

بررسی مارکرهای بیولوژیک نمونه‌های بیوپسی کارسینوم سلول سنگفرشی زبان و ارتباط با متاستاز غدد لنفاوی گردنی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت پروگنوستیک متاستاز غدد لنفی گردنی در کارسینوم سلول سنگفرشی SCC زبان و اهمیت مارکرهای بیولوژیک در رفتار تهاجمی تومور و ایجاد متاستاز ارتباط دو مارکر بیولوژیک P₅₃ و Epidermal Growth Factor (EGFR) که در پرولیفراسیون و تمایز سلولی نقش دارند و همچنین دو مارکر بیولوژیک CD₄₄ و E-cadherin که در چسبندگی سلولی نقش دارند با متاستاز غدد لنفی گردن تحت بررسی قرار گرفت. **روش بررسی:** این مطالعه توصیفی تحلیلی بر روی ۵۳ بیمار SCC زبان که تحت عمل جراحی برداشت تومور و دیسکسیون غدد لنفی گردن در سال‌های ۸۷-۱۳۸۰ قرار گرفته بودند انجام شد. نمونه‌های این بیماران تحت رنگ‌آمیزی ایمونو-هیستوشیمی قرار گرفت و میزان این مارکرهای بیولوژیک سنجیده شد و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با توجه به متغیرهای کلینیکو-پاتولوژیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **یافته‌ها:** در این مطالعه از بین فاکتورهای کلینیکو-پاتولوژیک، سن ($p=0/01$)، سابقه ریسک فاکتور ($p=0/002$)، وجود لنفادنوپاتی بالینی گردن ($p=0/002$) و سایر تومور ($p=0/001$) و از بین مارکرهای بیولوژیک کاهش CD₄₄ ($p=0/02$) ارتباط معنی‌داری با متاستاز غدد لنفی گردن مشاهده شد و بین جنس و سایر مارکرهای بیولوژیک شامل E-cadherin، EGFR، P₅₃ و متاستاز غدد لنفی گردن ارتباطی مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** با اندازه‌گیری CD₄₄ علاوه بر فاکتورهای کلینیکو پاتولوژیک می‌توان جهت بررسی احتمال متاستاز غدد لنفی گردن و پروگنوز بیماران SCC زبان بهره گرفت.

کلمات کلیدی: مارکر بیولوژیک، SCC زبان، CD₄₄، P₅₃، E-cadherin، EGFR.

ضیاءالدین مدنی کرمانی^۱

محمد تقی خرسندی آشتیانی^{۲*}

نسرین یزدانی^۲

فاطمه میراشرفی^۲

۱- گروه پاتولوژی، بیمارستان امیراعلم

۲- گروه گوش و حلق و بینی، مرکز تحقیقات

گوش و حلق و بینی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان سعیدی شمالی،

بیمارستان امیراعلم، مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی

تلفن: ۶۶۷۶۰۲۶۹

email: khorsandi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

بیمار ۵۰٪ کاهش و احتمال متاستاز افزایش می‌یابد.^{۱،۲} متاستاز این متاستازها در زمان تشخیص و درمان ساب کلینیکال و مخفی است. روش‌های متعددی جهت یافتن متاستاز غدد لنفی گردن وجود دارد. معاینه بالینی معمول‌ترین روش طبقه‌بندی و staging گردن بوده که غیر دقیق است.^۳ هیچ مطالعه تصویربرداری قادر به تشخیص میکرو-متاستاز غدد لنفی گردن نیست. به نظر می‌رسد میزان بقای بیمار وابسته به یافتن طبیعت بیولوژیک آن تومور، توانایی تهاجم به بافت‌های اطراف و متاستاز آن است. پروسه گسترش تومور و متاستاز بسیار پیچیده بوده و یک یافته تاخیری در ایجاد تومور است. در سلول‌ها پرولیفره شده، تماس با سلول‌های مجاور کم شده، از ماتریکس بینابینی مهاجرت کرده، به عروق خونی و لنفی دست‌اندازی می‌کند و به سمت غدد لنفی یا ارگان‌های دور دست می‌روند. محصولات ژنی این مراحل می‌تواند به‌عنوان مارکرهای پیش‌بینی کننده متاستاز غدد

کانسر دهان ششمین کانسر شایع در جهان و شایع‌ترین بدخیمی سر و گردن بوده و میزان مرگ و میر (۵۰٪) بالایی دارد. شایع‌ترین نوع کانسر دهانی کارسینوم سلول سنگفرشی Squamous cell carcinoma (SCC) می‌باشد که تقریباً ۹۰٪ بدخیمی‌های دهان است و شایع‌ترین محل آن زبان می‌باشد. شیوع آن در مناطق مختلف متفاوت است و فاکتورهای محیطی در آن بسیار موثر است. پیامد نهایی بالینی SCC دهان بر پایه سیستم تقسیم‌بندی کلینیکو-پاتولوژیک TNM، محل آناتومیک، فعالیت میتوتیک تومور، فاکتورهای اپیدمیولوژیک و غیره می‌باشد. استفاده از متغیرهای اپیدمیولوژیک و هیستوپاتولوژیک جهت ارزیابی پروگنوز بیماران بدون اطلاعات مولکولی ناکافی است. مهم‌ترین فاکتور پروگنوستیک بقای SCC زبان وجود متاستاز غدد لنفی گردن است.^۱ زمانی که درگیری غدد لنفی گردن وجود دارد بقای

انتقال سیگنال‌های خارجی را که در کنترل رشد دخیل هستند قطع کرده و به‌عنوان گیرنده (رِسپتور) فاکتور رشد عمل می‌نمایند. نمونه این انکوژن‌ها erb B است که پروتیین EGFR را ایجاد می‌نمایند. این گلیکو پروتیین ترانس مامبران در پرولیفراسیون، تقسیم سلولی و تمایز نقش دارند. بیان بیش از حد آن در بیش از ۸۰٪ SCC سر و گردن وجود دارد و در نتیجه به‌عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی‌دهنده و یک هدف بالقوه روش‌های درمانی جدید استفاده می‌شود. در این مطالعه با توجه به اهمیت پروگنوستیک متاستاز غدد لنفی گردنی در SCC زبان و اهمیت مارکرهای بیولوژیک در رفتار تهاجمی تومور و ایجاد متاستاز و ارتباط دو مارکر بیولوژیک P₅₃ و EGFR که در پرولیفراسیون و تمایز سلولی نقش دارند و همچنین دو مارکر بیولوژیک CD₄₄ و E-cadherin که در چسبندگی سلولی نقش دارند، بررسی شده‌اند.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی بر روی ۵۳ بیمار SCC زبان که تحت عمل جراحی برداشت تومور و دیسکسیون غدد لنفی در سال‌های ۸۷-۱۳۸۰ در بیمارستان امیراعلم قرار گرفته بودند انجام شد. مطالعه ملاحظات اخلاقی خاصی نداشت و اطلاعات حاصله محرمانه بود. هزینه‌های مطالعه از محل بودجه تخصیص داده شده به مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی پرداخت شد. نمونه‌های این بیماران تحت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفت و میزان این مارکرهای بیولوژیک سنجیده شد و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با توجه به متغیرهای کلینیکو-پاتولوژیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ابتدا پرونده بیمارانی که در این محدوده تحت عمل جراحی برداشت توده و دیسکسیون غدد لنفاوی گردن قرار گرفته بودند بررسی شد و اطلاعات کلینیکو-پاتولوژیک شامل سن، جنس، سایز توده وجود لنفادنویاتی کلینیکی و ریسک فاکتور استخراج شده به‌کمک این پرونده‌ها و شماره پاتولوژی ثبت شده بلوک‌ها و لام‌های هماتوکسیلین-ئوزین از آرشیو پاتولوژی خارج شد و تحت بازبینی توسط پاتولوژیست دوم در آزمایشگاه خصوصی قرار گرفت و تشخیص تأیید شد سپس آماده‌سازی جهت انجام ایمونوهیستوشیمی (IHC) صورت گرفت. برش‌ها چهار میکرومتری بافت پارافینه فیکس شده در فرمالین روی لام‌های شیشه‌ای انجام شد. پس از دیپارافینه سازی و بازیابی آنتی‌ژن در بافر سیترات ۰/۰۱M، با آنتی‌بادی

لنفی استفاده شود ولی مشخص نیست کدام مارکر برای متاستاز غدد لنفی گردن پیش‌گویی کننده است. پروتیین P₅₃ به‌عنوان تنظیم‌کننده نسخه‌برداری به DNA و دیگر پروتیین‌ها اتصال می‌یابد و پیشرفت سیکل سلولی را با فعالیت به‌عنوان فاکتور نسخه‌برداری ژن‌های متعددی کنترل می‌کند. ژن سرکوب‌کننده تومور P₅₃ در بازوی کوتاه کروموزم ۱۷ قرار دارد و موتاسیون آن به‌عنوان یک انکوژن قدرتمند عمل می‌کند. سلول‌های طبیعی غلظت کمی از این پروتیین هسته‌ای بیان می‌کنند ولی در آسیب رشته DNA این غلظت به‌طور واضح افزایش می‌یابد. رویداد مولکولی انکوژنیک در SCC دهان همچنین شامل تغییرات در مولکول‌های چسبندگی (Adhesion molecule) است که ایجاد انفیلتراسیون و تخریب بافت می‌کند. CD₄₄ اولین بار توسط Dalchav^۵ به‌عنوان یک مولکول موجود در سطح لنفوسیت T، گرانولوسیت‌ها و تیموسیت‌های کورتیکال معرفی شد. CD₄₄ یک گلیکو پروتیین غشایی با یک دامنه خارجی وسیع و یک دامنه سیتوپلاسمیک محدود می‌باشد. این پروتیین به‌عنوان یک فاکتور مهم در تداخلات سلولی و چسبندگی سلول شناخته شده است. در حالت نرمال CD₄₄ به هیالورونان متصل می‌شود تا ارتباط با ماتریکس خارج سلولی پایدار شود. سلول‌های تومورال به هیالورونیک اسید در ماتریکس خارج سلولی از طریق CD₄₄ متصل می‌شوند. کاهش CD₄₄ به‌علت شکستگی جزء اکستراسلولار (ectodomain) است که در تعداد زیادی تومورهای بدخیم اتفاق می‌افتد. شکستگی CD₄₄ سلول‌های تومورال را از ماتریکس خارج سلولی جدا کرده و منجر به مهاجرت سلول‌های تومورال می‌گردد که منجر به گسترش تومور و متاستاز می‌گردد.^۶ E-cadherin عضو خانواده بزرگ کادهرین‌ها و مهم‌ترین کادهرین بیان‌شده شده در سلول اپی‌تلیال می‌باشد. این پروتیین یک گلیکو پروتیین ترانس مامبران سلولی است این مولکول‌های چسبندگی داخل سلولی وابسته به کلسیم بوده و در پایداری سلول اپی‌تلیال و فقط پولاریتی سلولی و شکل بافتی نقش مهمی ایفاء می‌کنند. خانواده Adhesion molecule‌های سلولی که E-cadherin متعلق به آن است مشابه سرکوب‌کننده‌های تومور عمل می‌کنند به طوری که کمک به جلوگیری از تهاجم و متاستاز می‌کنند. کاهش تولید آن چسبندگی بین سلولی را ضعیف کرده به‌دنبال آن انفیلتراسیون، انتشار و متاستاز ایجاد می‌کند که منجر به پیش‌آگهی بدتر این بیماران می‌شود. دسته‌ای از انکوژن‌ها که در سطح غشای سلول قرار دارند

است. برای مقایسه متغیر کمی از Independent t-test استفاده شد. $p < 0/05$ به لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

این مطالعه در ۵۳ بیمار با کارسینوم سنگفرشی زبان صورت گرفت. اطلاعات از پرونده‌های بیماران استخراج و از نمونه‌های بیماران لام تهیه گردید سپس این لام‌ها رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای چهار مارکر بیولوژیک شامل P_{53} ، CD_{44} ، EGFR، E-cadherin شد. متغیرهای مورد بررسی این بیماران فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک شامل سن، جنس، ریسک فاکتور، سایز تومور، لنفادنوپاتی گردن و میزان بروز مارکرها بود. بر اساس داده‌های جمع‌آوری شده میانگین سنی بیماران ۵۷/۸ سال و انحراف معیار ۱۴/۶ می‌باشد. کم‌سن‌ترین بیمار ۲۳ ساله و مسن‌ترین آنها ۸۴ ساله بود. از میان این بیماران (۵۵٪) مردان و (۴۵٪) را زنان تشکیل می‌دهند. بین سن و متاستاز گردن ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری وجود داشت ($p=0/01$). (۲۶٪) بیماران ریسک فاکتور شامل سابقه مصرف سیگار، اپیوم، الکل و یا دندان مصنوعی نامناسب داشتند. در بررسی ارتباط میان وجود ریسک فاکتورها با متاستاز لنفی گردن ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری وجود داشت ($p=0/002$). از لحاظ سایز تومور (۱۷٪) افراد T_1 ، (۲۲/۶٪) T_2 ، (۴۳/۴٪) T_3 و (۱۷٪) در دسته T_4 قرار می‌گرفتند که در بررسی ارتباط سایز تومور و وجود متاستاز گردن ارتباط معنی‌داری بین سایز تومور و متاستاز غدد لنفی گردن وجود داشت ($p=0/00$). (۳۲٪) افراد در زمان تشخیص لنفادنوپاتی کلینیکی داشته‌اند ولی از لحاظ پاتولوژیک (۵۱٪) بیماران در غدد لنفی گردن متاستاز داشته‌اند. اطلاعات کلینیکی و پاراکلینیکی بیمار در جدول ۱ نشان داده شده است. در بررسی ارتباط لنفادنوپاتی کلینیکی با متاستاز گردن ارتباط معنی‌داری یافت شد ($p=0/002$) (جدول ۲). ارتباط بیان همزمان دومارکر بیولوژیک جهت متاستاز لنفی گردن توسط χ^2 بررسی و ارتباط معنی‌داری بین مثبت بودن همزمان دو مارکر P_{53} و E-cadherin با متاستاز لنفی نبود. به ترتیب از راست به چپ، ($p=1/00$) و ($p=0/42$). در بررسی ارتباط EGFR و متاستاز غدد لنفی گردن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p=1/00$). اختلاف آماری معنی‌داری در بررسی ارتباط CD_{44} و متاستاز غدد لنفی گردن وجود داشت ($p=0/02$) (جدول ۳).

مونوکلونال اولیه P_{53} (Novacastra Company) و (Lyophilized و Novacastra Variant 3 Company) E-Cadherin CD_{44} و (Concentrated Novacastra Company with 1/50 dilution). EGFR (Novacastra Company) به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه (Biotinylated link) مجدداً ریخته و انکوبه شد. محلول HRP استرپتواویدین ریخته شد در نهایت با محلول کروموزن DAB برای ۱۰ دقیقه تماس یافت. بین مراحل ذکر شده اسمیرها شستشو در PBS انجام شد و جهت رنگ‌آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده گردید. نمونه‌هایی که سلول تومور خیلی کم یا اصلاً نداشتند از مطالعه خارج شدند. Scoring و تفسیر نتایج توسط پاتولوژیست بدون داشتن اطلاع از پارامترهای بالینی و بر اساس رفرنس‌های موجود بدین صورت انجام شد. P_{53} به صورت رنگ‌آمیزی هسته‌ای قهوه‌ای بدون رنگ‌آمیزی مامبرانو و بر اساس سیستم grading اغلب مقالات از جمله Eckert A.W^۶ در صورتی که $P_{53} > 10\%$ سلول‌ها رنگ گرفت مثبت و در غیر این صورت منفی طبقه‌بندی شد.

CD_{44} : گروه ۱: تمام سلول‌های سرطانی بجز قسمت مرکزی آن مثبت باشد، گروه ۲: کاهش رنگ‌گیری محیطی در یک یا بیش از یک دسته سلول سرطانی، گروه ۳: در یک یا تمام دسته‌های سرطانی منفی باشد. E-cadherin (absent) 0 بدون رنگ‌آمیزی

+1 (weak) رنگ‌آمیزی در کمتر از ۱۰٪ سلول‌ها

+2 (moderate) رنگ‌آمیزی متوسط هموزن یا رنگ‌گیری

با شدت بیشتر در ۷۵-۱۰٪ سلول‌ها

+3 (intense) رنگ‌گیری هموزن شدید در بیش از ۷۵٪

سلول‌ها

EGFR: 0: بدون رنگ‌گیری 1: کمتر از ۱۰٪

2: بین ۱۰-۵۰٪ 3: بالای ۵۰٪

پس از انجام تمامی این مراحل تعداد ۵۳ لام برای بررسی آماده شد. این لام‌ها توسط دو پاتولوژیست شرکت کننده در طرح و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ برابر از نظر میزان رنگ‌گیری چهار مارکر بیولوژیک بررسی و نتایج حاصله ثبت شد. به منظور تجزیه و داده‌های این مطالعه از نسبت و میزان برای متغیرهای کیفی و میانگین و انحراف معیار برای متغیر کمی استفاده شد. برای مقایسه متغیرهای کیفی از آزمون‌های χ^2 ، Pearson و Fisher-exact test و در صورتی که متغیرها پارامتریک نبودند از تست McNemar استفاده شده

جدول ۱- مشخصات دموگرافیک و بالینی بیماران

مشخصات دموگرافیک و بالینی	فراوانی: تعداد (درصد)
جنس	مرد ۲۹(۵۴/۷) زن ۲۴(۴۵/۳)
ریسک فاکتور	مثبت ۱۴(۲۶/۴) منفی ۳۹(۷۳/۶)
تومور stage	T1 ۹(۱۷) T2 ۱۲(۲۲/۶) T3 ۲۳(۴۳/۴) T4 ۹(۱۷)
لنفادنوپاتی کلینیکی	مثبت ۱۷(۳۲/۱) منفی ۳۶(۶۷/۹)
متاستاز غدد لنفی گردن	مثبت ۲۷(۵۰/۹) منفی ۲۶(۴۹/۱)
مارکر p53	مثبت ۴۱(۷۷/۴) منفی ۱۲(۲۲/۶)
مارکر CD44	+۱ ۱۹(۳۵/۸) +۲ ۲۰(۳۷/۷) +۳ ۱۴(۲۶/۴)
EGFR	+۲ ۶(۱۱/۳) +۳ ۴۷(۸۸/۷)
E-CADHERIN	+۱ ۶(۱۱/۳) +۲ ۳۱(۵۸/۵) +۳ ۱۶(۳۰/۲)

میانگین سن بیماران ۵۷/۸±۱۴/۶ سال بود

جدول ۲- ارتباط ریسک فاکتور، لنفادنوپاتی، سایز تومور و متاستاز غدد لنفی گردنی

متغیر	متاستاز غدد لنفی گردن	p*
	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی
ریسک فاکتور	مثبت ۱۰ منفی ۱۷	۴ ۲۲
لنفادنوپاتی	مثبت ۱۷ منفی ۰	۲۶ ۱۰
سایز تومور بر اساس stage	T1 ۱ T2 ۳ T3 ۱۸ T4 ۵	۸ ۹ ۵ ۴

* آزمون Fisher-exact test (p<۰/۰۵)

جدول ۳- بررسی ارتباط بین بیومارکرها و متاستاز غدد لنفی گردنی

مارکرها	متاستاز غدد لنفی گردن	p*
	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی
P53	مثبت ۲۱ منفی ۶	۲۰ ۶
CD44	+۱ و +۲ ۲۱ +۳ و +۴ ۶	۱۸ ۸
E-CADHERIN	+۱ ۲ +۲ و +۳ ۲۵	۴ ۲۲
EGFR	+۲ ۳ +۳ ۲۴	۳ ۲۳

* آزمون Independent t-test (p<۰/۰۵)

بحث

را مرتبط با سورویوال بدتر دانسته‌اند. در بعضی مطالعات^۹ کاهش CD44 را مرتبط با افزایش سایز تومور و برخی دیگر^۷ بدون ارتباط با سایز تومور دانسته‌اند. در مطالعه ما نیز کاهش CD44 با سایز تومور و متاستاز غدد لنفی مرتبط بود. در مورد E-cadherin در مطالعاتی^{۱۱-۱۵} بین کاهش E-cadherin و متاستاز غدد لنفی رابطه ملاحظه می‌شود ولی در مطالعات دیگر این ارتباط دیده نشده است.^{۱۶-۱۸} بنابر دو مطالعه دیگر کاهش E-cadherin با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک ارتباطی نداشته است.^{۱۵،۱۹} در مطالعه ما نیز کاهش E-cadherin ارتباطی با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک و متاستاز غدد لنفی نداشت. در مورد P53 در دو مطالعه افزایش P53 با متاستاز غدد لنفی مرتبط بوده هر چند جهت تصمیم‌گیری درمانی کافی نیست.^{۲۰،۲۱} در مطالعات دیگر بین افزایش P53 و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک یا بقاء ارتباطی مشهود نبوده، به‌علاوه افزایش P53 ارتباطی با سایز تومور

به‌صورت خلاصه مارکرهاى پروگنوستیک در این مطالعه سن، سابقه ریسک فاکتور، وجود لنفادنوپاتی، و سایز تومور و از بین مارکرهاى بیولوژیک CD44 بود و سایر شاخص‌های کلینیکوپاتولوژی و همچنین مارکرهاى بیولوژیک مورد آزمایش ارزش پروگنوستیک جهت تصمیم‌گیری درمانی و انجام دیسکسیون انتخابی غدد لنفی گردن در موارد N0 کلینیکی و سایز کوچک تومور نداشتند. با مراجعه به مقالات اخیر در مورد مارکرهاى بیولوژیک از جهت پروگنوستیک بودن آنها اختلافی دیده نمی‌شود و اغلب مطالعات بر این باورند که با کاهش CD44 و E-Cadherin و افزایش EGFR و P53 پروگنوز و بقای بیمار کاهش پیدا می‌کند ولی از جهت ارتباط با متاستاز غدد لنفی کنتراروسی فراوان است به‌عنوان مثال در مورد CD44 طبق مطالعاتی^{۷،۸} کاهش CD44 را مرتبط با متاستاز غدد لنفی دانسته‌اند و در دو مطالعه^{۴،۹} کاهش CD44

اندازه‌گیری مارکرهای بیولوژیک، متد Scoring متفاوت، Cut off point نامشخص و اینکه قطعه بسیار کوچکی از تومور بر روی لام قابل ارزیابی است در حالی که ممکن است در سایر قسمت‌های تومور نتایج متفاوت باشد و همچنین آنالیز آماری نامناسب که روی نمونه‌های کوچک بیمار که تفسیر معنی‌داری ارائه نمی‌دهد است. اندازه‌گیری مارکرهای سلولی به‌خصوص CD44 می‌تواند فاکتور موثری در تعیین پروگنوز بیماران مبتلا به کارسینوم سر و گردن باشد. آگاهی از میزان این مارکرها در تعیین مداخله‌های درمانی (جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی) موثر است. سپاسگزاری: از همکاری آزمایشگاه دانش در مراحل مختلف دگردانی می‌شود. همچنین از زحمات خانم دکتر مونا حیدر علی در مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی در مراحل آماده‌سازی مقاله نیز سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

References

1. Spiro RH, Strong EW. Epidermoid carcinoma of the mobile tongue. Treatment by partial glossectomy alone. *Am J Surg* 1971;122(6):707-10.
2. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993;71(2):452-6.
3. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73(1):187-90.
4. González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Esteban F, Bascones-Martínez A, González-Moles S. Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncol* 2004;40(3):281-6.
5. Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* 1980; 10(10):737-44.
6. Takamune Y, Ikebe T, Nagano O, Nakayama H, Ota K, Obayashi T, et al. ADAM-17 associated with CD44 cleavage and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2007;450(2):169-77.
7. Eckert AW, Lautner MHW, Maurer P, Bilkenroth U, Hauptmann S, Schubert J. Expression of CD 44 in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofacial Surg* 2005;34 Suppl 1:5.
8. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, Zhao M, Kudo Y, Ogawa I, et al. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral Oncol* 2000;36(6):545-9.
9. Kosunen A, Pirinen R, Ropponen K, Pukkila M, Kellokoski J, Virtaniemi J, et al. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43(1):51-9.
10. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. 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):1-9.
11. 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(3):557-63.
12. Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res* 1996;2(10):1801-8.
13. Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):166-72.
14. 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(4):369-81.
15. Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(1):59-63.
16. Lopes FF, da Costa Miguel MC, Pereira AL, da Cruz MC, de Almeida Freitas R, Pinto LP, et al. Changes in immunorexpression of E-cadherin and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Ann Diagn Pathol* 2009;13(1):22-9.
17. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Decreased E-Cadherin but not β -Catenin expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134(1):142-6.
18. Diniz-Freitas M, García-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(2):190-200.

19. Zhang J, Zhang W, Gao P, Li Y, Li C, Maeda S. Expression of E-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma is Associated with Clinical Prognosis. *Chinese J Clin Oncol* 2006;3(3):181-4.
20. Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, et al. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett* 2002;184(2):223-30.
21. Carlos de Vicente J, Junquera Gutiérrez LM, Zapatero AH, Fresno Forcelledo MF, Hernández-Vallejo G, López Arranz JS. Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck* 2004;26(1):22-30.
22. Piffkò J, Bánkfalvi A, Tory K, Füzesi L, Bryne M, Ofner D, et al. Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck* 1998;20(1):8-15.
23. Friedman M, Lim JW, Manders E, Schaffner AD, Kirshenbaum GL, Tanyeri HM, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001;23(4):280-5.
24. Kozomara R, Jović N, Magić Z, Branković-Magić M, Minić V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33(5):342-8.
25. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, Alsner J, Overgaard J. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(2):561-6.
26. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(16):2164-70.
27. Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol* 2004;40(5):532-7.
28. Fischer C, Zlobec I, Stöckli E, Probst S, Storck C, Tornillo L, et al. Is immunohistochemical epidermal growth factor receptor expression overestimated as a prognostic factor in head-neck squamous cell carcinoma? A retrospective analysis based on a tissue microarray of 365 carcinomas. *Hum Pathol* 2008;39(10):1527-34.
29. Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002;8(3):885-92.

Evaluation of biologic markers in squamous cell carcinoma biopsy samples of the tongue and correlation with neck lymph node metastasis

Received: May 25, 2009 Accepted: August 12, 2009

Abstract

Madani Kermani Z.¹
khorsandi MT.^{2*}
Yazdani N.²
Mirashrafi F.²

1- Department of Pathology
2- Department of
Otorhinolaryngology,
Otorhinolaryngology Research
Center

Amiralam Hospital, Tehran
University of Medical Sciences

Background: Neck lymph node metastasis has the prognostic role in SCC of the tongue and the importance of the biologic markers in tumor invasion and metastasis has been stated in the medical literature. The aim of this study was to evaluate the relationship between two biomarkers, p53 and EGFR (which had the main role in cell proliferation) and two other biomarkers, CD44 and E-cadherin, in lymph node metastasis.

Methods: In an analytic descriptive study fifty three patients with SCC (Squamous Cell Carcinoma) of the tongue who underwent the resection of tumor and dissection of neck lymph nodes were assessed during the year of 2002-2009. Histological samples from 53 patients were immunohistochemically stained and the analysis of these markers were performed due to clinicopathological variable and metastasis of the neck lymph nodes.

Results: The result showed that among the clinicopathological factors, the relationship between Age ($p=0.01$), history of having risk factors ($p=0.002$), clinical lymphadenopathy ($p=0.002$), the size of the tumor ($p=0.001$), decreasing of CD44 ($p=0.02$) and lymph node metastasis of the neck were statistically significant. No significant relationship were found between sex and other biomarkers including p53, EGFR, E-cadherin.

Conclusion: CD44 is an important indicator of prognostic markers that can also be used as an indicator of clinicopathological markers.

Keywords: p53, EGFR, CD44, E-adherin, Squamous cell carcinoma, metastasis.

* Corresponding author:
Otorhinolaryngology Research Center,
Tehran University of Medical Sciences,
Amiralam Hospital, Saadi Ave., Tehran,
IRAN
Tel: +98-21-66760269
email: khorsandi@sina.tums.ac.ir