banerji S, Ni J, Wang S-X, Clasper S, Su J, Tammi R, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144(4): 789-801.
  18. Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225(3): 351-357.
  19. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4): 2351-2355.
  20. Mello FW, Kammer PV, Silva CAB, Parkinson EK, Monteiro L, Warnakulasuriya S, et al. Prognostic and clinicopathological significance of podoplanin immunorexpression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med* 2021; 50(1): 1-9.
  21. Aiswarya A, Suresh R, Janardhanan M, Savithri V, Aravind T, Mathew L. An immunohistochemical evaluation of podoplanin expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma to explore its potential to be used as a predictor for malignant transformation. *J Oral Maxillofac Pathol* 2019; 23(1): 159-162.
  22. Hesse K, Satzger I, Schacht V, Köther B, Hillen U, Klode J, et al. Characterisation of prognosis and invasion of cutaneous squamous cell carcinoma by podoplanin and E-cadherin expression. *Dermatology* 2016; 232(5): 558-565.
  23. Janardanan-Nair B. Podoplanin expression in oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Dent* 2017; 9(12): 1418-1424.
  24. Neville B, Daam D, Allen C, Bouqout J. Oral and maxillofacial pathology. 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders 2016.
  25. Taher MG, Abdullah BH, Al-Khuri LE. Immunohistochemical expression of CD34 as biological marker of angiogenesis and expression of D2-40 as marker of lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *J Pak Med Stud* 2012; 2(3): 126-133.
  26. Ciurea RN, Stepan A, Simionescu C, Margaritescu C, Patrascu V, Ciurea M. The role of podoplanin in the lymphangiogenesis

- of oral squamous carcinomas. *Curr Health Sci J* 2015; 41(2): 126.
27. Pradhan S, Guddattu V, Solomon MC. Association of the co-expression of SOX2 and Podoplanin in the progression of oral squamous cell carcinomas-an immunohistochemical study. *J Appl Oral Sci* 2019; 27: e20180348.
  28. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. *Oral Oncol* 2013; 49(6): 598-603.
  29. Rolim LSA, Mafra RP, Santos HBdP, Souza LBd, Pinto LP. Role of Twist and Podoplanin in Partial Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Braz Dent J* 2020; 31(5): 623-633.
  30. Inoue H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Yoshida N, Ide F, Ohmori Y, et al. Podoplanin expression during dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity. *Tumor Biol* 2012; 33(1): 183-194.
  31. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20(4): 672-682.
  32. Madani Kermani Z, Khorsandi M, Yazdani N, Mirashrafi F. Evaluation of biologic markers in squamous cell carcinoma biopsy samples of the tongue and correlation with neck lymph node metastasis. *Tehran Univ Med J* 2009; 67(7): 502-508 (Persian).
  33. Kalra M, Rao N, Nanda K, Rehman F, Girish K, Tippu S, et al. The role of mast cells on angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(2): 190-196.
  34. Yu M, Liu L, Liang C, Li P, Ma X, Zhang Q, et al. Intratumoral vessel density as prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis of literature. *Head Neck* 2014; 36(4): 596-602.
  35. Jardim JF, Galvis MM, Fabelo IR, Soares FA, Pinto CAL, Kowalski LP. Intratumoral lymphatic vascular density is an independent factor for disease-free and overall survival in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2021; 132(5): 580-588.
  36. Zhao D, Pan J, Li X, Wang X, Tang C, Xuan M. Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(10): 616-625.
  37. De Sousa SF, Gleber-Netto FO, de Oliveira-Neto HH, Batista AC, Abreu MHNG, De Aguiar MCF. Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20(6): 588-594.
  38. Rasi A, Safaei NZ, Tavangar M, Taghizadeh A, Davoodi F. Angiogenesis evaluation in cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *BMJ* 2006; 17(6): 67-74.