Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) σε κακοήθεις όγκους των σιαλογόνων αδένων

Διονύσιος ΦΩΤΟΠΟΥΛΟΣ[1], Νικόλαος ΠΑΠΑΔΟΓΕΩΡΓΑΚΗΣ[2], Ιωάννης ΙΑΤΡΟΥ[2], Σοφία ΤΣΕΛΕΝΗ[3], Αλεξάνδρα ΣΚΛΑΒΟΥΝΟΥ[4], Κωσταντίνος ΑΛΕΞΑΝΔΡΙΔΗΣ[5]

Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών (Διευθυντής: Καθηγητής Κ. Αλεξανδρίδης)
Εργαστήριο Στοματολογίας, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών (Διευθύντρια: Καθηγήτρια Α. Σκλαβούνου)

Immunohistochemical evaluation of transforming growth factor (TGF-b1) in malignant salivary gland tumours

Dionisios FOTOPOULOS, Nikolaos PAPADOGEORGAKIS, Ioannis IATROU, Sofia TSELENI, Alexandra SKLAVOUNOU, Constantinos ALEXANDRIDIS

Oral & Maxillofacial Surgery Clinic, School of Dentistry, University of Athens (Head: Professor C. Alexandridis)
Oral Pathology Laboratory, School of Dentistry, University of Athens (Head: Professor A. Sklavounou)

Ερευνητική εργασία
Research paper

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Η ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου χαρακτηρίζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κυττάρων και υποστρώματος μέσω πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και της έκκρισης κυτταροκινών. Έχει αποδειχθεί ότι αυξημένα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) σε επιθετικά καρκινώματα μαστού, προστάτου κ.α. προάγουν την καρκινογένεση. *Σκοπός:* Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση της έκφρασης του TGF-β1 σε κακοήθεις όγκους των σιαλογόνων αδένων και η συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους. *Υλικό-μέθοδος:* Το υλικό της μελέτης αποτελείται από δείγματα καρκινικών ιστών ασθενών με κακοήθη όγκο των σιαλογόνων αδένων. Η μελέτη αφορά την 12ετία 1996-2008. Αξιολογήθηκαν 54 περιπτώσεις: 29 άνδρες και 25 γυναίκες ηλικίας 16-75 ετών. *Αποτελέσματα:* Παρατηρήθηκε ασθενής έκφραση του TGF-β1, εντοπισμένη σε νεοπλασματικά κύτταρα καθώς και στο υπόστρωμα και θετική συσχέτισή της με τη σταδιοποίηση των όγκων. *Συμπεράσματα:* Η έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) που παρατηρήθηκε ίσως αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο του ρόλου του ως πιθανού προγνωστικού δείκτη.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού, αλληλεπιδράσεις επιθηλίου μεσεγχύματος, κακοήθεις όγκοι σιαλογόνων αδένων.

Παρελήφθη: 2/08/2010 - Έγινε δεκτή: 18/01/2011

SUMMARY: The development of malignant tumours is defined by interactions between tumour cells and the stroma through cell membrane proteins and the release of cytokines. It has been indicated that high concentrations of transforming growth factor (TGF-b1) in aggressive tumours of the breast, prostate etc. can promote carcinogenesis.
Aim: The aim of this study is to examine TGF-b1 expression in malignant salivary gland tumours and correlate it with clinical parameters.
Material and methods: 54 specimens of malignant salivary gland tumours obtained between 1996 and 2008 (12 years) were the material of the study. 54 cases were evaluated 29 male and 25 female, 16-75 years of age.
Results: TGF-b1 expression was weak and focal, located in neoplastic cells, as well as in the stroma. A positive correlation to tumour staging was also detected.
Conclusions: TGF-b1 expression in malignant salivary gland tumours and its positive correlation with tumour staging provide a useful basis for the further investigation of its potential role as a prognostic index.

KEY WORDS: Transforming Growth Factor (TGF-b1), epithelial-mesenchymal transitions, malignant salivary gland tumours.

Paper received: 2/08/2010 - Accepted: 18/01/2011

[1]*ΣΓΠΧ, MSc*
[2]*Αναπλ. Καθηγητής ΣΓΠΧ, ΕΚΠΑ*
[3]*Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας ΕΚΠΑ*
[4]*Καθηγήτρια Στοματολογίας, ΕΚΠΑ*
[5]*Καθηγητής ΣΓΠΧ, ΕΚΠΑ*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου χαρακτηρίζεται κυρίως από την ανεξέλεγκτη αναδιαμόρφωση των ιστών, μια διαδικασία με την οποία παρατηρείται αντικατάσταση του φυσιολογικού από παθολογικό ιστό (Zigrino και συν. 2004, Matsumoto και συν. 2006).

Τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον μέσω των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και διαμεσολαβητών όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TGF κ.α. Οι παράγοντες αυτοί έχει αποδειχθεί ότι τροποποιούν τη δράση των ινοβλαστών αλλά και των φλεγμονωδών κυττάρων, προάγοντας την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό τους και την παραγωγή αντίστοιχων κυτταροκινών και πρωτεασών από αυτά (Pollard, 2001, Aritzia και συν. 2003, Zigrino και συν. 2004, Matsumoto και συν. 2006).

Σε όλες τις παραπάνω διεργασίες σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι αυξητικοί παράγοντες μετασχηματισμού (TGF-βs) με αποτέλεσμα να προάγουν την ογκογένεση. Σε υποστήριξη των υποθέσεων αυτών έρχονται παρατηρήσεις αυξημένων επιπέδων της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού σε επιθετικά καρκινώματα μαστού, στομάχου, ενδομητρίου, καρκίνων του εγκεφάλου, γλοιωμάτων και μελανωμάτων, που υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα των TGF-βs προάγουν την καρκινογένεση (Walker και Dearing, 1992, Gorsch και συν. 1992, Dumont, 2000).

Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού (Transforming Growth Factors-βs, TGFβs) περιλαμβάνει 33 μέλη στον άνθρωπο μεταξύ των οποίων τα τρία ισομερή TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3, ακτιβίνες, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστού (BMPs), αυξητικούς παράγοντες διαφοροποίησης (growth/ differentiation factors, GDFs) και αντί μουλεριανή ορμόνη (anti-Mullerian hormone, AMH) (Kusafuka και συν. 2000, Heldin και συν. 2009).

Οι τρεις μορφές του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους.

Τα μέλη της TGF οικογένειας ασκούν την επίδρασή τους στα κύτταρα μέσω του σχηματισμού ετεροτετραμερών συμπλεγμάτων με συγκεκριμένους υποδοχείς (υποδοχέας τύπου I και τύπου II) που βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Στα τετραμερή συμπλέγματα υποδοχέων ο τύπος II φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I και έτσι ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες Smad που αποτελούν και τους βασικούς πρωταγωνιστές του μονοπατιού δράσης της οικογένειας των TGF-β (Heldin και συν. 1997, Miyazawa και συν. 2002).

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια δράσης των TGF-βs

INTRODUCTION

The development of a malignant tumour is mainly characterised by the uncontrolled remodelling of tissues, a process through which normal tissue is replaced by pathologic tissue (Zigrino et al. 2004, Matsumoto et al. 2006).

Cancer cells interact with the environment through cell membrane proteins and mediators such as the vascular endothelial growth factor, the platelet hemopetalic growth factor, the transforming growth factor (TGF) etc. It has been proved that these factors alter the activity of inoblasts as well as of inflammatory cells, promoting their proliferation and the production of the respective cytokines and proteases from them (Pollard, 2001, Aritzia et al. 2003, Zigrino et al. 2004, Matsumoto et al. 2006).

In all these processes, transforming growth factors (TGF-bs) also play an important role, promoting oncogenesis. These assumptions are supported by the detection of increased levels of TGF-bs family members in aggressive carcinomas of the breast, stomach, endometrium/uterus, as well as in brain cancers, gliomas and melanomas, which indicate that high concentrations of TGF-βs promote carcinogenesis (Walker and Dearing, 1992, Gorsch et al. 1992, Dumont, 2000).

The Transforming Growth Factors-βs family (TGFbs family) comprises 33 members in humans, including the three isomers TGF-b1, TGF-b2 και TGF-b3, activins, bone morphogenetic proteins (BMPs), growth differentiation factors (GDFs) and anti-Mullerian hormone (AMH) (Kusafuka et al. 2000, Heldin et al. 2009).

The three forms of transforming growth factor, TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3, are codified by different genes and display high homology in the sequence of their aminoacids.

TGF family members affect cells by forming heterotetrameric complexes with specific receptors (type I and II receptors) located on the surface of the cell membrane. In tetrameric receptor complexes, type II phosphorylates type I receptor, thus activating Smad proteins, which play a central role in the TGF-b signalling pathway (Heldin et al. 1997, Miyazawa et al. 2002).

TGF-bs signalling pathways interact with other pathways (crosstalk). These interactions further promote the influence of TGF-bs on cells. Thus, besides the important role of Smads proteins, there are also proteins such as Rho, p53MAPK (p53 mitogen activated protein kinase) Erk (extracellular signal regulated kinase), JNK(c-jun-NH2-kinase), PI-3K (phosphatidylinositol-3-kinase), which affect, through TGFbs, the regulation of transcription, the changes in cell forms, the loss of cell cohesion and the mobility of cells (Derynck και συν. 2001, Bakin και συν. 2002, Grady 2005, Moustakas και συν. 2005).

αλληλεπιδρούν και με άλλα μονοπάτια (crosstalk). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές διευκολύνουν ακόμη περισσότερο την επίδραση των TGF-βs στα κύτταρα. Έτσι εκτός του σημαντικού ρόλου των Smads πρωτεϊνών υπάρχουν πρωτεΐνες όπως οι Rho, p53MAPK (p53 mitogen activated protein kinase, Erk (extracellular signal regulated kinase), JNK (c-jun-NH2-kinase), PI-3K (phosphatidylinositol-3-kinase), οι οποίες μέσω των TGFβs παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, στις αλλαγές του σχήματος των κυττάρων, στην απώλεια της κυτταρικής συνοχής και στην κινητικότητα (Derynck και συν. 2001, Bakin και συν. 2002, Grady 2005, Moustakas και συν. 2005).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση πιθανής έκφρασης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) σε κακοήθεις όγκους των σιαλογόνων αδένων καθώς επίσης και πιθανή συσχέτιση της έκφρασης αυτής με τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος και με κλινικές παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η εντόπιση αλλά και το κλινικό στάδιο της νόσου (σύστημα TNM) όπως προκύπτουν από τις ιστοπαθολογικές εκθέσεις των παρασκευασμάτων.

ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό της μελέτης αποτέλεσε εγκυβωτισμένο βιοπτικό υλικό από 54 ασθενείς με κακοήθη όγκο των σιαλογόνων αδένων κατά τη χρονική περίοδο 1996-2008.

Τα κλινικά στοιχεία που αφορούσαν στην ηλικία, στο φύλο των ασθενών, στο μέγεθος και στο είδος των όγκων συνελέγησαν από τα παραπεμπτικά των ιστοπαθολογικών εκθέσεων.

Από τις 54 περιπτώσεις οι 29 (53,7%) ήταν άνδρες και οι 25 (46,3%) γυναίκες (Πίνακας 1).

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 16 έως και 75 έτη με μέσο όρο τα 53,4 έτη. Η ηλικία διαχωρίστηκε σε δεκαετίες με την 2η-4η δεκαετία να αντιστοιχεί σε 9 ασθενείς (16.7%), την 5η σε 9 ασθενείς (16,7%), την 6η σε 17 (31,5%) και την 7η και πάνω σε 19 (35,2%) (Πίνακας 2).

Από πλευράς εντόπισης των βλαβών 31 (57,4%) παρατηρήθηκαν στην υπερώα, 12 (22,2%) στην παρωτίδα, 3 (5,6%) στον υπογνάθιο αδένα, 1 (1,9%) στον υπογλώσσιο, 3 (5,6%) στο βλεννογόνο της παρειάς, 3 (5,6%) στην οπίσθια μοίρα της γλώσσας και τέλος 1 (1,9%) στο οπισθογόμφιο τρίγωνο (Πίνακας 3).

Η σταδιοποίηση των κακοήθων όγκων των μειζόνων σιαλογόνων αδένων βασίστηκε στο σύστημα TNM (World Health Organization –International Academy of Pathology 2005) που λαμβάνει υπόψιν το μέγεθος του όγκου, την επέκτασή του, τις μεταστάσεις και τη διήθηση των επιχώριων ή απομακρυσμένων λεμφαδένων.

Το σύστημα TNM παραμένει παγκοσμίως αποδεκτό αν και δεν περιλαμβάνει παραμέτρους όπως το βάθος διήθησης της πρωτοπαθούς βλάβης, την εξωκαψική

The aim of this paper is to investigate the possible expression of transforming growth factor (TGF-b1) in malignant salivary gland tumours, as well as the possible correlation of this expression with the histological type of the carcinoma and with clinical parameters such as the patient's age and gender, the location and the clinical stage of the disease (TNM system), as indicated by the pathology reports for the specimen.

MARERIAL AND METHODS

The material of this study included paraffin embedded bioptic material obtained from 54 patients who presented with malignant salivary gland tumours in the period between 1996 and 2008.

Clinical data related to age and gender of each patient and the size and type of each tumour were obtained from the histopathology reports.

Of these 54 patients, 29 (53.7%) were male and 25 (46.3%) female (Table 1).

The age of our patients ranged between 16 and 75 years, with an average of 53.4 years. Their ages were divided into decades, with 9 patients (16.7%) in the 2nd – 4th decade, 9 patients (16.7%) in the 5th, 17 patients (31.5%) in the 6th and 19 (35.2%) in the 7th or above (Table 2).

In terms of lesion location, 31 (57.4%) were found in the palate, 12 (22.2%) in the parotid, 3 (5.6%) in the

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων ανάλογα με το φύλο

Table 1. Classification of malignant salivary gland tumours by gender

Φύλο/Gender	N	(%)
Άνδρας/Male	29	53.7
Γυναίκα/Female	25	46.3
Σύνολο/Total	**54**	**100.0**

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων ανάλογα με την ηλικία

Table 2. Classification of malignant salivary gland tumours by age group

Ηλικία/Age	N	(%)
16-39	9	16.7
40-49	9	16.7
50-59	17	31.5
60-75	19	35.2
Σύνολο/Total	**54**	**100.0**
Εύρος/Range	**16-75**	
Μέση Τιμή/Mean value	**53.4**	

διήθηση κλπ. Η ταξινόμηση των κακοήθων όγκων των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων πραγματοποιείται σύμφωνα με τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για άλλα καρκινώματα στην ανατομική περιοχή στην οποία αυτοί βρίσκονται π.χ. στοματική κοιλότητα. Οι Spiro και συν. (1991) έχουν εφαρμόσει με επιτυχία τα κριτήρια που ισχύουν για το καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο της στοματικής κοιλότητας. Με βάση το σύστημα TNM, ως στάδιο I ταξινομήθηκαν 16 περιστατικά (29,6%), ως στάδιο II 16 (29,6%), ως στάδιο III 13 (24,1%) και τέλος ως στάδιο IVA 9 (16,7%) (Πίνακας 4).

Τα 54 ιστολογικά παρασκευάσματα υποβλήθηκαν σε μικροσκοπική μελέτη από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, σε τομές 5μm, χρωσμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε η αρχική διάγνωση αλλά και ο βαθμός διαφοροποίησης των όγκων. Η διάγνωση καθορίστηκε με βάση την τελευταία ιστολογική ταξινόμηση των όγκων των σιαλογόνων αδένων σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO), την Διεθνή Οργάνωση για την Ερευνα του Καρκίνου (IARC) και την Διεθνή Ακαδημία Παθολογίας (IAP) όπως αυτή παρουσιάστηκε στην διεθνή διάσκεψη για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου που πραγματοποιήθηκε στη Λυόν της Γαλλίας τον Ιούλιο του 2003 και δημοσιεύτηκε το 2005 (Barnes και συν. 2005). Σύμφωνα με τα ανωτέρω στην παρούσα μελέτη διακρίθηκαν:

19 αδενοκυστικά καρκινώματα από τα οποία 7 (13,0%) ήταν υψηλής κακοήθειας (high grade) και 12 (22,2%) μέσης κακοήθειας (intermediate grade).

Πίνακας 3. Ταξινόμηση των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων ανάλογα με την εντόπιση

Table 3. Classification of malignant salivary gland tumours by location

Εντόπιση όγκων/Tumour location	N	(%)
Υπερώα/ Palate	31	57.4
Παρωτίδα/ Parotid gland	12	22.2
Υπογνάθιος Αδένας/ Submandibular gland	3	5.6
Υπογλώσσιος Αδένας/ Sublingual gland	1	1.9
Βλεννογόνος Παρειάς/ Buccal mucosa	3	5.6
Οπίσθια Μοίρα Γλώσσας/ Base of the tongue	3	5.6
Οπισθογόμφιο Τρίγωνο/ Retromolar triangle	1	1.9
Σύνολο/ Total	**54**	**100.0**

submandibular gland, 1 (1.9%) in the sublingual gland, 3 (5.6%) in the bucal mucosa, 3 (5.6%) in the posterior part of the tongue and, last, 1 (1.9%) in the retromolar triangle (Table 3).

The staging of the malignant major salivary gland tumours was based on the TNM system (World Health Organisation –International Academy of Pathology 2005), which takes into account the tumour size and extension, as well as the (possible) metastases and infiltration of local or distant lymph nodes.

The TNM system is a universally accepted system, although it does not include factors such as the depth of infiltration of the primary lesion, extracapsular infiltration etc. Malignant minor salivary gland tumours are classified according to the criteria that have been set for other carcinomas in the anatomic area where they are located, e.g. the oral cavity. Spiro et al. (1991) have successfully applied the criteria for the squamous epithelium of the oral cavity. According to the TNM system, 16 cases (29.6%) were classified as stage I, 16 (29.6%) as stage II, 13 (24.1%) as stage III and 9 (16.7%) as stage IVA (Table 4).

The 54 histologic specimen were studied microscopically by two independent observers, on 5μm sections stained with hematoxylin eosin. This way, the initial diagnosis and the tumour differentiation grade were confirmed. The diagnosis was established on the last histologic classification of salivary gland tumours proposed by the World Health Organisation (WHO), the International Association for Research on Cancer (IARC) and the International Academy of Pathology (IAP), as presented at the international conference on head and neck cancer that was held in Lyon, France, in July 2003 and published in 2005 (Barnes et al. 2005). According to the above-mentioned criteria, in the present study the following were identified:

19 adenoid cystic carcinomas, of which 7 (13.0%) were high grade and 12 (22.2%) intermediate grade.

13 mucoepidermoid carcinomas, of which 2 (3.7%)

Πίνακας 4. Ταξινόμηση των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων ανάλογα με το στάδιο (σύστημα TNM–WHO 2005)

Table 4. Classification of malignant salivary gland tumours by stage (TNM system - WHO 2005)

Στάδιο/Stage	N	(%)
I	16	29.6
II	16	29.6
III	13	24.1
IVA	9	16.7
Σύνολο/Total	**54**	**100.0**

13 βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα, 2 (3,7%) υψηλής κακοήθειας, 3 (5,6%) διάμεσης κακοήθειας και 8 (14,8%) χαμηλής κακοήθειας (low grade).
5 (9,3%) πολύμορφα χαμηλού βαθμού κακοήθειας αδενοκαρκινώματα
2 (3,7%) αδενοκαρκινώματα μη συγκεκριμένης ταξινόμησης (non otherwise specified – NOS)
1 (1,9%) καρκίνωμα των εκφορητικών πόρων των σιαλογόνων αδένων
3 (5,6%) βλεννώδη αδενοκαρκινώματα
1 (1,9%) καρκίνωμα από πλειόμορφο αδένωμα
4 (7,4%) βασσικοκυτταρικά αδενοκαρκινώματα
6 (11,1%) μυοεπιθηλιακά καρκινώματα (Πίνακας 5).
Ακολούθησε ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές ιστών των 5μm, η οποία περιελάμβανε αποπαραφίνωση, ενυδάτωση και πρωτεολυτική κατεργασία των τομών. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε επώαση με καταλυτικό αντιδραστήριο και με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού TGF-β1 (sc-52893, Santa Cruz Biotechnology, Inc) σε αραίωση 1:50. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές από θηλώδη καρκινώματα θυρεοειδούς. Τέλος μετά τη χρήση χρωμογόνου και αντιχρώσης ακολούθησε αφυδάτωση και κάλυψη των τομών.
Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών του υλικού της μελέτης για το αντίσωμα του TGF-β1 έγινε ημιποσοτικά ανεξάρτητα από δύο έμπειρους παθολογοανατόμους. Σε περίπτωση διαφωνίας οι τομές επανεξετάσθηκαν από κοινού. Σε κάθε ιστολογική τομή καθορίστηκαν 4 περιοχές αξιολόγησης (οπτι-

were high grade, 3 (5.6%) intermediate grade and 8 (14.8%) low grade.
5 (9.3%) plyomorphic low-grade adenocarcinomas
2 (3.7%) non-otherwise specified adenocarcinomas (NOS)
1 (1.9%) carcinoma of the salivary gland excretion ducts
3 (5.6%) mucous adenocarcnomas
1 (1.9%) carcinoma from pleomorphic adenoma
4 (7.4%) basal cell adenocarcinomas
6 (11.1%) myoepithelial carcinomas (Table 5).
Immunohistochemical staining was then carried out on 5μm tissue sections, and included deparafination, rehydration and proteolytic treatment of these sections. Subsequently, they were incubated with mouse monoclonal antibodies using a catalytic reactor TGF-b1 (sc-52893, Santa Cruz Biotechnology, Inc) in a 1:50 dilution. As positive witnesses, histological sections from papillary thyroid carcinomas were used. Finally, the use of chromogen and counterstain was followed by dehydration and covering of the sections.
The evaluation of the immunohistochemical features of the study material for the TGF-b1 antibody was carried out by two independent experienced pathologists (semiquantitive analysis). In case of disagreement, the sections were reexamined by both of them. In each histological section, 4 areas of evaluation (optical fields) were specified. This evaluation was carried out across the length of the tissue and involved areas that did not

Πίνακας 5. Ιστοπαθολογική ταξινόμηση των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων
Table 5. Histopathological classification of malignant salivary glands

Ιστοπαθολογική ταξινόμηση/Histopathological classification	N	(%)
Αδενοκυστικό καρκίνωμα High grade/High grade adenoid cystic carcinoma	7	13.0
Αδενοκυστικό καρκίνωμα Intermediate grade/ Intermediate grade adenoid cystic carcinoma	12	22.2
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα low grade/ Low grade mucoepidermoid carcinoma	8	14.8
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα intermediate grade/ Intermediate grade mucoepidermoid carcinoma	3	5.6
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα high grade/ High grade mucoepidermoid carcinoma	2	3.7
Πολύμορφο low grade αδενοκαρκίνωμα/ Pleomorphic low grade adenocarcinoma	5	9.3
Αδενοκαρκίνωμα NOS/NOS adenocarcinoma	2	3.7
Βλεννώδες Αδενοκαρκίνωμα/Mucous adenocarcinoma	3	5.6
Καρκίνωμα εκφορητικών πόρων των σιαλογόνων αδένων/ Salivary duct carcinoma	1	1.9
Καρκίνωμα από πολύμορφο αδένωμα/Carcinoma ex pleomorphic adenoma	1	1.9
Βασικοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα/Basal cell adenocarcinoma	4	7.4
Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα/Myoepithelial carcinoma	6	11.1
Σύνολο/Total	**54**	**100.0**

κά πεδία). Η αξιολόγηση έγινε σε όλη την έκταση του ιστού και αφορούσε σε περιοχές όπου δεν υπήρχαν ιστοτεχνικά σφάλματα και πληρούσαν τα ιστολογικά κριτήρια των βλαβών. Σε κάθε οπτικό πεδίο εκτιμήθηκαν το ποσοστό των θετικά ανοσοχρωσμένων κυττάρων και η ένταση της ανοσοχρώσης. Η συνολική ανοσοαντίδραση προκύπτει από το μέσο όρο των 4 οπτικών πεδίων της κάθε τομής. Η τιμή ανοσοαντίδρασης απαντά και σε άλλες μελέτες (Allred και συν. 1993, Coppola και συν. 2004, Figueroa και συν. 2009) όπου ελέγχεται η ανοσοϊστοχημική έκφραση βιολογικών μορίων (Πίνακας 6).

Στατιστικές μέθοδοι: Για τη συσχέτιση της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού με κλινικούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν πίνακες διπλής εισόδου. Η στατιστική σημαντικότητα, η ισχύς και η κατεύθυνση των εκάστοτε σχέσεων, αξιολογήθηκε μέσω του συντελεστή tau κατά Kendall και του σχετικού p-value. Ως μέτρο της δύναμης της συσχέτισης αναφέρεται το Kendall's tau-b και το το Kendall's tau-c για πίνακες με διαφορετικό αριθμό στηλών και γραμμών (Agresti και Allan, 1996). Να σημειωθεί ότι τόσο το tau-b όσο και το tau-c κυμαίνονται από το -1 έως το + 1. Οι ακραίες τιμές υποδηλώνουν τέλεια αρνητική ή θετική αντίστοιχα συσχέτιση ενώ το 0 δηλώνει πλήρη απουσία συσχέτισης. Για την περίπτωση μη διατεταγμένων παραγόντων (εντόπιση) χρησιμοποιήθηκε έλεγχος x2. Επιπλέον οι σχέσεις αυτές μελετήθηκαν μέσω μοντέλων διατεταγμένης λογιστικής παλινδρόμησης (Hosmer και Lemeshow, 2000). Τα odds ratios που προκύπτουν από αυτά τα μοντέλα ερμηνεύονται ως πηλίκο πιθανοτήτων για αυξημένη έκφραση μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το 0.05 ενώ αποτελέσματα με p-value μεταξύ του 0.05 και του 0.10 χαρακτηρίζονται ως ενδεικτικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1): Η έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1) αξιολογήθηκε ξεχωριστά για τα καρκινικά κύτταρα των όγκων των σιαλογόνων

include histotechnical errors and met the histological criteria for lesions. In each optical field, the percentage of positively immunostained cells and the intensity of immunostaining were evaluated. The overall immunoreaction is given by the average of the 4 optical fields of each section. Immunoreaction value also occurs in other studies (Allred et al. 1993, Coppola et al. 2004, Figueroa et al. 2009), examining the immunohistochemical expression of biological molecules (Table 6).

Statistical methods: To correlate the expression of transforming growth factor with clinical factors, we used two way tables. The statistical significance, strength and direction of the individual relations were evaluated using Kendall's tau correlation coefficient and the corresponding p-value. Kendall's tau-b and Kendall's tau-c are mentioned as a measure of the strength of the correlation in tables with different numbers of columns and lines (Agresti and Allan, 1996). It should be noted here that both tau-b and tau-c range between -1 and +1. The extreme values indicate a perfectly negative or positive correlation respectively, while 0 indicates a complete absence of correlation. For non categorical data (location), x2 test was used. Moreover, these relations were studied by means of ordered logistic regression models (Hosmer and Lemeshow, 2000). The odds ratios resulting from these models are interpreted as the quotient of the possibilities for increased expression between the compared groups. 0.05 was used as the level of statistical significance, while results with p-value between 0.05 and 0.10 were characterised as indicative.

RESULTS

TGF-b1 expression: TGF-b1 expression was evaluated separatelly for salivary gland tumour cells and the stroma (stroma cells and intercellular substance).

In normal salivary gland tissue, it is expressed at a low concentration in epithelial and myoepithelial cells of the ducts and focally in the stroma (Dillard at al. 2001).

In the malignant tumours of the study, TGF-b1 expression was weak and focal. A total (++) immunoreaction

Πίνακας 6. Κλίμακα αξιολόγησης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης
Table 6. Immunostaining evaluation scale

Συνολική ανοσοαντίδραση/ Total immunoreaction	Ποσοστό ανοσοχρωσμένων κυττάρων/ Percentage of immunostained cells	Ένταση ανοσοχρώσης/Immunostaining intensity
-	< 5%	Απουσία ανοσοχρώσης/No immunostaining
+/-	5-30%	Ισοδύναμα ασθενώς θετική/αρνητική ανοσοχρώση/ Equally weak positive/negative immunostaining
+	5-30%	Ασθενώς θετική ανοσοχρώση/Weakly positive immunostaining
++	31-60%	Έντονα θετική ανοσοχρώση/Highly positive immunostaining

αδένων και για το υπόστρωμα (κύτταρα του υποστρώματος και μεσοκυττάρια ουσία).
Σε φυσιολογικό ιστό σιαλογόνων αδένων εκφράζεται σε μικρό ποσοστό σε επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα των πόρων και εστιακά στο υπόστρωμα (Dillard και συν. 2001).
Στους κακοήθεις όγκους της μελέτης η έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β1 ήταν ασθενής και εστιακή. Συνολική ανοσοαντίδραση (++) με θετικά καρκινικά κύτταρα 31-60% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 1,8 % των κακοήθων όγκων ενώ ανοσοαντίδραση (+) με θετικά καρκινικά κύτταρα 5-30% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 33,3% των κακοήθων όγκων. Η ανοσοχρώση παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων (Πίνακας Α.1).
Στο υπόστρωμα, συνολική ανοσοαντίδραση (++) και

with 31-60% positive cancer cells was observed in 1.8 % of the malignant tumours, while (+) immunoreaction with 5-30% positive cancer cells was observed in 33.3% of the malignant tumours. Immunostaining was observed in the cytoplasm of neoplastic cells (Table A1).
In the stroma, the total (++) and (+) immunoreaction was found to the be 1.8% and 37.0% respectively (Table A2).
In high-grade adenoid cystic carcinomas, the total (+) immunoreaction with 5-30% positive cancer cells was 28.6%, while in intermediate-grade carcinomas it was 25.0% (Fig. 1). Higher expression rates were not observed in any of the above.
In high, intermediate and low-grade mucoepidermoid carcinomas, the total (++) immunoreaction with 31-60% positive cancer cells was 0.0%, 0.0% and 12.5%

Πίνακας Α.1. Έκφραση % του TGF-β1 σε νεοπλασματικά κύτταρα των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων

Table A.1. TGF-b1 expression (%) in neoplastic cells of malignant salivary gland tumours.

	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1)				Σύνολο/ Total
	-	+/-	+	++	
	N* (%)	N* (%)	N* (%)	N* (%)	
Διάγνωση/Diagnosis					
Αδενοκυστικό καρκίνωμα high grade/ High grade adenoid cystic carcinoma	5 (71.4)	0 (0.0)	2 (28.6)	0 (0.0)	7 (100.0)
Αδενοκυστικό καρκίνωμα Internediate grade/ Intermediate grade adenoid cystic carcinoma	9 (75.0)	0 (0.0)	3 (25.0)	0 (0.0)	12 (100.0)
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα low grade/ Low grade mucoepidermoid carcinoma	7 (87.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	8 (100.0)
Βλεννοεπιδερμοειδές Καρκίνωμα intermediate grade/ Intermediate grade mucoepidermoid carcinoma	0 (0.0)	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0.0)	3 (100.0)
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα high grade/ High grade mucoepidermoid carcinoma	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100.0)
Πολύμορφο χαμηλού βαθμού κακοήθειας αδενοκαρκίνωμα/ Pleomorphic low grade adenocarcinoma	1 (20.0)	0 (0.0)	4 (80.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
Αδενοκαρκίνωμα NOS/NOS adenocarcinoma	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100.0)	0 (0.0)	2 (100.0)
Βλεννώδες Αδενοκαρκίνωμα/ Mucous adenocarcinoma	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	3 (100.0)
Καρκίνωμα των εκφορητικών πόρων των σιαλογ. αδένων/Salivary duct carcinoma	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Καρκίνωμα από πολύμορφο αδένωμα/ Carcinoma ex pleomorphic adenoma	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Βασικοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα/ Basal cell adenocarcinoma	4 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (100.0)
Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα/ Myoepithelial carcinoma	4 (66.7)	0 (0.0)	2 (33.3)	0 (0.0)	6 (100.0)
Σύνολο N* (%)/Total N* (%)	**34 (62.9)**	**1 (1.8)**	**18 (33.3)**	**1 (1.8)**	**54 (100.0)**

N* αριθμός περιπτώσεων/N* number of cases

(+) παρατηρήθηκε σε ποσοστό 1,8% και 37,0% αντίστοιχα (Πίνακας Α.2).
Στα αδενοκυστικά καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας συνολική ανοσοαντίδραση (+) με θετικά καρκινικά κύτταρα 5-30% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 28,6% ενώ σε διάμεσης κακοήθειας σε ποσοστό 25,0% (Εικ.1). Μεγαλύτερη έκφραση δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα παραπάνω.
Στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα υψηλής, ενδιάμεσης και χαμηλής κακοήθειας συνολική ανοσοαντίδραση (++) με θετικά καρκινικά κύτταρα (31-60%) παρατηρήθηκε σε ποσοστό 0.0%, 0.0% και 12.5% αντίστοιχα (Εικ. 2), ανοσοαντίδραση (+) με θετικά καρκινικά κύτταρα 5-30% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 0.0%, 66,7% και 0,0% και τέλος ανοσοαντίδραση (+_) σε ποσοστό 0,0%, 33,3% και 0,0% αντίστοιχα (Πίνακας Α.1).
Σε πλειόμορφα αδενοκαρκινώματα χαμηλής κακοήθειας συνολική ανοσοαντίδραση (+) με θετικά καρκινικά κύτταρα 5-30% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 80,0% και

respectively (Fig. 2), while (+) immunoreaction with 5-30% positive cancer cells was 0.0%, 66.7% and 0.0%, and, (+_) immunoreaction was 0.0%, 33.3% and 0.0% finally respectively (Table A.1).
In low-grade pleomorphic adenocarcinomas, the total (+) immunoreaction with 5-30% positive cancer cells was 80.0%, while in myoepithelial carcinomas, the total (-) immunoreaction with <5% positive cancer cells was 66.7% and (+) immunoreaction was 33.3%.
Regarding TGF-b1 expression in the stroma, in high and intermediate-grade adenoid cystic carcinomas the total (++) immunoreaction with 31-60% positive cancer cells was 14.3% and 0.0% respectively, while (+) immunoreaction was 28.6% and 41.7% respectively.
In high, intermediate and low-grade mucoepidermoid carcinomas, (+) immunoreaction with (5-30%) positive cancer cells was 12.5%, 66.7% and 100.0% respectively (Table A.2).
In low-grade pleomorphic adenocarcinomas, the total (-) immunoreaction with <5% positive cancer cells was

Πίνακας Α.2. Έκφραση % του TGF-β1 στο υπόστρωμα των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων
Table A.2. TGF-b1 expression (%) in the stroma of malignant salivary gland tumours.

	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1)			
	-	+	++	
	N* (%)	N* (%)	N* (%)	Σύνολο
Διάγνωση/Diagnosis				
Αδενοκυστικό καρκίνωμα high grade/ High grade adenoid cystic carcinoma	4 (57.1)	2 (28.6)	1 (14.3)	7 (100.0)
Αδενοκυστικό καρκίνωμα Internediate grade/ Intermediate grade adenoid cystic carcinoma	7 (58.3)	5 (41.7)	0 (0.0)	12 (100.0)
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα low grade/ Low grade mucoepidermoid carcinoma	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	8 (100.0)
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα intermediate grade/ Intermediate grade mucoepidermoid carcinoma	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0.0)	3 (100.0)
Βλεννοεπιδερμοειδές Καρκίνωμα high grade/ High grade mucoepidermoid carcinoma	0 (0.0)	2 (100.0)	0 (0.0)	2 (100.0)
Πολύμορφο χαμηλού βαθμού κακοήθειας αδενοκαρκίνωμα/ Pleomorphic low grade adenocarcinoma	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
Αδενοκαρκίνωμα NOS/NOS adenocarcinoma	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100.0)
Βλεννώδες Αδενοκαρκίνωμα/Mucous adenocarcinoma	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	3 (100.0)
Καρκίνωμα των εκφορητικών πόρων των σιαλογ. αδένων/ Salivary duct carcinoma	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Καρκίνωμα από πολύμορφο αδένωμα/ Carcinoma ex pleomorphic adenoma	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Βασικοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα/ Basal cell adenocarcinoma	0 (0.0)	4 (100.0)	0 (0.0)	4 (100.0)
Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα/Myoepithelial carcinoma	6 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)
Σύνολο N* (%)/Total N* (%)	**33 (61.1)**	**20 (37.0)**	**1 (1.8)**	**54 (100.0)**

N* αριθμός περιπτώσεων/N* number of cases

σε μυοεπιθηλιακά καρκινώματα συνολική ανοσοαντίδραση (-) με θετικά καρκινικά κύτταρα <5% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 66,7% και ανοσοαντίδραση (+) παρατηρήθηκε σε ποσοστό 33,3%.

Όσον αφορά στην έκφραση του TGF-β1 στο υπόστρωμα σε υψηλής και ενδιάμεσης κακοήθειας αδενοκυστικά καρκινώματα παρατηρήθηκε συνολική ανοσοαντίδραση (++) με θετικά καρκινικά κύτταρα (31-60%) σε ποσοστό 14,3% και 0,0% αντίστοιχα, ενώ ανοσοαντίδραση (+) σε ποσοστό 28,6% και 41,7% αντίστοιχα. Σε βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα χαμηλής, ενδιάμεσης και υψηλής κακοήθειας ανοσοαντίδραση (+) με θετικά καρκινικά κύτταρα (5-30%) παρατηρήθηκε σε ποσοστό 12,5%, 66,7% και 100,0% αντίστοιχα (Πίνακας Α.2).

Σε πλειόμορφα αδενοκαρκινώματα χαμηλής κακοήθειας συνολική ανοσοαντίδραση (-) με θετικά καρκινικά κύτταρα <5% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 80,0%, ενώ ανοσοαντίδραση (+_) σε ποσοστό 20,0% και σε μυοεπιθηλιακά καρκινώματα συνολική ανοσοαντίδραση (-) με θετικά καρκινικά κύτταρα <5% παρατηρήθηκε σε ποσοστό 100,0%.

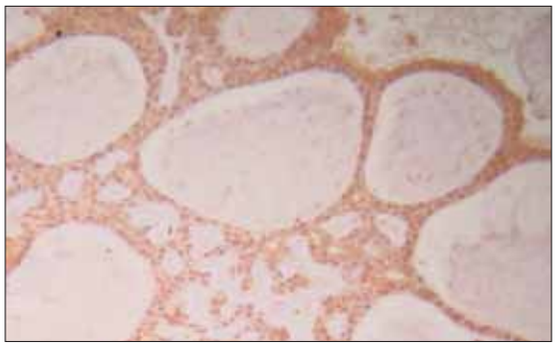
Η στατιστική διερεύνηση για πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β1 όπως αυτός εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα των σιαλογόνων αδένων με κλινικά χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο, εντόπιση, στάδιο της νόσου-TNM) δεν κατέδειξε κάποιο σημαντικό εύρημα (Πίνακας Ι. και Γράφημα 1.1-1.4).

Η συσχέτιση της έκφρασης του TGF-β1 στο υπόστρωμα των κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων με κλινικούς παράγοντες όπως φύλο, ηλικία και εντόπιση δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Στατιστικά σημαντική σχέση παρατηρήθηκε με τη σταδιοποίηση των κακοήθων όγκων με p-value 0.039 (Πίνακας ΙΙ και Γραφήματα 2.1-4). Τα νεοπλάσματα σε στάδιο ΙΙΙ και ΙVA φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη έκφραση TGF-β1 συγκριτικά με αντίστοιχα κακοήθη νεοπλάσματα σταδίου Ι με p-values 0.062 και 0.074 αντίστοιχα (Πίνακας ΙΙΙ).

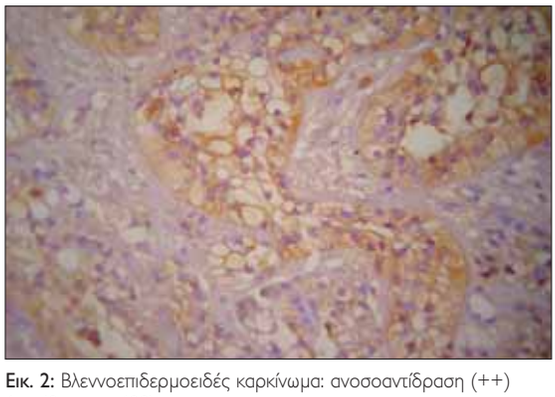
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αλληλεπιδράσεις επιθηλίου μεσεγχύματος επηρεάζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ιστών αλλά και τη δημιουργία και εξέλιξη νεοπλασμάτων μέσω μοριακών σημάτων. Τα μοριακά σήματα μέσω ποικίλων οδών επιδρούν στα κύτταρα τροποποιώντας τη δράση τους (Dumont και Artega, 2000).

Τα μέλη της οικογενείας των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού TGFβs παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς επίσης και στον μετέπειτα έλεγχο του ανοσιακού συστήματος των ενηλίκων και διεγείρουν την αγγειογένεση. Η δράση τους αφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφο-



Εικ. 1: Αδενοκυστικό καρκίνωμα: ανοσοαντίδραση (+) (μεγέθυνση x 100).
Fig. 1: Adenoid cystic carcinoma: (+) immunoreaction (magnification x100)



Εικ. 2: Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα: ανοσοαντίδραση (++) (μεγέθυνση x 400).
Fig. 2: Mucoepidermoid carcinoma: (++) immunoreaction (magnification x400).

80.0% and (+_) immunoreaction was 20.0%, while, in myoepithelial carcinomas, the total (-) immunoreaction with <5% positive cancer cells was 100.0%.

The statistical investigation of a possible correlation of TGF-b1 expression, as expressed in salivary gland cancer cells, with clinical characteristics (age, gender, location, TNM stage of disease) did not reveal any significant findings (Table I, Graph1.1-1.4).

The correlation of TGF-b1 expression in the stroma of malignant salivary gland tumours with clinical factors such as the gender, age and location, did not indicate statistically significant results. However, a statistically significant relation was observed between that and the staging of malignant tumours with p-value = 0.039 (Table II and Graphs 2.1-4). Stage III and IVA neoplasms seem to correlate with increased TGF- b1 expression, compaired to equivalent stage I malignant neoplasms with p-values= 0.062 and 0.074 respectively (Table III).

DISCUSSION

Epithelial - mesenchymal interactions affect the development and differentiation of tissues, as well as the development and progression of neoplasms via molecular signals. Through various paths, these molecular sig-

Πίνακας Ι. Συσχέτιση της έκφρασης του TGF-β1 των καρκινικών κυττάρων των νεοπλασμάτων με κλινικά χαρακτηριστικά. Σε παρένθεση δινονται οι τιμές Kendall's tau.

Table I. The correlation between TGF-b1 expression of neoplastic cancer cells and clinical characteristics. Kendall's tau values are given in brackets.

	TGF-b1					
	-	+/-	+	++	Σύνολο/Total	p-value (Kendall's t)
	N* (%)	N* (%)	N* (%)	N* (%)	N* (%)	
Φύλο/Gender						
Άνδρας/Male	18 (62.1)	1 (3.4)	10 (34.5)	0 (0.0)	29 (100.0)	0.967
Γυναίκα/Female	16 (64.0)	0 (0.0)	8 (32.0)	1 (4.0)	25 (100.0)	(0.007)
Ηλικία/Age						
16-39	5 (55.6)	0 (0.0)	4 (44.4)	0 (0.0)	9 (100.0)	
40-49	7 (77.8)	0 (0.0)	2 (22.2)	0 (0.0)	9 (100.0)	0.617
50-59	8 (47.1)	1 (5.9)	8 (47.1)	0 (0.0)	17 (100.0)	(-0.063)
60-75	14 (73.7)	0 (0.0)	4 (21.1)	1 (5.3)	19 (100.0)	
Εντόπιση όγκων/Tumour location						
Υπερώα/Palate	17 (54.8)	1 (3.2)	12 (38.7)	1 (3.2)	31 (100.0)	
Παρωτίδα/Parotid	8 (66.7)	0 (0.0)	4 (33.3)	0 (0.0)	12 (100.0)	0.746
Άλλο/Other	9 (81.8)	0 (0.0)	2 (18.2)	0 (0.0)	11 (100.0)	
Στάδιο/Stage						
I	11 (68.8)	0 (0.0)	5 (31.3)	0 (0.0)	16 (100.0)	
II	9 (56.3)	1 (6.3)	5 (31.3)	1 (6.3)	16 (100.0)	0.978
III	7 (53.8)	0 (0.0)	6 (46.2)	0 (0.0)	13 (100.0)	(-0.005)
IVA	7 (77.8)	0 (0.0)	2 (22.2)	0 (0.0)	9 (100.0)	

Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας η τιμή p-value 0.05. N* αριθμός περιπτώσεων/
The level of statistical signigicance is p-value 0.05. N* number of cases.

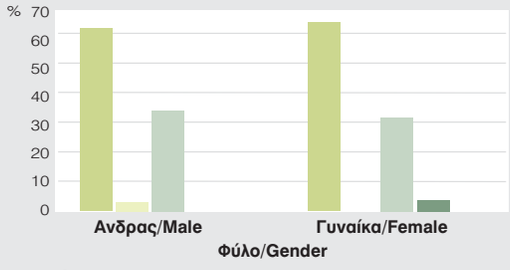
Πίνακας ΙΙ. Συσχέτιση της έκφρασης του TGF-β1 του υποστρώματος των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων με κλινικά χαρακτηριστικά. Σε παρένθεση δίνονται οι τιμές Kendall's tau.

Table II. The correlation between TGF-b1 expression in the stroma of malignant salivary gland neoplasms and clinical characteristics. Kendall's tau values are given in brackets

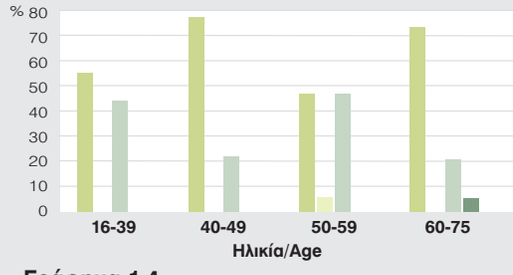
	TGF-b1					
	-	+/-	+	++	Σύνολο/Total	p-value (Kendall's t)
	N* (%)	N* (%)	N* (%)	N* (%)	N* (%)	
Φύλο/Gender						
Άνδρας/Male	19 (65.5)	0 (0.0)	10 (34.5)	0 (0.0)	29 (100.0)	
Γυναίκα/Female	14 (56.0)	0 (0.0)	10 (40.0)	1 (4.0)	25 (100.0)	
Ηλικία/Age						
16-39	7 (77.8)	0 (0.0)	2 (22.2)	0 (0.0)	9 (100.0)	
40-49	6 (66.7)	0 (0.0)	2 (22.2)	1 (11.1)	9 (100.0)	0.897
50-59	7 (41.2)	0 (0.0)	10 (58.8)	0 (0.0)	17 (100.0)	(0.015)
60-75	13 (68.4)	0 (0.0)	6 (31.6)	0 (0.0)	19 (100.0)	
Εντόπιση όγκων/Tumour location						
Υπερώα/Palate	20 (64.5)	0 (0.0)	11 (35.5)	0 (0.0)	31 (100.0)	
Παρωτίδα/Parotid	6 (50.0)	0 (0.0)	5 (41.7)	1 (8.3)	12 (100.0)	0.419
Άλλο/Other	7 (63.6)	0 (0.0)	4 (36.4)	0 (0.0)	11 (100.0)	
Στάδιο/Stage						
I	13 (81.3)	0 (0.0)	3 (18.8)	0 (0.0)	16 (100.0)	
II	10 (62.5)	0 (0.0)	5 (31.3)	1 (6.3)	16 (100.0)	0.039
III	6 (46.2)	0 (0.0)	7 (53.8)	0 (0.0)	13 (100.0)	(0.234)
IVA	4 (44.4)	0 (0.0)	5 (55.6)	0 (0.0)	9 (100.0)	

Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας η τιμή p-value 0.05. N* αριθμός περιπτώσεων/
The level of statistical signigicance is p-value 0.05. N* number of cases.

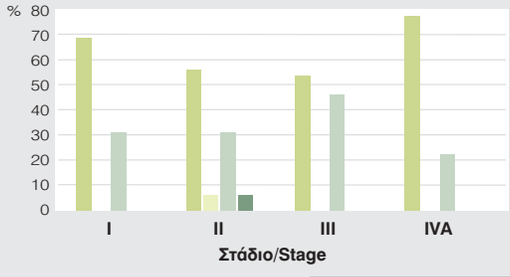
Γράφημα 1.1.
Έκφραση TGF-β1 ανάλογα με το φύλο
Graph 1.1.
TGF-b1 expression according to gender



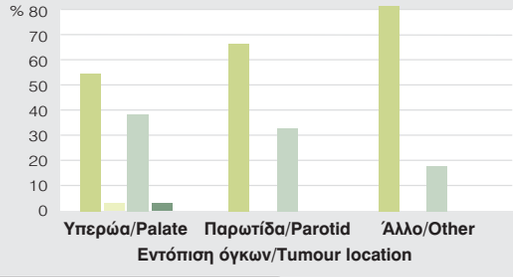
Γράφημα 1.2.
Έκφραση TGF-β1 ανάλογα με την ηλικία
Graph 1.2.
TGF-b1 expression according to age



Γράφημα 1.3.
Εκφραση του TGF-β1 ανάλογα
με το στάδιο των νεοπλασμάτων
Graph 1.3.
TGF-b1 expression according to neoplasm stage

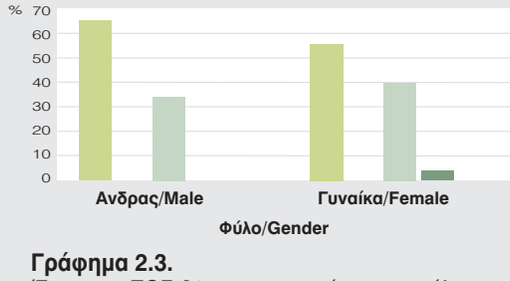


Γράφημα 1.4.
Έκφραση TGF-β1 ανάλογα
με την εντόπιση των νεοπλασμάτων
Graph 1.4.
TGF-b1 expression according to neoplasm location

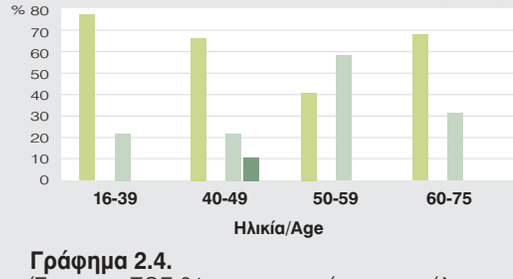


Έκφραση TGF-β1 - +/- + ++ +++

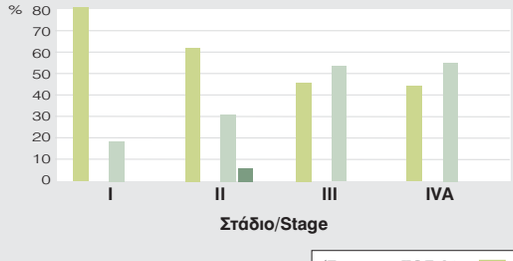
Γράφημα 2.1.
Έκφραση TGF-β1 του υποστρώματος
ανάλογα με το φύλο
Graph 2.1.
TGF-b1 expression in the stroma according to gender



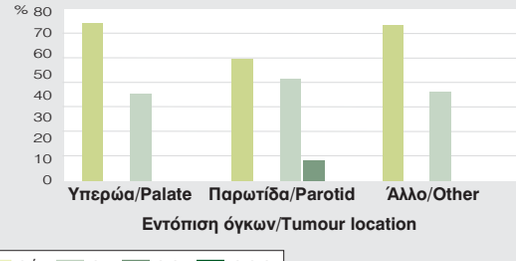
Γράφημα 2.2.
Έκφραση TGF-β1 στο υπόστρωμα
ανάλογα με την ηλικία
Graph 2.2.
TGF-b1 expression in the stroma according to age



Γράφημα 2.3.
Έκφραση TGF-β1 του υποστρώματος ανάλογα
με το στάδιο των κακοήθων νεοπλασμάτων
Graph 2.3.
TGF-b1 expression in the stroma according
to malignant neoplasm stage



Γράφημα 2.4.
Έκφραση TGF-β1 του υποστρώματος ανάλογα
με την εντόπιση των κακοήθων νεοπλασμάτων
Graph 2.4.
TGF-b1 expression in the stroma according
to malignant neoplasm location



Έκφραση TGF-β1 - +/- + ++ +++

ροποίηση, στη μετανάστευση, στη σύνθεση του εξωκυττάριου πλέγματος και στην απόπτωση (Markowitz και Roberts, 1996, Wilkstrom και συν. 1998, Heldin και συν. 2009). Αποτελούν έναν δυνητικό αναστολέα της ανάπτυξης σε μια πληθώρα κυττάρων όπως επιθηλιακών, ενδοθηλιακών, αιμοποιητικών και λεμφοκυττάρων. Σε περιπτώσεις όμως ύπαρξης όγκου τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι TGF-βs παίζουν ρόλο τόσο στις αλληλεπιδράσεις καρκινικών κυττάρων και υποστρώματος αλλά και στην εξέλιξη του όγκου. Οι TGF-βs που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα αλλά και από τα κύτταρα του υποστρώματος εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου συμβάλλουν στην διατήρηση αλλά και στην επέκτασή του (Markowitz και Roberts, 1996, Dumont και Arteaga, 2000).

Οι παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης συμφωνούν με έρευνα του Dillard και συν. (2001), οι οποίοι εξέτασαν την έκφραση του TGF-β1 σε 16 βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα. Έκφραση του TGF-β1 παρατηρήθηκε και στα 16 δείγματα ενώ εντοπίσθηκε στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων κυρίως στους πόρους των αδένων και σε κύτταρα του υποστρώματος. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η αυξημένη έκφραση του TGF-β1 στο νεοπλασματικό επιθήλιο και στο υπόστρωμα σχετίζεται με την εξέλιξη των όγκων. Έντονη έκφραση του TGF-β1 παρατηρήθηκε επίσης σε επιθηλιακά νεοπλασματικά κύτταρα σε αδενοκυστικά καρκινώματα σύμφωνα με έρευνα των Guo και συν. (2002).

Η διερεύνηση, στην παρούσα μελέτη, για πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του TGF-β1 στα καρκινικά κύτταρα των σιαλογόνων αδένων με κλινικά χαρακτηριστικά όπως η ηλικία, το φύλο και η εντόπιση των νεοπλασμάτων δεν κατέδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό εύρημα. Σε παρόμοια μελέτη των Desruisseau και συν. (2006) σε 193 ασθενείς με πρωτοπαθείς όγκους του μαστού, έκφραση του TGF-β1 παρατηρήθηκε στο 94,3% των ασθενών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία και το φύλο των ασθενών όπως επίσης και με το βαθμό κακοήθειας αλλά προέκυψε θετική συσχέτιση με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Σύμφωνα με μελέτη των Figueroa και συν. (2009) σε 623 γυναίκες με διηθητικά καρκινώματα του μαστού, η έκφραση του TGF-β1 ήταν κυρίως εξωκυττάρια στο μεγαλύτερο ποσοστό των όγκων (78%), εύρημα το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη με θετική έκφραση (5-30%) του TGF-β1 στο υπόστρωμα σε ποσοστό 37,0% σε σχέση με την αντίστοιχη στα νεοπλασματικά κύτταρα σε ποσοστό 33,3%. Σε αντίθεση όμως με την παρούσα μελέτη η έκφραση του TGF-β1 αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με μικρού μεγέθους και χαμηλής κακοήθειας όγκους (Figueroa και συν. 2009) και δόθηκε η ερμηνεία ότι πιθανόν η έκφραση του TGF-β1 να σχετίζεται με τη δράση του ως αναστολέα

Πίνακας III. Στατιστικό μοντέλο για την έκφραση του TGF-β1στο υπόστρωμα των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων ανάλογα με τη σταδιοποίησή τους

Table III. Statistical model for TGF-b1 expression in the stroma of malignant salivary gland neoplasms according to their staging

Παράγοντας/ Factor	Odds Ratio	95% C.I.	p-value
Στάδιο/Stage			
I*	1		
II	2.83	(0.56, 14.27)	0.208
III	4.79	(0.93, 24.79)	0.062
IVA	5.10	(0.85, 30.51)	0.074

Odds Ratios= Πηλίκο πιθανοτήτων για αυξημένη έκφραση/The ratio of chances for increased expression, CI= Διάστημα εμπιστοσύνης/Confidence Interval, p-value= Στατιστική σημαντικότητα/statistical significance

*Ομάδα αναφοράς/*Reference group

nals influence cells by altering their activity (Dumont and Artega, 2000).

TGF-b family members play a significant role in fetal development, as well as in the later control of the adult immune system, and stimulate angiogenesis. Their activity affects cell multiplication, differentiation and proliferation, as well as the composition of the extracellular matrix and the apoptosis (Markowitz and Roberts, 1996, Wilkstrom et al. 1998 Heldin et al. 2009). They are a potential suspender of development in a wide range of cells, such as epithelial, endothelial and haematopoietic cells and lymphocytes. In cases of tumours, however, experimental data indicate that TGF-bs affect both the interactions between cancer cells and the stroma and also tumour progression. TGF-bs released from cancer cells, as well as from stroma cells, into the tumour's microenvironment contribute to its survival and expansion (Markowitz and Roberts, 1996, Dumont and Arteaga, 2000).

The observations in this study are in agreement with a research by Dillard et al. (2001), who examined TGF-b1 expression in 16 mucoepidermoid carcinomas. TGF-b1 expression was detected in all 16 samples, and was located in the epithelial cell cytoplasm, mainly in gland ducts and stroma cells. According to the authors of that study, increased TGF-b1 expression is related to tumour progression. High TGF-b1 expression was also observed in epithelial neoplastic cells in adenoic cystic carcinomas, according to a research by Guo et al. (2002). In the present study, the investigation of a possible correlation of TGF-b1 expression in salivary gland cancer cells with clinical characteristics such as the age, gender and neoplasm location did not reveal any statistically significant findings. In a similar study by Desruisseau et

του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των όγκων.
Έντονη έκφραση του TGF-β1 έχει παρατηρηθεί επίσης και σε άλλες έρευνες σε κακοήθεις όγκους του προστάτη από τους Wikstrom και συν. (1998) στο 59% από τα 73 δείγματα των όγκων, χωρίς όμως αυτό να σχετίζεται με το στάδιο του όγκου.
Θετική συσχέτιση της έκφρασης του TGF-β1 με το βαθμό κακοήθειας των καρκινωμάτων αλλά και την επιβίωση των ασθενών παρατηρήθηκε σε έρευνες των Gorsch και συν. (1992) σε 42 δείγματα καρκίνου του μαστού, των Rosemary και συν. (1992) σε 54 διηθητικά καρκινώματα μαστού και των Ghellal και συν. (2000) σε 153 έντονα επιθετικά καρκινώματα.
Σε όλες τις παραπάνω έρευνες παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) σε κακοήθη νεοπλάσματα αδενικού ιστού όπως σιαλογόνων αδένων, μαστού και προστάτη καθώς και συσχέτιση της έκφρασης αυτής με διαφορετικούς κλινικούς και παθολογικούς παράγοντες. Η έκφραση του TGF-β1 σε κακοήθεις όγκους αδενικού επιθηλίου ενισχύει την άποψη ότι διαδραματίζει ρόλο στην ανάπτυξη και επέκταση των όγκων αυτών.
Ο ακριβής όμως τρόπος δράσης του TGF-β1 και οι αλληλεπιδράσεις μέσω διαφόρων μοριακών οδών χρήζει περαιτέρω μελέτης ώστε να αποσαφηνισθεί ο ρόλος του ως προγνωστικού δείκτη αλλά και η πιθανότητα να αποτελέσει στόχο μελλοντικών θεραπειών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κατέδειξαν:

A. αυξημένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) στα νεοπλασματικά κύτταρα και στο υπόστρωμα κακοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων, και
B. θετική συσχέτιση της έκφρασης του β1 με τη σταδιοποίηση των κακοήθων νεοπλασμάτων.

Τα αποτελέσματα της εργασίας υποστηρίζουν την συμμετοχή του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β1) στην καρκινογένεση αλλά και στην επέκταση του όγκου στους γύρω ιστούς πιθανότατα μέσω αλληλεπιδράσεων των καρκινικών κυττάρων με κύτταρα του μεσεγχύματος.

al. (2006) in 193 patients with primary breast tumours, TGF-b1 expression was observed in 94.3% of patients. No statistically significant correlation was found with the patients' age and gender or the grade of malignancy, however there was a positive correlation with lymph node metastases.
According to a study by Figueroa et al. (2009) in 623 women with infiltrating breast carcinomas, TGF-b1 expression was mainly extracellular in the majority of the tumours (78%), a finding also observed in the present study, where positive TGF-b1 expression (5-30%) in the stroma was found to be 37.0%, while in neoplastic cells it was 33.3%. However, in contrast to the present study, it was found that TGF-b1 expression correlates with small and low-grade tumours (Figueroa et al. 2009), and the explanation that was given was that TGF-b1 expression might be related to its activity as an inhibitor of cell reproduction at early stages of tumour development.
High TGF-b1 expression has also been observed in other researches on malignant prostate tumours by Wikstrom et al. (1998), in 59% of the 73 tumour samples; however this was not correlated with tumour stage. A positive correlation of TGF-b1 expression with the grade of malignancy, as well as with the survival of patients, was reported in researches by Gorsch et al. (1992) in 42 breast cancer samples, by Rosemary et al. (1992) in 54 infiltrating breast carcinoma samples and by Ghellal et al. (2000) in 153 highly aggressive carcinomas.
In all the above-mentioned researches, increased TGF-b1 expression was observed in malignant adenoid tissue neoplasms such as those of the salivary glands, breast and prostate, along with a correlation of this expression with different clinical and pathological factors. TGF-b1 expression in malignant tumours of the adenoid epithelium reinforces the opinion that TGF-b1 contributes to the development and extension of these tumours.
The exact way in which TGF-b1 acts, as well as its interactions through various molecular paths, have to be further investigated in order to clarify its role as a prognostic index and its potential use as a key target in future treatments.

CONCLUSIONS

The results of the present study indicated:

A. increased TGF-b1 expression in neoplastic cells and the stroma of malignant salivary gland tumours and
B. a positive correlation of b1 expression with the staging of malignant neoplasms

The results of our study support the involvement of TGF-b1 in carcinogenesis, as well as in the expansion of the tumour into neighbouring tissues, most likely through interactions between cancer cells and mesenchymal cells.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/REFERENCES

Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL: Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. J Nat Cancer Inst 85: 200-206, 1993

Arias MA: Epithelial Mesenchymal Interactions in Cancer and development. Cell 105: 425-31, 2001

Ariztia E, Subbarao V, Solt D, Rademaker A, Iyer A: Osteopontin contributes to hepatocyte growth factor-induced tumor growth and metastasis formation. Exper Cell Research 288(2): 257-67, 2003

Bakin A, Rinehart C: p38 mitogen activated protein kinase is required for TGF-b mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. J Cell Sci 115(15): 3193-206, 2002

Barnes L, Evanson J, Reichart P, Sidransky D: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumors. IARC Press Lyon 2005, pp 210

Chioni AM, Grose R: Organotypic modelling as a means of investigating epithelial stroma interactions during tumourigenesis. Fibrogenesis and Tissue Repair, Published online (1):8, 2008

Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers A, Yeatman T: Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. Clin Cancer Research 10:184-190, 2004

Derynck R, Zhang E: Smad dependent and Smad independent pathways in TGF-b family signaling. Nature 425(6958): 577-84, 2003

Desruisseau S, Palmari C, Giusti C, Romain S, Martin P, Berthois Y: Determination of TGF-b1 protein level in human primary breast cancers and relationship with survival. British J of Cancer. 94: 239-46, 2006

Dillard DG, Muller S, Cohen C, Bloch D, Del Gaudio JM, Gal A: High tumor grade in salivary gland mucoepidermoid carcinomas and loss of expression of transforming growth factor beta receptor type II. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127(6): 683-6, 2001

Dumont N, Artega CL: Transforming growth factor-beta and breast cancer: tumor promoting effects of transforming growth factor-β. Breast Cancer Res 2. 125-132,2000

Figueroa J, Flanders K, Garcia Closas M, Anderson W, Yang X, Matsumo R, Duggan M, Pfeifer R, Sherman M: Expression of TGF-b signaling factors in invasive breast cancer: relationships with age at diagnosis and tumor characteristics. Breast Cancer Res Treatm 24 (11): 211-300, 2009

Ghellal A, Li C, Hayers M; Prognostic significance of TGF-b1 and TGF-b3 in human breast carcinoma. Anticancer Res 20: 4413-18, 2000

Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA: Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. Cancer Res 52: 6949-6952, 1992

Grady W: Transforming growth factor-b, Smads and cancer. Clin Cancer Res 11. (9): 3151-3154, 2005

Guarino M: Epithelial mesenchymal transition and tumor invasion. Int J Biochem & Cell Biology 39: 2153-2160, 2007

Guo F, Jiang XC, Cheng RX: Expression of TGF-b1 and TGF bRI proteins in tissues of salivary adenoid cystic carcinoma. Human Yi Ke Da Xue Bao 28; 27 (3): 229-32, 2002

Heldin HC, Landstrom M, Moustakas A: Mechanism of TGF-b to growth arrest, apoptosis, and epithelial- mesenchymal transition. Current Op Cell Biology 21: 166-176, 2009

Hosmer, David W. Stanley Lemeshow: Applied Logistics Regression. 2nd Ed. New York; Chichester, Wiley 2000, pp 226-30

Markowitz SD, Roberts AB: Tumor suppressor activity of the TGF-b pathway in human cancers. Cytokine Growth Factor Rev 7(1): 93-102, 1996

Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor stroma interactions. Int J Cancer 119: 477-483, 2006

Moustakas A, Souchelyntskyi S, Heldin C: Smad regulation in TGF-b signal trasduction. J Cell Sci 114: 4359-4369, 2001

Pollard J: Tumor stroma interactions. Transforming growth factor-b isoforms and hypatocyte growth factor/ scatter factor in mammary gland ductal morphogenesis. Breast Cancer Research 3: 230-37, 2001

Rosmary A, Dearing W, Dearing S: Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. Eur J Cancer 28(2/3): 641-44, 1992

Spiro RH, Thaler HT, Hicks WF, Kher UA, Huvos AH, Strong EW: The importance of clinical staging of minor salivary gland carcinoma. Am J Surg. 162: 330-6, 1991

Walker RA, Dearing SJ: Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. Eur J Cancer 28:641-644, 1992

Wilkstrom P, Stattin P, Frank-Lissbrant I, Damber J, Berg A: Transforming growth factor-b1 is associated with angiogenesis, metastasis and poor clinical outcome in prostate cancer. The Prostate 37: 19-29, 1998

Zigrino P, Loffek S, Mauch C: Tumor stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. Biochimie 87: 321-328, 2004

Διεύθυνση επικοινωνίας:
Φωτόπουλος Διονύσιος
Εθν. Αντιστάσεως 41
121 34 Περιστέρι
Τηλ.: 210 5771181
e-mail: fotopoulos.dionisis@gmail.com

Address:
Fotopoulos Dionisios
41 Ethnikis Antistaseos Street
Peristeri 121 34, Athens - Greece
Tel.: 0030 210 5771181
e-mail: fotopoulos.dionisis@gmail.com