بررسی ایمونوهیستوشیمیایی نشانگرهای p1 و cyclin D1 در آملوبلاستومای فکین

دکتر مریم خلیلی†*- دکتر محمد اسلامی- دکتر پوپک معصومی*****

*استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

**استاد گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

***متخصص آسیب شناسی دهان و فک و صورت

Title: Immunohistochemical evaluation of p21 and cyclin D1 expression in ameloblastoma of the jaws

Authors: Khalili M. Assistant Professor*, Eslami M. Professor*, Masoumi P. Oral Pathologist

Address:*Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Medical Sciences/ University of Tehran

Background and Aim: The cell cycle is an important event in tumor growth and differentiation and several molecules are involved in this process. The aim of this study was to evaluate the expression of cyclin D1 (a cell cycle inducer) and p21 (a cell cycle inhibitor) in ameloblastoma of the jaws.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 40 cases of ameloblastoma were selected from the archive of oral pathology department. 3 micron sections were cut from paraffin blocks and immunohistochemically stained with antibody against cyclin D1 and $p21^{waf}$. Stained cells were counted using an eyepiece graticule and labeling index was calculated. Data were analyzed by SPSS version 11.5 for windows using Mann-Whitney and Wilcoxon signed ranked tests with $p<0.05$ as the level of significance.

Results: Expression of cyclin D1 protein was detected in nuclei of many tumoral cells. The expression of cyclin D1 in solid and unicystic ameloblastoma and also between its follicular and plexiform variants was not statistically different ($P>0.05$). There was no statistically significant difference in expression of cyclin D1 between peripheral and central cells ($P>0.05$). Expression of p21 protein was detected in nuclei of some tumoral cells. There were no statistically significant differences between p21 expression in unicystic and solid ameloblastoma ($P>0.05$). P21 expression was statistically different between plexiform and follicular variants of ameloblastoma ($P=0.049$). The difference between p21 expression in peripheral cells of plexiform and follicular variants was statistically significant ($P=0.009$). This was not observed in central cells. There was no statistically significant relation between p21 and cyclin D1 expression in ameloblastoma ($P>0.05$).

Conclusion: Based on the results of this study, cyclin D1 expression in ameloblastoma is in high level and it could have an important role in the process of tumorigenesis. P21 expression in ameloblastoma is very faint and its possible effects need further investigation.

Key Words: Cyclin D1; p21; Ameloblastoma; Immunohistochemistry

چکیده

زمینه و هدف: چرخه سلولی از اهمیت بسیاری در رشد و تمایز تومورها برخوردار است و مولکول‌های متعددی در این روند نقش دارند. مطالعه حاضر با هدف تعیین expression $p21^{waf}$ (مهارگر چرخه) و cyclin D1 (محرک چرخه سلولی) در آملوبلاستوما انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی تعداد ۴۰ بلوک پارافینی آملوبلاستوما انتخاب و مقاطع تهیه شده از آنها به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی $p21^{waf}$ و cyclin D1 رنگ‌آمیزی شدند. سپس توسط گراتیکول چشمی فراوانی سلول‌های رنگ گرفته به صورت labeling index تعیین شد. آنالیزهای آماری به صورت ناپارامتری و توسط آزمون من ویتنی و Wilcoxon signed ranked انجام و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: expression cyclin D1 در هسته سلول‌های تومورال به میزان زیاد مشاهده گردید. اختلاف بین میزان expression پروتئین cyclin D1 در

† مؤلف مسؤول: نشانی: تهران- خیابان انقلاب اسلامی- خیابان قدس- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده دندانپزشکی- گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت
تلفن: ۶۶۴۰۲۶۴۰ نشانی الکترونیک: mkhalili@tums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

بین نوع solid و یونی سیستیک و بین دو نوع بافت شناختی آن معنادار نبود. Expression p21 در هسته سلول‌های تومورال و به میزان کم مشاهده شد. اختلاف بین میزان expression پروتـئین p21 در بین نوع solid و یونی سیستیک معنادار نبود. اختلاف بین expression ملکول p21 در بین دو فرم پلکسی فرم و فولیکولار معنادار بود(P=۰/۰۴۹). در بین نوع پلکسی فرم و فولیکولار اختلاف طرح رنگ پذیری در سلول‌های حاشیه‌ای مشاهده شد (P=۰/۰۰۹)، ولی در سلول‌های مرکزی اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین دو نوع solid و یونی سیستیک در طرح رنگ پذیری اختلاف معناداری وجود نداشت. ارتباط بین cyclin d1 و p21 در آملوبلاستوما معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها میزان expression بالای cyclin D1 در آملوبلاستوما را نشان داد که به نظر می‌رسد این پروتئین در تومروژنز آملوبلاستوما نقش داشته باشد. در مورد پروتئین p21 نیز نتایج نشان دهنده expression پایین بود که به نظر می‌رسد مکانیسم‌های دیگری غیر از آن در تومروژنز نقش داشته باشند.

کلیدواژه‌ها: Cyclin D1؛ P21؛ آملوبلاستوما؛ ایمونوهیستوشیمی

وصول: ۸۵/۰۴/۱۷ اصلاح نهایی: ۸۵/۰۹/۰۴ تأیید چاپ: ۸۵/۱۰/۳۰

مقدمه

تومورهای اپی‌تلیایی ادونتوژنیک، شامل اپیتلیوم ادونتوژنیک بدون جزء مزانشیمی می‌باشند. تومورهای متعددی در این دسته قرار می‌گیرند که در این بین آملوبلاستوما شایع‌ترین و مهم‌ترین آنها می‌باشد (۱). نزدیک به یک قرن و نیم است که این تومور شناخته شده است (۲). این تومور با رفتار تهاجمی موضعی و رشد آهسته به عنوان یک تومور خوش خیم خوانده می‌شود (۱). گذر سلول از فازهای مختلف چرخه سلول جهت انجام تقسیم توسط سایکلین‌ها و کینازهای وابسته به سایکلین‌ها (CDKs) و مهارکننده‌های آنها اتفاق می‌افتد. اولین سایکلین ایجاد شده در چرخه سلولی سایکلین‌های نوع D هستند که در نیمه G1 تولید شده و نیمه عمر کوتاهی دارند که در فاز S دیده نمی‌شوند. در ابتدای چرخه این سایکلین‌ها به CDK4 متصل می‌گردند و ایجاد ترکیب cyclin-CDK4 می‌نمایند که نقش اصلی را در فسفوریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما بازی می‌کند (۳).

علاوه بر نقش سایکلین‌ها در چرخه سلولی، مهارکننده‌های چرخه نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. این مهارکننده‌ها با عنوان CDK inhibitors خوانده می‌شوند و دارای دو خانواده اصلی هستند: INK4A/ARF و Cip/Kip.

خانواده Cip/Kip شامل سه عضو می‌باشد: P57kip1، $P21^{waf}1/cip1$ و P27kip1. اعضای این گروه به کمپلکس cyclin-CDK متصل شده و آن را غیرفعال می‌کنند (۳).

Amplification ژن cyclin D1 در بسیاری از نئوپلاسم‌های انسانی از جمله سرطان پستان و سرطان سلول سنگفرشی در ناحیه سر و گردن و لوسمی تأیید شده است (۵،۴). افزایش میزان expression پروتئین cyclin D1 در بسیاری از ضایعات و نئوپلاسم‌های انسانی گزارش شده است (۶-۱۲). میزان بروز $p21^{waf}$ در بسیاری از ضایعات مورد بررسی قرار گرفته و افزایش آن نیز در بسیاری از تومورها مشاهده شده است (۱۳-۱۵).

علاوه بر موارد ذکر شده، مطالعاتی نیز به کاهش یا عدم بروز $p21^{waf}$ در ضایعات پرداخته‌اند. از جمله این مطالعات، کاهش میزان بروز $p21^{waf}$ در verrucous leukoplakia دهان (۱۶) و کاهش میزان بروز در موکواپیدرموئید کارسینومای غدد بزاقی (۱۷) می‌باشد.

در برخی مطالعات بین expression دو پروتئین $p21^{waf}$ و cyclin D1 ارتباط معناداری دیده نشد (۱۸). در حالی که در برخی مطالعات دیگر بر ارتباط این دو با هم تأکید شده است (۱۹).

در مطالعه Kumamoto و همکاران که به بررسی پروتئین‌های دخیل در سیکل سلولی در آملوبلاستوما پرداخته بودند، یافته‌ها نشان دهنده افزایش هر دو ملکول cyclin D1 و $p21^{waf}$ به خصوص در سلول‌های حاشیه‌ای آملوبلاستوما بود. نتایج کلی در مورد دو ملکول cyclin D1 و p21waf نشان داد، احتمالاً $p21^{waf}$ در تمایز نهایی سلول‌های تومورال در املوبلاستوما و cyclin D1 در پرولیفراسیون اولیه سلول‌های تومورال و تحریک تمایز نهایی آنها نقش دارند (۲۰).

در حال حاضر محققین اعتقاد دارند، تغییرات نئوپلاستیک، در پی تجمع چند مرحله‌ای اتفاقات ژنتیکی مضر در سلول است که در بسیاری از تومورهای انسانی در مناطق وسیعی از ژنوم رخ می‌دهند (۲۱). مطالعات متعددی به بررسی تغییرات ژنتیکی و سیتوژنتیکی در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

تومورهای اپیتلیال ادونتوژنیک پرداخته‌اند، اگرچه جزئیات مکانیسم انکوژنز، تمایز سلولی و تهاجم و پیشرفت تومورهای مزبور در هاله‌ای از ابهام قرار دارد. با توجه به این نکته که اصلی‌ترین قدم در رشد و پرولیفراسیون، در بافت‌های نرمال و بافت‌های تومورال، در سلول و چرخه تقسیم آن صورت می‌گیرد، بررسی چرخه سلولی و عوامل مؤثر بر آن در تفهیم انکوژنز تومورها و استفاده از آن در راهکارهای درمانی لازم می‌باشد.

مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان expression پروتئین‌های cyclin D1 و $p21^{waf}$ در آملوبلاستوما و تعیین ارتباط آنها با یکدیگر انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی مقطعی، پرونده ۱۲۱ بیمار مبتلا به آملوبلاستوما از بایگانی بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه تهران از سال ۱۳۴۶-۱۳۸۴ مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت ۴۰ مورد انتخاب شد. اطلاعات درج شده در پرونده بیماران که دارای اطلاعات بالینی شامل سن، جنس و محل ضایعه بود، استخراج شد. از هر بلوک پارافینی ابتدا یک برش تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بر روی آن انجام گرفت. بررسی لام‌ها توسط یکی از اساتید جهت تأیید تشخیص و دارا بودن معیارهای مورد نظر صورت گرفت. سپس نوع بافت شناختی تومورها با استفاده از تعریف Neville (۱) تعیین گردید. در نهایت از بلوک‌ها برش‌های بعدی تهیه و مورد رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفت.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

ایمونوهیستوشیمی با استفاده از روش streptavidin-biotin complex انجام گرفت. ابتدا برش‌های ۳µm از بلوک‌های پارافینی تهیه و روی لام‌های شیشه‌ای پوشیده شده از poly-L-Lysine قرار داده شد. سپس جهت خشک شدن ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در اتوکلاو قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در xylene پارافین‌زدایی و در درجات مختلف الکل اتانول رهیدراته شدند. سپس جهت مهار فعالیت پروکسیداز داخلی نمونه‌ها در متانول حاوی هیدروژن پراکساید ۰/۳٪ برای ۱۵ دقیقه قرار گرفته و با phosphate-buffered saline (PBS) شستشو داده شدند.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای $p21^{waf}$ به این ترتیب بود که نمونه‌ها بنا بر توصیه کارخانه سازنده (DAKO) جهت antigen retrieval در10mmol/L citrate buffer با PH=۹ به مدت ۱۰ دقیقه در مایکروویو قرار داده و پس از سرد شدن در دمای اتاق، با PBS شستشو شدند. نمونه‌ها با mouse antihuman monoclonal antibody (cloneSX118 ,diluted:1/50 ,DAKO) به مدت یک ساعت انکوبه شده و با PBS شستشو داده شدند و با آنتی بادی‌های biotinylated به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گشته و مجددا با PBS شستشو داده شدند. سپس با ماده رنگزای 3,3Diamino Benzidine Hydrochloride (DAB) مجاورت داده شدند.

در مورد رنگ‌آمیزی cyclin D1، نمونه‌ها در سیترات بافر M ۰/۰۱با pH=۶ در درون دیگ زودپز برای یک دقیقه قرار گرفت. سپس بلافاصله در داخل آب روان قرار داده شد و با Tris buffer solution (TBS) دارای pH=۷/۶ برای ۵ دقیقه شستشو داده شد و در سرم نرمال رقیق شده برای ۱۰ دقیقه قرارگرفت. مقاطع با primary mouse monoclonal antibody (clone P2D11F11; prediluted Novocastra , Newcastle upon Tyne, UK) برای یک ساعت انکوبه گردید، سپس در TBS buffer به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد.

پس از آن نمونه‌ها با biotinylated secondary antibody (rabbit anti-mouse biotinylated) انکوبه شده و با TBS buffer، ۵ دقیقه شسته شده و باstreptavidin/peroxidase complex انکوبه گردید، سپس با TBS buffer برای ۵ دقیقه شسته شده و با DAB انکوبه شدند. پس از این عمل در آب روان شسته شده و با هماتوکسیلین Harris به عنوان counterstain رنگ و دهیدراته شده ولامل بر روی آنها قرار گرفت. از رنگ‌آمیزی فاقد آنتی بادی اولیه و مجاورسازی با non-immune mouse serum به عنوان کنترل منفی و از بافت لوزه انسان به عنوان کنترل مثبت $p21^{waf}$ استفاده شد. در نمونه کنترل مثبت لنفوسیت‌های رنگ گرفته به رنگ قهوه‌ای دیده شد. از بافت تومور سینه به عنوان کنترل مثبتcyclin D1 استفاده شد. در این نمونه هسته کلیه سلول‌های تومورال به صورت واضح رنگ قهوه‌ای گرفته بودند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

شمارش سلول‌هایی که با $p21^{waf}$ و cyclin D1 واکنش نشان داده بودند، توسط کسی که از مشخصات کلینیکی اطلاعی نداشت، صورت گرفت. شمارش چشمی با استفاده از لنز چشمی مدرج (Eyepiece graticule) به منظور جلوگیری از شمارش مجدد سلول‌ها صورت گرفت. نحوه عمل بدین صورت بود که ابتدا با بزرگنمایی ۴× نواحی که شدت رنگ پذیری بالا داشتند، انتخاب گردید (۲۰،۱۹). سپس در ۱۰ high power field (HPF) و با بزرگنمایی ۴۰۰× سلول‌هایی که رنگ‌پذیری شدید هسته‌ای نشان دادند، شمارش شد (۲۳،۱۶). نتیجه به صورت labeling index (LI) بیان شد. برای تمام نمونه‌ها cut off point تعریف گردید. به این ترتیب که اگر میزان سلول‌های رنگ گرفته در کل نمونه ۵٪ یا کمتر بود، به عنوان منفی (–)، بین ۵–۲۵٪ ضعیف (+)، ۲۵–۵۰٪ متوسط (++) و بالای ۵۰٪ شدید (+++) دسته‌بندی شدند (۲۲). همچنین براساس یافته‌های Kumamoto و همکاران (۲۰) با توجه به محل، یعنی سلول‌های حاشیه‌ای یا مرکزی تومور، میزان expression به صورت کیفی رتبه‌بندی شد. در صورت نبود رنگ‌پذیری (–)، در صورت پراکندگی (scattered) سلول‌های رنگ‌گرفته (+) و در صورت منتشر بودن (diffuse) سلول‌های رنگ‌گرفته (++) به عنوان score در نظر گرفته شد (۲۳). محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS version 11.5 انجام شد. برای مقایسه بین میزان expression نشانگرها در بین انواع بالینی آملوبلاستوما و انواع هیستوپاتولوژیک آن از آزمون من ویتنی و مقایسه بین طرح expression نشانگرها در سلول‌های حاشیه‌ای و مرکزی تومور از آزمون Wilcoxon signed ranked استفاده و در تمامی موارد $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های بالینی

در مجموع تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد ۲۷ مورد (۶۷/۵٪) مرد و ۱۳ مورد (۳۲/۵٪) زن بودند. طیف سنی ۱۴–۹۵ سال با میانگین سنی ۳۸/۷ سال و انحراف معیار۱۷/۷۷ سال بود. ۳۹ مورد در فک پایین (۹۷/۵٪) و ۱ مورد در فک بالا (۲/۵٪) قرار داشتند.

یافته‌های بافت شناختی

یافته‌های بافت شناختی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- یافته‌های بافت شناختی آملوبلاستوما

نوع بالینی / نوع بافت شناختی	یونی‌سیستیک	solid	مجموع
فولیکولار	۴(٪۲۶/۷)	۱۴(٪۵۶)	۱۸(٪۴۵)
پلکسی فرم	۱۱ (٪۷۳/۳)	۱۱(٪۴۴)	۲۲(٪۵۵)
مجموع	۱۵(٪۳۷/۵)	۲۵(٪۶۲/۵)	۴۰

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی

cyclin D1

رنگ‌پذیری در کلیه نمونه‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی بود، ولی از رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی صرف نظر شد (۲۴). در مواردی که رنگ پذیری سیتوپلاسم بر روی هسته همپوشانی داشت، به عنوان رنگ‌پذیری مثبت تلقی شد (۲۰)، ضمن این که فقط هسته‌هایی مثبت در نظر گرفته شد که رنگ‌پذیری واضحی داشتند (۲۳،۱۶) (جدول ۲).

جدول ۲- میزان **expression** نشانگرهای **p21** و **cyclin D1** در انواع بافت شناختی آملوبلاستوما

نشانگر / انواع آملوبلاستوما		**cyclin D1**					**$p21^{waf}$**			
		حداقل*٪	**حداکثر**٪**	**میانگین٪**	**انحراف‌معیار**	**حداقل٪**	**حداکثر٪**	**میانگین٪**	**انحراف معیار**
یونی سیستیک	پلکسی فرم	۰	۷۷/۸۰	۲۶/۹۴	۲۵/۹۴	۰	۱۶/۰	۴/۸۱	۷/۰۷
	فولیکولار	۱۴/۸۰	۳۴/۶۰	۲۰/۷۰	۹/۴۲	۰	۰	۰	۰
solid	پلکسی فرم	۰	۱۰۰	۲۸/۸۴	۲۶/۳۸	۰	۱۶/۰	۴/۰۹	۵/۱۴
	فولیکولار	۰	۴۲/۰	۱۷/۳۴	۱۲/۵۳	۰	۱۰/۱۰	۱/۳۲	۳/۲۹

*– حداقل expression

**– حداکثر expression

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

جدول ۳- میزان **expression** براساس **cut off point** تعریف شده

نشانگر / انواع آملوبلاستوما		**cyclin D1**				**p21^{waf}**			
		≤%۵	%۲۵-۵	%۵۰-۲۵	≥%۵۰	≤%۵	%۲۵-۵	%۵۰-۲۵	≥%۵۰
یونی سیستیک	پلکسی فرم	(٪۲۷/۲)۳	(٪۳۶/۴)۴	(٪۱۸/۲)۲	(٪۱۸/۲)۲	(٪۶۳/۶)۷	(٪۳۶/۴)۴	–	–
	فولیکولار	–	(٪۷۵)۳	(٪۲۵)۱	–	(٪۱۰۰)۴	۰	–	–
solid	پلکسی فرم	(٪۱۸/۲)۲	(٪۳۶/۴)۴	(٪۳۶/۴)۴	(٪۹/۱)۱	(٪۶۳/۶)۷	(٪۳۶/۴)۴	–	–
	فولیکولار	(٪۲۸/۶)۴	(٪۵۰)۷	(٪۲۱/۴)۳	–	(٪۸۵/۷)۱۲	(٪۱۴/۳)۲	–	–

جدول شماره ٤- درجه بندی رنگ پذیری سلول‌ها براساس محل

نشانگر / انواع آملوبلاستوما		**cyclin D1**						**p21^{waf}**					
		سلول‌های حاشیه‌ای			**سلول‌های مرکزی**			**سلول‌های حاشیه‌ای**			**سلول‌های مرکزی**		
		−*	+**	++***	−	+	++	−	+	++	−	+	++
یونی سیستیک	پلکسی فرم	(٪۹/۱)۱	(٪۵۴/۵)۶	(٪۳۶/۴)۴	(٪۱۸/۲)۲	(٪۳۶/۴)۴	(٪۴۵/۵)۵	(٪۶۳/۶)۷	(٪۳۶/۴)۴	–	(٪۵۴/۵)۶	(٪۴۵/۵)۵	'
	فولیکولار	–	(٪۲۵)۱	(٪۷۵)۳	–	–	(٪۱۰۰)۴	(٪۱۰۰)۴	–	–	(٪۷۵)۳	(٪۲۵)۱	'
solid	پلکسی فرم	(٪۹/۱)۱	(٪۵۴/۵)۶	(٪۳۶/۴)۴	(٪۱۸/۲)۲	(٪۲۷/۳)۳	(٪۵۴/۵)۶	(٪۷۲/۷)۸	(٪۲۷/۳)۳	–	(٪۴۵/۵)۵	(٪۵۴/۵)۶	'
	فولیکولار	(٪۷/۱)۱	(٪۶۴/۳)۹	(٪۲۸/۶)۴	(٪۱۴/۳)۲	(٪۵۰)۷	(٪۳۵/۷)۵	(٪۱۰۰)۱۴	–	–	(٪۷۱/۴)۱۰	(٪۲۸/۶)۴	'

*– فاقد سلول‌های رنگ شده

**– سلول‌های رنگ گرفته به صورت پراکنده (scattered)

***– سلول‌های رنگ گرفته به صورت منتشر (diffuse)

در قسمت روش تحقیق برای میزان رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال cut off point تعریف شد. به ترتیبی که نمونه‌های رنگ گرفته کمتر از ۵٪ منفی (−)، نمونه‌های رنگ گرفته بین ۵–۲۵٪ (+)، نمونه‌های رنگ گرفته بین ۲۵–۵۰٪ (++) و نمونه‌های رنگ گرفته بالای ۵۰٪ (+++) تلقی شدند (جدول ۳). اختلاف بین میزان expression پروتئین cyclin D1 در بین نوع solid و یونی سیستیک (P=۰/۹۹) و همچنین بین دو نوع بافت شناختی آن (P=۰/۲۷۷) معنادار نبود. در مورد طرح expression ملکول cyclinD1 در سلول‌های حاشیه‌ای و مرکزی آملوبلاستوما نیز توضیح داده شد که براساس طرح رنگ‌پذیری سه score منفی، پراکنده (scattered) و منتشر (diffusse) در نظر گرفته شد (جدول ۴). همچنین در تعداد ۵ نمونه (٪۱۲/۵) آملوبلاستوما میزان رنگ‌پذیری سلول‌های مرکزی کمتر از سلول‌های محیطی بود. در ۷ مورد (٪۱۷/۵) میزان رنگ‌پذیری سلول‌های مرکزی بیشتر از سلول‌های محیطی بود. و در ۲۸ مورد (٪۷۰) میزان رنگ‌پذیری سلول‌های محیطی و مرکزی با هم برابر بود.

p21^{waf}

رنگ‌پذیری در نمونه‌ها در هسته سلول‌ها مشاهده شد (جدول ۲). نتایج cut off point تعریف شده نیز در جدول ۳ آورده شده است.

اختلاف بین میزان expression پروتئین p21^{waf} در بین نوع solid و یونی سیستیک معنی‌دار نبود (P=۰/۸۸۵). میزان expression ملکول p21^{waf} در بین دو فرم پلکسی فرم و فولیکولار معنی‌دار بود (P=۰/۰۴۹). طرح expression ملکول p21^{waf} در سلول‌های حاشیه‌ای و مرکزی آملوبلاستوما در جدول ۴ آورده شده است. در بین نوع پلکسی فرم و فولیکولار اختلاف طرح رنگ‌پذیری در سلول‌های حاشیه‌ای معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۹). ولی در سلول‌های مرکزی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P=۰/۱۵۹). بین دو نوع solid و یونی سیستیک از نظر طرح رنگ‌پذیری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

(p= ۱/۰۰ و P=۰/۲۴۳). همچنین در هیچ یک از نمونه‌های آملوبلاستوما میزان رنگ‌پذیری سلول‌های مرکزی کمتر از سلول‌های محیطی نبود. در ۹ مورد (۲۲/۵٪) میزان رنگ‌پذیری سلول‌های مرکزی بیشتر از سلول‌های محیطی بود. و در ۳۱ مورد (۷۷/۵٪) میزان رنگ‌پذیری سلول‌های محیطی و مرکزی با هم برابر بود.

بحث و نتیجه‌گیری

با وجود مطالعات متعددی که بر روی آملوبلاستوما انجام گرفته و به بررسی نشانگرهای مختلف در این تومور ادونتوژنیک پرداخته شده (۲۲)، به نظر می‌رسد، ملکول‌های چرخه سلولی به دلیل نقش در پرولیفراسیون و رشد تومور از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشند. به صورت یک قانون، رشد یک بافت تحت اثر پیام‌های خارج سلولی، برنامه‌های داخل سلولی و عوامل تنظیم کننده این دو می‌باشد. این موضوع در مورد بافت‌های تومورال هم صادق است (۳). اختلالات ژنتیکی در حوزه‌های تنظیم کننده که در هدایت سلول از فاز G1 عمل می‌کنند به صورت مکرر در سرطان‌های انسانی رخ می‌دهد و افزایش expression پروتئین cyclin D1 یکی از شایع‌ترین تغییراتی است که مشاهده می‌شود (۳). افزایش میزان expression پروتئین cyclin D1 باعث کوتاه شدن فاز G1 می‌شود و به هم خوردن تنظیم expression این ملکول در مراحل اولیه سیکل سلولی اتفاقی است که در حین تومورزدایی در ناحیه سر وگردن رخ می‌دهد (۲۴). بنابراین دور از ذهن نخواهد بود، اگر این پروتئین به عنوان عاملی جهت تومورزدایی در آملوبلاستوما مورد بررسی قرار گیرد.

در این مطالعه بروز cyclin D1 در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های تومورال مشاهده شد، ولی از رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی صرف نظر گردید، چون این پروتئین یک پروتئین هسته‌ای است و در هسته express می‌شود (۵-۱۲). در برخی مطالعات نیز به بروز این پروتئین در سیتوپلاسم اشاره شده است (۲۴). شاید اختلاف به وجود آمده به علت استفاده از کلون‌های متفاوت استفاده شده در کارخانه‌های سازنده باشد، هر چند در دستورالعمل کارخانه سازنده به رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی در نمونه‌های بلوک‌های پارافینی اشاره شده است. در برخی مطالعات کلون استفاده شده کلون DCS 6 مربوط به کارخانه Novacastra (۲۴)، کلون DCS 6 مربوط به کارخانه Dako (۱۸)، NCL CY مربوط به کارخانه Novacastra (۲۶) و در مطالعه Aguilera و همکاران (۲۷) محصول مربوط به کارخانه Westbrook بود. در تمامی این مطالعات از رنگ پذیری سیتوپلاسم صرف نظر شده بود. فقط در یک مطالعه که رنـگ‌آمیزی با دو کلون متفاوت (DCS 6-Dako, P2D11F11-Novacastra) انجام شده بود، رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم هم مد نظر قرار گرفته بود (۲۸).

با یک دید کلی می‌توان گفت که احتمالاً در تمام کلون‌ها این رنگ‌پذیری اتفاق می‌افتد، ولی با توجه به این که ساخته شدن کلیه پروتئین‌ها در سیتوپلاسم رخ می‌دهد، ممکن است این آنتی بادی‌ها به صورت غیراختصاصی توانایی اتصال به پروتئین‌های cyclin D1 غیرفعال سیتوپلاسم را داشته باشند، ولی به دلیل عدم اهمیت آنها در چرخه سلولی در مطالعات از این نوع رنگ‌پذیری صرف نظر می‌شود.

بین نوع پلکسی فرم و فولیکولار از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دیده نشد. این یافته در راستای نتایج به دست آمده توسط Kumamoto و همکاران بود که اختلاف واضحی در expression این پروتئین بین این دو نوع نمای بافتی در آملوبلاستوما دیده نشد. بنا به cut off point تعیین شده تعداد نمونه‌های – و + بیشتر از نمونه‌های ++ و +++ بود که این نتیجه به لحاظ آماری معنی‌دار نبود و البته قضاوت و تفسیر این نتایج به دلیل عدم استفاده از نمونه بافت نرمال مانند tooth germ دشوار است، زیرا در بافت‌های نرمال میزان بروز cyclin D1 نسبت به بافت‌های تومورال کمتر است (۲۵). دلیل عدم استفاده از tooth germ محدودیت‌های اخلاقی بود، زیرا از جنین تهیه می‌گردد. با وجود این، یافته مطالعه حاضر مشابه نتیجه کار انجام شده در ضایعات نئوپلاستیک دهان بود (۷). طرح رنگ‌پذیری سلول‌ها که به صورت منفی، scattered و diffuse بیان شد، هم در سلول‌های حاشیه‌ای و هم در سلول‌های مرکزی، اختلافی بین انواع بالینی و هیستولوژیک آملوبلاستوما نشان نداد. همچنین در تعداد ۵ نمونه آملوبلاستوما میزان رنگ‌پذیری سلول‌های مرکزی کمتر از سلول‌های محیطی بود. در ۷ مورد میزان رنگ‌پذیری سلول‌های مرکزی بیشتر از سلول‌های محیطی بود. و در ۲۸ مورد میزان رنگ‌پذیری سلول‌های محیطی و مرکزی با هم برابر بود. یافته این مطالعه در این مورد بر خلاف یافته Kumamoto و همکاران بود. در این مطالعه اشاره شد که رنگ‌پذیری در اکثر سلول‌های حاشیه‌ای و در تعدادی از سلول‌های

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

مرکزی دیده می‌شود (۲۰). در مطالعه حاضر در بیشتر نمونه‌ها میزان رنگ‌پذیری سلول‌های حاشیه‌ای و مرکزی با هم برابر بود. این موضوع را می‌توان به دو صورت توجیه نمود. با توجه به این که cyclin D1 یک پروتئین سیکل سلولی است که در اوایل سیکل تولید و سپس تجزیه می‌گردد (۳)، بنابراین بروز آن در سلول نشانه فعال بودن سیکل سلولی است. این بدان معنا است که سلول‌های میانی در آملوبلاستوما دارای قابلیت تقسیم بوده و وارد فاز G0 نشده‌اند. هرچند در مطالعات جدید عقیده بر این است که سلول‌های شبه رتیکولوم ستاره‌ای، سلول‌های کاملاً متمایزی می‌باشند (۲۶،۲۴). دوم این که این اختلاف شاید به دلیل این باشد که نمونه‌های این مطالعه به صورت retrospective جمع‌آوری شده است. یعنی از بلوک‌های با تشخیص آملوبلاستوما در بین سالهای ۱۳۴۶-۱۳۸۴ استفاده شده است. شاید نوع فیکساتیو مورد استفاده و مدت زمان فیکساسیون در ایجاد اختلاف اثر گذاشته باشد. همچنین استفاده از آنتی بادی با کلون متفاوت، ممکن است در به دست آوردن نتایج متفاوت تأثیرگذار باشد.

با توجه به این نکته که تمامی تومورها چه خوش خیم و چه بد خیم در اثر رشد کنترل نشده سلول‌ها به وجود می‌آیند، منطقی است که اختلال در عوامل تنظیم کننده رشد سلول از دلایل عمده ایجاد تومورها به شمار آیند. در این بین ملکول‌هایی که باعث مهار رشد می‌شوند، اهمیت ویژه‌ای می‌یابند، چرا که این پروتئین‌ها با مهار سیکل مانع از تکثیر سلول‌های دارای ژنوم معیوب می‌گردند (۳).

در بین این مهار کننده‌ها پروتئین $p21^{waf}$ متعلق به خانواده Cip/Kip بوده و با اتصال به کمپلکس cyclin-CDK آن را مهار می‌کند (۱۶). در این مطالعه $p21^{waf}$ بر روی ۴۰ نمونه آملوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از expression کم این پروتئین در نمونه‌ها بود. کاهش میزان بروز $p21^{waf}$ در ضایعات دیگری نیز دیده شده است (۱۷،۱۶). نتایج این مطالعه در راستای این مطالعات است. این احتمال وجود دارد که عوامل دیگری نیز در چرخه سلولی در آملوبلاستوما مؤثر باشند. از آنجا که اختلال در ژن و پروتئین p53 یکی از شایعترین مشکلات تومورهای انسانی است (۳) و در مسیر فعالیت آن $p21^{waf}$ نقش مهمی بازی می‌کند، ممکن است که بتوان از آن به عنوان عامل کلیدی یاد کرد. در مطالعات انجام شده بر روی ملکول p53 در آملوبلاستوما نشان داده شد که این پروتئین در بافت‌های آملوبلاستومایی افزایش expression دارد (۲۱).

با توجه به این نکته که در چرخه سلولی به دنبال استرس و DNA damage پروتئین p53 بر روی $p21^{waf}$ تأثیر گذاشته و باعث مهار سیکل سلولی و عملکرد سرکوب تومور می‌گردد و با عنایت به این نکته که در اکثر موارد پروتئین p53 قابل بررسی در بافت‌های تومورال، نوع موتاسیون یافته آن است (۳)، به نظر می‌رسد که با افزایش p53 در بافت‌های آملوبلاستومایی به صورت موتاسیون یافته، این پروتئین دیگر کارایی اصلی خود مبنی بر اثر القایی بر $p21^{waf}$ را نداشته باشد و همین امر منجر به بروز کمتر $p21^{waf}$ در بافتهای تومورال می‌گردد. همچنین با توجه به تنظیم $p21^{waf}$ از طرقی غیر از p53 شاید عوامل دیگری باعث مهار expression پروتئین $p21^{waf}$ شوند (۳). بنابراین به نظر می‌رسد، در حین بررسی ملکول $p21^{waf}$ بهتر است که راهکارهای مهار و ایجاد آن نیز مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان مکانیسم‌های مؤثر بر تومورژنز را بهتر درک نمود.

نتیجه کلی این تحقیق نشان دهنده افزایش بروز cyclin D1 در آملوبلاستوما است و به نظر می‌رسد این پروتئین می‌تواند در تومورژنز در آملوبلاستوما نقش داشته باشد. در مورد پروتئین $p21^{waf}$ یافته‌ها نشان داد، میزان آن در آملوبلاستوما کاهش می‌یابد و احتمالاً مکانیسم‌های دیگری غیر از آن در تومورژنز نقش دارند. با توجه به عدم معنی‌دار بودن نتایج با استفاده از LI، شاید استفاده از این روش در تومورهای ادونتوژنیک کاربرد نداشته باشد و استفاده از روش‌های رتبه‌بندی چشمی کفایت نماید.

پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی بر روی $p21^{waf}$، ملکول p53 نیز مورد بررسی قرار گیرد، زیرا اثرات مهارکنندگی p53 از طریق $p21^{waf}$ صورت می‌گیرد. در نهایت این که استفاده تنها از نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی برای بررسی عوامل تومورژنز کافی نبوده و نیاز به بررسی expression mRNA و همچنین DNA و به طور اعم بررسی در سطح ژنتیک و سیتوژنتیک مطرح می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران به شماره ۲۹۳۶ می‌باشد که بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]

منابع:

1- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology. 2nded. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002.p. 611-8.

2- Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RC. Oral Pathology. 4thed. Missouri: Saunders; 2003.p. 267-74.

3- Kumar V, Abbas AK, Faustu N. Pathologic Basis of Disease. 7thed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2005.p. 269-342.

4- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell R. Mini review: Cyclin D1: normal and abnormal function. Endocrinology 2004; 145(12):5439-7.

5- Schafer K. The cell cycle: a review. Vet Pathol 1998; 35: 461-78.

6- Pignataro L, Sambataro D, Pagani D. Clinico-prognostic value of D-type cyclins and p27 in laryngeal cancer patient. Acta Otorhinolaryngol Ital 2005; 25:75-85.

7- Nishikawa T, Hara R, Ito Y, Masuno K. Aberrant expression of histone H3 mRNA, p53, cyclin D1, and cyclin B1 in oral neoplastic epithelial lesions. Acta Histochem Cytochem 2005; 38(1):53-9.

8- Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravati N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alteration of Rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. Oncology 2005; 68: 314-25.

9- Turrati E, Neves A. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. J of Oral Science 2005; 47(2): 71-6.

10- Castle J, Cardinali M, Kratochvil J. P53 and cyclin D1 staining patterns of malignant and premalignant oral lesions in age-dependent populations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 88:326-32.

11- Rawal Y, Prasad M. Expression of G1/S phase modulators of cell cycle cyclin D1, CDK4, and pRb and of proliferation marker Ki67 in mucosal melanoma of the head and neck. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 98(2): 198.

12- Odajima T, Saski Y, Tanaka N. Abnormal β-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki67 labeling index, and clinicopathological features. Human Pathology 2005; 36:234-41.

13- Rau B. Dynamic expression profile of p21 and Ki67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radichemotherapy. J Clin Oncol 2003; 21:3391-401.

14- Bainkin A, Kench J, Morey A. Overexpression of p21 is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. Cancer Research 2001; 61:8830-37.

15- Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Relationship between p21 and p53 expression, human papilloma virus infection and malignant transformation in sinonasal-inverted papilloma. Clinical Oncology 2005; article in press

16- Chang K, Lin SC, Kwan PC, Wong YK. Association of abberant p53 and p21 immunoreactivity with the outcome of oral verrucous leukoplakia in Taiwan. J Oral Pathol Med 2000; 29:56-62.

۱۷- اسلامی محمد (استاد راهنما)، اعتماد مقدم شهرو. بررسی میزان expression نشانگر p21waf در موکواپیدرموئید کارسینومای غدد بزاقی اصلی و فرعی و رابطه آن با grade هیستولوژی. پایان نامه تخصصی ۴۸۹. دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بداشتی، درمانی تهران. سال تحصیلی ۸۳-۱۳۸۴.

18- Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Mc Millan A, Ziober BL. Cell cycle proteins and development of oral squamous cell carcinoma. Oral Oncology 1999; 35:333-42.

19- Volavsek M, Glava D, Gale N. Cell cycle regulating genes and their protein expression in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. Zdrav Vestn 2002; 71:29-34.

20- Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Detection of cell cycle-related factors in ameloblastoma. J Oral Pathol Med 2001; 30:309-15.

21- El Sissy N. Immunohistochemical detection of p53 protein in ameloblastoma types. Eastern Mediterranean Health Journal 1999; 5(3):478-89.

22- Schwandner O, Bruch H, Broll R. P21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance. Int J Colorectal Dis 2002; 17:11-9.

23- Linkkonen T, Lipponen P, Raitanen M. Evaluation of p21 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. Urol Res 2000; 28:285-92.

24- Ioachim E, Michael M, Stavropoulos N. Expression of cyclin D1, E and cyclin dependent kinase inhibitors p21 (waf1/cip1) and p27 (kip1) in urothelial carcinoma: correlation with other cell cycle related proteins (Rb, p53, Ki67 and PCNA) and clinicopathological features. Uro Int 2004; 73: 65-73.

25- Liu T, Zhu E, Wang L, Okada T. Abnormal expression of Rb pathway-related proteins in salivary gland acinic cell carcinoma. Human Pathology 2005; 36: 962-70.

26- Kuropkat C, Venkatesan T, Caldarelli D. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Auris Nasus Larynx 2002; 29:165-74.

27- Koveski G, Szende B, Prognostic value of cyclin D1, p27 and p63 in oral leukoplakia. J Oral Path Med 2006; 35:274-7.

28- Ratchiller D, Heighway J, Gugger M, Kappeler A. Cyclin D1 overexpression in bronchial epithelia of patients with lung cancer is associated with smoking and predicts survival. J Clin Oncol 2003; 21:2085-93.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-06-28]