بررسی تظاهر پروتئین bcl-2 و آنتی‌ژن ki-67 به روش ایمونوهیستوشیمیایی و وقوع آپوپتوز به روش TUNEL در ادنتوژنیک کراتوسیست در مقایسه با آملوبلاستوما

دکتر سید محمد رضوی[1]، دکتر سید حسین طباطبایی اردکانی[*]

چکیده

مقدمه: ادونتوژنیک کراتوسیت (OKC)، یک کیست تکاملی ادونتوژنیک با ماهیت تهاجمی و عود زیاد است. هدف از این پژوهش، ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی تظاهر پروتئین bcl-2 به عنوان شاخص مهار آپوپتوز و آنتی‌ژن ki-67 به عنوان شاخص پرولیفراسیون سلولی و نیز بررسی آپوپتوز با استفاده از روش TUNEL در OKC در مقایسه با آملوبلاستوما، به منظور شناخت بهتر و توجیه رفتار OKC بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش مقطعی، تحلیلی و گذشته‌نگر، ۱۶ نمونه ادونتوژنیک کراتوسیست (OKC) و ۱۶ نمونه آملوبلاستومای توپر (SAB)، که با فرمالین ثابت و در پارافین مدفون شده بود، از نظر بروز پروتئین bcl-2 و آنتی‌ژن ki-67 با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی و روش استاندارد بیوتین- استرپتاویدین استفاده شد. سلول‌های آپوپتوتیک با روش TUNEL (TDT- Mediated DUTP- biotin nick end labeling) مورد شناسایی قرار گرفت. یافته‌ها توسط نرم‌افزار $SPSS_{11/5}$ و آزمون‌های آماری Paired t-test و Independent تجزیه و تحلیل قرار شد.

یافته‌ها: نسبت سلول‌های bcl-2 مثبت در لایه بازال OKC (۱/۲ ± ۹۷/۶۹ درصد) به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) بیش از لایه محیطی SAB (۱۸/۵۷ ± ۵۳/۰۱ درصد) بود. سلول‌های ki-67 مثبت به طور معنی‌داری (p value = ۰/۰۲۱) در لایه سوپرابازال OKC (۷/۴۷ ± ۱۳/۵۹ درصد) بیش از سایر لایه‌های آن و نیز بیش از لایه محیطی SAB (۶/۹۴ ± ۷/۳۸ درصد) بود. هر چند نسبت سلول‌های ki-67 مثبت در OKC (۲/۹ ± ۶/۴۲ درصد) بیش از SAB (۳/۴۳ ± ۴/۹۸ درصد) بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (p value = ۰/۲۱۱). سلول‌های TUNEL مثبت به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) در لایه سطحی OKC (۲/۶ ± ۷/۶۹ درصد) بیش از لایه داخلی SAB (۰/۳۸ ± ۱/۹۵ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود ماهیت تهاجمی و عود زیاد OKC بر خلاف SAB، به جای آن که مربوط به بقای سلولی افزایش یافته در لایه محیطی SAB باشد، به دلیل فعالیت پرولیفراتیو بسیار در لایه سوپرابازال آن است. البته آپوپتوز بیشتر در لایه سطحی OKC، در مقایسه با لایه داخلی آملوبلاستوما، این فعالیت پرولیفراتیو را جبران می‌کند؛ در نتیجه همواره ضخامت یکنواخت اپی‌تلیوم کیست حفظ شده، بر خلاف SAB توده تومورال توپر تشکیل نمی‌شود.

کلید واژه‌ها: ایمونوهیستوشیمی، روش TUNEL، پروتئین bcl-2، آنتی‌ژن ki-67، ادنتوژنیک کراتوسیست، آملوبلاستومای توپر.

* استادیار، گروه آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران. (مؤلف مسؤول)
taba48971@gmail.com

۱: دانشیار، گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

این مقاله در تاریخ ۸۸/۳/۱۰ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۸۸/۵/۲۵ اصلاح شده و در تاریخ ۸۸/۶/۳ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۸۸؛ ۵(۳)؛ ۱۳۹ تا ۱۴۷

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ادنتوژنیک کراتوسیست (OKC)، یک نوع کیست تکاملی ادنتوژنیک است که از بقایای دنتال لامینای جنینی فانکشنال منشأ می‌گیرد و از نظر شیوع سومین کیست شایع فکی محسوب می‌شود[۴-۱].

مکانیسم رشدی OKC با کیست‌های ادنتوژنیک شایع‌تری مانند کیست دانتی‌ژور و کیست رادیکولار، که در اثر افزایش فشار اسموتیک محتویات لومن به صورت غیر فعال رشد می‌کنند، متفاوت است[۵]. بسیاری از پژوهشگران به واسطه رفتار بیولوژیک تهاجمی و نیز بر اساس شواهد مولکولی و ژنتیکی، از طبیعت نئوپلاستیک این کیست حمایت نموده‌اند[۵]. از طرفی، آملوبلاستوما به عنوان شایع‌ترین تومور ادونتوژنیک اپی‌تلیالی که به احتمال قوی از دنتال لامینا منشأ می‌گیرد، به طرز مشابهی دارای ویژگی‌های عود و تهاجم موضعی به داخل استخوان مجاور می‌باشد[۳]. به علاوه سال‌هاست که رفتار تهاجمی OKC، با وجود ظاهر هیستولوژیک آرامی که دارد[۴]، مورد بررسی پژوهشگران می‌باشد و پژوهش‌هایی از این دست بر سه موضوع اصلی شامل پرولیفراسیون سلولی، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و فرار از آپوپتور و بقای سلولی[۱۳-۶] متمرکز بوده است.

Ki-67 یک آنتی‌ژن هسته‌ای ۳۹۵ کیلو دالتونی است که در مراحل G_2 و M چرخه سلولی بروز آن به حداکثر می‌رسد و پس از میتوز کاهش می‌یابد[۱۴]. در رابطه با فعالیت تکثیری اپی‌تلیوم پوشاننده OKC، پژوهش‌هایی در مورد ki-67 انجام گرفته و نتیجه‌گیری شده است که این آنتی‌ژن در OKC در مقایسه با سایر کیست‌های ادونتوژنیک به میزان خیلی بیشتری بروز می‌یابد[۱۱-۶]. ژن bcl-2 یک پروتئین ۲۶ کیلو دالتونی را رمزگذاری می کند که می‌تواند مسیر آپوپتوز را تنظیم کند. bcl-2 با افزایش عمر سلول‌های اپی‌تلیالی که دارای پتانسیل تمایز هستند موجب پرولیفراسیون، تمایز و در نهایت مورفوژنزیس می‌شود[۱۵]. فعالیت پروتئین bcl-2 در جوانه‌های دندانی، آملوبلاستوما، OKC و کیست‌های دانتی ژور و همچنین در برخی تومورها به اثبات رسیده است. از طرفی بررسی‌های اندکی در رابطه با مشاهده سلول‌های آپوپتوتیک TUNEL مثبت در اپی‌تلیوم OKC[۱۶] و نیز آملوبلاستوما[۱۰] انجام شده است.

هدف از این پژوهش، یافتن پاسخی به این سؤال بود که چرا با وجودی که OKC نیز مانند آملوبلاستوما رفتاری تهاجمی دارد، ولی بر خلاف نوع توپر (Solid) آن یک توده تومورال تشکیل نمی‌دهد، بلکه همواره ضخامت یکنواخت اپی‌تلیوم آن حفظ می‌شود و به صورت یک ضایعه کیستی تظاهر می‌یابد. بدین منظور برخی وقایع سلول همچون پرولیفراسیون سلولی، آپوپتوز و فرار از آپوپتوز در اپی‌تلیوم OKC در مقایسه با نمونه‌های آملوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت. علت انتخاب آملوبلاستومای Solid در کنار OKC این بود که اولاً هر دو ضایعه از بقایای دنتال لامینا منشأ می‌گیرند[۳-۱] و ثانیاً OKC بر خلاف سایر کیست‌های شایع ادونتوژنیک، رفتاری تهاجمی همچون آملوبلاستوما از خود نشان می‌دهد[۳] ولی در عین حال بر خلاف نوع Solid آن یک توده تشکیل نمی‌دهد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش مقطعی، تحلیلی و گذشته‌نگر که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان انجام شد، از بین نمونه‌های OKC موجود در بایگانی بخش پاتولوژی دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان، ۱۶ عدد OKC ساده (غیر عود کننده) و غیر وابسته به سندرم Nevoid Basal cell carcinoma (NBCC) به روش نمونه‌گیری قضاوتی (Judgmental) انتخاب شدند. نمونه‌ها التهاب کمتر از متوسط (کمتر از ۱۵ لنفوسیت در یک فیلد با بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)[۹] داشتند. همچنین از میان ۱۸ نمونه تهیه شده از آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان و بیمارستان کاشانی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و نیز بخش پاتولوژی دانشکده دندان‌پزشکی شهید صدوقی یزد در حد فاصل سال‌های ۸۵-۱۳۷۵، ۱۶ مورد آملوبلاستومای نوع Solid صرف نظر از زیر گروه هیستوپاتولوژیک به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. کلیه نمونه‌ها توسط دو پاتولوژیست دهان مورد بررسی و تأیید مجدد قرار گرفتند. نمونه‌های OKC با التهاب بیش از متوسط و دارای طول نامناسب و همچنین نمونه‌های آملوبلاستوما با بافت اندک و نامناسب حذف شدند. از بلوک‌های مناسب حاوی حداکثر طول اپی‌تلیوم پوشاننده OKC و نیز بیشترین و

Archive of SID
www.SID.ir

مناسب‌ترین بافت از نمونه‌های آملوبلاستوما انتخاب شده، برش‌های ۴ میکرونی تهیه گردید. در این پژوهش، فرآیند پرولیفراسیون سلولی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ki-67 و فرایند فرار از آپوپتوز با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال bcl-2 (هر دو با روش ایمونوهیستوشیمیایی–IHC) بررسی شد. همچنین وقوع آپوپتوز با روش TUNEL بررسی گردید. هر سه این فرایندها (پرولیفراسیون سلولی، فرار از آپوپتوز و آپوپتوز) از نظر محل و شدت بروز در اپی‌تلیوم OKC با آملوبلاستومای توپر (Solid) مورد مقایسه قرار گرفت.

روش ایمونوهیستوشیمیایی (IHC): ابتدا برش‌های مذکور پارافین زدایی و رطوبت گیری شد و سپس به منظور تثبیت آنتی‌ژنی، اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول بافر سیترات با pH = ۶ در مایکروویو قرار گرفت. پس از شستشو با PBS (Phosphate Buffered salin)، اسلایدها جهت بررسی بروز آنتی‌ژن ki-67 به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی مونوکلونال Zymed ki-67 Mouse (clone MMI) با رقت ۱/۱۰۰ انکوبه شدند.

همچنین جهت بررسی بروز پروتئین bcl-2، اسلایدها در مجاورت آنتی‌بادی مونوکلونال Zymed bcl-2 (clone:124) Mouse با رقت $^{۱}/_{۵۰}$ به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از شستشو با محلول PBS، اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در محلول Zymed streptavidin (RES/cat.No.98-9643-2) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد اسلایدها جهت ایجاد یک محصول واکنشی قهوه‌ای رنگ در ماده کروموژن 3,3 Diamino benzodine hydrochloride (DAB) مجاور شدند.

روش TUNEL (Tdt- mediated dutp-biotin nick end lubeling): جهت بررسی آپوپتوز با روش TUNEL، از Insitu apoptosis detection kit استفاده شد. این روش بر مبنای افزودن DUTP (Deoxy uridine triphospate) نشان‌دار شده با biotin به انتهای 3'-OH قطعات شکسته شده DNA در سلول‌های آپوپتوتیک با استفاده از TDT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) پایه گذاری شده است[۱۶]. پس از انجام مراحل مختلف، نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمیایی و TUNEL توسط هماتوکسین رنگ‌آمیزی زمینه‌ای شده، در نهایت نمونه‌ها پس از آبگیری با الکل و شفاف سازی باگزیلول روی لام مانت شدند. در همه مراحل از کنترل منفی و مثبت برای اطمینان از صحت تکنیک رنگ‌آمیزی استفاده شد.

در رنگ‌آمیزی IHC جهت کنترل منفی، لام‌هایی با حذف مرحله آنتی‌بادی ثانویه تهیه شد. برای کنترل مثبت در مورد نشانگر ki-67 از یک نمونه کانسر پستان و در مورد نشانگر bcl-2 از یک نمونه لنفوما استفاده شد. از سلول‌های التهابی ارتشاح یافته در نمونه‌ها به عنوان کنترل مثبت داخلی استفاده شد.

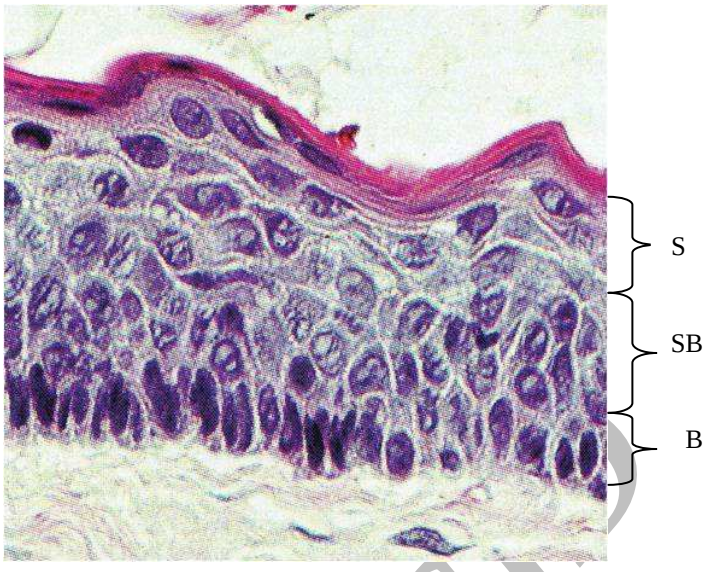
در روش TUNEL جهت کنترل منفی از بافت طبیعی ریه موش با حذف کاربرد آنتی بادی Anti-Brdu استفاده شد. به منظور کنترل مثبت از بافت طبیعی ریه موش با کاربرد همه مراحل استفاده شد. این بافت حاوی تعداد اندکی سلول‌های آپوتپوتیک است که با DAB مثبت می‌شوند.

روش بررسی: به منظور کاهش خطاهای شمارش، ارزیابی نمونه‌ها توسط دو مشاهده‌گر به صورت جداگانه و Blind توسط میکروسکوپ نوری Olympus (Tokyo, Japan) انجام گرفت. بدین منظور ابتدا نواحی رنگ گرفته با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر مشخص شدند. آن گاه جهت بررسی کیست‌ها، پوشش اپی‌تلیالی OKC به سه ناحیه (لایه) تقسیم شد: ۱– لایه بازال شامل یک ردیف سلول‌های مکعبی تا استوانه‌ای واقع بر غشای پایه. ۲– لایه سوپرابازال شامل دو تا سه ردیف سلول‌های مکعبی تا چند وجهی بالاتر از لایه بازال. ۳– لایه سطحی شامل یک تا سه ردیف سلول‌های مسطح یا چند وجهی واقع در زیر سطح اپی‌تلیوم در مجاورت لومن(شکل ۱).

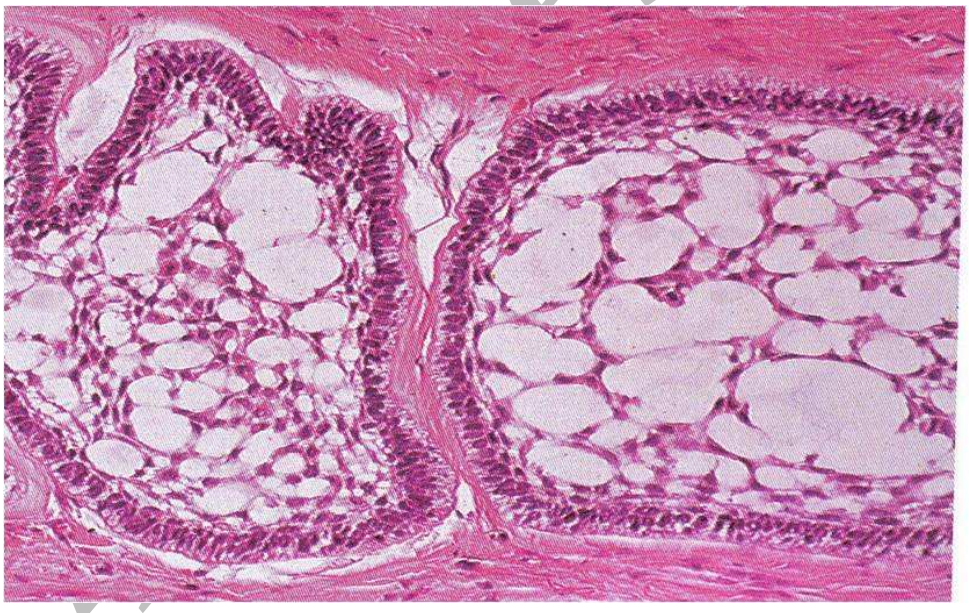
در مورد نمونه‌های آملوبلاستوما، سلول‌های اپی‌تلیالی به دو گروه تقسیم شدند: ۱– سلول‌های لایه محیطی (PL) شامل یک ردیف سلول‌های بازال مکعبی تا استوانه‌ای مستقر بر روی غشای پایه ۲– سلول‌های مرکزی یا لایه داخلی (IL) شامل سلول‌های شبیه رتیکولوم ستاره‌ای و کانون‌های اسکواموس یا سلول‌های گرانولر (در صورت وجود) محصور در لایه داخلی (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. لایه‌های مختلف مورد بررسی در اپی‌تلیوم OKC
S = surface layer, SB = Suprabasel layer, B = basal layer



شکل ۲. لایه‌های مختلف مورد بررسی در آملوبلاستومای توپر.
PL = peripheral layer, IL = Inner layer

از ویژگی‌های پژوهش حاضر، حذف فاکتور التهاب به عنوان یک عامل مداخله‌گر در بروز آنتی‌ژن ki-67 و نیز تظاهر پروتئین bcl-2[۱۲] در کیست‌های مورد بررسی می‌باشد.

جهت بررسی ایمونوری اکیتویتی ki-67، هسته‌های قهوه‌ای رنگ در زمینه‌ای از سیتوپلاسم بی‌رنگ[۸] به عنوان سلول‌های مثبت در نظر گرفته شدند. جهت بررسی ایمونوری اکتیویتی bcl-2، سلول‌هایی با سیتوپلاسم قهوه‌ای و برای بررسی سلول‌های آپوپتوتیک، سلول‌های با دانه‌های قهوه‌ای رنگ در هسته[۱۰] (صرف‌نظر از شدت رنگ پذیری[۸]) به

www.SID.ir

عنوان سلول‌های مثبت در نظر گرفته شدند. آن گاه در هر یک از لایه‌های مذکور در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر، ۱۰۰۰ سلول اپی‌تلیالی در حدود ۱۰ فیلد تصادفی مورد شمارش قرار گرفتند. در مورد سلول‌های آپوپتوتیک، به دلیل تعداد کم سلول‌های مثبت، ۱۵۰۰ سلول در حدود ۱۵ فیلد تصادفی شمارش شد. در نهایت برای هر مارکر، یافته‌ها به شکل کمی با استفاده از فرمول زیر تحت عنوان Labeling Index (LI) ثبت شد.

$$LI = \frac{\text{تعداد سلول‌های مثبت صرف نظر از شدت‌رنگ پذیری}}{\text{۱۰۰۰ سلول اپی‌تلیالی}}$$

با توجه به بالا بودن ضریب همبستگی (بیش از ۰/۹۵) دو مشاهده‌گر در تشخیص رنگ پذیری نمونه‌ها، میانگین مقادیر LI تعیین شده توسط هر دو مشاهده‌گر در لایه‌های مختلف نمونه‌های مورد بررسی محاسبه شد و سپس توسط نرم‌افزار $SPSS_{11/5}$ و آزمون‌های آماری Paired t-test و t-test مستقل و Repeated measuress ANOVA و Kolmogrov-Smirnov test مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج در سطح $\alpha = ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نمونه‌های مورد بررسی شامل ۱۶ نمونه OKC با التهاب کمتر از متوسط و ۱۶ نمونه آملوبلاستومای داخل استخوانی توپر (Solid) شامل ۸ نمونه فولیکولار، یک نمونه پلکسی‌فرم و ۴ نمونه آکانتوماتوز بود، هر چند بررسی‌های بعدی صرف نظر از زیر گروه هیستوپاتولوژیک انجام شد.

کل اطلاعات توصیفی به همراه نتایج معنی‌دار و غیر معنی‌دار به تفکیک در جدول ۱ آمده است.

یافته‌های مربوط به بروز bcl-2 در OKC: بیشترین میانگین bcl-2 در لایه بازال به میزان ۱/۲ ± ۹۷/۶۹ درصد و در لایه سوپرابازال تنها به میزان ۴/۸۲ ± ۸/۰۹ درصد بود. در لایه سطحی هیچ تظاهری دیده نشد. این اختلافات معنی‌دار بود (p value < ۰/۰۰۱)؛ (جدول ۱، شکل ۳).

یافته‌های مربوط به بروز bcl-2 در آملوبلاستوما: بیشترین میزان bcl-2-LI (۱۸/۵۷ ± ۵۳/۰۱ درصد) در لایه محیطی بود. بروز bcl-2 در لایه مرکزی به میزان کمتری (۱۸/۵۷ ± ۳۸/۴۶ درصد) دیده شد و این اختلاف معنی‌دار بود (p value = ۰/۰۱۴)؛ (جدول ۱، شکل ۴).

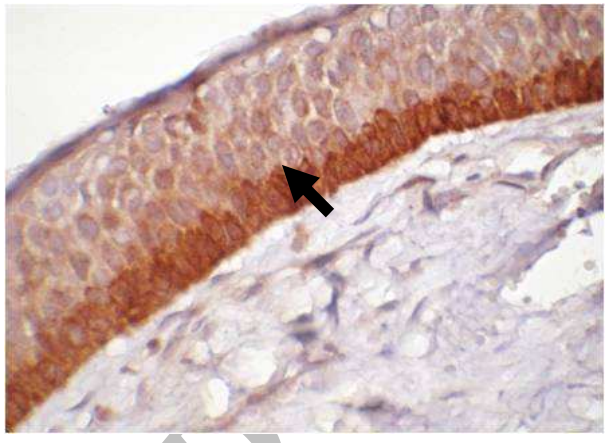
جدول ۱. مقادیر میانگین ± انحراف معیار پروتئین BCL-2 و آنتی‌ژن Ki-67 به روش TUNEL در ادنتوژنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما

ضایعه	LI (%) لایه	bcl-2	ki-67	TUNEL
OKC(16)	BL	۹۷/۶۹ ± ۱/۲	۴/۰۹ ± ۲/۱	۰/۵۹ ± ۰/۳۶
	SBL	۸/۰۹ ± ۴/۸۲	۱۳/۵۹ ± ۷/۴۷	۰/۷۵ ± ۰/۴۹
	SL	۰	۱/۵۹ ± ۱/۷۱	۷/۶۹ ± ۲/۶۲
	در مجموع	۳۵/۲۶ ± ۱/۱۵	۶/۴۲ ± ۲/۹	۳/۰۱ ± ۱/۰۱
SAB(15)	PL	۵۳/۰۱ ± ۱۸/۵۷	۷/۳۸ ± ۶/۹۴	۰/۰۶ ± ۰/۰۱۲
	IL	۳۸/۶۴ ± ۱۰/۶۶	۲/۵۸ ± ۰/۸۸	۱/۹۵ ± ۰/۳۸
	در مجموع	۴۵/۸۲ ± ۱۱/۰۳	۴/۹۸ ± ۳/۴۳	۱ ± ۰/۲

علامت (|) نشانه معنی‌داری تفاوت بین لایه‌های مقایسه شده و علامت (⋮) عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین لایه‌های مقایسه شده است.

BL: Basal layer SBL: Supra basal layer SL: Surface layer
PL: Peripheral layer IL: Inner layer

Archive of SID
www.SID.ir



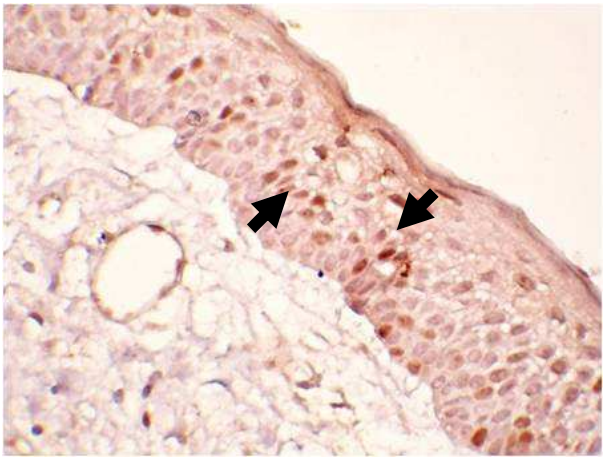
شکل ۳. توزیع سلول‌های bcl-2 مثبت در OKC
(رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بزرگ‌نمایی ۴۰×)
(به رنگ پذیری شدید لایه بازال توجه شود، پیکان)

یافته‌های مربوط به مقایسه bcl-2- LI بین OKC و AB: میانگینbcl-2- LI در لایه بازال OKC (۱/۱۲ ± ۹۷/۶۹ درصد) به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) بیش از لایه محیطی SAB (۱۸/۵۷ ± ۵۳/۰۱ درصد) بود. با این حال میانگین bcl-2- LI در OKC (۱/۷۵ ± ۳۵/۲۶ درصد) به طور معنی‌داری (p value = ۰/۰۰۲) کمتر از SAB (۱۱/۰۳ ± ۴۵/۸۲ درصد) بود (جدول ۱).

یافته‌های مربوط به بروز ki-67 در OKC: در OKC بیشترین میزان ki-67-LI در لایه سوپرابازال (SB) (۷/۴۷ ± ۱۳/۵۹ درصد) دیده شد که به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) بیش از لایه بازال (۲/۱ ± ۴/۰۹ درصد) و لایه سطحی (۱/۷۱ ± ۱/۵۹ درصد) بود. به طور کلی ۷۰ درصد از سلول‌های در حال پرولیفراسیون (ki-67 مثبت) در لایه سوپرابازال قرار داشتند (شکل ۴ و جدول ۱).

یافته‌های مربوط به بروز ki-67 در SAB: میانگین ki-67-LI در لایه محیطی SAB (۶/۹۷ ± ۷/۳۸ درصد) به طور معنی‌داری (p value = ۰/۰۰۱۷) بیش از لایه داخلی (۰/۰۸۸ ± ۲/۵۸ درصد) بود (جدول ۱).

یافته‌های مربوط به مقایسه ki-67- LI بین OKC و SAB: هر چند میانگین ki-67- LI در لایه بازال OKC (۲/۰۱ ± ۴/۰۹ درصد) کمتر از لایه محیطی SAB برابر با (۶/۹۴ ± ۷/۳۸ درصد) بود ولی این تفاوت معنی‌دار از نظر آماری نبود (p value = ۰/۰۸) که احتمال دارد به دلیل بالاتر بودن انحراف معیار داده‌های حاصل به ویژه در نمونه‌های آملوبلاستوما باشد.



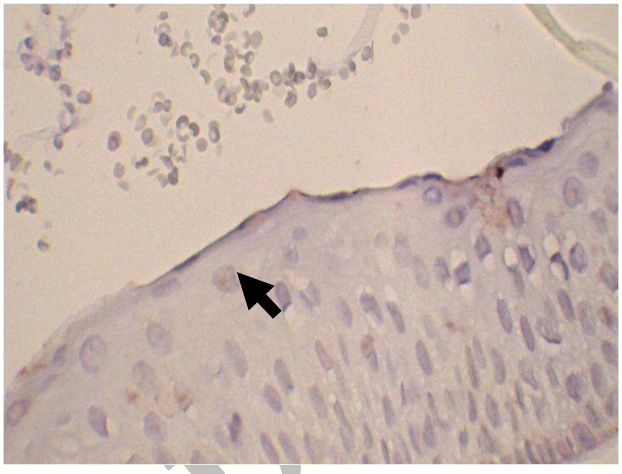
شکل ۴. توزیع سلول‌های ki-67 مثبت. پیکان در OKC
(رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بزرگ‌نمایی ۴۰×)

یافته‌های مربوط به روش TUNEL در OKC: بیشترین میانگین TUNEL-LI در لایه سطحی OKC با مقدار ۲/۶۲ ± ۷/۶۹ درصد به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) بیش از مقادیر قابل چشم پوشی در لایه‌های سوپرابازال و بازال بود (جدول ۱، شکل ۵).

یافته‌های مربوط به روش TUNEL در SAB: بیشترین میانگین TUNEL-LI در لایه داخلی SAB (۰/۳۸ ± ۱/۹۵ درصد) به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) بیش از مقادیر قابل چشم پوشی در لایه محیطی بود (جدول ۱).

یافته‌های مربوط به مقایسه سلول‌های TUNEL مثبت بین OKC و SAB: به طور کلی میانگین TUNEL-LI در لایه سطحی OKC با متوسط ۲/۶ ± ۷/۶۹ درصد به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) بیش از لایه داخلی SAB با مقدار ۰/۳۸ ± ۱/۹۵ درصد بود و به طور کلی میانگین TUNEL-LI در OKC با مقدار ۱/۰۱ ± ۳/۰۱ درصد) به طور معنی‌داری (p value < ۰/۰۱) بیش از SAB با مقدار ۰/۰۲ ± ۱ درصد بود (جدول ۱).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵. توزیع سلول‌های TUNEL مثبت پیکان در OKC (رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بزرگ‌نمایی ۴۰×)

بحث

در این پژوهش، نمونه‌های OKC مورد بررسی التهاب کمتر از متوسط (کمتر از ۱۵ لنفوسیت در بزرگ‌نمایی ۴۰۰×) داشتند. این ویژگی از تغییر غیر واقعی ایمونوری اکتیویتی bcl-2 و ki-67 در اثر التهاب جلوگیری می‌کند[۹]. آملوبلاستومای Solid به این دلیل در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت که با وجود داشتن برخی ویژگی‌های رفتاری مشابه مانند تهاجم موضعی و عود زیاد[۸]، بر خلاف OKC به صورت یک توده توپر ظاهر می‌شود[۳]. پروتئین bcl-2 محصول ژن bcl-2، اثر ضد آپوپتوزی دارد و بنابراین تظاهر بیش از حد آن ممکن است با ممانعت از آپوپتوز و افزایش بقای سلولی به ایجاد تومور منجر شود[۱۷].

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر و همانند نتایج پژوهش‌های Kummamoto و همکاران[۱۵] و Lou و همکاران[۱۰]، فرار از آپوپتوز در سلول‌های لایه محیطی آملوبلاستوما به طور معنی‌داری بیش از سلول‌های لایه مرکزی آن رخ می‌دهد. همچنین بیشترین میانگین bcl-2-LI، که نشان دهنده فرار از آپوپتوز می‌باشد، به طور معنی‌داری در لایه بازال OKC مشاهده شد. این یافته‌ها با نتایج پژوهش‌های Piattelli[۱۸]، جهانشاهی و همکاران[۱۹] و Kichi و همکاران[۱۵] همخوانی دارد.

از طرفی یافته‌های مربوط به تظاهر آنتی‌ژن Ki-67 در آملوبلاستوما در همخوانی با پژوهش Sandra و همکاران[۸] نشان داد که میانگین Ki-67-LI در لایه محیطی (PL) به طور معنی‌داری بیش از لایه داخلی (IL) بود. به عبارت دیگر، همان گونه که انتظار می‌رود ممانعت از آپوپتوز در این ناحیه به طور غیر مستقیم به افزایش تکثیر سلولی منجر می‌شود.

اما در مورد OKC، بر خلاف آملوبلاستوما بیشترین پرولیفراسیون سلولی در جایی که بیشترین تظاهر bcl-2 رخ داده است (لایه بازال) دیده نشد؛ بلکه پرولیفراسیون سلولی در لایه سوپرابازال OKC به طور معنی‌داری بیش از سایر لایه‌های آن بود. این یافته‌ها با نتایج پژوهش‌های Li و همکاران[۲۰] و Kichi و همکاران[۱۶] همخوانی دارد. به عبارتی می‌توان نتیجه گرفت که زیادتر بودن پرولیفراسیون در لایه سوپرابازال OKC در مقایسه با لایه محیطی آملوبلاستوما، ناشی از کاهش مرگ و افزایش بقای سلولی نیست، بلکه ممکن است فرآیندهای غیر طبیعی دیگری در رابطه با کنترل چرخه سلولی مسؤول آن باشند. گرچه در این پژوهش نیز همانند پژوهش Slootweg و همکاران[۲۱]، در کل میانگین Ki-67-LI در OKC بیش از آملوبلاستوما بود، ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر، در کل این دو ضایعه فعالیت پرولیفراتیو مشابهی دارند. این مسأله ممکن است تا حدودی توجیه کننده رفتار تهاجمی OKC همانند آملوبلاستوما باشد.

بررسی یافته‌های مربوط به وقوع آپوپتوز در OKC نشان داد که در لایه سطحی، یعنی جایی که هیچ تظاهری از bcl-2 دیده نمی‌شود، بیشترین میزان آپوپتوز و در لایه بازال که بیشترین بروز bcl-2 دیده می‌شود کمترین مقدار آن رخ می‌دهد. یافته‌های این پژوهش از نظر طرح بروز سلول‌های آپوپتوتیک با پژوهش Kichi و همکاران[۱۶] همخوانی دارد. در واقع سلول‌های لایه بازال OKC در طی مراحل نهایی تمایز خود کراتینیزه شده، وقتی به سطح می‌رسند طی فرآیند آپوپتوز پوسته پوسته می‌شوند و در داخل لومن تجمع می‌یابند.

یافته‌های پژوهش حاضر در مورد وقوع آپوپتوز در نمونه‌های آملوبلاستوما نشان داد که بیشترین میزان TUNEL-LI در بخش‌های داخلی جزایر و طناب‌های آملوبلاستومایی بود. از سویی وقوع آپوپتوز در سلول‌های لایه

Archive of SID
www.SID.ir

محیطی قابل چشم پوشی بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. این یافته‌ها با پژوهش Kumamoto و همکاران[۱۵] همخوانی دارد.

مقایسه وقوع فرآیند آپوپتوز در OKC و آملوبلاستوما نشان داد که بیشترین میزان آپوپتوز در OKC در لایه محیطی و در آملوبلاستوما در لایه داخلی دیده می‌شود و این مقادیر در OKC به طور معنی‌داری بیش از آملوبلاستوما بود.

به طور کلی در پژوهش حاضر بر خلاف پژوهش‌های Kichi و همکاران[۱۶] و Kummamoto و همکاران[۱۵] تعداد سلول‌های آپوپتوتیک کمتری مشاهده شد. احتمال دارد از آن جا که آپوپتوز یک فرایند دینامیک است، همه روش‌های استاتیک مورد استفاده برای اندازه‌گیری آن دچار اشکالاتی هستند

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های تعادلی برای حفظ تعداد سلول‌ها در آملوبلاستوما، هم در لایه محیطی و هم در بخش داخلی، مختل می‌شود و در نتیجه یک توده تومورال تشکیل می‌شود؛ در حالی که در OKC تعادلی که بین پرولیفراسیون سلولی و آپوپتوز وجود دارد، سبب حفظ ضخامت اپی‌تلیوم کیست می‌شود.

References

1. Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. Arch Pathol Lab Med 2004; 128(3): 313-7.
2. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology: clinical pathologic correlations. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2003. p. 245-88.
3. Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot JE: oral and maxillofacial Pathology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 683-708.
4. Henley J, Summerlin DJ, Tomich C, Zhang S, Cheng L. Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases. Histopathology 2005; 47(6): 582-6.
5. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. Oral Oncology 2001; 38(3): 219-26.
6. Baghae F, Eslami M, Sadri D. Evaluation of Ki-67 Antigen and Protein P53 Expression in Orthokratinized and Parakratinized Odontogenic Keratocyst. Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences 2004; 1(2): 53-8.
7. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. Oral Oncology 2004; 38(4): 323-31.
8. Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. Oral Oncol 2001; 37(2): 193-8.
9. Kaplan I, Hirshberg A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. Oral Oncol 2004; 40(10): 985-91.
10. Luo HY, Yu SF, Li TJ. Differential expression of apoptosis-related proteins in various cellular components of ameloblastomas. Int J Oral Maxillofac Surg 2006; 35(8): 750-5.
11. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. J Oral Pathol Med 1995; 24(5): 221-6.
12. de Paula AM, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. J Oral Pathol Med 2000; 29(10): 477-82.
13. Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. J Oral Pathol Med 2006; 35(2): 65-74.
14. Kim DK, Ahn SG, Kim J, Yoon JH. Comparative Ki-67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without an impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. Yonsei Med J 2003; 44(5): 841-6.
15. Kumamoto H. Detection of apoptosis-related factors and apoptotic cells in ameloblastomas: analysis by immunohistochemistry and an in situ DNA nick end-labelling method. J Oral Pathol Med 1997; 26(9): 419-25.
16. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. J Oral Pathol Med 2005; 34(5): 280-6.
17. Nussbaum RL, Mclnnes KK, Willard HF, Thompson MW. Thompson and Thempson genetics in medicine: genetics and cancer. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p. 311-33.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Piattelli A, Fioroni M, Rubini C. Differentiation of odontogenic keratocysts from other odontogenic cysts by the expression of bcl-2 immunoreactivity. Oral Oncol 1998; 34(5): 404-7.
19. Jahanshahi Gh, Talebi A, Shirvani A. Expression of bcl-2 in the Epithelial lining of odontogenic keratocysts. Journal of Dentistry, Tehran university of medical sciences 2006; 3(1): 30-5.
20. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. J Oral Pathol Med 1994; 23(4): 184-9.
21. Slootweg PJ. p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. J Oral Pathol Med 1995; 24(9): 393-7.

Archive of SID

www.SID.ir