

بررسی مقایسه‌ای تهاجم عصبی و عروقی آدنوئید سیستیک کارسینوما و موکوپیدر موئید کارسینوما ی غدد بزاقی با کاربرد مارکرهای S-100، GFAP، NCAM و PECAM-1

پرویز دیهیمی*#، نفیسه شاملو محمودی**، نصرت الله عشقیار***

* دانشیار آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات دندانپزشکی دکتر ترابی نژاد و دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

** آسیب شناس دهان، فک و صورت

*** دانشیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ ارائه مقاله: ۸۸/۸/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۴

The Comparative Evaluation of Perineural Invasion and Vascular Invasion in Adenoid Cystic Carcinoma and Mucoepidermoid Carcinoma of Salivary Glands by Expression of S-100, GFAP, NCAM and PECAM-1

Parviz Deyhimi*#, Nafiseh ShamlouMahmoudi**, Nosratollah Eshghyar***

* Associate Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, Torabinegad Dental Research Center and Dental School, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

** Oral & Maxillofacial Pathologist

*** Associate Professor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, Dental School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 14 November 2009; Accepted: 13 February 2010

Introduction: Mucoepidermoid carcinoma (MEC) and Adenoid cystic carcinoma (AdCC) are the most common salivary malignancies, and their biologic behavior has not been completely determined. Perineural and vascular invasion are effective on the biologic behavior. Therefore, the aim of this study was to evaluate perineural and vascular invasion in AdCC and MEC of major and minor salivary glands by expression of neural markers such as S-100, GFAP, NCAM and vascular marker such as PECAM-1.

Materials & Methods: Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections of 20 cases of AdCC and 20 cases of MEC were immunohistochemically analyzed for the presence of S-100, GFAP, NCAM, PECAM-1 by biotin streptavidin Novolink polymer procedure after antigen retrieval. Data were analyzed by Mann-Whitney and Fisher's exact tests.

Results: All AdCCs and MECs were positive (+1→+4) for S-100. S-100 positive frequency and severity ratios in AdCC were higher than MEC ($P < 0.05$). Two specimens of AdCC and nine specimens of MEC were positive (+1) for GFAP. GFAP positive frequency and severity ratios in MEC were higher than AdCC ($P = 0.013$). All AdCCs and MECs were negative for NCAM and PECAM-1 ($P = 1$).

Conclusion: The presence of S-100 and GFAP in AdCC and MEC probably indicates the role of myoepithelial cells in histogenesis of these tumors. Considering that perineural invasion in salivary gland tumors has been ascribed to myoepithelial cell, this characteristic does not necessarily indicate the poor prognosis of these tumors. As a result, according to the lack of expression of NCAM and PECAM-1 in AdCC and MEC and other findings, perineural and vascular invasion in these tumors do not appear to be different significantly.

Key words: Mucoepidermoid carcinoma, adenoid cystic carcinoma, S-100, GFAP, NCAM, PECAM-1, perineural invasion, vascular invasion.

Corresponding Author: Deihimi@dnt.mui.ac.ir

J Mash Dent Sch 2010; 34(1): 47-64.

چکیده

مقدمه: موکوپیدر موئید کارسینوما (MEC) و آدنویید سیستیک کارسینوما (AdCC) شایع ترین تومورهای بدخیم غدد بزاقی هستند که رفتار بیولوژیک آنها کاملاً مشخص نشده است. از عواملی که در رفتار بیولوژیک این تومورها موثر قلمداد شده است، تهاجم اطراف عصبی و عروقی می باشد. لذا هدف این مطالعه، بررسی تهاجم اطراف عصبی و عروقی AdCC و MEC غدد بزاقی اصلی و فرعی با استفاده از مارکرهای NCAM، S-100، GFAP به عنوان مارکرهای عصبی و PECAM-1 به عنوان مارکر عروقی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، ۲۰ نمونه AdCC و ۲۰ نمونه MEC غدد بزاقی که با فرمالین ثابت و در پارافین غوطه ور شده بودند، برای بررسی حضور پروتئین‌های S-100، GFAP، NCAM و PECAM-1 به روش Biotin-streptavidin novolink polymer، بازیافت آنتی‌ژنیک و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی شدند و داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمون آماری مان-ویتنی و دقیق فیشر تحلیل آماری شدند.

یافته‌ها: تمام نمونه‌های AdCC و MEC به S-100 واکنش داده که بین +۱ تا +۴ متغیر بودند. میزان فراوانی پروتئین S-100 و شدت رنگ پذیری آن در AdCC بیشتر از MEC بود ($P < 0/05$). دو مورد AdCC و ۹ مورد MEC واکنش +۱ به GFAP نشان دادند که میزان فراوانی و شدت رنگ پذیری آن در MEC بیشتر از AdCC بود ($P = 0/013$). هیچکدام از نمونه‌های AdCC و MEC به NCAM و PECAM-1 واکنش نشان ندادند ($P = 1$).

نتیجه گیری: باتوجه به حضور پروتئین S-100 و GFAP در AdCC و MEC، احتمالاً سلول‌های میوایی تلیال در هیستوژنز این دو تومور نقش دارند و با توجه به این که تهاجم اطراف عصبی در تومورهای غدد بزاقی به سلول میوایی تلیال نسبت داده شده است، الزاماً خصوصیت مزبور نمایانگر پیش‌آگهی ضعیف تر این تومورها نمی باشد. در نتیجه گیری کلی، با توجه به فقدان بروز مارکر NCAM و PECAM-1 در AdCC و MEC و سایر یافته‌ها، به نظر نمی رسد تهاجم اطراف عصبی و عروقی این دو تومور، تفاوت معنی داری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: موکوپیدر موئید کارسینوما، آدنویید سیستیک کارسینوما، S-100، GFAP، NCAM، PECAM-1، تهاجم اطراف عصبی، تهاجم عروقی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۸۹ دوره ۳۴ / شماره ۱: ۶۴-۴۷.

مقدمه

از جمله عوامل موثر در رفتار بیولوژیک و پیش‌آگهی تومورهای بدخیم غدد بزاقی، تهاجم عصبی و عروقی آنها می باشد. توانایی این تومورها برای تهاجم عروقی و اطراف عصبی با بروز مولکول‌هایی مرتبط است که مستقیم یا غیرمستقیم در فرآیندهای مزبور نقش دارند. سه مارکر عصبی S-100، GFAP، NCAM و مارکر عروقی PECAM-1 در این رابطه بیشتر مورد پژوهش قرار گرفته‌اند.

S-100 یک پروتئین اسیدی Ca-binding است که دارای دو زیرگروه آلفا و بتا می باشد و نخستین بار در CNS ایزوله شد و در تنظیم یونها در مغز نقش دارد ولی اختصاص به سلول‌های عصبی نداشته و در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های گلیال، ملانوسیت‌ها، کندروسیت‌ها،

سلول‌های میوایی تلیال غدد بزاقی و سایر سلول‌ها و

تومورهای ناشی از این سلول‌ها دیده می شود.^(۱۲)

گلیال فیبریلار اسیدیک پروتئین (GFAP) یکی از پنج فیلامان حد واسط سیتوپلاسمی و مربوط به سلول‌های گلیال است. بروز این مولکول در تومورهای اعصاب محیطی و تومورهای مخلوط (Mixed tumor or Pleomorphic Adenoma) غدد بزاقی گزارش شده است.^(۱۳)

NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) یا CD56

که جزو مولکول‌های چسبنده (Adhesion molecules) بوده و در واقع یک مولکول چسبنده سلول‌های عصبی است، به طور طبیعی در نورون‌ها، آستروسیت‌ها، سلول‌های شوان غلاف عصبی، میوبلاست‌ها و لنفوسیت‌های NK (Natural Killer) یافت می شود و در

Solochrome که یک رنگ‌آمیزی اختصاصی برای میلین است استفاده گردید، قویاً پیشنهاد شد که تمایز عصبی یا تغییر سلول شوان در این تومورها روی می‌دهد که در واقع مربوط به سلول‌های میوایی تلیال تغییر شکل یافته در آنها می‌باشد. اگرچه با توجه به بررسی‌های گذشته مشخص شده بود که سلول‌های میوایی تلیال تغییر شکل یافته، خصوصیات از انواع مختلف سلول‌ها دارا می‌باشند، ولی خصوصیات بافت عصبی در آنها یافت نشده بود. بررسی Toth مشخص نمود که سلول‌های میوایی تلیال تغییر شکل یافته به سلول‌های شوان تمایز می‌یابند که احتمالاً اساس تهاجم اطراف عصبی در این تومورها می‌باشد.^(۵)

در بررسی Gandour-Edwards در سال ۱۹۹۷ نیز مشخص شد NCAM در ۸۹٪ AdCC‌هایی که تهاجم اطراف عصبی نشان می‌دادند، بروز یافته بود که موید این فرضیه بود که تمایز سلول‌های شوان در سلول‌های میوایی تلیال تغییر شکل یافته AdCC روی می‌دهد که موجب تهاجم اطراف عصبی و یا به ندرت داخل عصبی می‌گردد.^(۶)

با وجودی که تهاجم اطراف عصبی در تومورهای بدخیم غدد بزاقی به سلول‌های میوایی تلیال تغییر شکل یافته به سلول‌های شوان غلاف عصبی نسبت داده شده است، ولی تهاجم اطراف عصبی در تومورهای بدخیم غیر غدد بزاقی مانند SCC و کارسینوم پروستات نیز مطرح شده است.

در سال ۱۹۹۹، Mclaughlin و همکارانش بر روی تظاهر NCAM در SCC سر و گردن تحقیقی را انجام دادند. در این تحقیق نتیجه گیری شد که یک ارتباط مثبت بین حضور NCAM و تهاجم عصبی در SCC سر و گردن وجود دارد ($P=0/002$). بروز این مولکول چسبنده به

میان تومورها، عمدتاً در کارسینوماهای نورواندوکراین و لنفوماهای NK و در بعضی از مزوتلیوماها بارز می‌شود.^(۱)

PECAM-1 (Platelete-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) یا CD31 جزو مولکول‌های چسبنده بوده و یکی از مفیدترین مارکرها برای سلول‌های اندوتلیالی است و در بعضی از کارسینوماها به طور کانونی رنگ می‌پذیرد. همچنین توسط سلول‌های نئوپلاستیک در بدخیمی‌های غدد بزاقی بارز شده و در اتصال هموفیلیک سلول‌های تومورال به سلول‌های اندوتلیال درگیر شده و متاستازهای عروقی و لنفاوی را تسهیل می‌نماید.^(۱۴)

موکوپیدرومئید کارسینوما (MEC) و آدنوییدسیستیک کارسینوما (AdCC) شایعترین تومورهای بدخیم غدد بزاقی هستند که رفتار بیولوژیک آنها کاملاً مشخص نشده است و مقایسه تهاجم اطراف عصبی و عروقی تومورهای مزبور، می‌تواند در مقایسه رفتار بیولوژیک آنها موثر قلمداد گردد، اگرچه خصوصیات فوق، تنها عوامل موثر در روند بیولوژیک این دو تومور نمی‌باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی آنتی‌ژن‌های S-100، GFAP، NCAM و PECAM-1 در موکوپای درموئید کارسینوما و آدنوییدسیستیک کارسینوما و میزان ارزش تشخیصی این مارکرها در بررسی مقایسه‌ای تهاجم عصبی و عروقی این دو تومور بدخیم می‌باشد. در این مورد تحقیقات مختلفی انجام شده است که به خصوص در مورد تهاجم اطراف عصبی تومورهای غدد بزاقی بوده است.

در سال ۱۹۹۶، Toth و همکارانش، تمایز سلول‌های شوان را در سلول‌های میوایی تلیالی تغییر یافته در آدنوییدسیستیک کارسینوما (AdCC) و پلی مورفوس آدنوکارسینوما درجه کم (PLGA) مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه که از آنتی‌بادی‌های S-100، GFAP، Neuron-specific enolase (NSE) و همچنین رنگ‌آمیزی

AdCCهای داخل دهانی که ابتدائاً به وسیله جراحی با یا بدون رادیوتراپی بعد از عمل درمان شده بودند، انجام گردید، هیچ ارتباطی بین تهاجم اطراف عصبی و محل اولیه یا اندازه تومور یافت نشد، اگرچه تهاجم اطراف عصبی بیشتر در تومورهایی که گسترش موضعی داشتند و در مواردی که حواشی جراحی، شواهد مثبت از تومور را نشان می‌دادند، رخ داده بود. به علاوه از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین تهاجم اطراف عصبی و متاستاز دوردست وجود نداشت.^(۱۰)

مشابه نتایج بدست آمده در مورد SCC، Thurairaja و همکارانش در سال ۲۰۰۶، مطالعه‌ای را برای مشخص کردن ارتباط بین تهاجم اطراف عصبی یا عروقی با متاستازهای اولیه استخوانی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات انجام دادند. در این بررسی، تهاجم اطراف عصبی به طور قابل ملاحظه‌ای با متاستازهای اولیه استخوانی مرتبط بود، در حالی این یافته در مورد تهاجم عروقی صادق نبود. لذا نتیجه گیری شد که ممکن است تهاجم اطراف عصبی یک عامل پیشگویی‌کننده مهم در متاستازهای اولیه استخوانی سرطان پروستات باشد.^(۱۱)

از آنجائی که آدنوئید سیستیک کارسینوما یک میل ترکیبی مهم برای بافت‌های غنی از غشاء پایه مانند لامینین دارد، در سال ۲۰۰۰، Franca و همکارانش مطالعه‌ای را بر روی نقش پروتئین‌های غشاء پایه در تظاهر NCAM بر روی دودمان سلول‌های آدنوئیدسیستیک کارسینوما بر روی دهنده NCAM (CAC2) انجام دادند. نتایج این بررسی نشان داد که سلول‌های آدنوئیدسیستیک کارسینوما کشت داده شده، NCAM را بروز داده و این بروز توسط ماتریکس خارج سلولی تنظیم می‌شود. لذا به وسیله تغییراتی در توزیع NCAM روی سلول‌های درمان شده با لامینین، نقشی برای NCAM در مهاجرت سلول‌های

وسيله سلول‌های تومور ممکن است هم چسبندگی هموفیلیک سلول به سلول و هم چسبندگی هتروفیلیک سلول به ماده زمینه را تسهیل نماید و بدین وسیله سلول‌های تومور را قادر می‌سازد که از بافت‌های اطراف عصبی، سلول‌های عصبی یا هر دو به عنوان یک مجرا برای گسترش اطراف عصبی استفاده نمایند. با این وجود در بررسی مزبور، هیچ ارتباط مهمی بین حضور تهاجم عصبی یا واکنش مثبت در رنگ‌آمیزی با عود ناحیه‌ای، متاستاز دوردست یا بقاء بیمار دیده نشد، اگرچه مدت متوسط پی‌گیری فقط ۱۳/۶ ماه بود.^(۷)

در تمایز با بررسی Mclaughlin، در سال ۲۰۰۰، Vural، Hutcheson و دیگر همکارانشان تهاجم اطراف عصبی را در SCC، یک عامل پیشگویی‌کننده ضعیف در ارتباط با افزایش خطر عود موضعی، متاستاز عقده‌ای (Nodal) و کاهش بقای بیماران مبتلا به SCC سر و گردن تلقی نمودند. در این بررسی که بر روی ارتباط NCAM و گسترش عصبی SCC سر و گردن انجام شد، تفاوت در بروز NCAM بین گروه مطالعه دارای تهاجم اطراف عصبی و گروه کنترل بدون تهاجم اطراف عصبی از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$)^(۸)، ولی همین محققین یعنی Hutcheson، Vural و دیگر همکارانشان در سال ۲۰۰۰ بر روی تظاهر NCAM در AdCCهای سر و گردن و ارتباط آن با گسترش اطراف عصبی بررسی مشابهی انجام دادند و پیشنهاد کردند که استفاده از بروز NCAM به عنوان یک عامل پیشگویی‌کننده برای تهاجم اطراف عصبی AdCC بسیار غیرمحمتمل می‌باشد.^(۹) در ارتباط با بررسی فوق، در پژوهش دیگری که توسط Van der wal و همکارانش در سال ۱۹۹۰ برای حضور تهاجم اطراف عصبی در ارتباط با مکان اولیه، اندازه، گسترش موضعی، وضعیت هیستولوژیک حواشی جراحی و انتشار متاستاتیک

Mclaughlin در مورد SCC می‌باشد که ارتباط مستقیمی بین رنگ‌پذیری ایمونولوژیک NCAM و تهاجم اطراف عصبی و رفتار بیولوژیک تومور یافتند.

در این بررسی، PECAM-1 (CD31) به ندرت توسط سلول‌های نئوپلاستیک غدد بزاقی بارز شده اما بروز آن در یک نمونه با متاستاز عروقی مشاهده شد. همچنین حضور آن در سه مورد از تومورهای بدخیم غده بزاقی مورد مطالعه با متاستاز و پیش‌آگهی ضعیف بیمار در ارتباط بود. البته مطالعات بیشتری برای تایید این مشاهدات لازم می‌باشد. همچنین هیچ ارتباط مشخصی بین تظاهر HCAM و ICAM-1 با تهاجم عصبی، تهاجم عروقی یا رفتار بیولوژیک تومور یافت نشد.^(۴)

در سال ۲۰۰۶، Sun و همکارانش مطالعه‌ای را بر روی بروز توام مارکر سلول شوان (GFAP) و مارکر سلول میوایی تلیال (α -smooth muscle actin) با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی Avidin-Biotin-Peroxidase complex Strept-(SABC)، ایمونوفلوروسانس هیستوشیمی دوگانه (double label immunofluorescence histochemistry)، لیزر اسکینینگ میکروسکوپ هم کانون (Confocal laser scanning microscope) در AdCC انجام داده و ارتباط این مارکرها را با تهاجم اطراف عصبی در این تومور مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، تمام نمونه‌ها به هر دو مارکر GFAP و α -SMA واکنش مثبت نشان دادند که هر دو مارکر در سیتوپلاسم سلول‌های انکومیوایی تلیال بارز شدند. براساس این یافته‌ها، نتیجه‌گیری شد که امکان دارد تمایز سلولی شوان در سلول‌های انکومیوایی تلیال AdCC رخ دهد که شاید اساس پاتولوژیکال تهاجم عصبی در این تومور باشد.^(۴)

آدنویید سیستیک کارسینوما پیشنهاد گردید.^(۱۲)

علاوه بر NCAM، مارکرهای دیگر عصبی مانند Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) که یک عامل رشد در عصب زایی است، توسط Kowalski و Paulino در سال ۲۰۰۲ در AdCC مورد بررسی قرار گرفته است. براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، BDNF به طور یکنواخت و با شدت‌های مختلف در AdCC بارز شده و ممکن است در تمایل آن برای تهاجم عصبی نقش داشته باشد.^(۱۳)

در سال ۲۰۰۴، Perschbacher و همکارانش بر روی بروز و توزیع NCAM، PECAM-1، و ICAM^۱ (CD45) و ICAM^۲ (CD44) در غدد بزاقی طبیعی و تعدادی از بدخیمی‌های غدد بزاقی و تاثیر آنها بر تهاجم عصبی، تهاجم عروقی، عود تومور و بقاء بیمار، مطالعه‌ای انجام دادند و نتیجه‌گیری کردند که NCAM (CD56) مشابه NSE، S-100 و GFAP ممکن است توسط سلول‌های میوایی تلیال تغییر شکل یافته نئوپلاستیک بارز شود و این بروز هیچ ارتباطی با حضور هیستولوژیک تهاجم عصبی یا رفتار تومور ندارد، به دلیل اینکه پژوهشگران مزبور قادر به مشاهده هم زمان تظاهر NCAM در اعصاب و سلول‌های تومورال که در تماس با اعصاب هستند، نبودند که یافته مزبور، مطرح‌کننده آن است که درگیری NCAM از طریق اتصال هموفیلیک در تهاجم عصبی ایجاد شده، نمی‌باشد.^(۴) این نتایج در تمایز با یافته‌های Vural و

۱. ICAM (CD54) یک مولکول چسبنده بین سلولی است که روی سلول‌های اندوتلیالی یا سلول‌های اپی تلیالی دیگر یافت می‌شود و افزایش یا انحراف بروز آن، تهاجم عروقی را تسهیل می‌نماید.

۲. HCAM (CD44) روی سلول‌های شوان و سلول‌های اپی تلیالی دیگر نمایان می‌شود که افزایش بروز یا انحراف بروز آن، تهاجم اطراف عصبی را تسهیل می‌نماید.

اطراف عصبی، ۷۵٪ بود. بنابراین بر اساس این مطالعه بروز NCAM می‌تواند به میزان معینی به عنوان یک فاکتور پیش‌گویی‌کننده در تهاجم عصبی آدنوییدسیستیک کارسینوما مطرح باشد. به علاوه، متاستاز عقده لنفاوی می‌تواند به عنوان یک شاخص کلینیکی برای تهاجم اطراف عصبی و بروز NCAM در نظر گرفته شود.^(۱۶)

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی-تحلیلی بود که در آن پرونده ۲۶ بیمار مبتلا به آدنوییدسیستیک کارسینوما و ۵۷ بیمار مبتلا به موکوپیدرموئید کارسینوما از آرشیو بخش آسیب‌شناسی دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران بین سال‌های ۸۷-۷۶ مورد مطالعه قرار گرفت و از آن میان، با توجه به حجم نمونه که بر اساس بررسی مقالات و مشاوره آماری تعیین گردید، ۲۰ مورد از تیبیک‌ترین نمونه‌های هر یک از تومورهای MEC و AdCC، بر اساس معیارهای زیر انتخاب شدند و بلوک‌های پارافینی آنها از آرشیو استخراج گردیدند و برش‌های جدیدی برای رنگ‌آمیزی H&E به منظور تایید تشخیص‌های قبلی و نیز اطمینان از کافی بودن نمونه‌ها برای آزمایش‌های تکمیلی مورد نظر به عمل آمد. به علاوه، درجه تمایز تومورهای MEC و نیز طرح هیستولوژیک AdCC در لام‌های H&E تعیین گردید. همچنین برش‌هایی برای رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS از بلوک‌های پارافینی MEC با درجه بالا انجام شد.

الف- معیارهای ورود به مطالعه

۱. نمونه‌ها تحت جراحی کامل قرار گرفته باشند.
۲. تومور اولیه باشد.
۳. طبق تعریف Neville خصوصیات میکروسکوپی آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما را داشته باشند.^(۱۷)

در همان سال ۲۰۰۶، Luo و همکارانش به وسیله روش‌های مذکور، نقش تمایز سلولی شوان را با استفاده از مارکرهای سلول شوان GFAP و S-100 در تهاجم عصبی AdCC و MEC غده بزاقی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، موقعیت فراساختاری S-100 و GFAP به وسیله ایمونوالکترون میکروسکوپ و بروز توام S-100 و Muscle actin به وسیله Double fluorescence immunostain و لیزر اسکینینگ میکروسکوپ هم‌کانون (CLSM) مورد پژوهش قرار گرفت. یافته‌های بدست آمده، اختلاف معنی‌داری را در میزان تهاجم عصبی و بروز S-100 و GFAP بین AdCC و MEC نشان می‌داد. در واقع تهاجم اطراف عصبی در ۵۵٪ AdCCها و صفر درصد MECها و نیز بروز S-100 و GFAP در بیشتر AdCCها، اما هیچیک از MECها یافته شد. به عبارت دیگر، یک ارتباط قوی بین تمایز سلولی شوان و تهاجم عصبی به دست آمد و مشخص شد که تمایز سلولی شوان در سلول‌های میوایی تلپال تغییر شکل یافته AdCC رخ می‌دهد، به دلیل اینکه خصوصیات فراساختاری سلول‌های S-100+ و GFAP+ با خصوصیات سلول‌های میوایی تلپال تطابق داشت. Double fluorescence immunostain نیز نشان داد که S-100 و Muscle actin در همان نوع سلول‌های AdCC نمایان شده بود. بنابراین تصور می‌شود که تمایز سلولی شوان در سلول‌های میوایی تلپال تغییر شکل یافته ممکن است اساس هیستولوژیک تهاجم عصبی AdCC باشد.^(۱۵)

در سال ۲۰۰۷، Shang و همکارانش بروز Neural cell adhesion molecule (NCAM) در آدنوییدسیستیک کارسینوما و ارتباط آن را با تهاجم عصبی مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش، حساسیت NCAM برای تهاجم اطراف عصبی، ۷۳٪ و ویژگی آن برای تهاجم

ب- معیارهای خروج از مطالعه

۱. بیوپسی اینسیژنال باشد.
۲. تومور اولیه نباشد (عود باشد).
۳. نمونه‌ها از نظر تشخیص هیستوپاتولوژیک مشکوک باشند.
۴. نمونه‌ها ثبوت (Fixation) نامناسب داشته باشند.
۵. نمونه‌ها واجد خونریزی، نکروز و التهاب فراوان باشند.

اطلاعات مندرج در پرونده بیمارانی که دارای ویژگی‌های فوق بوده استخراج شدند. این اطلاعات شامل سن، جنس، محل، اندازه ضایعه، متاستاز به عقده‌های لنفاوی و متاستاز دور دست بودند. متاسفانه به علت اطلاعات ناقص در مورد آدرس و تلفن بیماران و محدودیت در یافتن آنها و وضعیت کنونی بیمارانشان، جستجوی متاستاز در سال‌های بعد از درمان اولیه امکان‌پذیر نشد.

به منظور تشخیص وجود آنتی‌ژن‌های مورد نظر در این تحقیق از روش Novolink Polymer Detection System Biotin-Streptavidin به علت حساسیت و دقت بالای آن نسبت به سایر روش‌ها استفاده شد، بدین صورت که از بلوک‌های پارافینی مربوط به هر یک از نمونه‌ها، ۵ برش به ضخامت $3-4\mu m$ تهیه گردید و سپس مقاطع نمونه‌ها بر روی لام‌هایی آغشته به Poly-L-lysine به منظور جلوگیری از کنده شدن بافت قرار داده شد.^(۱۸)

لام‌های تهیه شده در دمای $58-60^{\circ}C$ در فور به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شدند. آنگاه در سه تغییر گزینش هر یک به مدت ۵ دقیقه به منظور پارافین‌زدایی و پنج تغییر الکل (۷۵، ۸۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۰۰) به منظور آب‌دهی مجدد تا آب مقطر عمل آورده شدند.^(۱۹)

در این مرحله نمونه‌ها در محلول بافر سیترات با $PH=6$ به منظور ثابت کردن آنتی‌ژن‌ها قرار داده شدند و این مجموعه در مایکروویو ($W=750$) به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه قرار گرفت تا ساختمان مولکولی آنتی‌ژن‌ها که به دلیل فیکساسیون تغییر شکل یافته بود به وسیله حرارت کنترل شده به حالت طبیعی برگردد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند.^(۱۷)

در مرحله بعد ابتدا تمامی نمونه‌ها به محلول Phosphate buffered saline (PBS) منتقل شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در هیدروژن پراکساید ۳٪ جهت متوقف کردن فعالیت پراکسیداز اندوژن انکوبه گردیدند.^(۳ و ۱۸)

به منظور جلوگیری از رنگ‌آمیزی کاذب در زمینه از محلول Protein Block (RE7102) به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و سپس نمونه‌ها با آب مقطر و محلول PBS شستشو داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه با تریپسین ($PH=7.3$) / ۰/۱٪ (Trypsin) انکوبه گردیدند. این آنزیم موجب رنگ‌پذیری بهتر از طریق تکمیل و تسریع واکنش‌ها می‌شود.^(۱۸)

بعد از شستشوی نمونه‌ها با محلول PBS، لام‌ها به مدت یک ساعت در محلول آنتی‌بادی قرار داده شدند. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده به شرح زیر بودند:

S-100 Lyophilised Monoclonal (Ncl-S-100) Clone S1/61/69 ۱:۱۰۰ بارقت

GFAP Lyophilised Monoclonal (Ncl-GFAP-GA5) Clone GA5 ۱:۱۰۰ بارقت

PECAM-1 Lyophilised Monoclonal (Ncl-CD31-1A10) Clone 1A10 ۱:۱۰۰ بارقت

NCAM Liquid Monoclonal (Ncl-L-CD56-1B6) Clone 1B6 (RTU) استفاده مستقیم

پس از طی شدن زمان لازم، لام‌ها مجدداً با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در

موکوپای درموئید کارسینوما، رنگ‌پذیری سلول‌های موکوسی، سلول‌های اسکواموس و سلول‌های حد واسط و در تومورهای آدنویید سیستیک کارسینوما، رنگ‌پذیری سلول‌های داکتال و سلول‌های میوپای تلیال بررسی شد.

همچنین واکنش ایمنی نمونه‌ها بر اساس روش معرفی شده توسط رگری، گروه (Score) بندی گردید.^(۳۰)

صفر ← بدون واکنش

+۱ ← رنگ‌پذیری پراکنده و کانونی

+۲ ← حداکثر ۲۵ درصد سلول‌ها مثبت

+۳ ← بین ۲۵-۵۰ درصد سلول‌ها مثبت

+۴ ← بیشتر از ۵۰ درصد سلول‌ها مثبت

سپس اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمون‌های

آماري مان ویتني و دقیق فیشر تحلیل آماری شدند.

شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها، تراکم یا شدت بروز مارکر در هر سلول می‌باشد که به طور متوسط در یک فیلد میکروسکوپی بر اساس تجربه آسیب‌شناس مورد ارزیابی قرار گرفت، به این صورت که اگر با بزرگنمایی کم، رنگ‌پذیری سلول‌ها مشهود بود، بیشترین شدت تشخیص داده شد.

یافته‌ها

در نمونه‌های بررسی شده در H&E، از ۲۰ مورد AdCC، در ۷ مورد (۳۵٪) طرح غربالی یا Cribriform، در ۷ مورد (۳۵٪) طرح توبولار ترابکولار و در ۶ مورد (۳۰٪) طرح توپر یا Solid غالب بود و از ۲۰ مورد MEC ۷ مورد (۳۵٪) درجه کم، ۶ مورد (۳۰٪) درجه متوسط و ۷ مورد (۳۵٪) درجه بالا تشخیص داده شدند.

پس از مشاهده و بررسی نمونه‌ها از نظر رنگ‌پذیری برای آنتی‌بادی‌های به کار گرفته شده (GFAP، NCAM، S-100، PECAM-1) مشخص شد که در تمام نمونه‌های آدنوییدسیستیک کارسینوما، سلول‌های تومورال با S-100

محلول Post primary block (RE 7111) قرار گرفتند. (این محلول یک آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌بادی اولیه با منشا Rabbit-mouse می‌باشد).

در این مرحله آنتی‌بادی و محلول Post primary block کمپلکس ایجاد می‌کنند. سپس لام‌ها به مدت ۵ دقیقه با محلول PBS شستشو داده شده آنگاه لام‌ها در محلول Novolink polymer (RE 7112) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته و مجدداً با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. محلول Novolink polymer در مقایسه با روش بیوتین استرپتاویدین، جایگاه‌های بیشتری برای واکنش دارد و باعث افزایش دقت و حساسیت می‌گردد.

در نهایت نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در کروموزن دی آمینو بنزیدین (DAB) رقیق شده، انکوبه گردیده و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند.

در این مرحله در صورتی که آنتی‌ژن مورد نظر در بافت وجود داشته باشد، به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شود. سپس تمامی نمونه‌ها توسط همتوکسیلین به منظور رنگ‌آمیزی مناسب زمینه، رنگ‌آمیزی شدند.^(۱۹)

در مرحله نهایی نمونه‌ها در الکل با درجات مختلف به منظور آب‌گیری و سپس گزیلول به منظور شفاف‌سازی قرار داده شدند و نهایتاً با P.V.mount مانت شدند.

در تمام مراحل از کنترل منفی و مثبت برای تفسیر دقیق لام‌ها و اطمینان از صحت تکنیک رنگ‌آمیزی انجام شده، استفاده گردید. در کنترل منفی به جای آنتی‌بادی از سرم انسانی و در کنترل مثبت از نمونه‌هایی که به طور تیپیک مثبت می‌شوند، که برای NCAM روده کوچک انسان، برای S-100 شوانوما، برای GFAP اپاندیموما و برای PECAM-1 گلوبانژیوما بود، استفاده شد.

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

معنی‌داری مشاهده شد ($P=0/010$)، ($Z=-2/308$)،
(Median=2/5) (جدول ۲) (تصاویر ۱ و ۲).

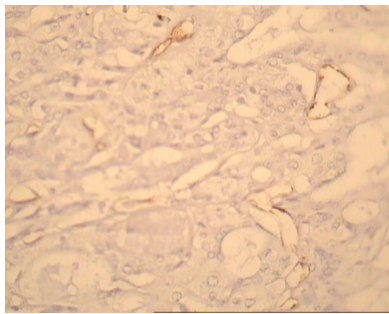
در رابطه با فراوانی و شدت رنگ‌پذیری پروتئین GFAP، نتایج این مطالعه نشان داد که تظاهر این پروتئین در تومورهای آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای‌درموئید کارسینوما غدد بزاقی متفاوت است و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود. با توجه به اینکه در مورد این مارکر فقط دو حالت صفر و یک وجود دارد از آزمون آماری دقیق فیشر که با $P=0/013$ معنی‌دار گردید استفاده شده است ($Z=-2/448$)، (Median=0) (جدول ۳). بطور کلی، درجات هیستولوژیک متفاوت MEC و طرح‌های هیستولوژیک مختلف AdCC، تفاوتی از نظر رنگ‌آمیزی IHC برای مارکرهای S-100 و GFAP نشان ندادند.

در مورد پروتئین‌های NCAM و PECAM-1 هیچ یک از سلول‌های تومورال در دو تومور تحت بررسی، واکنش مثبت به این پروتئین‌ها نشان نداده و با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=1$) (تصاویر ۳ و ۴).

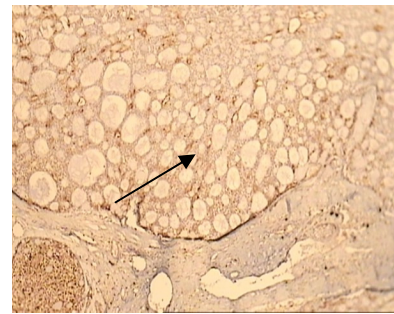
واکنش مثبت نشان داده که میزان رنگ‌پذیری بین +۱ تا +۴ متغیر بود (یک مورد +۱، ۸ مورد +۲، ۵ مورد +۳ و ۶ مورد +۴). همچنین شدت رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال در واکنش با آنتی‌بادی S-100 نیز بین +۲ تا +۴ متغیر بود (سه مورد +۲، ۵ مورد +۳، ۲ مورد +۴، ۶ مورد +۳-۴ و ۴ مورد +۴). در مورد GFAP میزان رنگ‌پذیری و شدت آن بین ۰ تا +۱ متغیر بود (۱۸ مورد منفی و ۲ مورد +۱). در تمام نمونه‌های مربوط به موکوپای‌درموئید کارسینوما، سلول‌های تومورال با S-100 واکنش مثبت نشان داده که میزان رنگ‌پذیری بین +۱ تا +۴ متغیر بود (۹ مورد +۱، ۵ مورد +۲، ۵ مورد +۳ و ۱ مورد +۴). همچنین شدت رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال در واکنش با پروتئین S-100 بین +۱ تا +۴ متغیر بود (۳ مورد +۱، ۴ مورد +۲، ۷ مورد +۳-۴، ۴ مورد +۳ و ۲ مورد +۴). در مورد GFAP میزان رنگ‌پذیری و شدت رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال بین ۰ تا +۱ متغیر بود (۱۱ مورد منفی و ۹ مورد +۱). در تمام نمونه‌های موکوپای‌درموئید کارسینوما و آدنوییدسیستیک کارسینوما، سلول‌های تومورال با NCAM و PECAM-1 واکنش نشان ندادند.

در رابطه با مقایسه فراوانی پروتئین S-100، نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی نسبی پروتئین S-100 در تومورهای موکوپای‌درموئید کارسینوما و آدنوییدسیستیک کارسینوما غدد بزاقی متفاوت است و با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P=0/007$)، ($Z=-2/693$)، (Median=2) (جدول ۱).

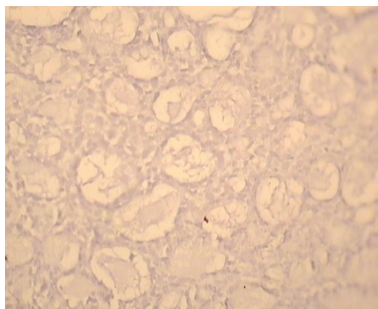
در رابطه با مقایسه شدت رنگ‌پذیری پروتئین S-100، نتایج این تحقیق نشان داد که شدت رنگ‌پذیری پروتئین S-100 در تومورهای آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای‌درموئید کارسینوما غدد بزاقی متفاوت است و با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney تفاوت



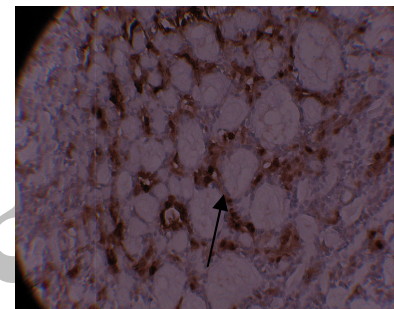
MEC بزرگنمایی (۴۰۰×)



بزرگنمایی (۱۰۰×)



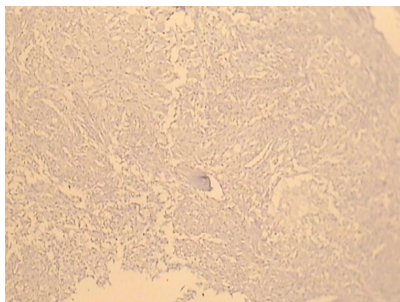
AdCC بزرگنمایی (۴۰۰×)



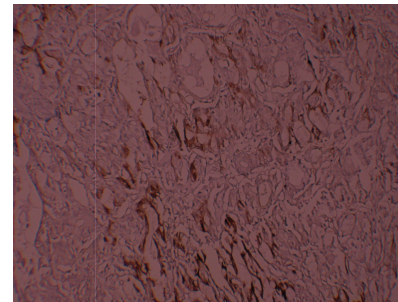
بزرگنمایی (۴۰۰×)

تصویر ۳: رنگ آمیزی منفی PECAM-1 در آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما

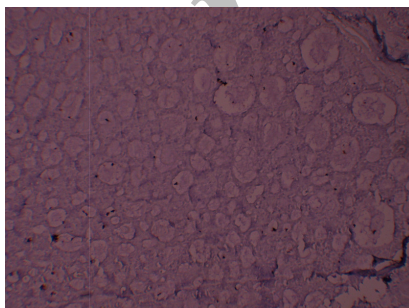
تصویر ۱: رنگ آمیزی S-100 در آدنوییدسیستیک کارسینوما واکنش مثبت برای S-100 در سلول‌های تومورال قابل مشاهده است.



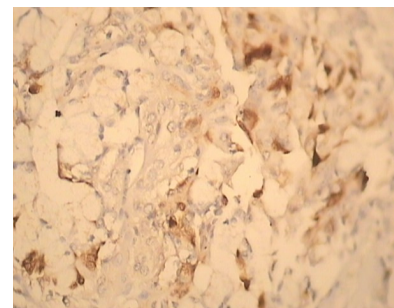
MEC بزرگنمایی (۱۰۰×)



بزرگنمایی (۱۰۰×)



AdCC بزرگنمایی (۴۰۰×)



بزرگنمایی (۴۰۰×)

تصویر ۴: رنگ آمیزی منفی NCAM در آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما

تصویر ۲: رنگ آمیزی S-100 در موکوپایدرموئید کارسینوما واکنش مثبت برای S-100 در سلول‌های تومورال قابل مشاهده است.

جدول ۱: توزیع فراوانی نمونه‌ها به تفکیک میزان رنگ‌پذیری پروتئین S-100

مجموع	میزان رنگ‌پذیری پروتئین S-100				نوع تومور
	+۴	+۳	+۲	+۱	
(/۱۰۰)۲۰	(/۳۰)۶	(/۲۵)۵	(/۴۰)۸	(/۵)۱	آدنوییدسیستیک کارسینوما
(/۱۰۰)۲۰	(/۵)۱	(/۲۵)۵	(/۲۵)۵	(/۴۵)۹	موکوپای درموئید کارسینوما

Mann-Whitney: P -value=۰/۰۰۷

جدول ۲: توزیع فراوانی نمونه‌ها به تفکیک شدت رنگ‌پذیری پروتئین S-100

مجموع	شدت رنگ‌پذیری پروتئین S-100					نوع تومور	
	+۴	+۴ تا +۳	+۳	+۳ تا +۲	+۲		+۱
(/۱۰۰)۲۰	(/۲۰)۴	(/۳۰)۶	(/۱۰)۲	(/۲۵)۵	(/۱۵)۳	صفر	آدنوییدسیستیک کارسینوما
(/۱۰۰)۲۰	صفر	(/۱۰)۲	(/۲۰)۴	(/۳۵)۷	(/۲۰)۴	(/۱۵)۳	موکوپای درموئید کارسینوما

Mann-Whitney: P -value=۰/۰۱

جدول ۳: توزیع فراوانی نمونه‌ها به تفکیک میزان و شدت رنگ‌پذیری پروتئین GFAP

مجموع	میزان و شدت رنگ‌پذیری پروتئین GFAP		نوع تومور
	+۱	صفر	
(/۱۰۰)۲۰	(/۱۰)۲	(/۹۰)۱۸	آدنوییدسیستیک کارسینوما
(/۱۰۰)۲۰	(/۴۵)۹	(/۵۵)۱۱	موکوپای درموئید کارسینوما

Fisher's Exact test: P -value=۰/۰۱۳**بحث**

دخیل در روند بیولوژیک تومورها، محل ایجاد تومور، اندازه تومور، حضور تومور در خط برش جراحی یا به عبارت دیگر جراحی ناکافی و عاری از حاشیه سالم، سن،

روند بیولوژیک تومورها نقش مهمی در تعیین پیش‌آگهی و حتی طرح درمان آنها دارد. از جمله عوامل

کارسینوم با منشأ غیر از غدد بزاقی، شباهت مورفولوژیک این سلول‌ها با سلول‌های شوان غلاف عصبی بیشتر شده و از طریق اتصال هموفیلیک به این سلول‌ها احتمالاً تهاجم عصبی تسهیل می‌گردد.

همانطور که Vural و همکارانش نیز مطرح نموده‌اند، تهاجم عصبی در SCC می‌تواند یک عامل پیش‌گویی‌کننده ضعیف در ارتباط با افزایش خطر عود موضعی، متاستاز عقده‌های لنفاوی و کاهش بقای بیماران تلقی گردد.^(۸) در تایید فرضیه فوق در مورد تهاجم عصبی تومورهای غیر غدد بزاقی، Thurairaja و همکارانش نیز نتایج مشابهی با تومورهای پروستات به دست آوردند. آنها براساس یافته‌های خود تهاجم اطراف عصبی را مرتبط با متاستازهای استخوانی و پیش‌آگهی ضعیف‌تر تومور ارزیابی کردند و این خصوصیت را یک عامل پیش‌گویی‌کننده مهم برای متاستاز اولیه استخوانی در تومور پروستات تلقی نمودند. نکته جالب در بررسی آنها، عدم ارتباط تهاجم عروقی با متاستازهای استخوانی بود که این یافته نشان‌دهنده پیش‌آگهی ضعیف‌تر تهاجم عصبی در مقایسه با تهاجم عروقی در کارسینوماهای غیر غدد بزاقی می‌باشد.^(۱۱)

در اینجا این سؤال مطرح می‌گردد که آیا همانند SCC می‌توان از بروز NCAM به عنوان یک عامل پیش‌گویی‌کننده در تهاجم عصبی و پیش‌آگهی یک تومور بدخیم غده بزاقی مثل آدنویید سیستیک کارسینوما استفاده نمود. پژوهشگرانی چون Hutcherson و همکارانش که بر روی تظاهر NCAM در آدنویید سیستیک کارسینوما و ارتباط آن با گسترش اطراف عصبی بررسی مشابهی روی ۳۷ مورد آدنویید سیستیک کارسینوما انجام دادند، در ۲۵ (۶۸٪) مورد شواهد هیستوپاتولوژیک تهاجم اطراف عصبی را مشاهده کردند در صورتی که در همه ۳۷ مورد،

جنس، خصوصیات هیستوپاتولوژیک، تهاجم عصبی و عروقی آنها می‌باشد، که البته این عوامل می‌تواند همگی روی یکدیگر تأثیر گذاشته و هیچ یک از آنها عامل کاملاً مستقلی نمی‌باشد.^(۲۱،۲۲) در مطالعه حاضر با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی در مورد تهاجم عصبی و عروقی موکوپای درموئید کارسینوما و آدنوییدسیستیک کارسینوما که از شایع‌ترین تومورهای بدخیم غدد بزاقی می‌باشند بحث شده است. از آن جایی که روند بیولوژیک این دو تومور متفاوت تلقی شده و تهاجم عصبی بیشتر در مورد آدنوییدسیستیک کارسینوما ذکر شده است، احتمال تمایز سلول‌های میوایی تلیال به سلول‌های عصبی در این تومور مطرح بوده که ممکن است از طریق اتصال هموفیلیک به سلول‌های شوان غلاف عصبی در تهاجم عصبی نقش داشته باشند.^(۱۴و۱۵)

اگرچه در آدنویید سیستیک کارسینوما احتمال تمایز سلول‌های میوایی تلیال به سلول‌های عصبی و نقش آن در تهاجم عصبی مطرح شده است ولیکن در مطالعه‌ای که Vural و McLaughlin بر روی تظاهر NCAM در SCC سروگردن انجام دادند، نتیجه‌گیری شد که بروز NCAM توسط سلول‌های تومورال ممکن است هم، چسبندگی هموفیلیک سلول به سلول و هم چسبندگی هتروفیلیک سلول به ماده زمینه را تسهیل نماید و بدینوسیله در تهاجم عصبی مؤثر باشد.^(۷و۸) از آنجایی که SCC فقط حاوی سلول‌های اپی‌درموئید بوده و فاقد سلول میوایی تلیال می‌باشد، این احتمال مطرح می‌گردد که وجود سلول میوایی تلیال برای تهاجم عصبی الزامی نیست و سلول‌های تومورال بدخیم دیگر با منشأ غیر از غدد بزاقی ممکن است از طریق اتصال هموفیلیک در تهاجم عصبی نقش داشته باشند. بر این اساس می‌توان چنین استنتاج نمود که احتمالاً با عدم تمایز بیشتر سلول‌های بدخیم در یک

کما اینکه در بررسی Vanderwal و همکاران در سال ۱۹۹۰ نیز هیچ ارتباط مهمی از نظر آماری بین تهاجم اطراف عصبی و متاستاز دوردست در ۲۲ مورد آدنویید سیستمیک کارسینوما داخل دهانی که ابتدائاً به وسیله جراحی با یا بدون رادیوتراپی بعد از عمل درمان شده بودند، یافت نشد. همچنین هیچ ارتباطی بین گسترش اطراف عصبی و محل اولیه یا اندازه تومور وجود نداشت. اگرچه تهاجم اطراف عصبی بیشتر در تومورهایی که گسترش موضعی داشتند و در مواردی که حواشی جراحی، شواهد مثبت از تومور را نشان می‌دادند، رخ داده بود.^(۱۰) نکته قابل ذکر آن است که حتی در تومورهای خوش خیم بزاقی مثل بازال سل آدنوما نیز پیشروی یا تجاوز اطراف عصبی توصیف شده که الزاماً دال بر بدخیمی نمی باشد.^(۲۳)

با این حال به علت مورفولوژی و یافته‌های ایمونولوژی متغیر در تومورهای غدد بزاقی از جمله آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپایدرموئید کارسینوما هنوز سوالات زیادی بدون پاسخ مانده است.

بر اساس یافته‌های بدست آمده در بررسی ما، GFAP کمتر از S-100 برای افتراق AdCC و MEC قابل استفاده بود. اگرچه با توجه به اینکه مارکر NCAM در هر دو تومور کاملاً منفی بود، نمی توانستیم از یافته‌های بدست آمده چنین استنتاج کنیم که تهاجم اطراف عصبی در AdCC بیشتر از MEC روی می‌دهد. در مورد تهاجم عروقی نیز با توجه به اینکه مارکر PECAM-1 در هر دو تومور کاملاً منفی بود، نمی توانستیم استنتاج کنیم که تهاجم عروقی این دو تومور متفاوت می‌باشد.

مانند مطالعه Toth و همکارانش در مطالعه ما نیز واکنش مثبت به S-100 در آدنوییدسیستیک کارسینوما مشاهده شد. همینطور در مطالعه Toth تمام نمونه‌ها به

بروز NCAM را بدون توجه به وجود تهاجم اطراف عصب مشاهده نمودند. بنابراین استنتاج کردند که بروز مارکر NCAM به تنهایی دال بر تهاجم عصبی نمی باشد و استفاده از آن به عنوان یک عامل پیشگویی کننده برای تهاجم اطراف عصبی در آدنویید سیستمیک کارسینوما بسیار غیرمحتمل است.^(۹)

در بررسی Perschbacher و همکارانش نیز که در سال ۲۰۰۴ بر روی غدد بزاقی طبیعی و تعدادی از بدخیمی‌های غدد بزاقی انجام گرفت، واکنش مثبت به NCAM در تعدادی از نمونه‌های آدنویید سیستمیک کارسینوما مشاهده شد ولی با توجه به اینکه هیچ کدام از سلول‌های تومورال دارای واکنش مثبت، در مجاورت با اعصاب نبودند، چنین استنتاج گردید که حضور NCAM ارتباطی با تهاجم اطراف عصبی ندارد. بنابراین در صورتی می‌توان از نتایج مثبت به دست آمده در مورد NCAM، تهاجم عصبی را استنباط کرد که سلول‌های دارای واکنش مثبت به این مارکر، مجاور عصب باشند. پس با توجه به این مطالعه می‌توان نتیجه گیری نمود که بروز NCAM هیچ ارتباطی با حضور هیستولوژیک تهاجم عصبی یا رفتار بیولوژیک تومور غده بزاقی مانند آدنویید سیستمیک کارسینوما ندارد.^(۴)

به علاوه در صورتی که رفتار تهاجم اطراف عصبی در آدنویید سیستمیک کارسینوما یا احیاناً تومورهای دیگر غدد بزاقی را به سلول میوایی تلیال منسوب نماییم، از آنجایی که سلول میوایی تلیال سلول مختلف الشکلی بوده که به اشکال مختلف در تومورهای غدد بزاقی بروز می‌کند، تمایز سلول شوان در آن الزاماً دال بر عدم تمایز سلولی نیست و نمی توان تهاجم اطراف عصبی در تومور آدنویید سیستمیک کارسینوما یا تومورهای دیگر غدد بزاقی را الزاماً نمایانگر پیش‌آگهی ضعیف‌تر این تومورها دانست.

NCAM در آدنوییدسیستیک کارسینوما مغایرت دارد.^(۱۶) علت این تفاوت مشخص نیست، شاید اختلاف تفسیر پاتولوژیک یا ضعف تکنیک، موثر باشد. از آنجایی که تمامی مارکرهای بکار رفته در بررسی حاضر دارای میل ترکیبی بالایی بوده لذا در صورت وجود آنتی‌ژن در بافت قطعاً با آن واکنش نشان می‌دادند. بنابراین منفی بودن نتایج به احتمال زیاد ناشی از عدم وجود آنتی‌ژن در بافت می‌باشد. همینطور ممکن است منفی بودن نتایج به دلیل قدیمی بودن بلوک‌های پارافینی باشد که آنتی‌ژن‌های آن ردیابی نشده است ولی با توجه به این که در مطالعه ما بلوک‌های پارافینی جدیدتر نیز هیچ واکنشی نشان نداده‌اند این احتمال کمتر مطرح می‌باشد. دلیل دیگر برای عدم بروز NCAM و PECAM-1 در بررسی ما می‌تواند شدت بروز کم این دو مارکر باشد زیرا مارکرهای دیگر با شدت بروز بیشتر (S-100) با بلوک‌های پارافینی قدیمی یا فیکساتیوهای معمول، واکنش نشان داده‌اند. همچنین این امکان وجود دارد که در زمان تهیه بلوک‌ها از روش غیراستاندارد مانند الکل با کیفیت پایین، افزایش درجه حرارت پارافین و فیکسسیون نامناسب استفاده شده که به همین دلیل آنتی‌ژن‌های آن قابل شناسایی نمی‌باشند.

نتایج بررسی ما با تحقیقات انجام شده توسط Franca و همکاران نیز در مورد حضور پروتئین NCAM در آدنوییدسیستیک کارسینوما مغایرت دارد. همانطور که ذکر شد در مطالعه Franca از روش ایمونوهیستوشیمی Strepto-avidin-biotin، محیط کشت و میکروسکوپ ایمونوفلورسانس استفاده شده بود، اگر چه روش ایمونوهیستوشیمی آنها در مقایسه با مطالعه ما از دقت و حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد اما چون از محیط کشت و میکروسکوپ ایمونوفلورسانس استفاده شده لذا احتمالاً نتایج آنها از دقت بالاتری برخوردار است.^(۱۲)

GFAP واکنش مثبت نشان دادند که با نتایج به دست آمده در تحقیق ما مغایرت دارد. علت این تفاوت شاید به دلیل آن است که در مطالعه Toth از تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی متفاوت و رنگ‌آمیزی Solochrome که یک رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین می‌باشد، استفاده شده است. علاوه بر اینکه احتمال خطاهای تشخیصی را نیز نمی‌توان منتفی دانست.^(۵)

نتایج مطالعه ما با نتایج تحقیقات انجام شده توسط Luo و Sun در مورد واکنش مثبت به S-100 در آدنوییدسیستیک کارسینوما یکسان است ولی در مورد مارکر GFAP در آدنوییدسیستیک کارسینوما و همچنین عدم واکنش موکوپای درموئید کارسینوما با S-100 و GFAP مغایرت دارد. علت این تفاوت، احتمالاً به اختلاف تکنیک‌های بکار رفته و خطاهای تشخیصی مربوط است. اگرچه روش ایمونوهیستوشیمی آنها نسبت به بررسی حاضر که از NPDBS استفاده شده، از دقت و حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد ولیکن چون علاوه بر آن از ایمونوفلوروسانس دوگانه و CLSM که تکنیک‌های پیشرفته‌تری هستند، استفاده شده، لذا نتایج پژوهش آنها احتمالاً از دقت بالاتری برخوردار می‌باشند.^(۱۴و۱۵)

همچنین نتایج تحقیق ما با مطالعه دیهیمی و ترابی‌نیا در سال ۲۰۰۴ مغایرت دارد که در مطالعه آنها هیچ یک از نمونه‌های MEC با GFAP و S-100 واکنش نشان ندادند. علت تفاوت در نتایج احتمالاً به اختلاف تکنیک بکار رفته مربوط می‌باشد که تکنیک استفاده شده در بررسی دیهیمی و ترابی‌نیا روش معمول Biotin-streptavidin بوده که نسبت به تکنیک بکار رفته در مطالعه ما از دقت و حساسیت کمتری برخوردار است.^(۲۴)

بعلاوه نتایج بررسی ما با تحقیقات انجام شده توسط Gandour-Edwards و Shang در مورد حضور پروتئین

مثبت S-100 و GFAP در آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما احتمالاً سلول‌های میوایی تلیال در هیستوژنز این دو تومور نقش دارند.

۲- بروز مارکرهای NCAM و PECAM-1 در هیچکدام از تومورهای موکوپای درموئید کارسینوما و آدنوییدسیستیک کارسینوما مشاهده نشد. لذا این دو مارکر برای افتراق تهاجم عصبی و عروقی بین تومورهای مزبور قابل استفاده نبود. با توجه به عدم بروز مارکرهای مزبور در تمام نمونه‌های مورد بررسی، احتمالاً شدت بروز این دو مارکر در تومورهای فوق حتی در صورت بروز، اندک است. لذا کاربرد تکنیک‌های دقیق‌تر ایمنوهیستوشیمی برای ردیابی آنها ضروری می‌باشد.

۳- در بررسی حاضر با توجه به یافته‌های به دست آمده از مارکرهای فوق‌الذکر، به نظر نمی‌رسد تهاجم اطراف عصبی و عروقی تومور آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما تفاوت معنی‌داری داشته باشد.

۴- درجه‌های هیستولوژیک متفاوت موکوپای درموئید کارسینوما و طرح‌های هیستولوژیک مختلف آدنوییدسیستیک کارسینوما تفاوتی از نظر رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای مارکرهای S-100 و GFAP نشان ندادند. بنابراین نمی‌توان از مارکرهای فوق‌الذکر برای مقایسه تهاجم اطراف عصبی درجه‌های مختلف هیستولوژیک موکوپای درموئید کارسینوما و طرح‌های هیستولوژیک متفاوت آدنوییدسیستیک کارسینوما استفاده نمود.

۵- در این بررسی با توجه به فقدان بروز NCAM در آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما ارتباط این مارکر با تهاجم اطراف عصبی یا به طور کلی روند بیولوژیک این دو تومور مشخص نشد. البته همانطور

نتایج مطالعه Perschbacher و همکاران در رابطه با بروز و توزیع NCAM و PECAM-1 در آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما با نتایج بررسی ما مغایرت داشت، اگرچه در مطالعه آنها، PECAM-1 تنها در یک مورد آدنوییدسیستیک کارسینوما و یک مورد موکوپای درموئید کارسینوما یافت شد که بالتبع ارزش آماری نیز ندارد. در مطالعه آنها از تکنیک بیوتین آویدین استفاده شده بود که نسبت به تکنیک به کار رفته در تحقیق ما از دقت و حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد. ولی با توجه به اینکه روش استفاده شده در مطالعه حاضر از دقت و حساسیت بالاتری برخوردار است قاعدتاً بایستی آنتی‌ژن‌های مورد نظر را بهتر ردیابی می‌کرد، بنابراین علت منفی شدن نتایج ما، ممکن است به علت فیکساسیون بیش از حد بافت یا نامناسب بودن مواد ثبوت‌کننده باشد. به علاوه شدت بروز اندک این دو مارکر نیز می‌تواند دلیل دیگر منفی شدن نتایج ما باشد. همچنین در مطالعه آنها تعداد نمونه‌های موکوپای درموئید کارسینوما تنها ۴ مورد بوده است که با این تعداد اندک امکان قضاوت صحیحی وجود ندارد.^(۴)

نتیجه‌گیری

۱- در بررسی حاضر بروز پروتئین S-100 در تمام موارد آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما مشاهده گردید که فراوانی و شدت رنگ‌پذیری این پروتئین به طور معنی‌داری در آدنوییدسیستیک کارسینوما بیشتر بود. در مقابل فراوانی و شدت رنگ‌پذیری پروتئین GFAP تنها در مورد ۱+ در موکوپای درموئید کارسینوما بیشتر از آدنوییدسیستیک کارسینوما بود. لذا به عنوان یک مارکر برای افتراق تهاجم اطراف عصبی در این دو تومور کمتر از S-100 قابل استفاده بود. به عنوان یک یافته جنبی، با توجه به واکنش

پیشنهادات

- ۱- توصیه می‌شود بررسی دقیق‌تری در مورد وقوع هم‌زمان مارکرهای عصبی مورد پژوهش در اعصاب و سلول‌های تومورال که در تماس با اعصاب هستند، انجام شود تا بتوان نتیجه‌گیری دقیق‌تری نمود.
- ۲- توصیه می‌شود از تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی دقیق‌تر مانند Immunogold silver staining method و در صورت امکان میکروسکوپ ایمونوالکترونی، CLSM و ایمونوفلورسانس دوگانه برای بررسی تهاجم عصبی و عروقی استفاده شود.
- ۳- توصیه می‌شود در صورت امکان از بلوک‌های پارافینی جدیدتر استفاده شود و نیز در زمان تهیه بلوک‌ها، روش‌های استاندارد کاملاً اجرا شده و در صورت امکان از فیکساتیو fine-fix استفاده شود.
- ۴- توصیه می‌شود از سایر مارکرهای عصبی مانند (Nerve Growth Factor) NGF و تیروزین کیناز A برای بررسی تهاجم اطراف عصبی و نیز سایر مارکرهای عروقی مانند Vascular endothelial growth factor (VEGF) و Factor VIII برای بررسی تهاجم عروقی این تومورها استفاده شود. به علاوه، پیشنهاد می‌گردد بر روی نقش پروتئین‌های غشاء پایه در تظاهر مارکرهای ایمونوهیستوشیمی و استفاده از محیط کشت برای بررسی تهاجم اطراف عصبی و عروقی در تومورهای غدد بزاقی تحقیقات بیشتری صورت گیرد.
- ۵- توصیه می‌شود مطالعات مولکولی و ژنتیکی در رابطه با ژن‌های مرتبط با تهاجم عصبی و عروقی تومورهای غدد بزاقی به خصوص تومورهای مورد مطالعه، انجام شود.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم می‌باشد که از زحمات سرکار خانم

که قبلاً ذکر شد، حتی با وجود مثبت شدن NCAM، در صورتی می‌توان تهاجم اطراف عصبی را استنباط نمود که سلول‌های دارای واکنش مثبت با این مارکر، مجاور عصب باشند.

۶- در این بررسی با توجه به فقدان بروز PECAM-1 در آدنوییدسیستیک کارسینوما و موکوپای درموئید کارسینوما ارتباط این مارکر با تهاجم عروقی یا به طور کلی روند بیولوژیک این دو تومور مشخص نشد.

۷- در نتیجه‌گیری کلی، با توجه به اینکه رفتار تهاجم اطراف عصبی در تومورهای غدد بزاقی، به سلول میوایی تلیال که سلول مختلف‌الشکلی است، نسبت داده شده، نمی‌توان تهاجم اطراف عصبی در این تومورها را الزاماً نمایانگر پیش‌آگهی ضعیف‌تر آنها تلقی نمود ولی در تومورهای غیر غدد بزاقی که فاقد سلول‌های میوایی تلیال می‌باشند، چنین فرض می‌شود که تهاجم اطراف عصبی به عدم تمایز سلول‌های تومورال مربوط باشد و بنابراین احتمالاً با پیش‌آگهی ضعیف‌تر این تومورها همراه است. با این وجود، مکانیسم تهاجم اطراف عصبی در تومورهای غدد بزاقی و غیر غدد بزاقی یکسان به نظر می‌رسد و بیشتر از طریق اتصال هموفیلیک سلول‌های تومورال به سلول‌های شوان غلاف عصبی می‌باشد، البته در صورتی که سلول‌های تومورال دارای خصوصیات دیسپلاستیک باشند. لذا چنین خصوصیتی فقط در مورد تومورهای بدخیم صادق است، وگرنه در بعضی تومورهای خوش‌خیم بزاقی و غیر بزاقی نیز ممکن است مارکرهای عصبی مثبت باشند ولی تهاجم عصبی واقعی معمولاً روی نمی‌دهد، چون سلول‌ها فاقد خصوصیات دیسپلاستیک هستند.

طرح تحقیقاتی را بر عهده داشتند، قدردانی و سپاسگزاری
گردد.

فرزانه محمودی کارشناس آزمایشگاه آسیب شناسی دهان
دانشکده دندانپزشکی اصفهان و نیز معاونت محترم
پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که پشتیبانی مالی

منابع

1. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. St. Louis: Mosby Co; 2004. P. 7-20, 37-73.
2. Campbell JB, Crocker J, Sheno PM. S-100 protein localization in minor salivary gland tumors: An aid to diagnosis. *J Laryngol Otol* 1988; 102(10): 905-8.
3. Curran AE, White DK, Damm DD, Murrah VA. 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 Radio Endod* 2001; 91(2): 194-9.
4. Perschbacher K, Jackson-Boeters L, Daley T. The adhesion molecules NCAM, HCAM, PECAM-1 and ICAM-1 in normal salivary gland tissues and salivary gland malignancies. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(4): 230-6.
5. Toth AA, Daley TD, Lampe HB, Stitt L, Veinot L. Schwann cell differentiation of modified myoepithelial cells within adenoid cystic carcinomas and polymorphous low-grade adenocarcinomas: Clinicopathologic assessment of immunohistochemical staining. *J Otolaryngol* 1996; 25(2): 94-102.
6. Gandour-Edwards R, Kapadia SB, Barnes L, Donald PJ, Janecka IP. Neural cell adhesion molecule in adenoid cystic carcinoma invading the skull base. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117(5): 453-8.
7. McLaughlin RB Jr, Montone KT, Wall SJ, Chalian AA, Weinstein GS, Roberts SA, et al. Nerve cell adhesion molecule expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: A predictor of propensity toward perineural spread. *Laryngoscope* 1999; 109(5): 821-6.
8. Vural E, Hutcheson J, Korourian S, Kechelava S, Hanna E. Correlation of neural cell adhesion molecules with perineural spread of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122(5): 717-20.
9. Hutcheson JA, Vural E, Korourian S, Hanna E. Neural cell adhesion molecule expression in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2000; 110(6): 946-8.
10. Van der Wal JE, Snow GB, van der Waal I. Intraoral adenoid cystic carcinoma. The presence of perineural spread in relation to site, size, local extension and metastatic spread in 22 cases. *Cancer* 1990; 66(9): 2031-3.
11. Thurairaja R, Macfarlane J, Iles R, Persad R, Bahl A. Does perineural invasion result in early bone metastases in prostate cancer. *Proceedings of the prosthate cancer symposium; 2006 feb 24-26; USA; Sanfrancisco*: 159.
12. Franca CM, Jaeger MM, Jaeger RG, Araujo NS. The role of basement membrane proteins on the expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in an adenoid cystic carcinoma cell line. *Oral Oncol* 2000; 36(2): 248-52.
13. Kowalski PJ, Paulino AF. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: It's causation / promotion by brain-derived neurotrophic factor. *Hum Pathol* 2002; 33(9): 933-6.
14. Sun MY, Chen W, Yang LJ, Dong SZ. Coexpression of Schwann cell marker GFAP and myoepithelial cell marker alpha-SMA in salivary adenoid cystic carcinoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2006; 41(8): 461-3.
15. Luo XL, Sun MY, Lu CT, Zhou ZH. The role of Schwann cell differentiation in perineural invasion of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35(8): 733-9.
16. Shang J, Sheng L, Wang K, Shui Y, Wei Q. Expression of neural cell adhesion molecule in salivary adenoid cystic carcinoma and its correlation with perineural invasion. *Oncol Rep* 2007; 18(6): 1413-6.
17. Neville B, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2008. P. 453-507.
18. Jordan RC, Daniels TE, Greenspan JS, Regezi JA. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: Immunohistochemical and immunofluorescent methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93(1): 56-74.

19. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. 1st ed. New York: Churchill Livingstone; 2002. P. 3-43.
20. Regezi JA, Zarbo RJ, Batsakis JG. Immunoprofile of mucoepidermoid carcinomas of minor salivary glands. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71(2): 189-92.
21. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2008. P. 179-215.
22. Kumar V, Fausto N, Abbas A. Robbins & Cotrain Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2004. P. 309-13.
23. Gnepp DR. Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck: Expert Consult. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2009. P. 471-6, 482-6.
24. Deyhimi P, Mahzooni P, Torabinia N. Study of myoepithelial cell markers in pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. Dental Researc Journal 2006; 3(2): 92-9.

Archive of SID