

## بررسی ایمونوهیستوشیمیایی آنتی ژن Ki-67 و پروتئین‌های MCM3 و p 27 در ادنتوزنیک کراتوسیست

دکتر فاطمه شاهسوار<sup>۱</sup> - دکتر سهیل جنتی عطایی<sup>۲</sup> - دکتر آبتین حیدرزاده<sup>۳</sup>

۱- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان و دانشگاه

آزاد اسلامی تهران

۲- دندانپزشک

۳- دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان

### چکیده

**زمینه و هدف:** ادنتوزنیک کراتوسیست درمان وسیعی نیاز داشته و همیشه مورد توجه محققان بوده تا رفتار بیولوژیک آن را بهتر بشناسند. *Minichromosome maintenance3 overexpression* در سرطانهای مختلف انسانی گزارش شده است. هدف از این مطالعه بررسی *Expression MCM3* در OKC و مقایسه آن با Ki-67 و p27 می‌باشد. روش بررسی: در این مطالعه تحلیلی ۲۳ مورد OKC از آرشیو آزمایشگاه رازی توسط دو پاتولوژیست مورد بازبینی قرار گرفتند. اطلاعات بالینی - آسیب شناختی از پرونده آنها استخراج شده و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به روش استاندارد Streptavidin-biotin peroxidase برای نشانگرهای Ki-67، p27 و MCM3 در آنها انجام شد. سلول‌های رنگ گرفته در 10HPF شمارش شده و Labeling Index محاسبه و نهایتاً سطوح رنگ‌پذیری به چهار گروه طبقه‌بندی شدند. محاسبات آماری با آزمون رگرسیون رتبه‌ای انجام شد. یافته‌ها: رنگ‌پذیری Ki-67 بیشتر در سلول‌های لایه سوپرا بازال و بازال اما p27 بیشتر در لایه‌های بالا دیده شد. هیچ یک از نمونه‌ها با MCM3 رنگ نگرفت. بین سن، محل ضایعه و اندازه کیست با نشانگرها همبستگی معنی‌داری یافت نشد. نتیجه‌گیری: اکثر ادنتوزنیک کراتوسیست‌ها p27 و Ki-67 را ضعیف بیان کردند. احتمالاً MCM3 در روند پاتوژنز این کیست نقشی ندارد.

**کلید واژه‌ها:** ایمونوهیستوشیمی - کیست ادنتوزنیک - نشانگرهای بیولوژیک - Ki-67, p27, MCM3

پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۲

اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۸/۶

وصول مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۰

**نویسنده مسئول:** دکتر فاطمه شاهسوار، گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان و دانشگاه آزاد اسلامی تهران  
e.mail:shaahsavari@gums.ac.ir

### مقدمه

مؤثر است بلکه می‌تواند در امر تشخیص این ضایعات نیز مفید واقع شود. به کمک IHC می‌توان پروتئین‌های مؤثر در چرخه سلولی را مورد بررسی قرار داد. از بین این پروتئین‌ها p 27 عضوی از خانواده مهارکننده یونیورسال CDK است که در سال ۱۹۹۴ به عنوان یک عضو جدید از این خانواده معرفی شد. p 27 مانع عبور سلول از فاز G<sub>1</sub> به S می‌شود. در مورد p 27 Expression تحقیقات زیادی صورت گرفته است و در اکثر مطالعات کاهش آن در تومورهای بدخیم گزارش شده (۱-۲) و حضور آن نشان دهنده تمایز سلولی بوده و در افتراق تومورهای خوش خیم و بدخیمی که نمای

رفتار بیولوژیک هر ضایعه عامل مهمی در تعیین متنی آن ضایعه و روش درمان است. در همین ارتباط به علت وجود محدودیتهای فراوان در شناخت دقیق رفتار بیولوژیک هر ضایعه نه می‌توان متنی ضایعه را پیش‌بینی کرد و نه به درمان دقیق و اختصاصی برای آن ضایعه پرداخت. پیشرفتهایی اخیراً در علم زیست‌شناسی سلولی و مولکولی شده است، در همین راستا دانشمندان در پی بررسی ریز مولکولی در ضایعات مختلف و نهایتاً به دنبال درمان خاص برای آن ضایعه می‌باشند. جالب است که ماحصل این مطالعات نه تنها در امر درمان

میکروسکوپی مشابهی دارند می تواند کمک کننده باشد. (۳)

یکی دیگر از مارکرهايي که اخیراً توسط محققان در زمینه بیولوژی سرطانها مطرح شده است Minichromosome maintenance 3 می باشد که عامل اساسی در شروع رپلیکاسیون DNA بوده (۴) و Over expression آن در سرطانهای مختلف انسانی مانند لوکمی، لنفوما، کارسینومای گردن رحم، کولون، ریه، معده، کلیه، پستان و ملانوم بدخیم گزارش شده است. (۵)، یکی دیگر از شناخته شده ترین پروتئین های مرتبط با چرخه سلولی که در هیستوپاتولوژی تشخیصی استفاده می شود Ki-67 است که در سلول های تکثیر شده ظاهر می شود اما زمانی که سلول وارد حالت استراحت می گردد به سرعت ناپدید می شود. از این خصوصیت به صورت گسترده در آسیب شناسی و تحقیقاتی سرطان به منظور برآورد و تعیین تقسیم رشدی در یک جمعیت سلولی استفاده می شود. مطالعات کلینیکی این آنتی ژن را به عنوان یک نشانگر پروگنوستیک مستقل در بسیاری از نئوپلاسم های مختلف انسانی نشان داده اند. (۶)

Ki-67 و MCM 3 در سلول های در حال تکثیر Express می شوند ولی Down- regulation این پروتئین دیرتر از Ki-67 صورت می گیرد و مثبت شدن آن در سلولی که Ki-67 آن منفی شده نشانه آن است که سلول وارد مرحله استراحت شده است که می تواند دوباره وارد چرخه سلولی شده، Ki-67 آن مثبت شود و یا تمایز یافته p 27 آن مثبت گردد. از طرفی بررسی همزمان Ki-67 و p27 می تواند در تعیین رفتار ضایعات کمک کننده باشد درحالی که بررسی یک عامل به تنهایی می تواند گمراه کننده باشد، مثلاً در مدولای آدرنال نرمال درصد رنگ پذیری برای Ki-67 مشابه نوروبلاستوما است درحالی که تفاوت عمده ای در درصد رنگ پذیری p27 در آنها دیده می شود. پس بررسی هم زمان این پروتئین ها می تواند ارزش تشخیصی و درمانی هم داشته باشد. (۷-۸)، کیست های ادنتوژنیک ضایعات نسبتاً نادری بوده و اغلب آنها به سادگی درمان شده و عود نمی کنند بجز ادنتوژنیک کراتوسیست (OKC) که درمان وسیعتری نیاز داشته و برخی آن را جز

ضایعات تومورال می شناسند و احتمال عود آنها بیشتر است. مطالعه ای در سال ۱۳۷۷ نشان می دهد که OKC ۳۸٪ کل کیست های رشدی نمودی را در بافت ادنتوژنیک شامل می شود. میزان شیوع ذکر شده برای OKC قابل توجه بوده و استفاده از روشهای تشخیصی کمکی امری ضروری به نظر می رسد. (۹)

با توجه به بررسیهای انجام شده با استفاده از منابع موجود مطالعه ای در مورد Expression MCM3 بر روی OKC صورت نگرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی ایمونوهیستوشیمیایی ژن Ki-67 و پروتئین های MCM3 و p 27 در ادنتوژنیک کراتوسیست ها می باشد.

### روش بررسی

در این مطالعه تحلیلی پرونده بیماران مبتلا به OKC از سال ۱۳۷۹-۱۳۸۶ از آرشیو آسیب شناسی آزمایشگاه رازی رشت مورد مطالعه قرار گرفت و از میان ۵۹ عدد OKC تعداد ۲۳ عدد بلوک پارافینه جهت IHC که شامل شرایط زیر بودند انتخاب شدند.

۱- طبق تعریف Neville و همکاران خصوصیات میکروسکوپی OKC را داشته باشند.

۲- ضایعه به طور کامل خارج شده باشد.

۳- نمونه های مشکوک از نظر تشخیص، نمونه های با Fixation نامناسب و نمونه های در ارتباط با سندرم گورلین از مطالعه خارج شدند. در کیست های واجد التهاب شمارش در قسمتهای کم التهاب یا فاقد التهاب صورت گرفت.

اطلاعات مربوط شامل سن، جنس، محل و اندازه از پرونده بیماران استخراج گردید. بلوک های پارافینه و اسلایدهای H&E همه بیماران مجدداً مورد بررسی قرار گرفتند.

در این بررسی ۲۳ نمونه از بلوک های پارافینه انتخاب شدند. مطالعه ایمونوهیستوشیمی نمونه های مذکور به روش استاندارد Streptavidin-biotin peroxidase، با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال MCM3 (Dako Denmark)، آنتی بادی مونوکلونال p27<sup>kip1</sup> (Dako Denmark) و آنتی بادی مونوکلونال Ki-67 Antigen (Dako Denmark) انجام گرفت.

چهار درجه High یا شدید ( $LI > 50$ )، Moderate یا متوسط ( $25 < LI < 50$ )، Low یا ضعیف ( $LI < 5$ ) و Negative یا منفی ( $LI < 5$ ) تقسیم شدند. با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ و آزمون آماری رگرسیون رتبه‌ای تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت.

#### یافته‌ها

از ۲۳ نمونه هفت بیمار مرد معادل  $30/4\%$  و ۱۶ بیمار زن برابر  $69/4\%$  بودند. طیف سنی بیماران از ۱۰-۷۵ بود. (متوسط سنی  $30/08$  بود). ۱۹ مورد از نمونه‌ها در فک پایین برابر  $82/6\%$  و چهار مورد در فک بالا معادل  $17/4\%$  قرار داشتند. تمام نمونه‌ها از نظر میکروسکوپی منطبق بر معیارهای ذکر شده بودند. اپیتلیوم جدار کیست نازک و نمای Palisading در لایه بازال و همچنین نمای چین خورده در سلول‌های سطحی (لایه پاراکراتوز) مشاهده شدند. جدار کیست در برخی نمونه‌ها آماس ناچیز و در برخی نمونه‌ها التهاب بیشتری را نشان داد. در یک مورد کیست‌های اقماری در جدار کیست دیده شد.

از نظر رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای مارکر Ki-67 هشت مورد برابر  $34/8\%$  منفی ۱۳ مورد معادل  $56/5\%$  ضعیف یک مورد برابر  $3/4\%$  متوسط و یک مورد معادل  $4/3\%$  رنگ‌پذیری شدیدی را نشان دادند. رنگ‌پذیری بیشتر در سلول‌های لایه سوپرا بازال و بازال مشاهده شد. (شکل ۱، نمودار ۱)

از نظر رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای پروتئین p27 هفت مورد برابر  $30/4\%$  از نمونه‌ها منفی، ۱۲ مورد معادل  $52/2\%$  ضعیف، یک مورد معادل  $3/4\%$  متوسط و سه مورد برابر  $13\%$  نمونه‌ها رنگ‌پذیری شدید را نشان دادند. رنگ‌پذیری بیشتر در سلول‌های لایه‌های بالا دیده شد. (شکل ۲، نمودار ۲)

از نظر رنگ‌آمیزی IHC نمونه‌ها جهت پروتئین MCM3 ۲۳ مورد  $100\%$  نمونه‌ها رنگ‌پذیری منفی را نشان دادند. (شکل ۳، نمودار ۳)

هیچ‌یک از نمونه‌ها با MCM3 رنگ‌پذیرفت در حالی که نمونه‌های OKC با p27 و Ki-67 رنگ گرفتند. ارتباط بین سن، اندازه (بزرگترین بُعد بر حسب

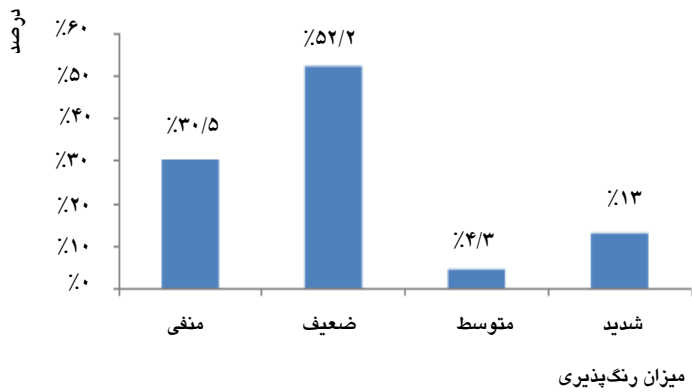
تکنیک رنگ‌آمیزی IHC برای نمونه‌ها به صورت زیر انجام شد:

- ۱- تهیه برش سه میکرونی از بلوک‌ها
- ۲- قرار دادن لام‌ها در فور  $74$  درجه سانتی‌گراد (پنجاه دقیقه برای پارافین زدایی)
- ۳- قرار دادن لام‌ها در دو ظرف گزیلول (پنج دقیقه) و دو ظرف الکل مطلق (پنج دقیقه) و دو ظرف الکل  $96\%$  (دو دقیقه).
- ۴- Antigen retrieval: قرار دادن لام‌ها را در داخل بافرسیترات (Citrate/ Hcl Buffer 10 mmol) با  $PH = 6.0$  برده به مدت یک ساعت در بن ماری جوش. (در محلول/ HCL Buffer Tris با  $PH = 9.0$  به مدت ده دقیقه در اتوکلاو)
- ۵- قرار دادن لام‌ها داخل بافر فسفات و سپس آب اکسیژنه  $3\%$  به مدت ده دقیقه.
- ۶- شستشوی مجدد با PBS.
- ۷- پرایمری آنتی بادی‌ها به مدت شصت دقیقه روی لام‌ها ریخته شد. (غلظت آنتی‌بادی، MCM3 و p27  $1:50$  بود و آنتی‌بادی Ki-67 از قبل آماده شده بود [ Ready to use ])

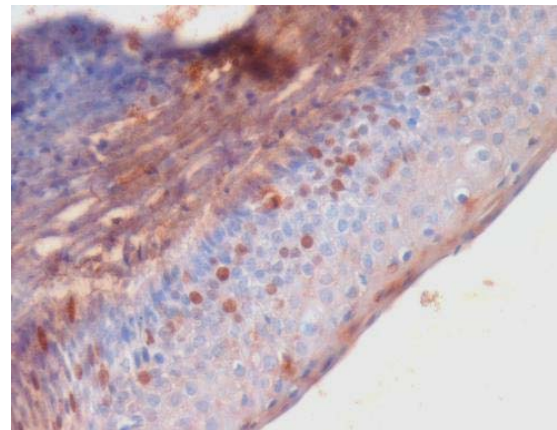
- ۸- قرار دادن لام‌ها در PBS و سپس به مدت یک ساعت در محلول Envision+ Dual link system peroxidase
- ۹- شستشوی لام‌ها در بافر فسفات.
- ۱۰- قرار دادن لام‌ها در ( 3,3 Diamino Benziedine )
- ۱۱- شستشو با آب مقطر
- ۱۲- قرار دادن لام‌ها داخل هماتوکسیلین.

- ۱۳- مراحل آب‌گیری ( بردن در الکل)
- ۱۴- قراردادن لام‌ها با چسب مخصوص IHC

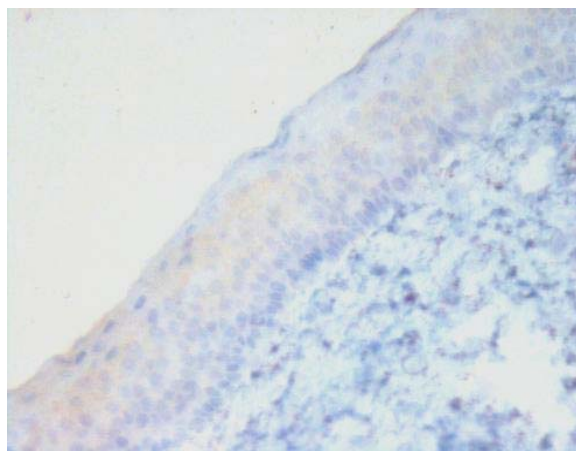
توجه: در هر دور انجام IHC کنترل مثبت (نمونه tonsil برای p27 و MCM3 و نمونه کارسینوم پستان برای Ki-67) و کنترل منفی (حذف primary antibody) به کار برده شدند. هسته سلول‌های رنگ گرفته با آنتی‌بادی‌ها-هسته‌های قهوه‌ای شده مثبت در نظر گرفته شدند. تعداد سلول‌های رنگ‌گرفته توسط p27, T ki67T و MCM3 در هزار سلول شمرده شده و بر اساس درصد سلول‌های رنگ گرفته (Labeling Index : LI) به



نمودار ۲: توزیع فراوانی سطوح رنگ‌پذیری p 27 در نمونه‌های OKC



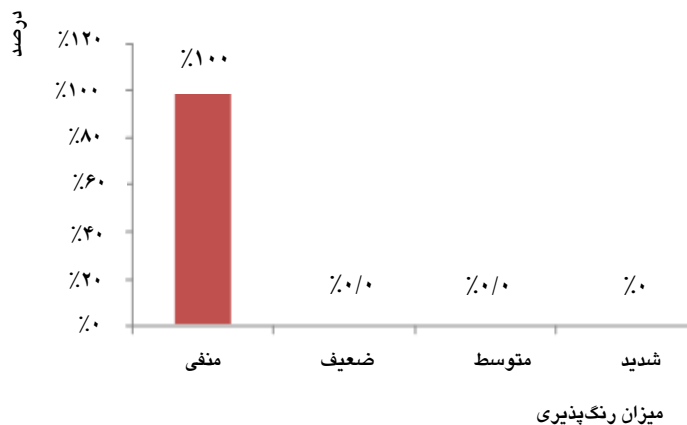
شکل ۱: رنگ‌آمیزی Ki-67 به روش IHC در OKC. ×۴۰۰: به رنگ قهوه‌ای هسته‌ها که عمدتاً در لایه سوپرابازال دیده می‌شود توجه نمایید.



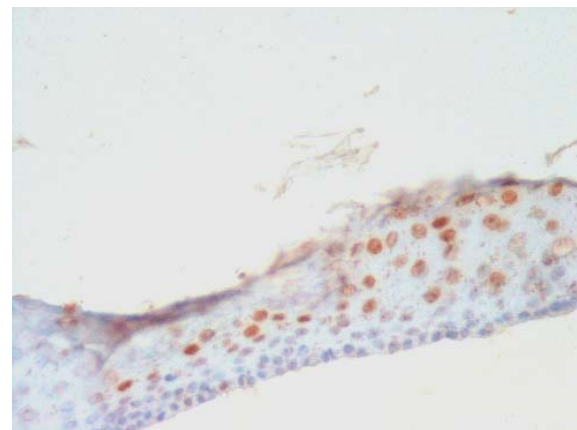
شکل ۳: رنگ‌آمیزی MCM3 به روش IHC در OKC. ×۴۰۰ عدم رنگ‌پذیری هسته‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار ۱: توزیع فراوانی سطوح رنگ‌پذیری Ki-67 در نمونه‌های OKC



نمودار ۳: توزیع فراوانی سطوح رنگ‌پذیری MCM3 در نمونه‌های OKC



شکل ۲: رنگ‌آمیزی p 27 به روش IHC در OKC. ×۴۰۰: به رنگ قهوه‌ای هسته‌ها که عمدتاً در لایه‌های بالایی دیده می‌شود توجه نمایید.

بیان دیگر کاهش p 27 در کارسینومای اندومتر دیده می‌شود اما در اندومتر تحریک شده (Hyperstimulated) و بافت ترشخی نرمال (مرحله ترشخی اندومتر) دیده نمی‌شود. (۱۴)

بیشترین مارکر پرولیفراسیون که در مقالات استفاده شده‌اند PCNA و Ki-67 است. Ki-67 expression به طور خاص جهت تشخیص سرطانها مانند سرطان سینه استفاده می‌شود و در پیش‌بینی کردن پیشرفت بیوشیمیایی سرطان پروستات پس از خارج کردن کامل پروستات نیز می‌تواند مفید و کمک کننده باشد (۱۵-۱۶). بیان همزمان Ki-67 با P53 به عنوان یک عامل پروگنوستیک در اسکواموس سل کارسینوما (SCC) و تومورهای استرومال معدی-رودهای بیان شده است. (۱۷-۱۸). بر خلاف مفید بودن این مارکر هنوز فانکشن دقیق Ki-67 شناخته شده نیست، اگرچه مقالات پیشنهاد می‌کنند که احتمالاً این آنتی‌ژن به جای ارتباط مستقیم با چرخه سلولی در بیوسنتز ریبوزوم در حین پرولیفراسیون سلولی مورد نیاز است. (۱۹)

پروتئین‌های MCM3 عوامل اساسی برای شروع رپلیکاسیون هستند که ابتدا تحت عنوان پروتئین‌های مورد نیاز برای MCM در *Saccaromyces cerevisiae* شناسایی شدند. کلاس‌های مشابهی از این پروتئین در *Xenopus*, *Murine* و سلول‌های انسانی نیز یافت شده‌اند. در انتقال مرحله G1 به S رپلیکاسیون DNA کینازهای وابسته به سایکلین مرحله s و Cdc7 آغاز می‌شود. این پروتئین‌ها آهسته از کروماتین جدا شده و مرحله s جلو می‌رود. این جداسدن سبب می‌شود که رپلیکاسیون تنها یک بار در چرخه سلولی رخ دهد. این پروتئین‌ها در طول چرخه سلولی باقی مانده و بعد از ورود سلول به G0 (استراحت) یا مرحله تمایز نهایی در بافت از بین می‌رود. (۲۰-۲۲). پس مطالعه همزمان این مارکرها می‌تواند کمک کننده باشد.

نتایج مطالعه حاصل نشان داد که بین Expression این سه پروتئین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. رنگ‌آمیزی IHC نشان داد که Ki-67 و p27 در اپیتلیوم جدار کیست مثبت شدند، اما MCM3 در هیچ یک از نمونه‌ها رنگ نگرفت. در مورد MCM3 با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که این پروتئین در روند ایجاد OKC

سانتی‌متر) و محل ضایعه با شدت رنگ‌پذیری Ki-67، p27 و MCM3 توسط رگرسیون رتبه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند و از نظر آماری همبستگی معنی‌داری بین سن، اندازه (بزرگترین بُعد بر حسب سانتی‌متر) و محل ضایعه با هیچ یک از مارکرها یافت نشد.

## بحث

اندوتوزنیک کراتوسیست به دلیل رفتار مهاجم، عودهای مکرر و ویژگیهای بیولوژیکی خاص خود همواره هدف مطالعات بسیاری از محققان بوده است. از گذشته تا امروز مطالعات مختلفی در بررسی توان رشدی اندوتوزنیک کراتوسیست انجام شده و عوامل بسیاری را در این مسئله دخیل دانسته‌اند.

Gerdes و همکارانش نشان دادند اگر چه بروز PCNA با مرحله سنتز (S) چرخه سلولی ارتباط دارد اما این امر الزاماً به آن معنی نیست که با چرخه سلولی در ارتباط تنگاتنگ باشد. به طور مثال بیان PCNA در روند ترمیم DNA نیز دیده شده است. در هر حال شاخص اختصاصی تکثیر سلولی که به میزان فراوان در مرحله S چرخه سلولی بارز شده و سریعاً بعد از پایان میتوز از بین می‌رود، آنتی‌ژن Ki-67 است که جهت نمایش میزان تکثیر سلولی در مطالعات ایمونوهیستوشیمی ارجح بوده و معیاری قابل اعتماد می‌باشد. (۱۰)

تا به حال مطالعات زیادی در مورد اهمیت پیش آگهی دهنده و تشخیصی p 27 را ضایعات مختلف صورت گرفته است. تقریباً تمام مطالعات کاهش p 27 را در تومورهای پیشرفته‌تر گزارش کرده‌اند یا به عبارت دیگر p 27 را عمدتاً در تومورهایی که تمایز بهتری دارند یافته‌اند. (۱۱)، بسیاری از مطالعات استفاده از p 27 به عنوان نشانگر تشخیصی و پیش‌بینی‌کننده اثبات کرده‌اند. در بیشتر مطالعات داده‌های بالینی آسیب شناختی نیز مورد مطالعه قرار گرفته و اثر پیش‌بینی کننده p 27 در مورد بقا مورد مطالعه واقع شده است و نتایج نسبتاً مشابهی در تومورهای مختلف ارائه شده است. (۱۲-۱۳)، در کارسینومای اندومتر و فاز پرولیفراتیو اندومتر در مقایسه با بافت اندومتر نرمال در مرحله ترشخی زمانی که Ki-67 و Skp2 زیادتر بیان می‌شوند p27 به طور معناداری کمتر بیان می‌گردد. به

کیست‌های مورد بررسی هم p27 و هم Ki-67 به صورت ضعیف بیان شده‌اند (به ترتیب ۵۲/۲٪ و ۵۶/۶٪) و این که کیست‌ها اسپورادیک بوده‌اند (همراه با سندرم نبوده‌اند) و عود هم نبوده‌اند شاید بتوان نتیجه گرفت که ضایعات ما رفتار بیولوژیک تهاجمی نخواهند داشت. البته اثبات این موضوع نیاز به پیگیری این بیماران در بالین و یا بررسی نشانگرهای بیشتری دارد که انجام آن برای محققان امکان پذیر نبوده است. با توجه به یافته‌های به تنهایی نمی‌توان رفتار بیولوژیک این کیست‌ها را دقیقاً پیش‌بینی کرد زیرا بیان ضعیف Ki-67 به معنای کاهش تکثیر در این کیست‌ها بوده و در مقابل بیان ضعیف p27 بدان معنی است که این ضایعات توانایی تکثیر بالایی دارند اما با توجه به مطالعات قبلی که این مارکرها را پروگنوستیک اعلام کرده‌اند، در مواردی که نیاز به پیش‌بینی رفتار بالینی داریم شاید بتوان توصیه کرد که OKC‌ها را از نظر این دو مارکر مورد بررسی قرار دهند و برای درک بیشتر رفتار تهاجمی این کیست‌ها بهتر است به دنبال عوامل دیگر پروگنوستیک نیز بود. منفی شدن تمام نمونه از نظر رنگ پذیری برای MCM3 نشان داد که احتمالاً این پروتئین در روند پاتورنژ این کیست نقش ندارد.

#### نتیجه‌گیری

اکثر ادنتورژنیک کراتوسیست‌ها در این مطالعه p27 و Ki-67 را ضعیف بیان کردند. منفی شدن تمام نمونه از نظر رنگ پذیری برای MCM3 نشان داد که احتمالاً این پروتئین در روند پاتورنژ این کیست نقش ندارد. پیشنهاد می‌شود پیگیری بیماران پس از استفاده از رنگ آمیزی IHC برای نشانگرهای Ki-67 & p27، استفاده از حجم نمونه بیشتر، استفاده از نشانگرهای دیگر IHC مانند پروتئین‌های دیگر دخیل در چرخه سلولی و نیز استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR و هیبریدیزاسیون درجا صورت گیرد.

#### تقدیر و تشکر

با سپاس فراوان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان که این مطالعه را حمایت مالی کردند. از همکاری صمیمانه استادان و دوستان عزیزم

نقشی نداشته باشد، گرچه نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه از جمله بررسی ژن و مطالعات دقیقتر سلولی مولکولی است در واقع این مطالعه تنها یک تحقیق اولیه در این رابطه بوده و اظهار نظر محکمی در این رابطه نمی‌توان کرد. در مورد Ki-67 Expression مثبت شدن سلول‌ها عمدتاً در لایه‌های سوپرا بازال و کمی در لایه بازال دیده شد که این نتایج مشابه نتایج محققان قبلی است. (۹، ۲۳-۲۵)، علت بیان بیشتر نشانگر Ki-67 در ناحیه پارابازال را می‌توان این طور توجیه کرد که سلول‌های ناحیه پارابازال در مقطعی از چرخه سلولی قرار دارند که میزان بیشتری بروز نشانگر Ki-67 را به دنبال دارد. یک تعبیر دیگر ممکن برای این یافته آن است که سلول‌های لایه بازال بیشتر به صورت Stem Cell‌هایی هستند که چرخه سلولی آهسته داشته و ممکن است یک فاز G1 طولانی داشته باشند.

مطابق مطالعه Kimi (۲۶) نتایج نشان داد که سلول‌های رنگ شده با p 27 عمدتاً در لایه‌های بالائی دیده شدند. همان طور که در مطالعات قبلی این پروتئین بیشتر در تومورهای تمایز یافته‌تر یافت شده بود، در اینجا نیز دیده شدن این پروتئین در لایه‌های بالائی مؤید این مطلب است که سلول‌های طبقات بالاتر تمایز بیشتری را نشان می‌دهند و این همان چیزی است که به نظر می‌رسد در روند طبیعی رشد اپی تلیالی وجود داشته باشد، یعنی سلول‌های طبقات بالاتر تمایز بیشتری از سلول‌های طبقات پایینتر دارند. این مطلب می‌تواند نشان دهنده آن باشد کیست‌هایی که این پروتئین را بیشتر بیان می‌کنند در بالین رفتار کمتر تهاجمی دارند. البته این مطلب باید در کنار میزان Ki-67 Expression بررسی شود. زیرا نتایج این دو در کنار هم می‌تواند کمک کننده‌تر باشد. در این مطالعه به علت محدودیتهای موجود رفتار بالینی و عود بعدی ضایعات مورد بررسی قرار نگرفته است.

در مطالعه حاضر ارتباطی بین Expression این پروتئین‌ها با سن و اندازه ضایعه دیده نشد. ممکن است با افزایش حجم نمونه نتایج متفاوتی یافت. برخی مطالعات در ضایعات تومورال بین افزایش اندازه تومور و بیان p27 و Ki-67 ارتباط یافته‌اند. (۳ و ۱۵) با کنار هم قرار دادن یافته‌های این مطالعه که در اکثر

تشکر راداریم. در آخر لازم می دانیم از تمامی عزیزانی که مارا در این مطالعه همراهی و یاری کردند و نام آنها آورده نشده تشکر نماییم. بی شک بدون یاری این عزیزان انجام این مطالعه بسی مشکلتر یا غیرممکن بود.

جناب آقایان دکتر صبا هدی و محمود حبیب زاده و سرکارخانم دکتر زهره ملکی در آزمایشگاه رازی رشت که در set up آنتی بادیها و تمامی مراحل ما را بسیار یاری کردند و سرکارخانم زهره هادی پور کارشناس محترم که رنگ آمیزی نمونهها را انجام دادند کمال

## REFERENCES

1. Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, et al. P27 (kip1), A multifunctional cyclin\_ dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol.* 1999 Feb; 154(2):313-323.
2. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung Decreased levels of the cell- cycle inhibitor p27 kip1 YC, et al. protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med.* 1997 Feb; 3(2):227-30.
3. Shahsavari F, Eslami M, Baghaie F, Tirgari F, Motahary P. Immunohistochemical evaluation of p27 (kip1) in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2005 Oct-Dec; 6(4):527-30.
4. Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:649-86.
5. Ha SA, Shin SM, Namkoong H, Lee H, Cho GW, Hur SY, et al. Cancer-associated expression of minichromosome maintenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec;10(24):8386-95.
6. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar; 182 (3): 311-22.
7. Schories B, Engel K, Dorken B, Gossen M, Bommert K. Characterization of apoptosis-induced Mcm3 and Cdc6 cleavage reveals a proapoptotic effect for one Mcm3 fragment. *Cell Death Differ.* 2004 Aug;11(8):940-2.
8. Endl E, Kausch I, Baack M, Knippers R, Gerdes J, Scholzen. The expression of ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J Pathol.* 2001 Nov;195(4):457-62.
9. Baghaie F, Eslami M, Sadri D. [Evaluation of ki-67 antigen and p53 protein in orthokeratinized cysts and odontogenic keratocysts]. *J Dent Teh Univ.* 2004 Summer; 1(2):53-6.(Persian)
10. Kolár Z, Geierová M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrdý P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocyst. *J Oral Pathol Med.* 2006 Feb; 35(2):75-80.
11. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990 Jun; 1(3):199-206.
12. Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, et al. The cell cycle inhibitor P27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 1997Apr; 57(7):1259-63.
13. Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, and Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N, et al. Localization and expression of P27(kip1) in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998 Jan;58(1):114-22.

14. Lahav-Baratz S, Ben-Izhak O, Sabo E, Ben-Eliezer S, Lavie O, Ishai D, et al. Decreased level of the cell cycle regulator p27 and increased level of its ubiquitin ligase Skp2 in endometrial carcinoma but not in normal secretory or in hyperstimulated endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2004Aug;10(8):567-72.
15. Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, et al. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Aug;78(4):460-5.
16. Ojea Calvo A, Mosteiro Cerviño MJ, Domínguez Freire F, Alonso Rodrigo A, Rodríguez Iglesias B, Benavente Delgado J, et al. The usefulness of Ki67 expression in the biopsy specimens, to predict the biochemical progression of the prostate cancer after radical prostatectomy. *Actas Urol Esp.* 2004 Oct;28(9):650-60.
17. Motta Rda R, Zettler CG, Cambuzzi E, Jotz GP, Berni RB. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009Jul-Aug;75(4):544-9.
18. Neves LR, Oshima CT, Artigiani-Neto R, Yanaguibashi G, Lourenço LG, Forones NM. Ki67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors--GIST. *Arq Gastroenterol.* 2009 Apr-Jun;46(2):116-20.
19. MacCallum DE, Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol.* 2000 Apr;190(5):537-44.
20. Tye BK. Minichromosome maintenance as a genetic assay for defects in DNA replication. *Methods.* 1999 Jul; 18(3):329-34.
21. Bell SP, Dutta A. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1997; 13:293-332.
22. Kearsley SE, Labib K. MCM proteins Evolution, properties and role in DNA replication. *Biochem Biophys Acta.* 1998 June; 1398(2):113-36.
23. Li T, Brawne RM, Mathewse JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: immunocytochemical study of Ki-67 in simple, recurrent and basal cell naevuse syndrome (BCNS) associated lesions. *J Oral Pathol Med.* 1995 May; 24(5):221-6.
24. Ananthanarayanan V, Deaton RJ, Yang XJ, Pins MR, Gann PH. Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. *BMC Cancer.* 2006 Mar; 17(6):73.
25. de Paula AM, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocysts: Effect of inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2000 Nov; 29(10):477-82.
26. 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.