

Immunohistochemical study of ki-67 and bcl-2 expression in some odontogenic cystic lesions with different clinical behaviors

H. Tabatabaei*

SH. TaqipourZahir**

S. Keshavarz***

F. Khajehzade****

*Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

**Department of Clinical and Anatomical Pathology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

***Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Rafsanjan University of Medical Science, Rafsanjan, Iran

****Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Yasooj University of Medical Science, Yasooj, Iran

*Abstract

Background: Cystic lesions with odontogenic epithelial origin and similar clinicoradiographic appearance, show different clinical behaviors.

Objective: To compare some factors related to cell proliferation and escape from apoptosis in epithelium covering two groups of odontogenic cystic lesions with different clinical behaviors.

Methods: In this cross-sectional study 11 paraffin-embedded samples were selected of each lesions radicular cyst, dentigerous cyst, odontogenic keratocyst, and unicystic ameloblastoma. The sample underwent immunohistochemical staining for investigating the expression of ki-67 antigen and bcl-2 protein. Data analyzed with SPSS17 software and Kruskal–Wallis and chi-square statistical tests.

Findings: Most of ki-67 positive cells were observed in parabasal layer of odontogenic keratocyst [$35.50 \pm 26.29\%$; $P=0.001$]. The average of ki-67-LI was more in parabasal layer of aggressive group ($26.80 \pm 37.79\%$) compared to non-aggressive group ($4.04 \pm 3.38\%$), was not being statistically significant. The highest average of bcl-2-LI was $95 \pm 6.70\%$ in basal layer of odontogenic keratocyst ($P=0.001$). In all layers, the average of bcl-2-LI was more in aggressive lesions compared to non-aggressive ones and the highest amount was found in basal layer ($72.45 \pm 3.94 \times 10\%$) which was statistically significant ($P=0.001$).

Conclusion: According to the results of this study, more expression of the markers related to escape from apoptosis in aggressive lesions group compared to non-aggressive group, suggests that escape from apoptosis had a more critical role in aggressive behavior of odontogenic cystic lesions.

Keywords: bcl-2 Protein, ki-67 Antigen, Immunohistochemical Staining, Odontogenic Cystic Lesions

Citation: Tabatabaei H, Taqipour Zahir SH, Keshavarz S, Khajehzade F. Immunohistochemical study of ki-67 and bcl-2 expression in some odontogenic cystic lesions with different clinical behaviors. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 20 (4): 4-12.

Corresponding Address: Samaneh Keshavarz, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Rafsanjan, Iran

Email: skeshavarz63@yahoo.com

Tel: +98-917-3098077

Received: 6 Feb 2016

Accepted: 30 Jun 2016

بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان نشان‌گرهای $ki-67$ و $bcl-2$ در برخی ضایعه‌های کیستی دندانی با رفتارهای بالینی متفاوت

دکتر فاطمه خواجه‌زاده****

دکتر سمانه کشاورز***

دکتر شکوه تقی‌پور ظهیر**

دکتر سید حسین طباطبایی*

* گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 ** گروه آموزشی آسیب‌شناسی بالینی و آناتومیک دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 *** گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان، رفسنجان، ایران
 **** گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی یاسوج، شهرکرد، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: رفسنجان، دانشکده دندان‌پزشکی، بخش آسیب‌شناسی، تلفن ۰۹۱۷۳۰۹۸۰۷۷

Email: skeshavarz63@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۷

* چکیده

زمینه: ضایعه‌های کیستی با منشأ اپیتلیوم دندانی و ظاهر بالینی و رادیوگرافی مشابه، رفتار بالینی متفاوتی دارند.
هدف: مطالعه به منظور مقایسه برخی عوامل مرتبط با تکثیر و فرار از مرگ سلولی در اپیتلیوم پوشاننده دو گروه از ضایعه‌های کیستی دندانی با رفتار بالینی متفاوت انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تحلیلی و گذشته‌نگر تعداد ۱۱ نمونه پارافینه از هر یک از ضایعه‌های کیست رادیکولار، کیست دنتی ژروس، ادونتوژنیک کراتوکیست و آمولوبلاستوما تک کیستی، برای بررسی بروز آنتی‌ژن $ki-67$ و پروتئین $bcl-2$ رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری کروسکال-والیس و کای دو تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیش‌ترین میزان سلول‌های $ki-67$ مثبت ($35/50 \pm 26/29\%$) در لایه پارابازال ادونتوژنیک کراتوکیست دیده شد ($P=0/001$). میانگین $ki-67-LI$ در لایه پارابازال گروه تهاجمی ($26/80 \pm 37/79\%$) بیش‌تر از گروه غیرتهاجمی ($4/04 \pm 3/38\%$) بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. بیش‌ترین میانگین $bcl-2-LI$ ($95 \pm 6/70\%$) در لایه بازال ادونتوژنیک کراتوکیست بود ($P=0/001$). میانگین $bcl-2-LI$ در همه لایه‌ها در ضایعه‌های تهاجمی بیش‌تر از ضایعه‌های غیرتهاجمی و بیش‌ترین مقدار آن ($72/45 \pm 3/94 \times 10\%$) در لایه بازال و این تفاوت معنی‌دار بود ($P=0/001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، تظاهر بیش‌تر نشان‌گرهای مرتبط با فرار از مرگ سلولی در گروه ضایعه‌های مهاجم در مقایسه با گروه غیرمهاجم، این احتمال را مطرح می‌کند که فرار از مرگ سلولی نقش مهم‌تری در رفتار تهاجمی ضایعه‌های دندانی کیستی ایفا می‌کند.

کلیدواژه‌ها: پروتئین $bcl-2$ ، آنتی‌ژن $ki-67$ ، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی، ضایعه‌های کیستی دندانی

* مقدمه:

کیست‌های دندانی در حفره دهان، ضایعه‌های شایعی هستند. برخی از این ضایعه‌ها علی‌رغم ظاهر بالینی و آسیب‌شناسی مشابه، رفتار بالینی متفاوتی از خود نشان می‌دهند.^(۱) بعضی از آن‌ها مانند کیست رادیکولار (شایع‌ترین کیست دندانی با منشأ التهابی) و کیست دنتی ژروس (شایع‌ترین کیست دندانی با منشأ تکاملی) تخریب

قابل توجهی ایجاد نمی‌کنند و بعد از درمان مناسب به‌ندرت عود می‌کنند.^(۲) اما برخی ضایعه‌های کیستی مانند ادونتوژنیک کراتوکیست و آمولوبلاستوما تک کیستی، با وجود داشتن نمای آسیب‌شناسی ملایمی، رفتار بالینی مهاجمی مثل عود و تخریب موضعی از خود نشان می‌دهند.^(۳-۶)

پروتئین bcl-2 می‌تواند سبب افزایش در بقای سلول‌های اپیتلیال شود که در الگوی رشدی مهاجم ادونتوزنیک کراتوکیست دیده می‌شود. به عقیده آن‌ها رنگ‌آمیزی برای bcl-2 می‌تواند در تشخیص ادونتوزنیک کراتوکیست از سایر کیست‌ها کمک‌کننده باشد.^(۱۷) تأکید برای پیشگویی رفتار بالینی ضایعه‌ها به این جهت است که بتوان آن‌ها را قبل از گسترش و تخریب قابل توجه ساختارهای مجاور تشخیص و از عوارض درمان وسیع یا عودهای مکرر تا حد امکان جلوگیری کرد. در برخی مطالعه‌ها رفتار بالینی متفاوت ادونتوزنیک کراتوکیست از نظر تکثیر، مرگ سلولی و تمایز نسبت به سایر کیست‌های ادونتوزنیک مطرح و نظریه ماهیت نئوپلاستیک آن تقویت شده است.^(۱۸، ۱۹) نفرزاده و همکاران در مطالعه‌ای احتمال تفاوت میزان مولکول‌های درگیر در چرخه سلولی در ضایعه‌های با تهاجم بالاتر را بیان کرده‌اند.^(۱۴)

به‌طور کلی رفتار بالینی ادونتوزنیک کراتوکیست در مقایسه با ضایعه‌های دندانی مختلف متعددی در مطالعه‌ها بررسی شده است،^(۲۱-۱۸) اما تاکنون یک بررسی کلی برای شناسایی نشان‌گرهای مؤثر در تکثیر سلولی و فرار از مرگ سلولی در دو گروه از ضایعه‌های کیستی دندانی با رفتار مهاجم و غیرمهاجم ارایه نشده است. از این رو مطالعه حاضر با هدف مقایسه تکثیر سلولی و فرار از مرگ سلولی بر روی اپیتلیوم پوشاننده دو گروه از ضایعه‌های دندانی با ظاهر بالینی و رادیوگرافی مشابه اما با رفتار متفاوت از نظر میزان و محل تظاهر انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تحلیلی و گذشته‌نگر، در مهر ماه سال ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام شد. از بین نمونه‌های موجود در بایگانی دانشکده دندان پزشکی بین سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۹۲ به روش نمونه‌گیری آسان، ۱۱ نمونه از بین موارد تشخیص قطعی آسیب‌شناسی از هر یک از ضایعه‌های کیست رادیکولار، کیست دنتی ژروس، ادونتوزنیک کراتوکیست و

ضایعه‌های دندانی از اپیتلیوم ادونتوزنیک به وجود می‌آیند که منشأ تکامل دندان‌هاست. به منظور بررسی رفتار این ضایعه‌ها، مطالعه‌های متعددی بر روی چرخه سلولی و فرآیند تقسیم و مرگ سلولی انجام شده است.^(۱۰-۷) از آن‌جا که مراحل مختلف چرخه سلولی به‌وسیله ژن‌های متعددی کنترل می‌شوند، تغییر تظاهر ژن‌های دخیل در چرخه سلولی در کنترل و پیشرفت آن نقش اساسی ایفا می‌کند.^(۱۱) یکی از اهداف مطالعه‌های انجام شده پیرامون مراحل چرخه سلولی و نشان‌گرهای تکثیر سلولی در تومورهای دندانی، تعیین ارتباط چرخه سلولی با فرآیند ایجاد تومور بوده است.^(۳، ۴) طبق مطالعه‌ای سه نشان‌گر P53، Ki-67 و COX2 می‌توانند برای ارزیابی رفتار بالینی ادونتوزنیک کراتوکیست استفاده شوند.^(۱۲) مطالعه دیگری Ki-67 را نشان‌گری مناسب برای ارزیابی تکثیر پیشنهاد کرده است.^(۱۳) نفرزاده و همکاران در مطالعه‌ای ارزیابی سطح بیان Ki-67 و ارتباط آن با عود و رفتار بالینی را در ضایعه‌های مختلف بررسی و پیشنهاد کرده‌اند که در ضایعه‌های با تهاجم بالاتر نسبت به ضایعه‌های با تهاجم کم‌تر، میزان مولکول‌های درگیر در چرخه سلولی متفاوت است.^(۱۴)

سیندورا و همکاران ماهیت مهاجم ادونتوزنیک کراتوکیست و توانایی رشد داخلی لایه اپیتلیوم آن را بررسی و به‌طور آشکار بیان کرده‌اند که ادونتوزنیک کراتوکیست هم مانند آمولوبلاستوما رفتار بالینی مهاجم دارد و بهتر است به عنوان یک تومور دندانی در نظر گرفته شود.^(۱۵)

پروتئین bcl-2 در تکامل دندان و جوانه دندانی نقش مهمی دارد و ممکن است حضور آن در اپیتلیوم مینایی داخلی و خارجی برای افزایش اندازه جسم دندانی و بلوغ سلول‌های لایه بینابینی در آن ضروری باشد. این پروتئین حتی پس از قطعه‌قطعه شدن لامینای دندانی، در جزایر سلولی حاصل باقی می‌ماند و به‌نظر می‌رسد در ایجاد برخی ضایعه‌های دندانی نقش داشته باشد.^(۱۶) در مطالعه‌ای پژوهش‌گران به این نتیجه رسیدند که افزایش بیان

زمینه‌ای مناسب رنگ‌آمیزی شدند و لام‌ها به منظور شفاف‌سازی در الکل و گزیلول قرار گرفتند.^(۳۳) برای اطمینان از صحت روش رنگ‌آمیزی در همه مراحل از شاهد منفی و مثبت استفاده شد. در رنگ‌آمیزی‌های ایمونوهیستوشیمیایی لام‌هایی با حذف مرحله بافر سالین و نشانه‌گذاری، به عنوان شاهد منفی، یک نمونه سرطان پستان به‌عنوان شاهد مثبت ki-۶۷، یک نمونه لنفوما به‌عنوان شاهد مثبت bcl-۲ و سلول‌های التهابی ارتشاح یافته در نمونه‌ها به‌عنوان شاهد مثبت داخلی در نظر گرفته شدند.

نمونه‌ها توسط دو مشاهده‌گر به‌صورت جداگانه با میکروسکوپ نوری مدل المپیا بررسی شدند. به منظور بررسی محل تظاهر نشان‌گرهای مورد بررسی، اپیتلیوم پوشاننده کیست به سه ناحیه تقسیم شد: ۱- لایه بازال شامل یک ردیف سلول مکعبی تا استوانه‌ای مجاور غشای پایه، ۲- لایه پارابازال شامل یک تا دو ردیف سلول سنگ‌فرشی بالاتر از لایه بازال و ۳- لایه سطحی شامل سایر سلول‌های سنگ‌فرشی بالاتر از لایه پارابازال تا سطح اپیتلیوم پوشاننده.^(۳۳) در هر یک از لایه‌های فوق، ۱۰۰۰ سلول پشت سر هم در حدود ده زمینه که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر مشاهده و شمارش شدند. جهت بررسی واکنش ایمنی ki-۶۷، هسته‌های قهوه‌ای رنگ در زمینه سیتوپلاسم بی‌رنگ و جهت بررسی واکنش ایمنی bcl-۲، سلول‌هایی که سیتوپلاسم آن‌ها به رنگ قهوه‌ای درآمده بود، صرف‌نظر از شدت رنگ‌پذیری به عنوان سلول‌های مثبت در نظر گرفته شدند. به‌منظور بررسی میزان تظاهر نشان‌گرهای مورد بررسی در هر یک از نواحی سه‌گانه ذکر شده، نتایج به‌صورت شاخص نشانه‌گذاری براساس فرمول زیر محاسبه گردید:^(۳۱ و ۳۲)

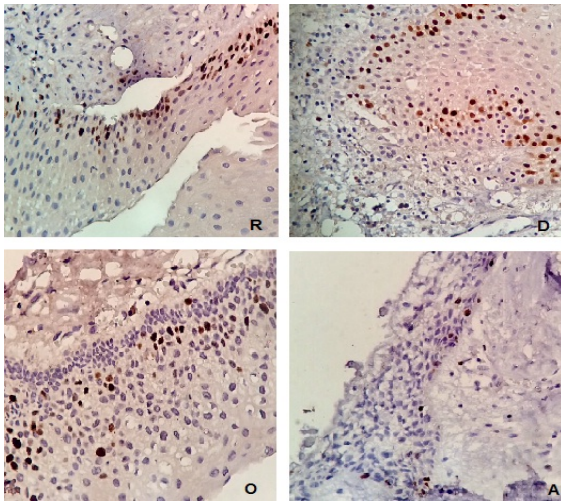
$$\text{تعداد سلول‌های رنگ گرفته صرف‌نظر از شدت رنگ‌پذیری} \times ۱۰۰ = \text{شاخص نشانه‌گذاری}$$

$$۱۰۰۰ (\text{تعداد سلول‌های اپیتلیالی})$$

آملوبلاستومای تک کیستی انتخاب شدند. ادونتوزنیک کراتوکیست‌های سندرمیک و موارد ارتوکراتینیزه در مطالعه وارد نشدند. در این مطالعه کیست‌های رادیکولار و دنتی‌ژروس به‌عنوان گروه ضایعه‌های غیرمهاجم و ادونتوزنیک کراتوکیست و آملوبلاستومای تک کیستی به عنوان گروه ضایعه‌های مهاجم از نظر بالینی در نظر گرفته شدند.^(۳-۶)

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی جهت بررسی بروز آنتی‌ژن ki-۶۷ (داکو، دانمارک) و پروتئین bcl-۲ (داکو، دانمارک) بدین شرح انجام شد: از هر یک از نمونه‌ها، برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرون تهیه و مقاطع بر روی لام آغشته به پلی‌ال لیزین قرار داده شد. سپس لام‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خارج کردن پارافین، نمونه‌ها به منظور تثبیت آنتی‌ژن‌ها در محلول بافر سیترات با PH=۶ غوطه‌ور شدند و در مایکروویو قرار گرفتند تا ساختمان مولکولی آنتی‌ژن‌ها توسط حرارت به حالت طبیعی برگردد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس با محلول بافر سالین شستشو و به مدت ۵ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳ درصد برای جلوگیری از فعالیت پراکسیداز درونی انکوبه شدند.

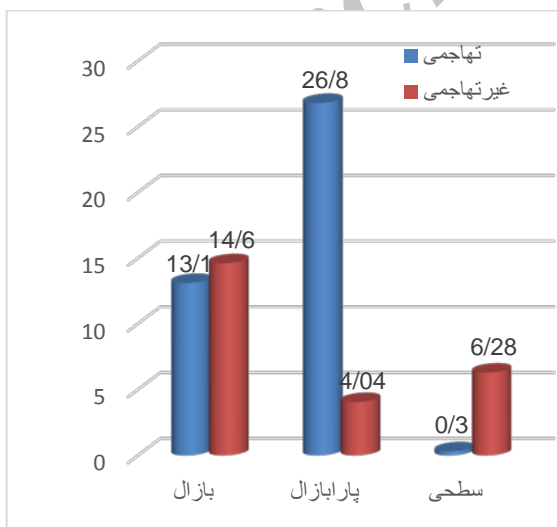
جهت بررسی بروز آنتی‌ژن ki-۶۷، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در محلول آنتی‌بادی مونوکلونال mouse Zymed ki-۶۷ با رقت ۱:۱۰۰ قرار گرفتند که بر ضد آنتی‌ژن هسته‌ای ki-۶۷ فعال است. همچنین نمونه‌ها جهت بررسی بروز پروتئین bcl-۲ به مدت یک ساعت در مجاورت آنتی‌بادی مونوکلونال bcl-۲ mouse Zymed با رقت ۱:۵۰ قرار گرفتند. نمونه‌ها بعد از شستشو با محلول بافر سالین، در کروموژن ۳ و ۳ دی آمینو بنزودین هیدروکلرید با غلظت ۲۰X که به غلظت ۱X رقیق شده بود، به مدت ۵ دقیقه انکوبه و سپس با آب مقطر و بافر سالین شستشو شدند، تا آنتی‌ژن مورد نظر در صورت وجود در بافت به رنگ قهوه‌ای قابل مشاهده باشد. تمام نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین مایر جهت ایجاد رنگ



شکل ۱- توزیع سلول‌های ki-67 مثبت در ضایعه‌های مورد بررسی (R= کیست رادیکولار، D= کیست دنتی ژروس، O= ادونتوژنیک کراتوکیست و A= آملوبلاستومای تک کیستی)

یافته‌های مربوط به گروه غیرتهاجمی در مقایسه با گروه تهاجمی از نظر بالینی نشان داد که میانگین ki-67-LI در لایه پارابازال گروه تهاجمی (۳۷/۷۹±۲۶/۸۰ درصد) بیش‌تر از گروه غیرتهاجمی (۳/۳۸±۴/۰۴ درصد) بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- میانگین ki-67-LI در گروه ضایعه‌های تهاجمی و غیرتهاجمی (برحسب درصد)



مشاهده حداقل ۱۰ درصد سلول‌های رنگ گرفته در بافت، ملاک مثبت تلقی کردن ۲-bcl در نمونه‌ها بود.^(۲۱)

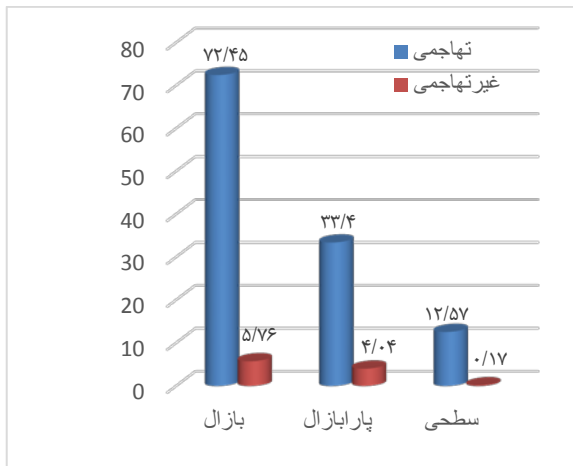
ضریب توافق دو مشاهده‌گر با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد که بالای ۹۵ درصد بود. لذا میانگین شاخص‌های نشانه‌گذاری تعیین شده توسط هر دو مشاهده‌گر در لایه‌های مختلف نمونه‌های مورد بررسی محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۷ و آزمون‌های آماری کروسکال-والیس و کای دو تحلیل و نتایج در سطح $\alpha=0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها:

به‌طور کلی بروز ki-67 در لایه‌های مختلف کیست رادیکولار تفاوت معنی‌داری داشت ($P=0/001$). بیش‌ترین میانگین ki-67-LI در لایه پارابازال به میزان $16/05 \pm 14/75$ درصد دیده شد. در حالی که بروز ki-67 در لایه بازال به میزان $8/50 \pm 8/38$ درصد و در لایه سطحی به میزان $0/83 \pm 1/58$ درصد بود. میزان بروز ki-67 در لایه‌های مختلف کیست دنتی ژروس نیز تفاوت معنی‌داری داشت ($P=0/001$). بیش‌ترین میانگین ki-67-LI در لایه بازال به میزان $21/27 \pm 2/41 \times 10$ درصد دیده شد. در حالی که بروز ki-67 در لایه پارابازال به میزان $8/81 \pm 10/29$ درصد بود و در لایه سطحی هیچ تظاهراتی را نشان نداد. بروز ki-67 در لایه‌های مختلف ادونتوژنیک کراتوکیست تفاوت معنی‌داری داشت ($P=0/001$). بیش‌ترین میانگین ki-67-LI در لایه پارابازال به میزان $35/50 \pm 26/29$ درصد دیده شد. در حالی که بروز ki-67 در لایه بازال به میزان $21/30 \pm 2/47$ درصد بود و در لایه سطحی هیچ تظاهراتی را نشان نداد. بروز ki-67 در لایه‌های مختلف آملوبلاستومای تک کیستی تفاوت معنی‌داری نداشت، بیش‌ترین میانگین به‌دست آمده در لایه‌های پارابازال و سطحی به میزان مساوی ($18/10 \pm 46/44$ درصد) و در لایه بازال به میزان $4/90 \pm 9/08$ درصد دیده شد (شکل شماره ۱).

یافته‌های مربوط به گروه غیرتهاجمی در مقایسه با گروه تهاجمی از نظر بالینی نشان داد که میانگین bcl-2-LI در همه لایه‌های مورد بررسی در ضایعه‌های تهاجمی بیش‌تر از ضایعه‌های غیرتهاجمی و بیش‌ترین مقدار آن به ترتیب در لایه بازال، پارابازال و در نهایت لایه سطحی بود. این تفاوت در لایه بازال گروه تهاجمی (۷۲/۴۵±۳/۹۴×۱۰٪) با گروه غیرتهاجمی (۵/۷۶±۱/۰۳×۱۰٪) از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۱) (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- میانگین bcl-2-LI در گروه ضایعه‌های تهاجمی و غیرتهاجمی (برحسب درصد)

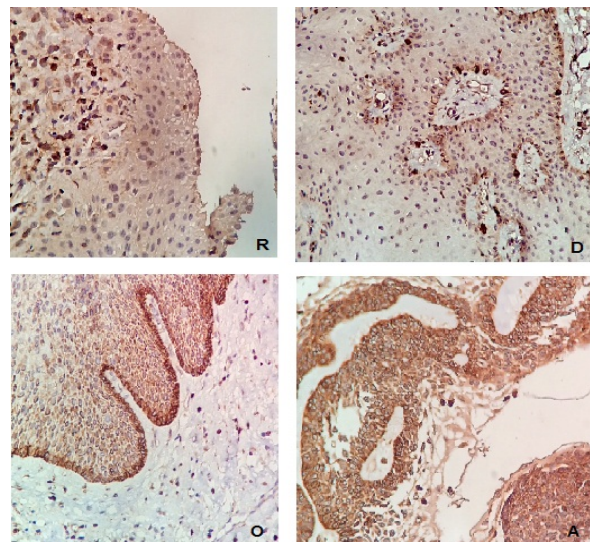


*بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه، بیش‌تر بودن تظاهر نشان‌گرهای مرتبط با فرار از مرگ سلولی در گروه ضایعه‌های مهاجم در مقایسه با گروه غیرمهاجم، این احتمال را مطرح می‌کند که فرار از مرگ سلولی نقش مهمی در رفتار تهاجمی ضایعه‌های کیستی دندان با ظاهر بالینی و رادیوگرافی مشابه ایفا می‌کند. بنابراین این نشان‌گرها می‌توانند برای پیشگویی رفتار بالینی این ضایعه‌ها مورد توجه قرار گیرند.

در بررسی تظاهر آنتی ژن ki-۶۷ در پژوهش حاضر، بیش‌ترین میانگین ki-۶۷-LI مربوط به لایه پارابازال ادونتوزنیک کراتوکیست بود که این یافته با سایر

بروز bcl-2 در لایه‌های مختلف کیست رادیکولار تفاوت معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۱). میانگین bcl-2-LI در لایه بازال به میزان ۷/۸۱±۱/۴۲×۱۰ درصد و در لایه پارابازال به میزان ۵/۴۵±۳/۹۰ درصد بود و در لایه سطحی هیچ تظاهری را نشان نداد. بروز bcl-2 در لایه‌های مختلف کیست دنتی ژروس تفاوت معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۶). میانگین bcl-2-LI در لایه بازال به میزان ۳/۵۰±۱/۶۴ درصد، در لایه پارابازال به میزان ۲/۵۰±۱/۸۴ درصد و در لایه سطحی ۰/۵۰±۰/۸۳ درصد بود. بروز bcl-2 در لایه‌های مختلف ادونتوزنیک کراتوکیست تفاوت معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۱). بیش‌ترین میانگین bcl-2-LI در لایه بازال به میزان ۲۹±۲۱/۳۶ درصد و در لایه پارابازال به میزان ۹۵±۶/۷۰ درصد دیده شد و در لایه سطحی هیچ تظاهری را نشان نداد. در آملوبلاستومای تک کیستی، بروز bcl-2 در لایه‌های مختلف آملوبلاستومای تک کیستی تفاوت معنی‌داری نداشت. بیش‌ترین میانگین bcl-2-LI در لایه بازال به میزان ۳۸/۲۹±۴/۳۹×۱۰ درصد، در لایه پارابازال به میزان ۱۸/۳۶±۲۶/۳۳ درصد و در لایه سطحی ۶/۷۲±۲/۲۲ درصد بود (شکل شماره ۲).



شکل ۲- توزیع سلول‌های bcl-2 مثبت در ضایعه‌های مورد بررسی (R= کیست رادیکولار، D= کیست دنتی ژروس، O= ادونتوزنیک کراتوکیست و A= آملوبلاستومای تک کیستی)

کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان bcl-2 در آملوبلاستوما نسبت به ادونتوزنیک کراتوسیت و کیست رادیکولار شدیدتر بود و تفاوت معنی داری بین ادونتوزنیک کراتوسیت و آملوبلاستوما مشاهده نکردند که با مطالعه حاضر همسو نبود. آن‌ها نشان دادند که توانایی تکثیر اپیتلیوم و افزایش بیان پروتئین‌های ضد مرگ سلولی در تومورهای اپیتلیالی ادونتوزنیک، با رفتار بالینی آن‌ها مرتبط بود و افزایش بیان bcl-2 و ki-67 در نمونه‌های ادونتوزنیک کراتوکیست با رفتار بالینی مهاجم و میزان عود بالای آن‌ها مطابقت داشت.^(۳۷)

بیان بالای bcl-2 در لایه بازال ادونتوزنیک کراتوکیست این احتمال را مطرح می‌کند که ایجاد این کیست یک رفتار جنینی است که در بقایای اپیتلیوم ادونتوزنیک مجدداً تکرار شده است. از طرفی به دلیل این که bcl-2 برای پیشگیری از مرگ سلولی لازم است، وقوع آن در بافت‌های ادونتوزنیک در شناسایی جمعیت‌های سلولی مفید است که ضایعه‌های ادونتوزنیک از آن‌ها برمی‌خیزد.^(۱۵)

طبق نتایج مطالعه حاضر، از نظر بالینی بیش‌ترین میزان تکثیر سلولی در لایه بازال گروه ضایعه‌های مهاجم وجود داشت و این یافته پیشنهاد می‌کند که بین تظاهر نشان‌گرهای مرتبط با تکثیر و رفتار بالینی مهاجم ضایعه‌های کیستی ادونتوزنیک رابطه وجود دارد. به عبارتی، ممکن است بروز این نشان‌گر بتواند در زمینه پیشگویی رفتار تهاجمی ضایعه‌ها، کمک‌کننده باشد. هرچند براساس یافته‌های حاصل، این احتمال مطرح می‌شود که تظاهر پروتئین bcl-2 در مقایسه با ki-67، در رفتار تهاجمی ضایعه‌های ادونتوزنیک کیستی، نقش مهم‌تری داشته باشد، البته با توجه به تعداد محدود نمونه‌ها در مطالعه حاضر، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های دقیق‌تری در این زمینه با تعداد نمونه‌های بیش‌تر انجام شود.

*سیاس‌گذاری:

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۳۲۳۱ است. از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی

مطالعه‌ها همسو بود.^(۳۴،۳۱) طبق نتایج مرتبط با مقایسه فعالیت تکثیر سلولی بین چهار ضایعه، شاخص تکثیر بالا در لایه پارابازال ادونتوزنیک کراتوکیست می‌تواند تا حدودی توجیه‌کننده رفتار مهاجم و ماهیت نئوپلاستیک آن باشد.

در این مطالعه، میزان ki-67-LI در لایه پارابازال گروه ضایعه‌های مهاجم بیش‌تر از گروه ضایعه‌های غیرمهاجم بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. این احتمال وجود دارد که میزان بروز ki-67 در لایه پارابازال ضایعه‌های مورد بررسی، پیش‌گویی‌کننده رفتار بالینی تهاجمی آن‌ها باشد. کنت و همکاران در یک مطالعه دریافتند که فعالیت تکثیر سلولی برای آنتی‌ژن ki-67 و P53 در آملوبلاستوما بالاتر از کیست‌های ادونتوزنیک بود،^(۳۵) اما در مطالعه حاضر بروز آنتی‌ژن ki-67 در ادونتوزنیک کراتوکیست بالاتر از سایر ضایعه‌ها بود.

در یک مطالعه پیشنهاد شد که بیان bcl-2 در ادونتوزنیک کراتوکیست می‌تواند به تشخیص آن از کیست دنتی ژروس کمک کند.^(۳۶) بخشی از مطالعه حاضر نیز به دنبال تشخیص رفتار تهاجمی ضایعه‌ها با استفاده از نشان‌گر bcl-2 بود. در مطالعه حاضر، میزان bcl-2-LI در هر سه لایه بازال، پارابازال و سطحی در گروه ضایعه‌های مهاجم بالاتر از گروه غیرمهاجم و این تفاوت در لایه بازال و پارابازال از نظر آماری معنی‌دار بود که این احتمال را مطرح می‌کند که بررسی بروز bcl-2 می‌تواند به پیش‌گویی رفتار بالینی ضایعه‌ها کمک کند.

در مطالعه حاضر میزان bcl-2-LI در لایه بازال ادونتوزنیک کراتوکیست به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سه ضایعه دیگر و نیز بالاتر از سایر لایه‌های خود این ضایعه بود که این یافته با نتایج سایر مطالعه‌ها در زمینه بررسی تظاهر bcl-2 هم‌خوانی داشت.^(۳۱،۱۹) ممکن است بین شدت بروز bcl-2 و رفتار بالینی ادونتوزنیک کراتوکیست از جمله میزان عود و تهاجم آن رابطه وجود داشته باشد. در مطالعه‌ای پژوهشگران میزان بروز نشان‌گرهای bcl-2، bax و ki-67 را در ضایعه‌های کیست رادیکولار، آملوبلاستوما و ادونتوزنیک کراتوسیت بررسی

dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005 May; 34 (5): 280-6.

9. Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of cell-cycle and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2001 Aug; 30 (7): 434-42.

10. Edamatsu M, Kumamoto H, Ooya K, Echigo S. Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005 Jan; 99 (1): 17-23.

11. Dehghan Nayyari F, Alizadeh H, Naghavi MR, Mohammadi SA, Soltani-Najafabadi M. Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Iranian J Agricultural Sciences* 2010 Fall; 12 (3): 346-63. [In Persian]

12. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011 Mar; 111 (3): 333-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.10.004.

13. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frecherro N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013 Mar 1; 18 (2): e174-9.

14. Nafarzadeh S, Seyedmajidi M, Jafari S, Bijani A, Rostami-Sarokolaei A. A comparative study of PCNA and Ki-67 expression in dental follicle, dentigerous cyst, unicystic ameloblastoma and ameloblastoma. *Int J Mol Cell Med* 2013 Winter; 2 (1): 27-33.

شهید صدوقی یزد و همکارى دکتر حمید عباسى و خانم رقيه حکیمیان سپاس گزارى مى‌شود.

*مراجع:

1. Seyedmajidi M, Nafarzadeh S, Siadati S, Shafae S, Bijani A, Keshmiri N. p53 and PCNA expression in keratocystic odontogenic tumors compared with selected odontogenic cysts. *Int J Mol Cell Med* 2013 Fall; 2 (4): 185-93.

2. Koseoglu BG, Atalay B, Erdem MA. Odontogenic cysts: a clinical study of 90 cases. *J Oral Sci* 2004 Dec; 46 (4): 253-7.

3. Amin Z, Amran M, Khairudin A. Removal of extensive maxillary dentigerous cyst via a Caldwell-Luc procedure. *Archives of Orofacial Sciences* 2008; 3 (2): 48-51.

4. Zadik Y, Aktas A, Drucker S, Nitzan DW. Aneurysmal bone cyst of mandibular condyle: a case report and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2012 Dec; 40 (8): e243-8. doi: 10.1016/j.jcms.2011.10.026.

5. Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *Tex Dent J* 2008 May; 125 (5): 446-54.

6. Pattipati S, Ramaswamy P, Kumar BP, Khaitan T. Unicystic ameloblastoma: A classic presentation. *J Stomat Occ Med* 2013; 6: 33-7. doi: 10.1007/s.12548.012.0067.2.

7. Mateus GC, Lanza GH, de Moura PH, Marigo Hde A, Horta MC. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008 Nov 1; 13 (11): E697-702.

8. 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

15. Sindura C, Babu C, Mysorekar V, Kumar V. Study of immunohistochemical demonstration of Bcl-2 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013 May; 17 (2): 176-80. doi: 10.4103/0973-029X.119750.
16. Slootweg PJ, de Weger RA. Immunohistochemical demonstration of bcl-2 protein in human tooth germs. *Arch Oral Biol* 1994 Jul; 39 (7): 545-50.
17. Sujatha R, Chandrashekar P, Kumar KK, Reddy GS, Chandra KL, Reddy BR. Differentiation of odontogenic keratocyst from radicular and dentigerous cysts by bcl-2 protein-An immunohistochemical study. *J Dr NTR Univ Health Sci* 2013; 2 (3): 186-90.
18. Ayoub MS, Baghdadi HM, El-Kholy M. Immunohistochemical detection of laminin-1 and Ki-67 in radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. *BMC Clin Pathol* 2011 Mar 2; 11: 4. doi: 10.1186/1472-6890-11-4.
19. Galvao HC, Gordon-Nunez MA, de Amorim RF, Freitas Rde A, de Souza LB. Immunohistochemical expression of protein 53, murine double minute 2, B-cell lymphoma 2, and proliferating cell nuclear antigen in odontogenic cysts and keratocystic odontogenic tumor. *Indian J Dent Res* 2013 May-Jun; 24 (3): 369-74. doi: 10.4103/0970-9290.118019.
20. de Vicente JC, Torre-Iturraspe A, Gutierrez AM, Lequerica-Fernández P. Immunohistochemical comparative study of the odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010 Sep 1; 15 (5): e709-15.
21. Razavi SM, Tabatabaie SH, Hoseini AT, Hoseini ET, Khabazian A. A comparative immunohistochemical study of Ki-67 and Bcl-2 expression in solid ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *Dent Res J (Isfahan)* 2012 Mar; 9 (2): 192-7.
22. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocysticodontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment-an overview. *Oral Oncol* 2010 Jan; 46 (1): 19-24. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.10.009.
23. Lippman SM, Shin DM, Lee JJ, Batsakis JG, Lotan R, Tainsky MA, et al. p53 and retinoid chemoprevention of oral carcinogenesis. *Cancer Res* 1995 Jan 1; 55 (1): 16-9.
24. Seifi S, Mahjoub S, Shafigh E, Bijani A, Ahangari MH. Ki67 and p53 proteins in odontogenic keratocyst. *J Babol Univ Med Sci* 2008-2009; 10 (5): 23-9. [In Persian]
25. Kanth KS, Kumar TD, Kumar AR. Immunohistochemical analysis of dentigerous cyst and ameloblastoma using cytokeratin 19 & 14, p53, p63 and ki-67. *SRM J Research in Dental Sciences* 2012; 3 (4): 236-9. doi: 10.4103/0976-433X.114967.
26. Lee IH, Choi SY, Park JH, Kim CS. Expression of Bcl-2 in the epithelial lining and clinical findings of keratocystic odontogenic tumor. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2011 Jun; 37 (3): 161-8. doi: 10.5125/jkaoms.2011.37.3.161.
27. Soluk Tekkesin M, Mutlu S, Olgac V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg* 2012; 28 (1): 49-55. doi: 10.5146/tjpath.2012.01097.