



MALMÖ HÖGSKOLA



Kan β -catenin användas som en prognostisk markör för utvecklingen av oral skivepitelcancer?

- En laborativ studie

Z. Pourakbar

Handledare: P. Lindberg**, R. Liedholm***

** Oral Patologi, Odontologiska fakulteten, Malmö högskola, Malmö.

*** Käkkirurgi och oral medicin, Odontologiska fakulteten, Malmö högskola, Malmö.

Examensarbete (30 hp)
Tandläkarprogrammet
Januari, 2014

Malmö högskola
Odontologiska fakulteten
205 06 Malmö

SAMMANFATTNING

Cirka 300 000 individer drabbas årligen i världen av oral cancer och mer än nittio procent av alla orala cancerformer utgörs av skivepitelcancer. Den femåriga prognosen är generellt 50 % och den 5-åriga relativa överlevnaden har under en tioårsperiod förblivit densamma. Detta motiverar utvecklingen av bättre prognostiska markörer och diagnostiska metoder för att tidigt identifiera de patienter som har risk att utveckla oral skivepitelcancer för att förbättra prognosen och minska lidandet genom tidig insatt behandling.

β -catenin är en adhesionsmolekyl som är viktig för bibehållandet av cellulär integration och avvikelser i celladhesionsmolekyler tros spela en central roll när tumörceller invaderar närliggande vävnad det vill säga metastaserar till andra organ.

Syftet med studien är att med hjälp av immunohistokemi undersöka om β -catenin kan fungera som en prognostisk markör för utvecklingen av oral skivepitelcancer. Detta görs genom att jämföra förekomsten av β -catenin med hjälp av monoklonala antikroppar i normalt skivepitel, dysplasi och cancer från 18 patienter som har diagnostiserats med oral skivepitelcancer. Infärgningen av Beta catenin jämfördes i normalt oralt skivepitel med cancer och dysplasi för alla biopsier för att undersöka om det förekommer någon skillnad av infärgningen. Förutom detta skedde även en jämförelse av normalt skivepitel med dysplasi och cancer inom varje enskild biopsi.

Resultaten visade att det finns en skillnad i uttrycket av β -catenin i normalt skivepitel jämfört med dysplasi och cancer i denna patientgrupp. I denna studie visade mer än 70 % av biopsierna en stark eller måttlig och stark infärgning av β -catenin i normalt skivepitel, mer än 60 % av biopsierna visade en måttlig eller måttlig och svag infärgning av dysplasi och 58,8 % av alla biopsier visade svag infärgning eller ingen och svag infärgning av skivepitelcancer.

Då studien visar att mängden av β -catenin är starkast i normalt oralt skivepitel, måttligt i dysplasi och svagast i cancer tyder detta på att β -catenin skulle kunna vara en viktig faktor i utvecklingen av skivepitelcancer i munhålan vilket stämmer väl överens med resultat från andra studier.

ABSTRACT

Approximately 300,000 individuals are affected every year in the world of oral cancer and more than ninety percent of all oral cancers consists of squamous cell carcinoma. The five-year prognosis is generally 50 % and the 5-year relative survival has over ten years remained the same. This motivates the development of better prognostic markers and diagnostic methods for the early identification of patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma to improve prognosis and reduce the suffering of these patients with early treatment.

β -catenin is an adhesion molecule that is important for the maintenance of cellular integration and abnormalities of cell adhesion molecules is thought to play a central role in tumorigenesis. The abnormalites is though to enhance tumour cells to break loose from neighbouring cells and invade nearby tissues and organs, however the exact mechanisms are unknown.

The purpose of the study is that using immunohistochemistry to examine whether β -catenin may serve as a prognostic marker for the development of oral squamous cell carcinoma. This is done by examining the presence of β -catenin with monoclonal antibodies in 18 biopsies with normal squamous epithelia, dysplasia and cancer from 18 patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma from the department of Oral Pathology at Malmö Höskola, Malmö. The staining of beta catenin was compared in normal oral squamous cancer and dysplasia for all biopsies to see whether there is any difference of dyeing. Besides this, there was also a comparison of normal squamous epithelium with dysplasia and cancer in each biopsy.

The results showed that there is a difference in the expression of β -catenin in normal squamous epithelium, dysplasia and cancer in this population. In this study, more than 70 % of the biopsies expressed a strong or moderate and strong staining of β -catenin in normal oral squamous epithelium, more than 60 % of the biopsies showed a moderate or moderate and weak staining of dysplasia and 58.8 % of all biopsies showed weak or no staining and weak staining of squamous cell carcinoma.

As the study shows that the amount of β -catenin is strongest in normal oral squamous epithelium, moderate in dysplasia and weakest in cancer, this suggests that β -catenin could be an important factor in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity which is in line with results from other studies.

Keywords

β -catenin, adhesion molecule, prognostic marker, oral squamous cell carcinoma, dysplasi, immunohistochemistry, monoclonal antibody.

Innehållsförteckning

SAMMANFATTNING	2
ABSTRACT	4
INTRODUKTION	6
Oral skivepitelcancer	7
Dysplasi	8
Celladhesion-förbindelser; cadheriner och cateniner	9
Immunohistokemi	10
SYFTE.....	10
MATERIAL OCH METODER	11
Litteratursökning.....	11
Selektion av biopsier.....	12
Kalibrering	12
Antikroppsspädning och kontroll	12
Immunohistokemi	13
Kvantifiering av immunofärgning	13
RESULTAT	14
Uttrycket av β -catenin i normalt oralt skivepitel, dysplasi och cancer.....	14
Uttrycket av β -catenin i dysplasi i förhållande till normalt oralt skivepitel	16
Uttrycket av β -catenin i oral skivepitelcancer i förhållande till normalt oralt skivepitel	16
Lokalisationen av β -catenin i normalt oralt skivepitel, dysplasi och cancer	17
DISKUSSION	18
KONKLUSION	21
REFERENSER.....	23
BILAGA 1	28
BILAGA 2.....	29

INTRODUKTION

Oral cancer är den åttonde vanligaste cancertypen i världen och prevalensen är särskilt hög bland män (1). På grund av dess aggressivitet och höga dödstal är det en av de mest allvarliga cancertyperna (2). Cirka 300 000 individer drabbas årligen i världen (3) och cirka femtio procent dör av komplikationer relaterade till tumören (4). Världshälsoorganisationen, WHO, har dessutom visat att incidensen har ökat på grund av ökad tobaks- och alkoholkonsumtion (1).

Under år 2012 inrapporterades 872 individer i Sverige som hade drabbats av tumörer i munhålan (5).

Oral skivepitelcancer

Skivepitelcancer definieras av Världshälsoorganisationen, WHO, som en invasiv tumör i epitelet med varierande grad av differentiering och benägenhet till tidig och omfattande lymfnodmetastas.

Oral skivepitelcancer svarar för mer än nittio procent av alla orala cancerformer (2). I en studie som utfördes i Norge var de största riskfaktorerna för oral skivepitelcancer tobak- och alkoholanvändning där tobaksrökning utgör den viktigaste riskfaktorn (6).

Incidensen är högre i delar av centrala och södra Europa samt södra Asien där det är vanligt med bidier (en ofta förekommande cigarett i södra Asien där tobak rullas i tendublad) som har visat sig medföra en högre risk för cancer (3, 7).

Tungan är den vanligaste platsen för skivepitelcancer i munnen (8) och därefter i fallande ordning läpparna, annan eller ospecifik del av munnen, spottkörtlarna och munbotten (5).

Trots tidig diagnostik och förbättrad kirurgisk behandling (9) förblir prognosen i avancerade fall dåliga (10). Den femåriga prognosen är generellt 50 % men varierar betydligt beroende på cancerdiagnosens stadium. De patienter som har den metastatiska typen, som utgör 10 % av alla fall, har endast en femårig överlevnad på 25 % (11)

Den 5-åriga relativa överlevnaden har även under en tioårsperiod fram till i mitten av 90-talet förblivit densamma (12). Detta motiverar utvecklingen av prognostiska markörer för att identifiera de patienter som har risk att utveckla oral skivepitelcancer och därmed riktar behandlingen så att man inte behandlar i onödan.

Dysplasi

Dysplasi är ett potentiellt malignt tillstånd som kännetecknas av en histopatologisk förändring i vävnadens arkitektur samt en cytologisk avvikelse, exempelvis ändringar i cellernas eller cellkärnans storlek eller form. Graden av dysplasi kan histologiskt indelas i mild, måttlig och svår men specifika kriterium finns inte för denna indelning (13).

Kliniska fynd ses inte nödvändigtvis vid dysplasi men erytroplaki och leukoplaki är lesioner som är associerade med dysplastiska förändringar (14).

Leukoplaki definieras som en icke avskrapbar vit lesion som kliniskt eller patologiskt inte kan diagnostiseras som någon annan sjukdom eller lesion. Leukoplaki är en klinisk diagnos och har därför inte ett specifikt histologiskt utseende.

Trots att dysplasier är potentiellt maligna tillstånd utvecklas inte alla dysplastiska lesioner till cancer och man har visat att även lesioner utan dysplasi har utvecklats till cancer (14). Detta innebär att alla potentiellt maligna lesioner inte alltid upptäcks med de befintliga kliniska och histologiska metoderna. Därmed kan inte alltid tidiga åtgärder insättas för att undvika utvecklingen av oral skivepitelcancer. Den dåliga prognosen för oral skivepitelcancer (11) och

den låga sensitiviteten av dysplasi för cancerutveckling (14) motiverar bättre prognostiska markörer för tidigare och mer valid diagnostik för att förutse vilka potentiellt maligna lesioner som kommer att utvecklas till oral skivepitelcancer och för att öka överlevnaden då behandlingen kan sättas in tidigare.

Celladhesion-förbindelser; cadheriner och catenier

Celladhesions-förbindelser är viktiga för bibehållandet av cellulär integration då de ger strukturella och mekaniska funktioner mellan cellerna (15), (16). Adhensionsmolekyler spelar även en central roll i regleringen av cellulär respons till adhesion- och tillväxtfaktormedierad signalering i närmiljön (15).

Cateniner, som utgörs av proteinerna α -, β -, och γ -catenin, bildar tillsammans med proteinet Cadherin celladhesionsförbindelser. β - och γ -catenin är cytoplasmatiske proteiner som binder till cadheriners adhesionsreceptorer i cellmembranet och till aktincytoskelettet i cellen via α catenin. Cadherin består i sin tur av en intracellulär domän som binder β - och γ -catenin, en transmembran domän och en extracellulär domän (17, 18).

Vid magsäckscancer och lobulär bröstcancer har man visat att nedreglering sker av de gener som reglerar funktionen av adhesionsproteiner genom mutationer. Förutom mutationer kan även adhesionsproteiner inaktiveras genom andra signaleringsmekanismer som är oberoende av genetiska förändringar (19).

När tumörceller invaderar närliggande vävnad och metastaserar till andra organ bryter de sig loss från närliggande celler (20). Man har t ex vid bröstcancer påvisat att cancerceller migrerar som enskilda celler från tumörmassor (21). Avvikelser i förbindelsen mellan β -catenin och E-cadherin är således ett sannolikt skede i denna process (20).

Immunohistokemi

Den grundläggande idén med immunohistokemi är att man med hjälp av antikroppar kan påvisa specifika antigeners distribution och lokalisation i en vävnad (22). Detta sker förenklat genom en interaktion mellan antigenet och antikroppen som därefter visualiseras med en markör såsom fluorescencinfärgning, radioaktiva element eller med ett enzym (som används i denna studie i form av ett peroxidase).

En fördel med immunohistokemi är att ett obegränsat antal enzymer, proteiner och vävnadsstrukturer kan infärgas (23).

Värmeinducerad epitopåtervinning innebär att man med hjälp av mikrovågor exponerar antigenets epitoper, den strukturella delen av antigenet som antikroppen binder till, för att underlätta antikroppens igenkänning (24, 25).

Den primära antikroppen tillsätts och därefter den sekundära antikroppen som bär på ett enzym med vilket den binder till den primära antikroppen. Antikropp-antigen-komplexet visualiseras genom tillsättning av ett kromogen. Därefter sker infärgning med kontrastmedel för att påvisa cellkärnorna. Avslutningsvis dehydreras vävnadssnittet och monteras (25).

SYFTE

Syftet med denna studie är att med hjälp av immunohistokemi undersöka om β -catenin kan fungera som en prognostisk markör för utvecklingen av oral skivepitelcancer.

Detta görs genom att undersöka om skillnader förekommer av β -catenin i normal slemhinna jämfört med dysplasi och skivepitelcancer.

MATERIAL OCH METOD

En etisk ansökan har sedan tidigare utförts på avdelningen för Oral Patologi, Odontologiska fakulteten, Malmö högskola och godkänts av Regionala etikprövningsnämnden i Lund,

Litteratursökning

För att samla bakgrundsfakta söktes artiklar på databasen PubMed november 2012 samt september 2014. Söktermerna " Beta catenin " och "oscc", oral squamous cell carcinoma, användes då arbetet avser att studera eventuell skillnad i uttrycket av β -catenin mellan normal munslemhinna, slemhinna med dysplasi och cancer. Litteratursökningen skedde icke-systematiskt och för att inkludera flera artiklar än de som resulterade i den initiala sökningen inkluderades även vissa artiklars referenser, även detta skedde icke-systematiskt.

Urvalskriterier för litteratursökning som avser informationssökning i anknytning till β -catenin

Inklusionskriterier:

- Studier gjorda på normal slemhinna och/eller dysplasi och/eller cancervävnad med dysplasi och cancer.
- Studier gjorda på human vävnad.

Exklusionskriterier:

- Artiklar som inte fanns i elektronisk fulltext på PubMed via Malmö högskola.
- Studier gjorda på DNA- nivå.
- Djurstudier

Selektion av biopsier

166 remisser skickades mellan 2005 till 2010 till avdelningen för Oral Patologi, Odontologiska fakulteten, Malmö högskola, med den tentativa diagnosen oral skivepitelcancer. Dessa granskades och de remissvar som inte fanns tillgängliga eller där normal slemhinna, dysplasi och cancer inte angavs i remissvaret exkluderades, varefter 44 remisser återstod. I de fall då paraffinblock inte fanns tillgängliga och då man med säkerhet inte kunde påvisa normalt epitel, dysplasi och cancer i ett och samma preparat såväl innan som efter immunofärgning av β -catenin exkluderades och kvar blev endast 18 biopsier.

Kalibrering

För att särskilja de olika vävnadstyperna inför studien kalibrerades författaren mot oral patolog där samtliga 18 biopsier studerades för att diagnostisera normalt oralt skivepitel, dysplasi och cancer. I denna kalibrering ingick även hur man utvärderar infärgningen, dess lokalisation som angavs som membranöst, cytoplasmatiskt eller nukleärt samt graden av infärgning i 9 av de 18 infärgade biopsierna. Därefter studerades samtliga 18 biopsier igen självständigt och jämfördes. Oenighet löstes genom diskussion mellan författare och oral patolog.

Målet var att jämföra infärgningen av β -catenin i de olika vävnadstyperna i varje enskild biopsi där normalt epitel var referensvärdet mot vilket infärgningen av dysplasi och cancer skulle jämföras.

Antikroppsspädning och kontroll

Se bilaga

Immunohistokemi (se bilaga)

Infärgningen med immunohistokemi sker förenklat i följande steg:

- Värmeinducerad epitopåtervinning
- Tillsättning av primär antikropp samt visualiseringssystemet
- Tillsättning av kromogen
- Infärgning med kontrastmedel

Kvantifiering av immunofärgning

Antigenets uttryck utvärderades genom att en generell kvantitativ uppskattning gjordes av infärgningen i de olika vävnadstyperna för varje biopsi. Graden av immunreaktion angavs som:

- 0: ingen infärgning
- 0-1: ingen till svag infärgning
- 1: svag infärgning
- 1-2: svag till måttlig infärgning
- 2: måttlig infärgning
- 2-3: måttlig till stark infärgning
- 3: stark infärgning

En jämförelse gjordes därefter av infärgningen mellan de olika vävnadstyperna, normal epitel, dysplasi och cancer för varje biopsi enligt nedan:

- *Normalt epitel* utgjorde referensvävnaden mot vilket *dysplasi* och cancer jämfördes med.

Följande termer användes för att beskriva förhållandet mellan normal epitel och dysplasi och cancer:

- Underuttryck (-): om infärgningen är svagare än referensvävnaden.
- Oförändrad (0): om infärgningen är densamma som referensvävnaden.
- Överuttryck (+): om infärgningen är starkare än referensvävnaden.

RESULTAT

Uttrycket av β -catenin i normalt oralt skivepitel, dysplasi och cancer

I 17 fall av totalt 18 biopsier uttrycktes β -catenin i normal oral skivepitel (tabell 1). Uttrycket var i 16 fall membranöst och i ett fall cytoplasmiskt (tabell 3). I ett fall (5,6 %) sågs ingen infärgning, i 2 fall (11,1 %) svag och måttlig infärgning, i 2 fall (11,1 %) måttlig infärgning, i 3 fall (16,7 %) måttlig och stark infärgning och i 10 fall (55,5 %) stark infärgning (tabell 1).

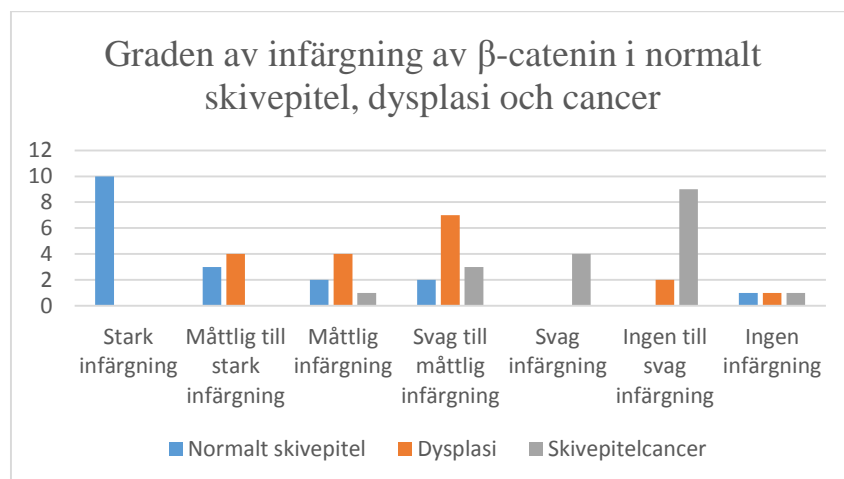
I 17 fall av totalt 18 biopsier fanns ett membranöst uttryck av β -catenin vid dysplasi (tabell 3). I ett fall (5,6 %) sågs ingen infärgning, i två fall (11,1 %) ingen och svag infärgning, i 7 fall (38,9 %) svag och måttlig infärgning, i 4 fall (22,2 %) måttlig infärgning och i 4 fall (22,2 %) måttlig och stark infärgning (tabell 1). I tre fall förekom en starkare infärgning i de perifera områdena av dysplasi jämfört med de centrala delarna och i ett fall fanns en starkare infärgning i de centrala delarna.

I 17 biopsier förekom positiv infärgning av β -catenin i cellmembranet vid oral skivepitelcancer (tabell 3). I ett fall (5,6 %) fanns inget uttryck av β -catenin, i 9 fall (50 %) fanns ingen och svag infärgning, i 4 fall (22,2 %) svag infärgning, i 3 fall (16,7 %) svag och måttlig infärgning och i ett fall (5,6 %) måttlig infärgning (tabell 1).

Tabell 1. Förekomsten av β -catenin och graden av infärgning i normalt oral skivepitel, dysplasi och cancer. Den procentuella andelen anges inom parantes.

	Positiv infärgning	Negativ/ Ingen infärgning 0	Ingen till svag infärgning 0-1	Svag infärgning 1	Svag till måttlig infärgning 1-2	Måttlig infärgning 2	Måttlig till stark infärgning. 2-3	Stark infärgning 3
Normal epitel	17 (94,4 %)	1 (5,6 %)	0	0	2 (11,1 %)	2 (11,1 %)	3 (16,7 %)	10 (55,5 %)
Dysplasi	17 (94,4 %)	1 (5,6 %)	2 (11,1 %)	0	7 (38,9 %)	4 (22,2 %)	4 (22,2 %)	0
Cancer	17 (94,4 %)	1 (5,6 %)	9 (50 %)	4 (22,2 %)	3 (16,7 %)	1 (5,6 %)	0	0

Figur 1 Visar hur graden av infärgning förhåller sig mellan normalt skivepitel, dysplasi och cancer.



Uttrycket av β -catenin i dysplasi i förhållande till normalt oralt skivepitel

13 av 18 fall av dysplasi visade ett underuttryck av β -catenin i förhållande till normal epitelvävnad i respektive biopsi. I 4 fall förekom ett oförändrat uttryck och i 1 fall överuttryck av β -catenin i dysplasi i förhållande till normal oral skivepitel (tabell 2).

Uttrycket av β -catenin i oral skivepitelcancer i förhållande till normalt oralt skivepitel

I 17 fall av 18 förekom ett underuttryck av β -catenin i oral skivepitelcancer i förhållande till normal skivepitel. I 1 fall skedde överuttryck av β -catenin i oral skivepitelcancer jämfört med normal oral epitel (tabell 2).

Tabell 2. Sammanställning av hur graden av infärgning förhåller sig för mellan 1) dysplasi och normal oral skivepitel 2) cancer och normal oral skivepitel

	Underuttryck	Oförändrat	Överuttryck
Dysplasi i ft* normal oral skivepitel	13 (72,2 %)	4 (22,2 %)	1 (5,6 %)
Cancer i ft normal oral skivepitel	17 (94,4 %)	0	1 (5,6 %)

** I förhållande till*

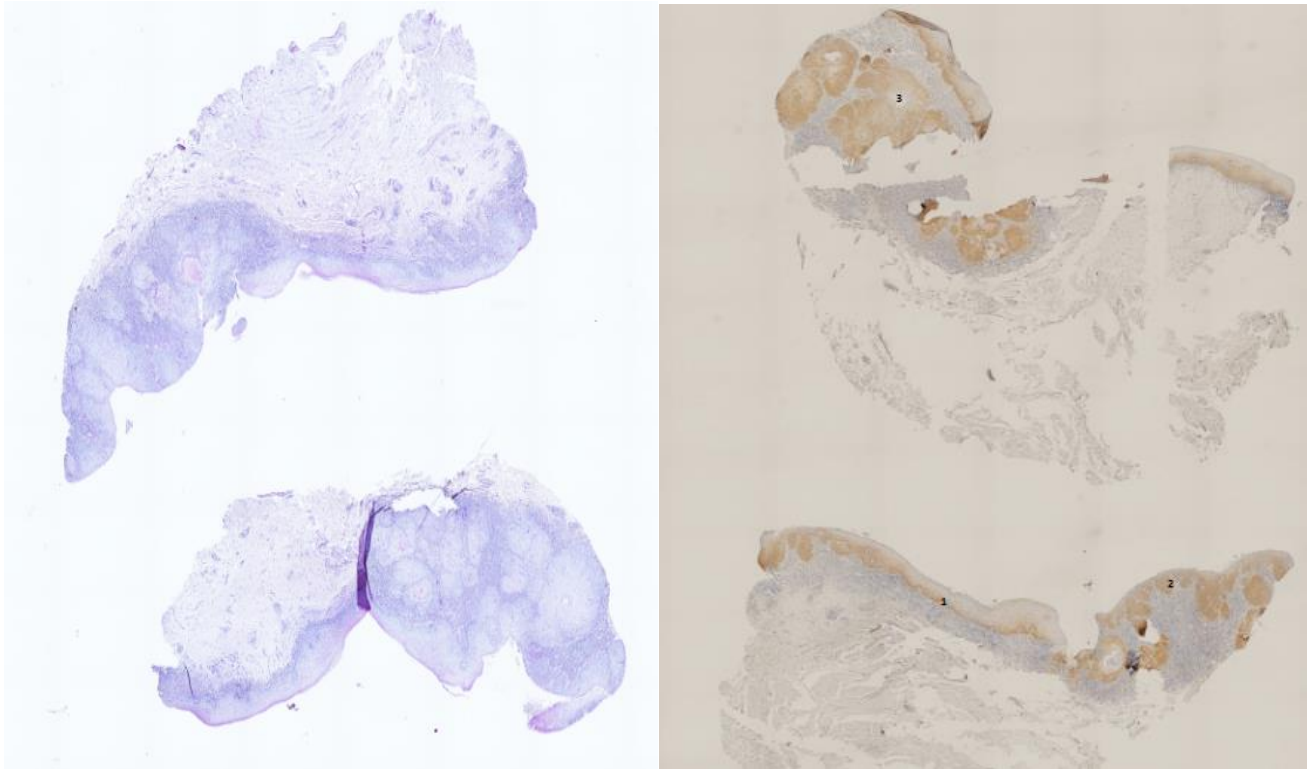
Lokalisationen av β -catenin i normalt oralt skivepitel, dysplasi och cancer

I 17 av 18 fall förekom ett membranöst uttryck och i ett fall förekom cytoplasmiskt uttryck av β -catenin i normalt oralt skivepitel.

I 17 av 18 fall förekom membranöst uttryck av β -catenin i dysplasi och oralt skivepitelcancer.

Tabell 3. Lokalisationen av β -catenin i normal oral skivepitel, dysplasi och cancer

	Membranöst uttryck	Cytoplasmiskt uttryck	Nukleärt uttryck
Normal epitel	16	1	0
Dysplai	17	0	0
Cancer	17	0	0



Figur 2a. Snitt med Hematoxyllineosin-infärgning *1b.* Immunohistokemiskt uttryck av β -catenin i normal oral skivepitel, 1, dysplasi, 2, och cancer, 3. Måttlig membranös infärgning kan ses i normal epitel, stark membranös infärgning kan ses i dysplasi och svag membranös infärgning i cancer. Perifert kring canceröarna är intensiteten 1 och centralt är intensiteten noll.

DISKUSSION

Studien visade att mer än 70 % av biopsierna en stark eller måttlig till stark infärgning av β -catenin i normalt skivepitel, mer än 60 % av biopsierna visade en måttlig eller måttlig och svag infärgning av dysplasi och 58,8 % av alla biopsier visade svag infärgning eller ingen och svag infärgning av skivepitelcancer. Infärgningen av β -catenin varierade mellan 0 (ingen infärgning) till 3 (stark infärgning) för normalt oralt skivepitel, 0 till 2-3 (måttlig till stark infärgning) för dysplasi och 0 till 2 för oralt skivepitelcancer. Studien visar ett tydligt mönster där β -catenin är starkast i normalt oralt skivepitel och svagast i cancer. I enstaka fallet, 1 av 18, som inte

uttryckte β -catenin i något av tillstånden skulle kanske kunna räknas som ett tekniskt misslyckande och därför exkluderas. Ett tydligt uttryck av β -catenin har även visats i andra studier i normalt oral skivepitel (26, 27) medan ett avsevärt mindre uttryck har visats i invasiva tumörer (26) och dysplasi där förlusten av β -catenin direkt har varit korrelerat till en ökad allvarlighetsgrad av lesionen (28).

Lo Muzio och medförfattare (28) visade inte någon statistisk signifikant skillnad i uttrycket av membranöst β -catenin mellan dysplastiska lesioner som progredierade till invasiva oral skivepitelcancer och i de fall där progression inte skedde. Vidare har man visat att majoriteten av de fall som progredierade till cancer hade färre fall av förändringar i β -catenin jämfört med de dysplastiska lesioner som inte utvecklades till skivepitcancer. Detta menar författarna leder till frågan om förändringar i uttrycket av membranöst β -catenin är en konsekvens av skivepitelcancer eller orsaken.

Studiens begränsningar

Vid jämförelse av lokalisation samt graden av infärgning av β -catenin som individuellt utfördes av oral patolog och författare skedde ingen beräkning av reliabiliteten och således kan ingen bedömning göras av tillförlitligheten av individuella observationer.

Antigenets uttryck har dessutom utvärderats genom att en generell kvantitativ uppskattning gjorts av infärgningens grad vilket ger en subjektiv tolkning av resultaten och kan även medföra observatörsskillnader vid jämförelse med andra studiers resultat. Hänsyn har inte tagits till antalet celler som har gett uttryck för β -catenin vilket idealiskt skulle vara av intresse vid jämförelse av normalt oralt skivepitet, dysplasi och cancer för att ge en uppfattning av hur stor andel av cellerna som ger ett visst uttryck av β -catenin men också vid jämförelse med andra studiers resultat.

Infärgning med immunohistokemi utfördes manuellt, vilket kan medföra risker för avvikelser i metoden som kan ha bidragit till varierande grader av infärgning. För att standardisera resultaten och öka resultatens validitet kunde infärgningen med fördel ha utförts maskinellt.

Infärgningens intensitet varierade i vissa fall perifert jämfört med centralt i en cancerö vilket kan bero på en central nekros till följd av en syrefattig miljö inom en cancerö och resulterat i bristande uttryck av β -catenin.

Ytterligare en begränsning är att det inte har utförts en power analys för att beräkna antalet biopsier som behövdes för att kunna påvisa en statistisk signifikans.

Studiens styrkor

I denna studie användes en monoklonal antikropp som endast binder en epitop på antigenet och därför möjliggör en selektiv infärgning av β -catenin. Metoden har en hög specificitet och resulterar i mindre bakgrundsfärgning men är dyr (23, 29).

Uttrycket av β -catenin i normalt oralt skivepitel har visat sig variera mellan olika patienter (Figur 1). Därmed skulle en falsk positiv skillnad kunna påvisas i uttrycket av β -catenin vid jämförelser mellan biopsier som endast innehåller normalt oralt skivepitel, dysplasi eller cancer. I denna studie inkluderades därför biopsier som innehåller samtliga tre vävnadstyper vilket även möjliggör jämförelse av marköruttrycket i normalt oralt skivepitel, dysplasi och cancer i varje biopsi.

Vid jämförelse av dysplasi med oral skivepitelcancer, cancer med normal oral skivepitel och cancer med dysplasi sker ett underuttryck av β -catenin i majoriteten av alla fall. Enligt denna studie skulle mängden β -catenin kunna vara korrelerat till en ökad allvarlighetsgrad av lesionen.

I normal oral skivepitel, dysplasi och skivepitelcancer var β -catenin i samtliga fall beläget i cellmembranet förutom vid ett fall av normalt skivepitel där β -catenin fanns beläget i cytoplasman. I andra studier har man utöver förlust av membranöst uttryck även funnit ansamling av β -catenin i cytoplasman eller cellkärnan i tidiga skeden av dysplasi, oral tumörutveckling (28, 30) vid invasiv oral skivepitelcancer och vid metastas (31). Även mängden av β -catenin i cytoplasman och cellkärnan har varit korrelerad till en ökad allvarlighetsgrad av lesionen (28, 32).

Med bakgrund av den låga sensitiviteten av dysplasi för cancerutveckling (14) bör framtida forskning av β -catenin som en prognostisk markör för skivepitelcancer innefatta retrospektiva studier där man undersöker om det förekommer en signifikant skillnad i marköruttrycket i dysplastiska lesioner som progredierat till cancer och de som inte gjort det. Genom att utvärdera uttrycksmönstret av β -catenin skulle man i ett tidigt skede kunna få information om vilka potentiellt maligna lesioner som har en större risk att utvecklas till oral skivepitelcancer samt förutse utgången och anpassa behandling för dessa patienter för att förbättra prognosen och minska lidandet för dessa patienten genom tidigt insatt behandling.

Fler och större studier behövs för att klargöra vilka dysplastiska lesioner som progredierar till cancer och de som inte gör det för att utreda om β -catenin kan fungera som en prognostisk markör för utvecklingen av oral skivepitelcancer.

KONKLUSION

Då studien visar att mängden av β -catenin är starkast i normalt oralt skivepitel, måttligt i dysplasi och svagast i cancer tyder detta på att β -catenin skulle kunna vara en viktig faktor i utvecklingen av skivepitelcancer i munhålan vilket stämmer väl överens med resultat från andra studier.

Mot bakgrund av den låga sensitiviteten av dysplasi för cancerutveckling bör framtida forskning av β -catenin som en prognostisk markör för skivepitelcancer kunna innefatta retrospektiva studier där man undersöker om det förekommer en signifikant skillnad i marköruttrycket i dysplastiska lesioner som progredierar till cancer mot de som inte gör det.

Referencer

1. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003; 31 Suppl 1: 3-23.
2. Krisanaprakornkit S and Iamaroon A. Review Article Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma [Web Page]. Thailand: Hindawi Publishing Corporation; 2012 [2012 January 7]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/ethics/>.
3. Boyle P and Bernard L. World Cancer Report 2008 [Web Page]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008 [2008 Available from: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001; 94: 153-156.
5. Socialstyrelsen. Cancerincidens i Sverige 2012 [Web Page]. Sverige2014 [2012 Available from: <http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/19291/2013-12-17.pdf>.
6. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Control.* 1998; 9: 99-108.
7. Rahman M, Fukui T. Bidi smoking and health. *Public Health.* 2000; 114: 123-127.
8. Chen AY, Myers JN. Cancer of the oral cavity. *Dis Mon.* 2001; 47: 275-361.

9. Teymoortash A, Werner JA. Current advances in diagnosis and surgical treatment of lymph node metastasis in head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012; 11: Doc04.
10. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 67-76.
11. Jemal A, Ward E and et. A. CA Cancer Statistics 2008 [Web Page]. Atlanta: American Cancer Society; February 2010 [February 2008 February 23]. Available from: <http://www.aunet.org/education/modules/core/topics/pros-blad-cancer/noninvasive-blad-cancer/assets/JemalCancerstatistics-2008.pdf>.
12. Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H et al. EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol.* 2003; 14 Suppl 5: v128-49.
13. Barnes, Leon; Eveson, John W; Reichart, Peter; Sidransky, David. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. [Web Page]. Lyon, France: IARC Press; 2007 July, 2005]. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/BB9.pdf>.
14. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14: 47-62.
15. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002; 109: 987-991.

16. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 562-571.
17. Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*. 2001; 13: 600-603.
18. Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*. 2000; 113 (Pt 18): 3127-3139.
19. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 1998; 153: 333-339.
20. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 1621-1630.
21. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 921-930.
22. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry [Web Page]. : SAGE Publications; 2005 July, 2005]. Available from:
<http://vet.sagepub.com/content/42/4/405.full.pdf+html>.
23. Anonymous Introduction to Immunohistochemistry [Web Page]. Woodstock, Maryland: IHC World; 2003 [2011 Available from: <http://www.ihcworld.com/intro/intro.htm>].
24. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (eds) Cellular and Molecular Immunology. Canada: ELSEVIER Saunders; 2014.

25. Taylor C and Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods [Web Page]. Danmark: Dako Denmark A/S; [2013 Available from:
http://www.dako.com/se/08002_ihc_staining_methods.pdf.
26. Bankfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol.* 2002; 198: 343-351.
27. 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.
28. Lo Muzio L, Lo Russo L, Falaschini S, Ciavarella D, Pentenero M, Arduino P et al. Beta- and Gamma-Catenin Expression in Oral Dysplasia. *Oral Oncol.* 2009; 45: 501-504.
29. Anonymous Abcam's antibody guide [Web Page]. Cambridge, UK: Abcam plc.; 2015 [2008 Available from:
<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11269&pid=11287>.
30. Kaur J, Sawhney M, DattaGupta S, Shukla NK, Srivastava A, Walfish PG et al. Clinical significance of altered expression of beta-catenin and E-cadherin in oral dysplasia and cancer: potential link with ALCAM expression. *PLoS One.* 2013; 8: e67361.
31. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5455-5463.

32. Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol.* 2012; 48: 997-1006.

Bilaga 1

Antikroppsspädning och kontroll

För att erhålla lämplig koncentration av antikroppen gjordes inledningsvis försök med tre olika antikroppskoncentrationer, 1:500, 1:1 000 och 1: 2000, varefter infärgningens intensitet utvärderades i förhållande till bakgrundsfärgningen. En hög intensitet med en låg bakgrundsinfärgning valdes till koncentrationen 1: 1000.

Epitel från colon användes som positiv kontroll på grund av dess antigena egenskaper för antikroppen för att bekräfta metodens validitet. Som negativ kontroll användes ett icke-immunt serum utan den primära antikroppen. Vid mikroskopering användes tidigare hematoxylineosin infärgade vävnadssnitt för respektive biopsi som referens.

Bilaga 2

Immunohistokemisk tillvägagångsätt

Avparaffinering av vävnadssnitt

Formalinfixerade vävnadsbiopsier snittades i 3 µm tjocka snitt och monterades på SuperFrost®Plus-objektglas. Glasen placerades i torkskåp vid 57-58° under en timme. Vävnadssnitten avparaffinerades med xylen och etanol och rehydrerades med destillerat vatten;

- 3x7 min xylen
- 3x3 min i 99% etanol
- 2x3 min i 96 % etanol
- 5 min i destillerat vatten

Värmeinducerad epitopåtervinning

Snitten placerades i 700 ml Natriumcitratbuffert (pH 6.0) och värmdes under 20 minuter (program Antigen retrieval 98 C-S 30 m 40 s-700 ml) i tryckkammare (Decloaking Chamber™ NxGen, Biocare Medical) för att exponera epitoperna i antigenet.

Därefter inkuberades de i kyvett med destillerat vatten i 5 minuter och med TRIS-HCl buffert (pH 7,6) i 5 minuter. Bägaren togs ut från mikrovågsugnen tilläts svalna i 10 min i rinnande vatten.

Glasen placerades i fuktig kammare och inkuberades med 100 µl 1,5 % Bovine Serum Albumin, BSA, (SIGMA)/TRIS i 15 minuter. Därefter sköljdes glasen av och placerades i kyvett med Tris-buffert.

Primär antikroppsreagens anti-β-catenin

100 µl polyklonal primär antikroppsloösning β-catenin (Purified Mouse anti-β-catenin, BD Transduction laboratories) spädd med 1,5 % BSA(SIGMA)/TRIS till 1:1 000 tillsattes. Till den

negativa kontrollen tillsattes istället för antikroppslösning 100 µl icke-immun serum, 1,5 % BSA. Vävnadssnitten inkuberades i 16 timmar vid 4°C.

Glasen rumstempererades i 15 minuter, tvättades och placerades i kyvett med TRIS-HCl buffert (pH 7,6) under 3x3 minuter. Därefter inkuberades de i 10 minuter med 100 µl 3 % H₂O₂ (peroxidas blocking solution, DAKO Ref S2023) för att förhindra icke-specifik bindning och endogen peroxidas aktivitet. Glasen tvättades och inkuberades med destillerat vatten under 2x2 minuter.

Sekundär antikropp- visualisering

2-3 droppar ENV (sekundär antikropp märkt med HRP, Envision Detection System K5007 DAKO) tillsattes och glasen placerades i fuktig kammare varefter de inkuberades i 15 minuter. Snitten tvättades därefter med TRIS-HCl buffert (pH 7,6) och inkuberades under 3x10 minuter.

EnVision-detektionsreagens

Snitten placerades i en fuktig kammare och 100 µl kromogen (EnVision Detection System K5007, DAKO) tillsattes och sedan inkuberades snitten i 15 minuter. Snitten sköljdes och inkuberades med destillerat vatten i 2x2 minuter.

Infärgning av cellkärnor med Haematoxylin

Snitten motfärgades med 100 µl haematoxylin (Mayer's) och inkuberades i en fuktig kammare i 2 minuter. Snitten sköljdes och sattes i kyvett med destillerat vatten i 5 minuter.

Montering

Därefter skedde dehydrering och montering med xylenebaserat monteringsmedel och slutligen mikroskopering med ljusmikroskop.