

بررسی ارتباط میان میزان بروز E-cadherin و β -catenin با درجه‌ی آسیب‌شناختی بافت کارسینوم سلول سنگفرشی

پرویز دیهیمی*، بابک کریمی**

* دانشیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، اصفهان، ایران
** استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اهواز، اهواز، ایران

چکیده

بیان مساله: E-cadherin، مولکول چسبندگی میان سلولی است که وظیفه‌ی اتصال سلول به سلول را در اپی‌تلیوم بر عهده دارد. β -catenin یک پروتئین سیتوپلاسمی است که در سیستم اتصال، E-cadherin را به سیتواسکلتون متصل می‌سازد. نخستین گام در نفوذ سلول‌های سرطانی به بافت‌های مجاور و یا ایجاد متاستاز کاهش چسبندگی میان سلول‌های تومورال است.

هدف: هدف از این پژوهش، تعیین ارتباط میان درجه‌های تمایز گوناگون SCC با میزان بروز نشانگرهای یاد شده و نیز ارتباط بروز این نشانگرها با یکدیگر بود.

مواد و روش: مقاطع ۶۰ نمونه از بلوک‌های پارافینی ثابت شده با فرمالین شامل ۲۰ عدد مربوط به SCC با تمایز خوب، ۲۰ عدد مربوط به SCC با تمایز متوسط و ۲۰ عدد مربوط به SCC با تمایز ضعیف جهت تعیین بروز مولکول‌های E-cadherin و β -catenin به روش ایمونوهیستوشیمیایی رنگ‌آمیزی گردید. جهت واکاوی آماری داده‌ها از آزمون‌های کروسکال والیس (Kruskal-wallis)، مان ویتنی (Mann-whitney) و ویلکسون (Wilcoxon) استفاده شد.

یافته‌ها: بروز هر یک از نشانگرهای E-cadherin و β -catenin در درجه‌های تمایز گوناگون SCC، از نظر آماری تفاوت معنادار نشان داد ($p < 0/001$)، اما مقایسه‌ی بروز دو نشانگر یاد شده به تفکیک درجه‌های تمایز، تفاوت معنادار نداشت ($p > 0/05$). هر چند بی در نظر گرفتن درجه‌ی تمایز تومور، به گونه‌ی کلی میزان بروز β -catenin تفاوت معنادار با E-cadherin نشان داد ($p = 0/015$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش بیانگر این بود که با ضعیف‌تر شدن درجه‌ی تمایز SCC، بروز E-cadherin و β -catenin نیز کاهش یافت. همچنین، کاهش بروز نشانگرهای E-cadherin و β -catenin با یکدیگر متناسب بود، گرچه به گونه‌ی کلی بی در نظر گرفتن درجه‌ی تمایز میزان بروز β -catenin نسبت به E-cadherin کمتر گزارش شد.

واژگان کلیدی: E-cadherin، β -catenin، کارسینوم سلول سنگفرشی، درجه‌ی تمایز آسیب‌شناختی

درآمد

سلول‌های اپی‌تلیالی، انسجام و یکپارچگی خود را به وسیله‌ی ملکول‌های چسبندگی سلول‌ها حفظ می‌کنند^(۱). سلول‌های اپی‌تلیال با یکدیگر و غشای پایه‌ی زیرین به انحاء مختلف متصل می‌شوند که در این میان ملکول‌های بسیاری دخیل هستند که خانواده‌ی کادهرین‌ها و کاتنین‌ها از آن دسته هستند. کادهرین‌ها، پروتئین‌های اتصالی میان غشایی وابسته به کلسیم هستند که E-cadherin جزو آنها به شمار می‌رود^(۲). E-Cadherin، یک گلیکو پروتئین میان غشایی وابسته به کلسیم با وزن مولکولی ۱۲۴ کیلو/دالتون (kd) است که وظیفه‌ی اتصال سلول به سلول را در اپی‌تلیوم بر عهده دارد^(۳-۵). کاتنین‌ها، پروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند که در سیستم اتصال، کادهرین‌ها را به سیتواسکلتون متصل می‌سازند^(۶). β -catenin، یک پروتئین سیتوپلاسمیک با وزن مولکولی ۹۲ کیلو/دالتون بوده که در اتصالات میان سلولی، حلقه‌ی اتصال میان E-Cadherin و استخوان درون سلولی یا فیلامنت اکتین است^(۷). در سلول‌های طبیعی، β -catenin نه تنها همراه با کادهرین‌ها بوده، بلکه همراه با کمپلکس چند پروتئینی آدنوماتوز پولیپوزیس کولی (APC) است^(۸).

نخستین گام در نفوذ سلول‌های سرطانی به بافت‌های پیرامون و یا ایجاد متاستاز، کاهش چسبندگی میان سلول‌های تومورال است^(۶). از آنجا که در خلال امبریونز و نیز ترمیم و بهبودی بافت به دنبال ایجاد زخم، کاهش بروز E-cadherin دیده می‌شود، این مولکول را به عنوان سرکوب کننده‌ی تهاجم (Invasion suppressor) نامیده‌اند^(۲). به این ترتیب این فرضیه مطرح می‌شود که شاید در تهاجم بافت تومورال به بافت‌های پیرامون این مولکول دخالت داشته باشد^(۹). به علت ارتباط مستقیم E-cadherin و β -catenin در ساختار اتصال میان سلولی ممکن است تغییر در یکی باعث ایجاد تغییر در دیگری گردد^(۱۰).

کارسینوم سلول سنگفرشی (Squamous cell carcinoma) یا SCC، ۳ درصد از کل بدخیمی‌های بدن و بیشتر از ۹۰ درصد بدخیمی‌های دهان را تشکیل می‌دهد^(۱۰). در حقیقت، زمانی که سلول‌های دیسپلاستیک سنگفرشی در ناحیه‌ی اپی‌تلیوم آسیب از غشای پایه گذر کرده و به بافت همبندی زیرین تهاجم پیدا کند، به آن آسیب SCC گفته می‌شود^(۱۱). چنان که گفته شد این تهاجم به ایجاد گسستگی میان سلول‌های اپی‌تلیال نیاز دارد. روند جدا شدن سلول‌های تومورال از اپی‌تلیال مجاور خود و رفتار تهاجمی

آن همچنان ناشناخته باقی مانده است. در این پژوهش، از طریق آزمایش‌های ایمنو‌هیستوشیمیایی، بروز مولکول‌های E-cadherin و β -catenin در SCC با درجه‌ی تمایزهای متفاوت بررسی و ارتباط آن با درجه‌ی تمایز آنها تعیین شد. همچنین ارتباط بروز دو نشانگر یاد شده با یکدیگر بررسی گردید. با توجه به این که SCC‌های استفاده شده در بررسی کنونی از نواحی گوناگون دهان و بیرون دهان بودند، پژوهش کنونی با هدف بررسی بود یا نبود ارتباط مستقیم میان تمایز نداشتن و بروز مولکول‌های E-cadherin و β -catenin و این که آیا می‌توان تنها بر پایه‌ی یافته‌های ایمنو‌هیستوشیمیایی و آسیب‌شناختی بافت، ارتباط میان درجه‌بندی آسیب‌شناختی بافت تومور و بروز مولکول‌های اتصالی را برقرار نمود یا خیر، انجام گردید.

مواد و روش

بررسی انجام شده، گذشته‌نگر و از گونه‌ی توصیفی-تحلیلی بود. بر پایه‌ی پژوهش‌های پیشین و مشاوره‌ی آماری، شمار ۲۰ نمونه برای هر درجه آسیب‌شناختی بافت SCC تعیین گردید. بنابراین، با استفاده از بایگانی بخش آسیب‌شناسی دانشکده‌ی دندانپزشکی، بیمارستان الزهرا و بیمارستان کاشانی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و بررسی اسلایدهای میکروسکوپی، شمار زیادی نمونه انتخاب شد. سپس، برش‌های جدیدی به ضخامت ۳ تا ۴ میکرومتر برای رنگ‌آمیزی H & E به منظور تایید تشخیص‌های قبلی و اطمینان از کافی بودن نمونه‌ها به عمل آمد. همچنین، درجه‌ی تمایز این نمونه‌ها بر پایه‌ی دو سیستم طبقه‌بندی Broder^(۱۲) و Bryne^(۱۳)، دوباره تعیین و روایی آنها با یکدیگر مهار گردید. بر این پایه، شمار ۶۰ نمونه از بلوک‌های پارافینی، ۲۰ عدد مربوط به SCC با تمایز خوب، ۲۰ عدد مربوط به SCC با تمایز متوسط و ۲۰ عدد مربوط به SCC با تمایز ضعیف گردآوری شد. از بافت طبیعی پیرامون تومور که شامل پوشش اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی بود، به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. افزون بر آن، شمار ۵ نمونه شاهد از آسیب‌های تحریکی لته فراهم گردید.

- معیارهای انتخاب نمونه یا ورود به بررسی بر این پایه بودند:
- ۱- تومور، آغازین باشد.
 - ۲- خصوصیات آسیب‌شناختی بافت تیپیک SCC را دارا باشد.

این مجموعه در مایکروویو ۷۵۰ وات ناسیونال ساخت ژاپن برای برگرداندن ساختمان مولکولی آنتی‌ژن‌ها به حالت طبیعی قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در آغاز آنها به محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) منتقل شده و سپس در پراکسید هیدروژن ۳ درصد جهت متوقف کردن فعالیت پراکسید از اندوژن انکوبه گردیدند. پس از آن، به منظور رنگ پذیری بهتر با آنزیم تریپسین (PH= ۷/۳) ۱ درصد تریپسین) انکوبه شدند. پس از شست و شوی نمونه‌ها با محلول PBS به منظور جلوگیری از رنگ‌آمیزی کاذب در زمینه، از محلول پروتئین بلوک (Protein Block (RE7102)) استفاده گردید. سپس، لام‌ها به مدت یک ساعت در محلول آنتی‌بادی قرار داده شدند.

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده شامل E-cadherin [Lyophilised Monoclonal (NCL-E-Cad) clone 36B5] و [Lyophilised Monoclonal (NCL-B-CAT) Clone -catenin و 17 C2]β ساخت شرکت نووکاسترا (Novocastra) آلمان بودند که با رقت ۱:۵۰ استفاده شدند. پس از طی شدن زمان لازم و شست و شو با PBS، لام‌ها در محلول پست پرایمری (Post primary Block) (RE 7111) که آنتی‌بادی ثانویه بود، قرار گرفتند. در گام بعد، پس از شست و شو با محلول PBS، لام‌ها در محلول نوولینک پلیمر (Novolink Polymer) (RE7112) که نسبت به روش بیوتین استرپتاویدین شناخته شده حساس‌تر است، قرار گرفته و دوباره با محلول PBS شست و شو داده شدند. در نهایت نمونه‌ها در کروموزن دی آمینو بنزیدین (DAB) رقیق شده، انکوبه گردیده و سپس با آب مقطر شست و شو داده شدند. پس از آن، همه‌ی نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین به منظور رنگ‌آمیزی مناسب زمینه رنگ‌آمیزی گردیدند. در مرحله‌ی نهایی، نمونه‌ها در الکل با درجه‌های گوناگون به منظور آب‌گیری و سپس گزینول به منظور شفاف‌سازی قرار داده و در نهایت با P.V.mount مانت شدند.

در طی پژوهش، از شاهد منفی که در آن به جای آنتی‌بادی از سرم استفاده می‌شود و شاهد مثبت که در آن از نمونه‌هایی که به طور طبیعی مثبت می‌گردند، همچون پوشش اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی پیرامون تومور و نیز آسیب‌های حرکتی لته استفاده شد.

ارزیابی نمونه‌ها

نمونه‌ها توسط دو آسیب‌شناس با میکروسکوپ المپیوس

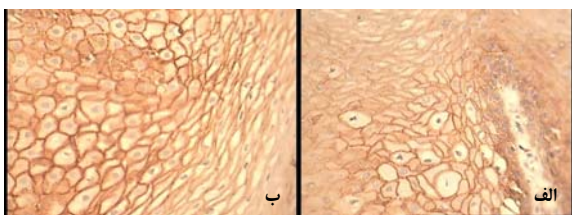
۳- فیکسسیون بافت مطلوب و کافی باشد.
 ۴- نمونه‌ی مورد نظر، دارای بافت تومورال و طبیعی باشد تا از قسمت طبیعی آن به عنوان شاهد داخلی استفاده گردد.
 ۵- نمونه‌ها بدون نکروز، التهاب و خونریزی فراوان باشند.
 ۶- نمونه‌ها تا جایی که ممکن است، بزرگ بوده و به تازگی برداشته شده باشند.
 معیارهای کنار گذاشته شدن از بررسی، بر این پایه بودند:

۱- تومور، ثانویه باشد.
 ۲- تومور، دارای خونریزی و نکروز و التهاب فراوان باشد.
 ۳- نمونه‌ها کوچک باشد، به گونه‌ای که بافت کافی برای بررسی ایمونوهیستوشیمی وجود نداشته باشد.
 از ۶۰ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی آغازین، ۳۸ مورد مذکر و ۲۲ مورد مونث بودند. دامنه‌ی سنی نمونه‌ها ۲۲ تا ۸۳ سال با میانگین سنی ۶۰/۲۴ بود. شایع‌ترین جا در حفره‌ی دهان، مخاط آلتولار و زبان بود که هر یک ۱۳ مورد را در بر می‌گرفتند. پس از آنها، مری ۱۱ مورد، مخاط باکال یا گونه ۷ مورد، پوست ۴ مورد، حنجره ۳ مورد، کف دهان ۳ مورد، سینوس ماگزیلاری ۲ مورد، استخوان آلتولار ۱ مورد و ریه ۱ مورد بودند. ضمن اینکه اطلاعات مربوط به جای آسیب در مورد دو بیمار در پرونده‌ی آنها آورده نشده بود. با توجه با اینکه پژوهش کنونی یک بررسی صد در صد آسیب‌شناختی بافت بود، SCC‌ها از نواحی گوناگون دهان و نیز نواحی پیرامون دهان برای بررسی استفاده شدند.
 پس از انتخاب بلوک‌های پارافینی مناسب برای هر درجه آسیب‌شناختی SCC و نیز بلوک‌های شاهد از آسیب‌های تحریکی لته، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به منظور تشخیص آنتی‌ژن‌های E-cadherin و β-catenin انجام شد.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

در این پژوهش از Biotin- streptavidin Novolink polymer Detection system به علت حساسیت و دقت بالای آن نسبت به دیگر روش‌ها استفاده شد که مراحل اصلی آن بر این پایه بود: پس از فراهم نمودن مقاطع به ضخامت ۳ تا ۴ میکرومتر از بلوک‌های پارافینی و قراردادن برش‌ها روی لام‌های میکروسکوپیک آغشته به Poly-L-Lysin، مراحل پارافین زدایی و آب دهی دوباره (Rehydration) انجام شد. سپس به منظور ثابت کردن آنتی‌ژن‌ها، نمونه‌ها در محلول بافر سترات قرار داده شد و

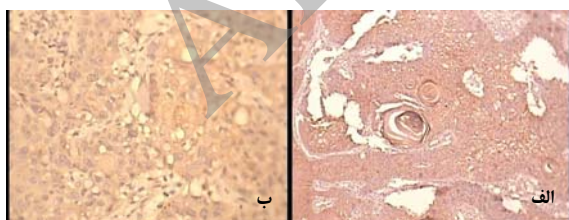
نشانگر در سیتوپلاسم و هسته‌ی سلول‌های اپی‌تلیوم در لایه‌های رنگ گرفته گزارش شد (نگاره‌ی ۱).



نگاره‌ی ۱ الف الگوی بروز E-cadherin در مخاط طبیعی دهان با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر **ب** الگوی بروز β -Catenin در مخاط طبیعی دهان با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

الگوی بروز E-cadherin در SCC خوب تمایز یافته

در بررسی ۲۰ نمونه SCC خوب تمایز یافته، رنگ‌پذیری نشانگر از نظر بروز مکانی آن در سلول‌های تومورال، در همه‌ی نمونه‌ها به صورت غشایی-سیتوپلاسمی بود که دارای نمره‌ی ۲ شدند. بروز نشانگر از نظر بود و نبود یکنواختی نیز به این ترتیب بود که ۱۳ مورد رنگ‌آمیزی غیر یکنواخت (دارای نمره‌ی ۱) و تنها ۷ مورد یکنواخت (دارای نمره‌ی ۲) شدند. همچنین از نظر درصد رنگ‌پذیری در همه‌ی نمونه‌های این گروه، بالای ۷۵ درصد سلول‌های تومورال نشانگر را بروز دادند (دارای نمره‌ی ۳). نمودارهای ۱، ۲ و ۳ توزیع فراوانی عوامل بالا را در مورد E-cadherin در هر سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهند. در نهایت با توجه به مجموع نمره‌های به دست آمده در این گروه، همه‌ی نمونه‌ها نمره‌ی بالای ۵ دریافت نموده و از نظر آماری مشخص شد که بروز E-cadherin به گونه‌ی معنادار از نظر آماری حفظ شده (Preserved) بود (نگاره‌ی ۲).



نگاره‌ی ۲ الف بروز E-cadherin در SCC خوب تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر **ب** بروز E-cadherin در SCC خوب تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

الگوی بروز E-cadherin در SCC متوسط تمایز یافته

طی بررسی ۲۰ نمونه SCC متوسط تمایز یافته، رنگ‌پذیری نشانگر از نظر بروز مکانی آن در سلول‌های تومورال در همه‌ی موارد به صورت غشایی-سیتوپلاسمی (دارای نمره‌ی ۲) بود.

الگوی CX21F51 بررسی و بر پایه‌ی معیارهای تعریف شده‌ی زیر ارزیابی گردیدند. در آغاز واکنش ایمنی هر یک از نشانگرها در گروه‌های گوناگون بررسی شد که نمره‌بندی آن بر پایه‌ی روش معرفی شده توسط باگوتی (Bagotti)، کایور (Kaur)، تاناکا (Tanaka)، لویز (Lopez) و محتشم بود (۱، ۳، ۱۷-۱۵).

نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده جهت تعیین نمره، از نظر جای بروز نشانگر در سلول، بود و نبود یکنواختی و درصد رنگ‌آمیزی بررسی شدند. به گونه‌ی متوسط، ۱۰ میدان میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر بررسی و در هر میدان، ۱۰۰ سلول شمارش گردیدند. شمار سلول‌های رنگ گرفته در ۱۰۰۰ سلول مشخص و بر آن پایه، درصد سلول‌های مثبت ارزیابی شد. از نظر جای بروز، رنگ‌آمیزی محدود به غشای سلول نمره‌ی ۳، رنگ‌آمیزی غشایی-سیتوپلاسمی نمره‌ی ۲، سیتوپلاسمی نمره‌ی ۱ و نبود بروز برابر صفر در نظر گرفته شد.

بروز یکنواخت (هموژن) نمره‌ی ۲، بروز غیر یکنواخت (هتروژن) نمره‌ی ۱ و نبود بروز برابر صفر منظور شد. همچنین، چنانچه بیشتر از ۷۵ درصد سلول‌ها رنگ گرفتند نمره‌ی ۳، میان ۵۰ تا ۷۵ درصد نمره‌ی ۲، میان ۲۵ تا ۵۰ درصد نمره‌ی ۱ و کمتر از ۲۵ درصد معادل صفر در نظر گرفته شد. با توجه به معیارهای عددی بالا در مورد هر نمونه، ارقام سه‌گانه را جمع کرده و چنانچه حاصل جمع برابر ۶ یا ۷ باشد به عنوان حفظ معیارهای طبیعی رنگ‌پذیری (Preservation) و چنانچه برابر ۵ یا کمتر از آن بود به عنوان تغییر بروز (Alteration) به شمار رفتند.

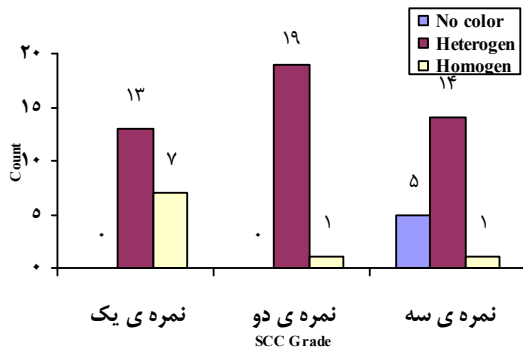
آزمون‌های آماری

ارتباط میان بروز نشانگر E-cadherin و نیز β -catenin در درجه‌های تمایز گوناگون آسیب‌شناختی بافت تومور با آزمون‌های آماری کروسکال-والیس و مان ویتنی ارزیابی گردید. همچنین مقایسه‌ی دو نشانگر بالا با یکدیگر در گروه‌های گوناگون توسط آزمون آماری ویلکسون انجام شد.

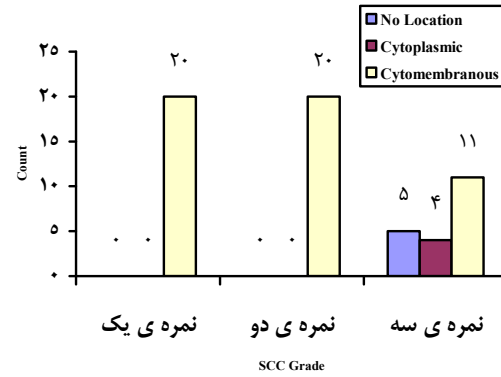
یافته‌ها

الگوی بروز E-cadherin و β -Catenin در مخاط طبیعی دهان

در بافت اپی‌تلیالی طبیعی رنگ‌پذیری هر دو نشانگر در غشای سلول‌های لایه‌ی بازال، پارابازال و لایه‌ی خاردار شدت زیاد نشان داد، در حالی که در لایه‌ی کراتینیزه نبود کامل رنگ‌پذیری آشکار بود. ضمن اینکه نبود بروز یا بروز کم هر دو



نمودار ۲ توزیع فراوانی بروز E-cadherin از نظر بود و نبود یکنواختی در سه درجه‌ی بافت شناختی SCC



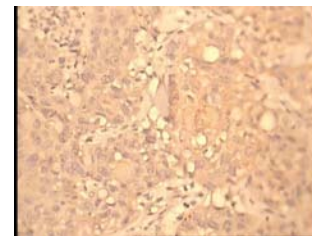
نمودار ۱ توزیع فراوانی بروز مکانی E-cadherin در سه درجه‌ی بافت‌شناختی

با توجه به مجموع نمره‌های به دست آمده در این گروه بروز E-cadherin در ۸ مورد حفظ شده و در ۱۲ مورد تغییر یافته (altered) بود و در نهایت مشخص گردید که بروز E-cadherin در این گروه به گونه‌ی معنادار از نظر آماری کاهش پیدا می‌کند. ضمن انجام آزمون تکمیلی مان ویتنی دیده شد که بروز نشانگر در این گروه نسبت به گروه خوب تمایز یافته از نظر آماری کاهش معنادار نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

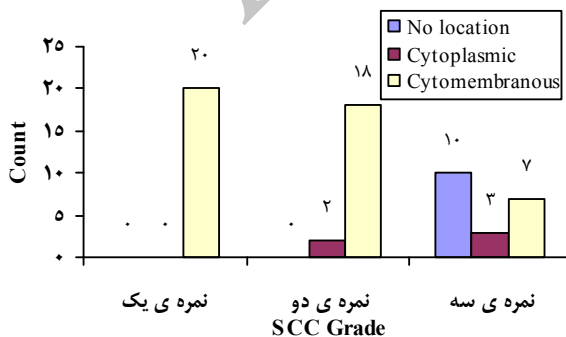
الگوی بروز E-Cadherin در SCC ضعیف تمایز یافته

طی پژوهشی بر روی ۲۰ نمونه SCC ضعیف تمایز یافته جهت بررسی رنگ‌پذیری نشانگر از نظر مکانی آن در سلول‌های تومورال، ۱۱ مورد رنگ‌آمیزی غشایی- سیتوپلاسمی (دارای نمره ی ۲)، ۴ مورد رنگ‌آمیزی سیتوپلاسمی (دارای نمره ی ۱) و ۵ مورد نبود کامل رنگ‌پذیری را (دارای نمره ی صفر) نشان دادند. افزون بر این، از نظر بود و نبود یکنواختی بروز نشانگر در سلول‌های تومورال دیده شد که همه‌ی موارد به جز یک مورد که

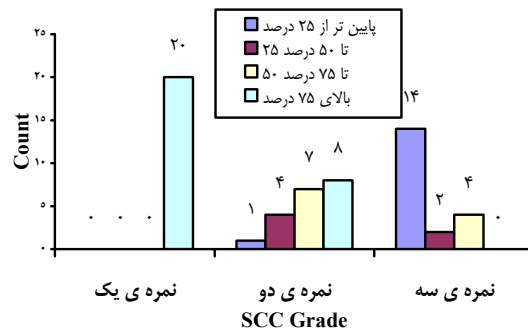
همچنین از نظر بود و نبود یکنواختی بروز نشانگر، ۱۹ مورد رنگ‌پذیری غیر یکنواخت (دارای نمره ی ۱) و تنها یک مورد رنگ‌پذیری یکنواخت (دارای نمره ۲) را نشان دادند. ضمن اینکه درصد رنگ‌پذیری ۸ مورد از نمونه‌ها بالای ۷۵ درصد (دارای نمره ی ۳)، ۷ مورد میان ۵۰ تا ۷۵ درصد (دارای نمره ی ۲)، ۴ مورد میان ۲۵ تا ۵۰ درصد (دارای نمره ی ۱) و تنها ۱ مورد زیر ۲۵ درصد (دارای نمره ی صفر) بود (نگاره ی ۳). نمودارهای ۱، ۲ و ۳ توزیع فراوانی عوامل بالا را در مورد E-cadherin در هر سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهند.



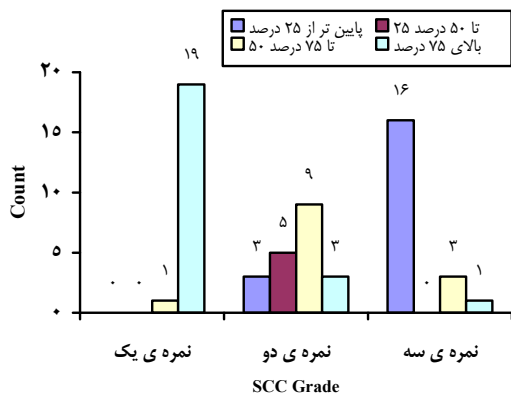
نگاره‌ی ۳ بروز E-cadherin در SCC متوسط تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر



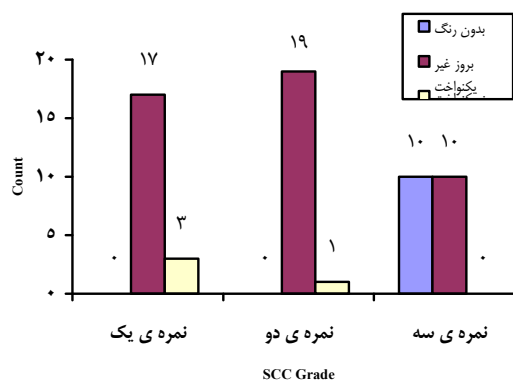
نمودار ۴ توزیع فراوانی بروز مکانی beta-Catenin در سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC



نمودار ۳ توزیع فراوانی بروز E-cadherin از نظر درصد رنگ‌پذیری در سه درجه‌ی بافت شناختی SCC



نمودار ۶ توزیع فراوانی بروز β -Catenin از نظر درصد رنگ پذیری در سه درجه‌ی بافت شناختی SCC

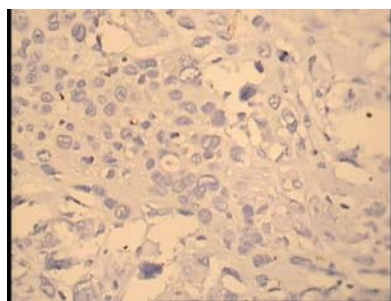


نمودار ۵ توزیع فراوانی بروز E-cadherin از نظر نبود و نبود یکنواختی در سه درجه‌ی بافت شناختی SCC

آزمون آماری کروسکال والیس نشان داد که از نظر بروز مکانی، بود و نبود یکنواختی و نیز درصد رنگ‌پذیری میان درجه‌های گوناگون بافت‌شناختی SCC تفاوت معنادار وجود دارد ($p < 0/001$). در تکمیل آن، آزمون آماری مان‌ویتنی نشان داد که بروز E-cadherin از نظر مکانی تفاوت معنادار ندارد ($p = 1/00$)، اما در بود و نبود یکنواختی بروز و نیز درصد رنگ‌پذیری از نظر آماری تفاوت معنادار وجود دارد (به ترتیب $p = 0/019$ و $p < 0/001$). همچنین، آزمون مان‌ویتنی نشان داد که میان گروه ۱ و ۳ از نظر بروز مکانی، بود و نبود یکنواختی و درصد رنگ‌پذیری تفاوت معنادار دیده می‌شود ($p < 0/001$) که میان گروه ۲ و ۳ نیز تفاوت معنادار نشان داد ($p < 0/001$)، با این تفاوت که تنها در مورد بود و نبود یکنواختی $p = 0/05$ بود.

الگوی بروز β -Catenin در SCC خوب تمایز یافته

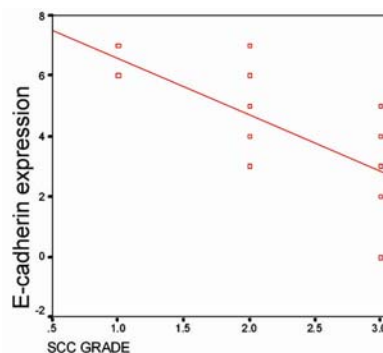
در بررسی ۲۰ نمونه SCC خوب تمایز یافته، رنگ‌پذیری نشانگر از نظر بروز مکانی آن در سلول‌های تومورال نشان داد که در همه‌ی نمونه‌ها رنگ‌پذیری به صورت غشایی-سیتوپلاسمی



نگاره‌ی ۴ بروز E-cadherin در SCC ضعیف تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

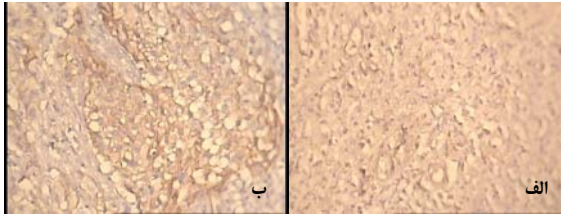
بروز یکنواخت نشان داد (دارای نمره‌ی ۲). بروز غیر یکنواخت (دارای نمره‌ی ۱) داشتند. بررسی درصد رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال در این گروه نشان داد که ۴ مورد میان ۵۰ تا ۷۵ درصد (دارای نمره‌ی ۲)، ۲ مورد میان ۲۵ تا ۵۰ درصد (دارای نمره‌ی ۱)، ۱۴ مورد کمتر از ۲۵ درصد (دارای نمره‌ی صفر) رنگ گرفتند (نگاره‌ی ۴).

نمودارهای ۱، ۲ و ۳ توزیع فراوانی عوامل بالا را در مورد E-cadherin در هر سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهند. مجموع نمره‌های گرفته شده در این گروه نشان داد که بروز E-cadherin در SCC ضعیف تمایز یافته در همه‌ی نمونه‌ها دچار تغییر (Altered) شده و این تغییر از نظر آماری معنادار است. انجام آزمون مان‌ویتنی نشان داد، که بروز این نشانگر در گروه ضعیف تمایز یافته نسبت به هر دو گروه خوب و متوسط تمایز یافته به گونه‌ی معنادار از نظر آماری کاهش می‌یابد ($p < 0/001$). منحنی ۱، ارتباط بروز E-cadherin را با درجه‌های گوناگون بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهد.



منحنی ۱ ارتباط بروز E-cadherin با درجه‌های بافت‌شناختی SCC

تمایز یافته از نظر آماری کاهش معنادار دارد. آزمون مان-ویتنی نشان داد که بروز β -Catenin در این گروه در مقایسه با گروه خوب تمایز یافته از نظر آماری کاهش معنادار دارد ($p < 0/001$).



نگاره‌ی ۶ الف بروز β -Catenin در SCC متوسط تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر
ب بروز β -Catenin در SCC متوسط تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

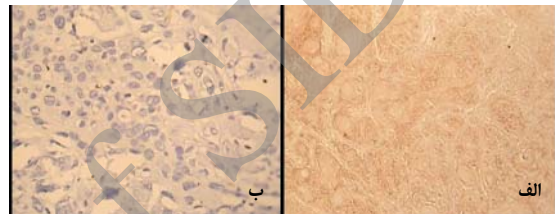
الگوی بروز β -Catenin در SCC ضعیف تمایز یافته

در بررسی ۲۰ نمونه SCC ضعیف تمایز یافته، رنگ‌پذیری نشانگر از نظر بروز مکانی آن در سلول‌های تومورال نشان داد که ۷ نمونه به صورت غشایی-سیتوپلاسمی (دارای نمره‌ی ۲)، ۳ نمونه به صورت سیتوپلاسمی (دارای نمره‌ی ۱) و ۱۰ نمونه نبود رنگ‌پذیری کامل (دارای نمره‌ی صفر) را نشان دادند. بررسی بود و نبود یکنواختی رنگ‌پذیری نمونه‌ها در این گروه بیانگر این بود که ۱۰ نمونه به صورت غیر یکنواخت رنگ گرفتند (دارای نمره‌ی ۱) و ۱۰ نمونه نیز نبود رنگ‌آمیزی را نشان دادند (دارای نمره‌ی صفر). در بررسی درصد رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال نیز ۱ مورد بالای ۷۵ درصد (دارای نمره‌ی ۳)، ۳ مورد میان ۵۰ تا ۷۵ درصد (دارای نمره‌ی ۲) و ۱۶ مورد دیگر کمتر از ۲۵ درصد (دارای نمره‌ی صفر) رنگ گرفته بودند (نگاره‌ی ۷). نمودارهای ۴، ۵ و ۶ توزیع فراوانی عوامل بالا را در مورد β -Catenin در سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهد.

بررسی مجموع نمره‌های گرفته شده نشان داد که بروز نشانگر در همه‌ی نمونه‌ها دچار تغییر شده و این تغییر از نظر آماری معنادار است. آزمون مان-ویتنی نشان داد کاهش بروز β -Catenin در این گروه نسبت به هر دو گروه خوب و متوسط تمایز یافته از نظر آماری معنادار بود ($p < 0/001$). در نهایت، آزمون کروسکال والیس نشان داد که بروز β -Catenin در هر سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC تفاوت معنادار دارد ($p < 0/001$). منحنی ۲ ارتباط میان β -Catenin و درجه‌ی بافت‌شناختی SCC را نشان می‌دهد. آزمون کروسکال-والیس نشان داد که بروز β -Catenin در کل ۶۰ نمونه به تفکیک بروز مکانی، بود و نبود

(دارای نمره‌ی ۲) بوده است. همچنین از نظر بود و نبود یکنواختی رنگ‌پذیری، ۱۷ مورد رنگ‌آمیزی غیر یکنواخت (دارای نمره‌ی ۱) و تنها ۳ مورد رنگ‌آمیزی یکنواخت (دارای نمره‌ی ۲) را نشان دادند. بررسی نمونه‌ها از نظر درصد رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال نشان داد که همه‌ی نمونه‌ها در این گروه بالای ۷۵ درصد از سلول‌ها رنگ گرفتند (نگاره‌ی ۵).

نمودارهای ۴، ۵ و ۶ توزیع فراوانی عوامل بالا را در مورد β -Catenin در سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهد. در نهایت با توجه به مجموع نمره‌های دریافت شده، بروز β -Catenin در همه‌ی نمونه‌های SCC خوب تمایز یافته حفظ شده بود که از نظر آماری نیز معنادار نشان داد.



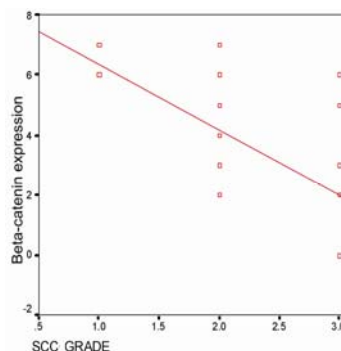
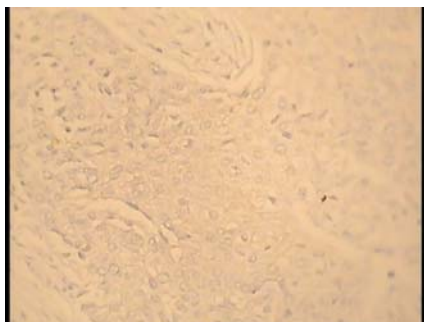
نگاره‌ی ۵ الف بروز β -Catenin در SCC خوب تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر
ب بروز β -Catenin در SCC خوب تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

الگوی بروز β -Catenin در SCC متوسط تمایز یافته

طی بررسی ۲۰ نمونه SCC متوسط تمایز یافته، رنگ‌آمیزی نشانگر از نظر بروز مکانی آن در سلول‌های تومورال بیان‌کننده‌ی این بود که ۱۸ نمونه به صورت غشایی-سیتوپلاسمی (دارای نمره‌ی ۲) و تنها ۲ مورد به صورت سیتوپلاسمی رنگ گرفتند (دارای نمره‌ی ۱). از نظر بود و نبود یکنواختی رنگ‌پذیری نیز همه‌ی نمونه‌ها به صورت غیر یکنواخت (دارای نمره‌ی ۱) رنگ گرفتند. در ارتباط با درصد رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال در نمونه‌های این گروه نتایج به این ترتیب بود که در ۳ نمونه بالای ۷۵ درصد (دارای نمره‌ی ۳)، ۹ نمونه میان ۵۰ تا ۷۵ درصد (دارای نمره‌ی ۲)، ۵ نمونه میان ۲۵ تا ۵۰ درصد (دارای نمره‌ی ۱) و ۳ نمره نیز زیر ۲۵ درصد سلول‌ها (دارای نمره‌ی صفر) رنگ گرفتند (نگاره‌ی ۶).

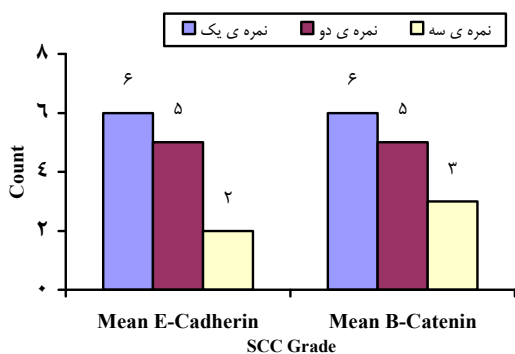
نمودارهای ۴، ۵ و ۶ توزیع فراوانی عوامل بالا را در مورد β -Catenin در سه درجه‌ی بافت‌شناختی SCC نشان می‌دهند.

با توجه به حاصل جمع نمره‌های به دست آمده در هر سه عامل، بروز β -Catenin در ۳ مورد حفظ شده و در ۱۷ مورد تغییر یافته بود که نشان داد بروز این نشانگر در نمونه‌های متوسط



منحنی ۲ ارتباط میان بروز β -Catenin و درجه‌ی بافت‌شناختی SCC

نگاره‌ی ۷ بروز β -Catenin در SCC ضعیف تمایز یافته با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر



نمودار ۷ مقایسه‌ی بروز E-cadherin و β -Catenin در درجه‌های گوناگون بافت‌شناختی SCC

یکنواختی و نیز درصد رنگ‌پذیری به گونه‌ی معنادار کاهش یافته است ($p < 0/001$). آزمون تکمیلی مان-ویتنی در مقایسه با گروه‌های ۱ و ۲ از نظر بروز مکانی و نیز بود و نبود یکنواختی تفاوت معنادار نشان نداد (به ترتیب $p = 0/152$ و $p = 0/298$) در حالی که از نظر درصد رنگ‌پذیری تفاوت معنادار گزارش شد ($p < 0/001$). این آزمون نشان داد که در مقایسه‌ی گروه‌های ۱ و ۳ و همچنین گروه‌های ۲ و ۳ از نظر بروز مکانی، بود و نبود یکنواختی و نیز درصد رنگ‌پذیری تفاوت معنادار از نظر آماری وجود دارد ($p < 0/001$).

مقایسه بین بروز E-cadherin با β -Catenin در SCC‌های خوب، متوسط و ضعیف تمایز یافته

در مقایسه‌ی میان بروز E-Cadherin با β -Catenin در SCC‌های خوب، متوسط و ضعیف تمایز یافته آزمون آماری ویلکسون نشان داد که بروز β -Catenin نسبت به E-Cadherin در نمونه‌ها به تفکیک درجه‌ی بافت‌شناختی تفاوت معنادار ندارد، به این ترتیب که مقایسه‌ی بروز دو نشانگر در گروه خوب تمایز یافته $p = 0/216$ ، گروه متوسط تمایز یافته $p = 0/055$ و در گروه ضعیف تمایز یافته $p = 0/242$ بود. این آزمون نشان داد که بروز β -Catenin نسبت به E-Cadherin در همه‌ی نمونه‌ها بی در نظر گرفتن درجه‌ی بافت‌شناختی به گونه‌ی معنادار از نظر آماری کاهش دارد ($p = 0/015$) (نمودار ۷).

بحث

سلول‌های اپی‌تلیالی توسط یک کمپلکس اتصالاتی پیچیده به هم متصل هستند و هر روند بدخیمی در این سلول‌ها مستلزم گسستن این کمپلکس اتصالاتی و تهاجم آنها به بافت همبند زیرین است. بنابراین فرضیه‌ای مطرح می‌گردد که هر چه بروز

مولکول‌های درگیر در این کمپلکس اتصالاتی کمتر باشد یا بروز آنها نا به جا باشد احتمال تهاجم سلول‌های اپی‌تلیالی بدخیم بیشتر می‌شود. فرضیه‌ی دیگری که مطرح می‌گردد این است که هر چه سلول‌های کارسینومایی، آنتی‌بیک‌تر یا پلئومورفیک‌تر باشند، شباهت کمتری به سلول‌های منشا مادری نشان می‌دهند (نشان‌دهنده‌ی درجه‌ی بدخیمی بالاتر آنهاست) که از جمله خصوصیات همانند نبودن به سلول‌های مادری، ضعف یا نبود بروز یا نا به جایی بروز مولکول‌های اتصالاتی در آنهاست. بر این پایه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که هر چه درجه‌ی بدخیمی سلول‌های کارسینومایی بالاتر باشد، بروز این مولکول‌های اتصالاتی در آنها کمتر یا نا به جاتر است و حتی در موارد بدخیمی بسیار شدید، بروز نداشتن آنها آشکار است. همین دو فرضیه پایه‌ی پژوهش کنونی را تشکیل می‌دهند و علت اصلی این موضوع که چرا تنها بررسی آسیب‌شناختی بافت محض بی در نظر گرفتن عوامل گوناگون موثر دیگر در پیش‌آگهی همچون سن، جنس، محل، اندازه، درگیری غدد لنفی و متاستاز دور دست انجام گرفت، مشخص می‌گردد. البته بررسی SCC‌های دهان به تنهایی، در درجه‌های آسیب‌شناختی بافت گوناگون به

شمار مورد نیاز، هر چند مطلوب به نظر می‌رسد ولی بسیار دشوار بوده و در غیر این صورت غیرممکن است. چون بیشتر SCCهای دهان، خوب تمایز یافته و به میزان کمتر، متوسط تمایز یافته هستند و موارد ضعیف تمایز یافته نادر هستند. این نکته را نیز باید در نظر داشت که گرچه محل SCC در پیش آگهی موثر بوده، ممکن است در نواحی غیر قابل دسترس‌تر همچون سینوس و ریه، دیرتر تشخیص داده شده و در نتیجه در درجه‌های آسیب‌شناختی بافت بالاتر تشخیص داده می‌شوند و به همان دلیل وارد بررسی کنونی می‌گردند. از سویی دیگر، با توجه با اینکه در درجه‌بندی آسیب‌شناختی بافت، از دو معیار آسیب‌شناختی بافت Broder و Bryne استفاده گردید تا درجه‌بندی دقیق‌تر انجام شود و نیز با توجه با اینکه در درجه‌بندی Bryne، معیار درجه‌بندی، جبهه‌ی تهاجم تومور است که بر پایه‌ی بررسی‌های انجام شده، بیشتر از درجه‌بندی متعارف Broder با مرحله‌ی بالینی تومور همخوانی دارد، بنابراین با دقت زیادی که در درجه‌بندی تومور بر پایه‌ی معیارهای Bryne به روش کمی انجام شد و هر درجه‌بندی متعارف Broder، دوباره با معیارهای Bryne مورد بررسی دقیق‌تر کمی قرار گرفت، کوشش فراوانی به کار رفت تا متغیرهای مخدوش کننده‌ی بالینی و محل از میان برداشته شوند.

هدف از این پژوهش این بود که آیا می‌توان تنها بر پایه‌ی یافته‌های آسیب‌شناختی بافت و ایمونوهیستوشیمی، ارتباط میان درجه‌بندی آسیب‌شناختی بافت تومور و بروز مولکول‌های اتصالاتی را برقرار نمود یا خیر. از میان مولکول‌های اتصالاتی، دو مولکول E-cadherin و β -catenin بیشتر مطرح بودند که در این زمینه نیز بررسی‌های بسیار گسترده‌ای انجام گرفته است. به نظر می‌رسد که E-cadherin به عنوان یک سرکوب کننده‌ی تومور، ایفای نقش کرده و باعث ممانعت از تهاجم و متاستاز می‌شود.^(۹) پیامد جهش در ژن E-cadherin استعداد ابتلا به کارسینوم هاست^(۱۸). افزون بر این، روند متیلاسیون باعث بروز پایین این مولکول شده و برخی بررسی‌ها بیانگر این است که میان شمار بسته‌های سیگار مصرف شده طی یک سال و متیلاسیون E-cadherin در SCCهای سر و گردن ارتباط وجود دارد^(۱۹ و ۲۰).

β -catenin افزون بر این که در اتصالات سلولی نقش مهمی را بازی می‌کند، در هسته‌ی سلول نیز روند انتقال پیام در سلول را تنظیم می‌نماید. β -catenin به گونه‌ی پیوسته به وسیله‌ی فسفوریلاسیون، هنگامی که به یک کمپلکس پروتئینی که شامل

محصول ژن APC است متصل می‌گردد، غیر فعال می‌شود و این نظریه به طور کلی مورد قبول است که عمل کلیدی سرکوب‌گری تومور ژن APC به توانایی آن در جهت بی‌ثبات نمودن β -catenin آزاد مربوط است. بنابراین تجمع و جا به جایی β -catenin ایجاد شده به وسیله‌ی از دست رفتن عمل APC، ممکن است عوامل نسخه‌برداری را فعال نموده و در نهایت تومورزایی را در سرطان کولورکتال و پستان آغاز نماید^(۲۱). در این روند ژن‌های WNT، اثر مهمی بر روی پیشرفت تومور دارند. از آنجا که این ژن‌ها از هر دو مسیر متعارف (Canonical) و غیر متعارف (Non canonical) در تهاجم و متاستاز دخیل هستند، چنین انگاشته می‌شود که β -Catenin نیز که در مسیر متعارف تثبیت شده و به هسته منتقل گردیده است به گونه‌ی غیر مستقیم در این روند دخیل باشد^(۲۲).

پروتئین APC تنظیم رشد سلول را از طریق بی‌ثبات نمودن β -Catenin آزاد و پایین نگاه داشتن سطح آن در سیتوپلاسم بر عهده دارد. β -catenin قادر است از سیتوپلاسم به هسته رفته و در آنجا به واسطه‌ی تعامل با عوامل رونویسی تزايد سلول‌ها را تحریک کند^(۲۱). بنابراین پیشنهاد شده است که الگوی بروز سیتوپلاسمیک β -catenin به جای رنگ‌پذیری غشایی، یک تغییر وابسته به تومور نا به جا بوده که بیشتر از کاهش یا نبود آن در تومورزایی موثر است. موتاسیون ژن APC در کارسینومای دهان یافت شده، اما هیچ اطلاعاتی وجود ندارد که این موتاسیون مربوط به بروز بیشتر از حد β -catenin سیتوپلاسمیک باشد. گرچه هیپرمتیلاسیون ژن APC به صورت یک رویداد شایع در سرطان‌های کولورکتال، مثانه، ریه، پستان و ملانوما یافت شده^(۲۳-۲۲)، اما تنها یک گزارش، متیلاسیون ژن APC را به عنوان پیش برنده‌ی (Promotor) کارسینوم دهان توصیف می‌کند و نشان می‌دهد که بروز نا به جا یا موقعیت غیر طبیعی β -catenin و E-cadherin مستقل از وضعیت متیلاسیون یا موتاسیون‌های ژن APC است که در واقع این مساله را مطرح می‌سازد که ژن‌های وابسته به مسیر WNT نقش بسیار محدودی در SCCهای دهانی بازی می‌کنند^(۲۱). در نتیجه ارتباط مهمی میان درجه‌ی آسیب‌شناختی بافت کارسینوماهای دهان و تغییر ژن APC یافته نشده است. با این وجود نبود هتروزایگوسیتی و هایپرمتیلاسیون ژن APC ممکن است به تجمع β -catenin آزاد در سیتوپلاسم سلول‌های کارسینومای دهانی و به آن وسیله به پیشرفت بدخیمی‌های دهان بینجامد^(۲۱). بر این پایه، نقش β -catenin

ویلیامز (Williams) و محتشم نیز دیده شد (۱۶، ۱۷). هر چند در برخی دیگر از پژوهش‌ها همچون پایو (Pyo)، فریتاس (Freitas) و کاپور گزارش گردید که بروز E-cadherin در گروه خوب و متوسط تمایز یافته از نظر آماری تفاوتی ندارد (۳، ۴، ۳۰).

این اختلاف در نتایج به دست آمده ممکن است به دلیل اختلاف در مراحل عمل‌آوری (Processing) بافتی، تازگی یا کهنگی بلوک‌های پارافینی، روش‌های ایمونوهیستوشیمی به کار رفته در پژوهش‌های گوناگون، شمار موارد بررسی شده و نیز دقت آسیب‌شناس باشد. همان‌گونه که مشخص است هر چه تکنیک IHC پیشرفته‌تر و دقیق‌تر باشد بروز آنتی‌ژن بهتر مشخص شده و هر چه شمار نمونه‌ها بیشتر باشد بیشتر نمایانگر جمعیت جامعه است.

نتایج پژوهش کنونی در مورد بروز E-cadherin در SCCهای ضعیف تمایز یافته بیانگر این بود که در حدود در نیمی از موارد، رنگ آمیزی غشایی-سیتوپلاسمی و در نیم دیگر موارد، رنگ‌آمیزی سیتوپلاسمی و حتی نبود رنگ‌آمیزی است. در ضمن بیشتر نمونه‌های این گروه بروز غیر یکنواخت نشانگر را نشان دادند. همچنین در بیشتر موارد کمتر از ۲۵ درصد سلول‌های تومورال نشانگر را بروز دادند. با در نظر گرفتن همه‌ی عوامل، نتایج به دست آمده تایید کننده‌ی این نکته بود که بروز E-cadherin در SCCهای ضعیف تمایز یافته به گونه‌ی معنادار از نظر آماری کاهش یافته و این کاهش نسبت به دیگر گروه‌ها (خوب و متوسط تمایز یافته) از نظر آماری چشمگیر است. نگاهی کوتاه به دیگر بررسی‌های نشان داد که برخی پژوهش‌ها همچون پژوهش یامادا، تاناکا، هیراتسوکا (Hiratsuka)، باگوتی (Bagutti) و ویلیامز به نتایج همانندی دست یافته‌اند (۱۵، ۱۶، ۳۱). هر چند پایو (Pyo) و شینوهارا (Shinohara) گزارش نمودند که میزان بروز E-cadherin در هر سه درجه‌ی بدخیمی ارتباط معنادار ندارد (۳۹ و ۴۰). اختلاف در نتایج به دست آمده را می‌توان با همان دلایل پیشین که در مقایسه‌ی گروه‌های خوب و متوسط تمایز یافته بیان گردید، توجیه نمود.

با توجه به اینکه با افزایش درجه‌ی بدخیمی، سلول‌های تومورال تمایز کمتری از خود نشان داده و رفتار همانند کمتری نسبت به سلول‌های مادری بروز می‌دهند و همچنین میتوز، پلئومورفیسم بیشتر و تمایل اندک را به تشکیل جزایر تومورال و قرار گرفتن در کنار هم نشان می‌دهند، احتمال اینکه بروز

SCCهای دهان بیشتر در کمپلکس اتصالی مطرح است تا نقش هسته‌ای و پیام‌رسانی آن.

ضعف یا نبود بروز مولکول‌های E-cadherin و β -catenin افزون بر SCC دهان در کارسینوم‌های دیگر نواحی همچون معده، پستان، رکتوم مطرح بوده که در بسیاری موارد نیز نمایه‌ای از تهاجم و متاستاز در این تومورهاست (۲۸-۳۵). هدف از انجام این پژوهش، بررسی بروز نشانگرهای چسبندگی اپی‌تلیالی E-cadherin و β -Catenin در درجه‌های آسیب‌شناختی بافت خوب، متوسط و ضعیف کارسینوم سلول سنگفرشی بود. در این پژوهش، محل بروز E-cadherin در بافت اپی‌تلیالی طبیعی، در غشای سلول‌های لایه‌ی بازال و پارابازال و لایه‌ی خاردار بود، در حالی که در لایه‌ی کراتینه‌ی بروز این نشانگر به طور کامل منفی شد. این نتیجه در بررسی‌های دیگر نیز تایید شده است (۴، ۵، ۳۹). در این پژوهش بروز E-cadherin در SCC خوب تمایز یافته در همه‌ی موارد به صورت غشایی-سیتوپلاسمی بوده اما بروز نشانگر در بیشتر موارد غیر یکنواخت (Heterogen) و درصد رنگ‌پذیری در همه‌ی نمونه‌ها بالای ۷۵ درصد بود که در نهایت بروز آن در نمونه‌های SCC خوب تمایز یافته به گونه‌ی معنادار از نظر آماری حفظ شده (Preserved) بود. در پژوهش‌های یامادا (Yamada) و باگوتی (Bagutti)، بروز E-cadherin در نمونه‌های SCC خوب تمایز یافته همانند بافت اپی‌تلیوم طبیعی (حفظ شده) بوده است (۵، ۳۱)، که بر بروز غشایی نشانگر تاکید دارد. در عین حال گائو (Gao) و همکاران، طی بررسی‌های مولکولی بیان داشتند که بروز سیتوپلاسمی E-cadherin و β -catenin در SCCهای دهانی ممکن است ناشی از نبود هتروزوگوسیتی (Loss of heterozygosity) و هیپرمتیلاسیون ژن APC در سلول‌های سنگفرشی تومورال باشد (۳۱). پژوهش‌های دیگری نیز با وجود بروز حفظ شده E-cadherin در درجه‌ی خوب SCC، نبود همانندی این گروه با اپی‌تلیوم طبیعی و بروز غشایی-سیتوپلاسمی نشانگر را گزارش نموده‌اند (۴، ۱۰) که ممکن است با نظریه‌ی گائو همخوانی داشته باشد.

الگوی بروز E-cadherin در SCCهای متوسط تمایز یافته نیز در سلول‌های تومورال، غشایی-سیتوپلاسمی و غیر یکنواخت بود. در این گروه بروز E-cadherin به طور معنادار از نظر آماری نسبت به گروه خوب تمایز یافته کاهش نشان داد. این کاهش بروز در پژوهش‌های کیتاهارا (Kitahara)، لویز (Lopes)،

بررسی‌های دیگری همچون پژوهش موزیو (Muzio) و کورتز نبود ارتباط معنادار میان بروز β -Catenin در درجه‌های خوب و متوسط گزارش شده است^(۳۳ و ۳۴). این اختلاف در نتایج به دست آمده ممکن است به دلیل اختلاف در مراحل عمل آوری (Processing) بافتی، تازگی یا کهنگی بلوک‌های پارافینی، روش‌های ایمونوهیستوشیمی به کار رفته در پژوهش‌های گوناگون، شمار موارد بررسی شده و همچنین دقت آسیب‌شناس باشد. همان‌گونه که آشکار است هر چه روش IHC پیشرفته‌تر و دقیق‌تر باشد بروز آنتی ژن، بهتر مشخص شده و هر چه شمار نمونه‌ها بیشتر باشد بیشتر نمایانگر جمعیت جامعه است.

بررسی الگوی رنگ‌آمیزی β -Catenin در نمونه‌های ضعیف تمایز یافته SCC در این پژوهش نمایانگر این مساله بود که نیمی از نمونه‌ها بدون هرگونه رنگ‌پذیری بوده و بقیه به صورت غشایی-سیتوپلاسمی یا سیتوپلاسمی رنگ گرفتند. نمونه‌های رنگ گرفته، بروز غیر یکنواخت نشانگر را آشکار ساختند همچنین، درصد رنگ‌پذیری بیشتر نمونه‌ها زیر ۲۵ درصد بود. در نهایت نتایج بیانگر کاهش معنادار بروز نشانگر از نظر آماری نسبت به هر دو گروه خوب و متوسط تمایز یافته بود. بیشتر پژوهش‌ها همچون کای (Cai)، تاناکا، ماهومد (Mahomed)، لوپز و ویلیامز نشان دادند که میزان بروز β -Catenin با درجه‌ی تمایز ارتباط معکوس دارد. به این شیوه که هر چه تومور درجه‌ی بدخیمی بالاتری داشته باشد میزان بروز نشانگر کاهش می‌یابد^(۷، ۱۰، ۱۵ و ۱۶). موزیو، طی پژوهشی نشان داد که گر چه بروز β -Catenin در SCC خوب تمایز یافته با متوسط تمایز یافته تفاوت ندارد اما در گونه‌ی ضعیف تمایز یافته کاهش معنادار از نظر آماری نشان می‌دهد^(۳۳)، در عین حال کورتز نبود ارتباط میان بروز β -Catenin و درجه‌ی تمایز را گزارش کرد^(۳۳). اختلاف در نتایج به دست آمده را می‌توان با همان دلایل پیشین که در مقایسه‌ی گروه‌های خوب و متوسط تمایز یافته بیان گردید، توجیه نمود.

لازم به یادآوری است β -Catenin از نظر بروز مکانی و نیز بود و نبود یکنواختی آن در پژوهش کنونی در هر سه گروه تفاوت معنادار نشان نداد. به این ترتیب که در هر سه گروه بروز نشانگر، بیشتر به صورت غیر یکنواخت و غشایی-سیتوپلاسمی بود، اما از نظر درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها هر چه درجه‌ی تمایز تومور کمتر شد درصد رنگ‌پذیری نیز کاهش یافت. علت نبود تفاوت بروز مکانی و نیز بود و نبود یکنواختی نشانگر یاد شده در سه درجه‌ی

نشانگرهای چسبندگی در آنها کاهش باید منطقی‌تر به نظر می‌رسد.

گفتنی است که بروز E-cadherin از نظر بروز مکانی در پژوهش کنونی در هر سه گروه تفاوت معنادار نشان نداد، به این ترتیب که در هر سه گروه بروز نشانگر، بیشتر غشایی-سیتوپلاسمی بوده اما از نظر درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها و نیز بود و نبود یکنواختی، هر چه درجه‌ی تمایز تومور کمتر شد درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها و نیز یکنواختی بروز نشانگر کاهش یافت.

علت نبود تفاوت بروز مکانی نشانگر یاد شده در سه درجه‌ی تمایز SCC، شاید به دلیل ارزیابی کیفی و کلی میدان دید میکروسکوپی بوده و ممکن است در صورتی که ارزیابی عامل بالا به صورت کمی و درصدی انجام می‌شد تفاوت معنادار در این مورد میان درجه‌های گوناگون آسیب‌شناختی بافت به دست می‌آمد.

الگوی بروز β -Catenin در SCC خوب تمایز یافته در پژوهش کنونی بیشتر غشایی-سیتوپلاسمی و غیر یکنواخت بوده و بالای ۷۵ درصد از سلول‌ها رنگ گرفته بودند که به این نتیجه انجامید که بروز این نشانگر در گروه خوب تمایز یافته از نظر آماری به گونه‌ی معنادار کاهش نیافته (حفظ شده) است که این مساله توسط کورتز (Kurtz) نیز تایید شده است^(۳۳).

همان‌گونه که بیان شد الگوی بروز β -Catenin در اپی‌تلیوم طبیعی به صورت یکنواخت و غشایی است که سیتوپلاسم و هسته‌ی بدون رنگ‌آمیزی هستند یا به میزان بسیار ناچیز رنگ می‌گیرند^(۷). گائو در پژوهشی نشان داد که بروز سیتوپلاسمی β -Catenin بیشتر در درجه‌های تمایز متوسط و ضعیف رخ می‌دهد و نه در نوع خوب تمایز یافته. او علت این امر را به از دست رفتن هتروزایگوسیتی (Loss of heterozygosity) در لوکوس ژن APC و یا هیپرمتیلاسیون ژن APC promoter la نسبت داد، به این ترتیب که این عوامل باعث تجمع آزاد β -Catenin در سیتوپلاسم سلول سنگفرشی کارسینومایی شده می‌گردند^(۳۱).

در این پژوهش، بروز β -Catenin در SCC متوسط تمایز یافته بیشتر به صورت غشایی-سیتوپلاسمی و غیر یکنواخت بود و اغلب نمونه‌ها درصد رنگ‌پذیری کمتر از ۷۵ درصد نشان دادند. بروز این نشانگر در این گروه به گونه‌ی معنادار از نظر آماری نسبت به گروه خوب تمایز یافته کاهش نشان داد. با وجود تایید این مساله در پژوهش‌های کیتاهارا، تاناکا و ویلیامز^(۱۵ و ۱۶)، در

β -Catenin افزون بر نقش اتصالی در کمپلکس با E-cadherin، نقش پیام‌رسانی و مهار رونویسی ژن‌های هدف را در روند WNT در هسته بازی می‌کند که ممکن است در بروز SCC دهان نیز موثر باشد، به صورت آزاد در سیتوپلاسم کمتر از E-cadherin وجود دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش به شماره‌ی ۳۸۸۳۵۸ با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. به علاوه انجام این پژوهش با همکاری خانم محمودی تک‌نشین آسیب‌شناسی دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که مسوولیت تهیه‌ی لام‌های ایمونوهیستوشیمی را به عهده داشتند، انجام گردید که به این وسیله از زحمات ایشان قدردانی می‌گردد.

تمایز SCC ممکن است به دلیل ارزیابی کیفی و کلی میدان دید میکروسکوپی بوده و شاید در صورتی که ارزیابی دو عامل بالا به صورت کمی و درصدی انجام می‌شد تفاوت معنادار در این موارد میان درجه‌های گوناگون آسیب‌شناختی بافت به دست می‌آمد.

در پژوهش کنونی، مقایسه‌ی میانگین بروز E-cadherin و β -Catenin در هر سه گروه خوب، متوسط و تمایز یافته انجام گرفت که نتایج بیانگر این بود که بروز β -Catenin نسبت به E-cadherin در هر سه گروه کاهش یافته اما این کاهش از نظر آماری معنادار نبود ($p > 0.05$). به نظر می‌رسد به علت ارتباط مستقیم این دو مولکول در ساختار اتصال سلول به سلول احتمالاً اثر روی یک مولکول، دیگری را نیز متاثر می‌نماید. همان‌گونه که در یافته‌ها نیز گزارش شد β -Catenin نسبت به E-cadherin در همه‌ی نمونه‌ها بی در نظر گرفتن درجه‌ی بافت‌شناختی به گونه‌ی معنادار کاهش نشان داد. این احتمال مطرح است که چون

References

1. Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol* 1998; 186: 8-16.
2. Williams HK, Sanders DS, Jankowski JA, Landini G, Brown AM. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 308-317.
3. Kaur G, Carnelio S, Rao N, Rao L. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res* 2009; 20: 71-76.
4. Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42: 190-200.
5. Yamada K, Jordan R, Mori M, Speight PM. The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 1997; 3: 82-85.
6. Kitahara H, Kawashiri S, Kato K, Ohara T, Yoshizawa K, Nozaki S, et al. Immunohistochemical expressions of E-cadherin and β -catenin correlate with the invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery* 2008; 1: 28-34.
7. Cai ZG, Shi XJ, Gao Y, Wei MJ, Wang CY, Yu GY. beta-catenin expression pattern in primary oral squamous cell carcinoma. *Chin Med J Engl* 2008; 121: 1866-1870.
8. Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 2001; 439: 725-751.
9. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 806-811.

10. Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis* 2007; 13: 386-392.
11. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & maxillofacial pathology*. 2nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2009. p. 409-413, 419-420.
12. Shafer W, Hine M, Levy B. *A textbook of oral pathology*. 4th ed., Philadelphia: W.B.Saunders Co; 1983; p. 115-117.
13. Zain RB, Sakamoto F, Shrestha P, Mori M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in oral squamous cell carcinoma - an aid to conventional histological grading? *Malays J Pathol* 1995; 17: 23-30.
14. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; 166: 375-381.
15. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89: 557-563.
16. Lopes FF, da Costa Miguel MC, Pereira AL, da Cruz MC, de Almeida Freitas R, Pinto LP, de Souza LB. Changes in immunoexpression of E-cadherin and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13: 22-29.
17. Mohtasham N, Omidi A, Kamyabhesari K, Shakeri M. A comparative evaluation on E-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma with and without regional lymph node metastasis. *J Islamic Dent Assoc* 2006; 18: 56-61.
18. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, et al. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 1999; 14: 249-255.
19. Maruya S, Kurotaki H, Wada R, Saku T, Shinkawa H, Yagihashi S. Promoter methylation and protein expression of the E-cadherin gene in the clinicopathologic assessment of adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol* 2004; 17: 637-645.
20. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21: 4231-4236.
21. Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sorensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*; 34: 116-119.
22. Xavier FC, Rodini CO, Ramalho LM, Mantesso A, Nunes FD. WNT-5A, but not matrix metalloproteinase 3 or beta-catenin protein, expression is related to early stages of lip carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 708-715.
23. Worm J, Christensen C, Grønbaek K, Tulchinsky E, Guldberg P. Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 2004; 23: 5215-5226.
24. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320.
25. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-4371.
26. Sarrió D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez-Estévez C, Guo M, Herman JG, et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003; 106: 208-215.
27. Chang KW, Lin SC, Mangold KA, Jean MS, Yuan TC, Lin SN, et al. Alterations of adenomatous polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29: 223-226.

28. Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 236-244.
29. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 1998; 184: 369-381.
30. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, Wheelock MJ, Park JU. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg* 2007; 35: 1-9.
31. Hiratsuka H, Nakamori K, Chinen K. Expression pattern of E-cadherin and catenin family in squamous cell carcinoma of the oral cavity and its clinical significance. *J Jpn Soc Oral Tumor* 2001; 13: 283-8.
32. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Decreased E-cadherin but not beta-catenin expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134: 142-146.
33. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Grieco M, Mignogna MD, Cerrato A, et al. Beta- and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 1999; 19: 3817-3826.

Archive of SID