

بررسی بروز MDM_2 و P_{53} در کیست دنتی ژروسی و ادنتوزنیک کراتوکیست به روش ایمنو هیستوشیمی

ستاره شجاعی*، شکوفه جمشیدی**، نوشین محتشم***، قدرت الله روشنایی****، مهدی شهابی نژاد*****#

* استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران

** استادیار آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران

*** استاد گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات بیماری های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، ایران

**** استادیار گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات مدلسازی بیماری های غیرواگیر، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی

همدان، ایران

***** دستیار تخصصی گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۳/۳/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۴

Evaluation of MDM_2 and P_{53} Expression in Dentigerous Cyst and Odontogenic Keratocyst by Immunohistochemistry

Setareh Shojaee*, Shokoofeh Jamshidi**, Nooshin Mohtasham***, Ghodratallah Roshanaee****, Mahdi Shahabinejad*****#

* Assistant Professor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

** Assistant Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, Dental Research Center, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

*** Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, Oral & Maxillofacial Diseases Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

**** Assistant Professor of Biostatistics and Epidemiology, Modeling of Noncommunicable Diseases Research Center, School of Public Health, Hamadan University of Medical Science, Hamadan, Iran.

***** Postgraduate Student, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 25 May 2014 ; Accepted: 15 December 2014

Introduction: Odontogenic keratocyst (OKC) is a developmental odontogenic cyst that has high recurrence rate and aggressive behavior. Dentigerous cyst is the most common developmental odontogenic cyst that may transfer to neoplasm. P_{53} and Murine double minute₂ (MDM_2) are over expressed in some odontogenic cysts and tumors. The aim of this study was to compare the expression of MDM_2 and P_{53} in OKC and dentigerous cyst and their relation to proliferative activity of these cysts by immunohistochemistry.

Materials & Methods: In this cross sectional study expression of MDM_2 and P_{53} proteins were determined in 15 cases of OKCs and 15 cases of dentigerous cysts. Results were analysed with statistical tests Chi-square, *t*-student and the relative significance value of 0.05 considered.

Results: Expression of MDM_2 and P_{53} had been observed in all the odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. Expression of both markers were higher in OKC than dentigerous and expression were higher in suprabasal layers than basal layers ($P=0.045$). The severity of P_{53} and MDM_2 were high in both OKC and dentigerous cysts, and there was a statistically significant difference between MDM_2 and P_{53} in dentigerous cysts ($P=0.032$), but in OKC there was no significant difference ($P=0.83$).

Conclusion: Expression of MDM_2 and P_{53} had been higher in odontogenic keratocysts than dentigerous cysts. Over expression of P_{53} and MDM_2 may be associated with pathogenesis of OKC and dentigerous cyst and may contribute to biological behavior of these cysts.

Key words: Odontogenic keratocyst, dentigerous cyst, immunohistochemistry, murine double minute 2 (MDM_2), p_{53} .

Corresponding Author: mehremadar@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2015; 39(2): 163-72 .

چکیده

مقدمه: ادنتوژنیک کراتوسیست (OKC) یک نوع کیست رشدی تکاملی است که دارای خصوصیات تهاجمی و میزان عود بالا می‌باشد. کیست دنتی ژروس شایع‌ترین کیست رشدی تکاملی فکین می‌باشد، که توانایی تبدیل به نئوپلاسم را دارد. P53 و MDM2 (Murine double minute2) در برخی از کیست‌ها و تومورهای ادنتوژنیک افزایش بیان پیدا می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی بروز نشانگرهای MDM2 و P53 در ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس و بررسی ارتباط آنها با فعالیت تکثیری بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به روش مقطعی، بیان پروتئین‌های P53 و MDM2 در ۱۵ نمونه OKC و ۱۵ نمونه کیست دنتی ژروس بررسی شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری *t*-student و Chi square تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بروز P53 و MDM2 در تمامی نمونه‌های ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس دیده شد. بروز هر دو مارکر در ادنتوژنیک کراتوسیست بیشتر از کیست دنتی ژروس بود. و بروز در لایه‌های سوپرابزال بیشتر از لایه بازال بود ($P=0/045$). تفاوت آماری معنی‌داری مابین P53 و MDM2 در کیست دنتی ژروس وجود داشت ($P=0/032$)، ولی این اختلاف در OKC معنی‌دار نبود ($P=0/83$).

نتیجه گیری: در این مطالعه میزان بروز مارکر MDM2 و P53 در ادنتوژنیک کراتوسیست از کیست دنتی ژروس بیشتر بود. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که افزایش بیان P53 و MDM2 در ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس ممکن است با پاتونز OKC و کیست دنتی ژروس در ارتباط باشد و می‌تواند نشان دهنده رفتار بیولوژیک این دو کیست باشد.

کلمات کلیدی: ادنتوژنیک کراتوسیست، کیست دنتی ژروس، ایمونوهیستوشیمی، P53، MDM2.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۴ دوره ۳۹ / شماره ۲: ۷۲-۱۶۳.

مقدمه

می‌گردند.^(۱) احتمال تبدیل کیست دنتی ژروس به نئوپلاسم وجود دارد که از جمله این موارد، تغییر نئوپلاستیک پوشش کیست به یک آملوبلاستوما، به ندرت کارسینوم سلول سنگفرشی و کارسینوم موکوپیدرموئید می‌باشد.^(۱) ادنتوژنیک کراتوسیست شکل مشخصی از یک کیست رشدی تکاملی می‌باشد که به علت تظاهرات هیستوپاتولوژیک خاص و رفتار کلینیکی با تهاجم موضعی و عودهای مکرری که دارد توجه خاصی را به خود معطوف کرده است.^(۱) OKC بیش از ۳ تا ۱۱ درصد کل کیست‌های ادنتوژنیک را تشکیل می‌دهد. این کیست مکانیسم رشد و رفتار بیولوژیکی متفاوتی را نسبت به کیست‌های شایع‌تر نظیر دنتی ژروس و رادیکولار نشان می‌دهد و ممکن است رشد آن به فاکتورهای ناشناخته ذاتی در اپی‌تلیوم یا فعالیت آنزیماتیک در دیواره فیروزه کیست ارتباط داشته باشد.^(۱) از جمله مکانیسم‌های رشد OKCها، میزان پرولیفراسیون (تکثیر) بالا، افزایش بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 و بیان ماتریکس

کیست‌ها و تومورهای ادنتوژنیک بخش مهمی از ضایعات فکی و دهانی هستند که از بقایای اپی‌تلیوم ادنتوژنیک در مراحل مختلف ادنتوژنیزس به وجود می‌آیند. کیست‌های دندانی اصولاً به دو دسته اصلی کیست‌های التهابی و رشدی تکاملی تقسیم گردیده و رفتارهای بیولوژیک متنوعی دارند.^(۱) کیست دنتی ژروس شایع‌ترین کیست رشدی نموی ادنتوژنیک است که بیش از ۲۰ درصد کیست‌های مفروش از اپی‌تلیوم فک را تشکیل می‌دهد.^(۱) این کیست از جدایی فولیکول از طرف تاج دندان رویش نیافته به وجود می‌آید.^(۱،۲) هرچند در برخی از موارد به نظر می‌رسد که این کیست منشأ التهابی داشته باشد.^(۱) همانند کیست‌های دیگر، بزرگ شدن کیست دنتی ژروس در رابطه با پرولیفراسیون اپی‌تلیال، فاکتورهای تحلیل برنده استخوان و افزایش فشار اسمزی مایع داخل کیست ایجاد می‌شود. این کیست‌ها گاهی تا اندازه‌ای بزرگ می‌شوند که باعث ناقربینی صورت

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی به روش مقطعی، ۳۰ بلوک پارافینه شامل ۱۵ بلوک ادنتوژنیک کراتوسیست و ۱۵ بلوک کیست دنتی ژروس از آرشیو دانشکده دندانپزشکی مشهد و همدان به منظور رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با مارکرهای P₅₃ و MDM₂ انتخاب شدند. برای تعیین تعداد نمونه از رابطه حجم نمونه در دو گروه به صورت زیر

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha} \sqrt{\bar{p}(1-\bar{p})} + Z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)})^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

و اطلاعات مقاله شریفی سیستانی و همکاران^(۵) استفاده شد. با در نظر گرفتن خطای نوع اول ۵ درصد و توان ۸۰ درصد تعداد نمونه لازم در هر گروه برابر ۱۵ به دست آمد. بلوک‌ها توسط دو پاتولوژیست به طور کامل بررسی شدند و نمونه‌هایی که دارای میزان کافی از ضایعه به منظور رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بوده و فاقد التهاب یا دارای التهاب اندک بودند و فیکساسیون مطلوب داشتند، انتخاب شدند. نمونه‌هایی که فاقد مشخصات فوق بودند از مطالعه خارج شدند. ضمناً اطلاعات بالینی نظیر سن، جنس و محل ضایعه از پرونده بیماران استخراج گردید. پس از انتخاب بلوک‌های پارافینی، از هر بلوک پارافینی دو برش به ضخامت ۵ تا ۶ میکرون تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی از مارکرهای P₅₃ (مونوکلونال موشی ضد P₅₃، DAKO/clone DO-7/IS 616)، ساخت دانمارک) و MDM₂ (مونوکلونال موشی ضد MDM₂، Novocastra ساخت انگلستان) طبق دستورالعمل سازنده برای رنگ‌آمیزی نمونه‌ها استفاده شد. پس از تهیه برش‌های بافتی و قرار دادن آن بر روی اسلایدها، به وسیله گزین، پارافین‌زدایی و با الکل‌های درجه‌بندی شده آبدهی شدند. سپس جهت بازیافت آنتی‌ژن از دستگاه ماکروویو در دمای

متالوپروتئینازها (MMP_{2,9}) می‌باشد.^(۲) به غیر از تمایل به عود به طور کلی پیش‌آگهی اکثر OKCها خوب است. این کیست‌ها در آخرین طبقه‌بندی تومورهای ادنتوژنیک WHO (World Health Organization)، کراتوسیستیک ادنتوژنیک تومور نام گرفته‌اند.^(۱) پیشروی منظم سلول‌ها از مراحل مختلف چرخه سلولی توسط کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) بعد از اتصال این کینازها به خانواده دیگری از پروتئینها موسوم به سیکلین‌ها سازماندهی می‌شود. پروتئین‌هایی که باعث مهار تکثیر سلولی می‌شوند، محصولات ژن‌های سرکوب کننده تومور هستند.^(۳) P₅₃ که به عنوان ژن سرکوبگر تومور شناخته می‌شود، فاکتور تنظیم‌کننده مسیرهایی نظیر ترمیم DNA، سیکل سلولی، آپوپتوز، آنژیوژنز و حفظ ثبات ژنومی می‌باشد.^(۳و۴) P₅₃ به صورت منفی به وسیله تقابل با انکوپروتئین MDM₂ تنظیم می‌گردد.^(۳و۴) ژن MDM₂ که به عنوان یک انکوژن شناخته می‌شود دارای دو عامل فعال‌کننده رونویسی به نام P₁ و P₂ می‌باشد که P₂ وابسته به P₅₃ می‌باشد.^(۴) در حالت نرمال MDM₂ در هسته تولید می‌شود ولی جهت فعال کردن تنزل (Degradation) عوامل هدف خود به وسیله پروتئینازها به سیتوپلاسم منتقل می‌شود.^(۴) مطالعات مختلفی جهت بررسی رابطه بین MDM₂ و P₅₃ در ضایعات مختلف صورت گرفته است اما بررسی‌های اندکی این مطالعات را در کیست‌ها و تومورهای ادنتوژنیک انجام داده‌اند.^(۵و۶) لذا هدف از این مطالعه بررسی بروز نشانگرهای MDM₂ و P₅₃ که به عنوان شاخص‌های مهم تکثیر و تنظیم سیکل سلولی می‌باشند، در ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس بود، تا شاید بتوان کیست‌هایی را که دارای پتانسیل بیشتری برای تغییرات نئوپلاستیک هستند را مشخص کرده و توانایی بروز رفتارهای گوناگون آنها را توجیه نمود.

و به صورت خفیف، متوسط و شدید ارزیابی شد. در این مطالعه از آزمون *t*-student و Chi-square برای بررسی داده‌ها استفاده شد و ($P \leq 0.05$) در نظر گرفته شد. برای تحلیل داده‌ها نرم افزار SPSS با ویرایش ۱۶ به کار رفت.

یافته‌ها

همانطور که در جدول ۱ مشخص شده است بین سن و جنس و محل ضایعات در گروه‌های مورد مطالعه اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت. در این مطالعه، بروز P53 و MDM2 در تمامی نمونه‌های ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس دیده شد. بروز هر دو مارکر در ادنتوژنیک کراتوسیست بیشتر از کیست دنتی ژروس بود، که بروز در لایه‌های سوپرابازال بیشتر از لایه بازال بود (تصاویر ۱ تا ۴) و این در حالیکه در ادنتوژنیک کراتوسیست بروز MDM2 نسبت به P53 دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای هم در لایه بازال و هم سوپرابازال بود که داده‌های مربوط به هر ضایعه در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس داده‌های بدست آمده رابطه بین P53 و MDM2 همسو بود ($r = 0.45$ و $P = 0.013$) مقایسه نیمه کمی برای میزان بروز این دو مارکر در کیست‌های مورد مطالعه نیز نشان دهنده بروز بیشتر P53 و MDM2 در ادنتوژنیک کراتوسیست بود ولی این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود، که به ترتیب ($P = 0.051$) و ($P = 0.34$) به دست آمد. (جدول ۳) بررسی‌های کیفی الگوی رنگ‌پذیری نشان داد که با مارکر P53 در گروه ادنتوژنیک کراتوسیست‌ها پترن غالب رنگ‌پذیری متوسط و در گروه کیست‌های دنتی ژروس، خفیف بود، با مارکر MDM2 در گروه OKC، و دنتی ژروس پترن غالب رنگ‌پذیری شدید بود و از آزمون همبستگی و آماره *t* برای ارزیابی ارتباط بین متغیرها استفاده شد.

۹۵°C و مدت زمان ۲۵ دقیقه استفاده شد. پس از شستشو با PBS (Phosphate buffered saline) از آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد، که هر دو مارکر با توجه به اینکه آماده استفاده بودند، رقیق نشدند، و سپس انکوباسیون انجام شد. در مرحله بعد ماده رنگ‌زای DAB استفاده و در مرحله بعد برش‌ها با هماتوکسیلین Counterstain و در مرحله آخر Mounting صورت گرفت. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ نوری (Olympus Bx41) ساخت ژاپن با درشت‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰ برابر تحت مطالعه قرار گرفت، سلول‌های مثبت رنگ گرفته، سلول‌هایی که هسته آنها قهوه‌ای رنگ گرفته بودند برای شمارش انتخاب شد. ابتدا با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر مناطقی که بیشترین رنگ‌پذیری را داشتند مشخص شدند و سپس با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، پنج منطقه که بیشترین تعداد سلول‌های اپی‌تلیال رنگ پذیرفته (Hot spot) (با استفاده از مارکر P53 و MDM2) را داشتند در لایه بازال و ۵ منطقه در لایه‌های سوپرابازال انتخاب شدند^(۵) از این مناطق توسط دوربین دیجیتال DP12 مدل UTV0.5 XC-3 عکس تهیه گردید و با شاهد مثبت که برای هر دو مارکر (Breast interaductal carcinoma) در نظر گرفته شده بود مقایسه شد. سپس با استفاده از برنامه Analysis LS starter تعداد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در این مناطق توسط دو پاتولوژیست شمارش و میانگین آنها گرفته شد. میزان همبستگی بین دو پاتولوژیست برابر ۰/۹ بوده است. در این مطالعه بررسی نیمه کمی نیز انجام شد، به این نحو که نمونه‌هایی که کمتر از ۵ درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفته بودند (\pm)، نمونه‌هایی که بین ۵-۲۵ درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفته بودند (+) و آنهایی که $> 25\%$ رنگ‌پذیری نشان دادند (++)، در نظر گرفته شدند.^(۵) شدت رنگ‌پذیری در این مطالعه چشمی

جدول ۱: اطلاعات بالینی مربوط به سن، جنس و مکان در گروه‌های تحت مطالعه

گروه	فراوانی	سن		جنسیت		مکان			
		حداکثر	انحراف معیار	زن	مرد	خلف	خلف فک	قدام فک سینوس	
ادنتوژنیک	۱۵	۷۳	۱۳/۹۸	۳۳/۸	۶(۴۰/۰)	۹(۶۰/۰)	۳(۲۰/۰)	۱(۶/۷)	۲(۱۳/۳)
کراتوسیست	۱۵	۵۶	۱۳/۱	۳۱	۸(۵۳/۳)	۷(۴۶/۷)	۳(۲۰/۰)	۴(۲۶/۷)	۰(۰/۰)
کیست دنتی ژروس	۱۷	۵۶	۱۳/۱	۳۱	۸(۵۳/۳)	۷(۴۶/۷)	۳(۲۰/۰)	۴(۲۶/۷)	۰(۰/۰)
			$P\text{-value} = ۰/۶$		$P\text{-value} = ۰/۶$		$P\text{-value} = ۰/۲۷$		

جدول ۲: توزیع فراوانی مارکرهای P₅₃ و MDM₂ در گروه‌های مورد مطالعه

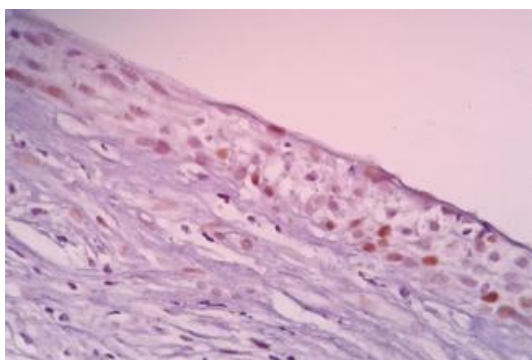
P-value	آماره t Student	انحراف معیار	میانگین	فراوانی	نوع	
۰/۰۹۰	۱/۷۶	۵/۶۲	۹/۶۹	۱۵	OKC	P ₅₃
		۳/۷۶	۶/۶۳	۱۵	DC	
۰/۰۷۸	۱/۸۳	۱۱/۷۰	۲۴/۰۹	۱۵	OKC	لایه پارابازال
		۸/۸۷	۱۷/۱۶	۱۵	DC	
۰/۰۸۰	۱/۸۲	۱۶/۹۳	۳۳/۵۵	۱۵	OKC	لایه بازال و پارابازال
		۱۱/۹۵	۲۳/۱۸	۱۵	DC	
۰/۰۰۴	۳/۱۵	۷/۵۸	۱۷/۲۰	۱۵	OKC	MDM ₂
		۴/۵۹	۹/۹۹	۱۵	DC	
۰/۰۱۴	۲/۶۱	۱۳/۲۲	۳۵/۴۱	۱۵	OKC	لایه پارابازال
		۸/۷۸	۲۴/۷۲	۱۵	DC	
۰/۰۰۴	۳/۱۸	۱۸/۲۰	۵۲/۳۵	۱۵	OKC	لایه بازال و پارابازال
		۱۱/۴۸	۳۴/۷۱	۱۵	DC	

DC = کیست دنتی ژروس

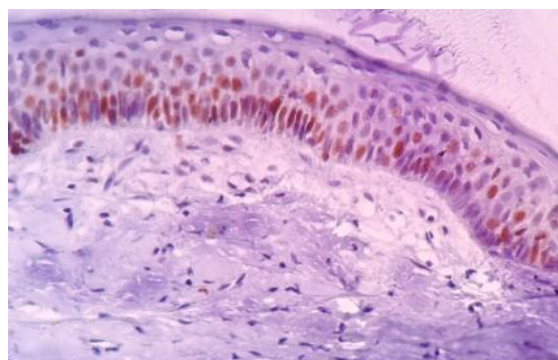
OKC = ادنتوژنیک کراتوسیست

جدول ۳: توزیع فراوانی مارکرهای P₅₃ و MDM₂

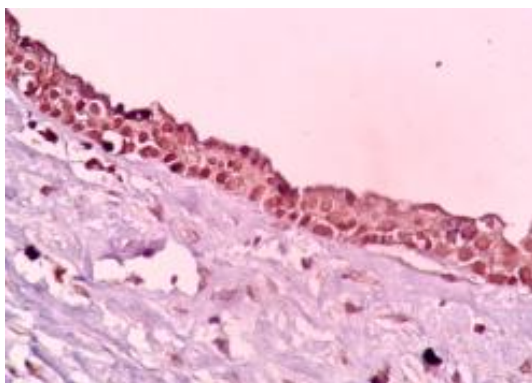
P-value	آماره t	انحراف معیار	میانگین	تعداد	
۰/۰۵۱	۱/۹۵	۱۷/۲۸	۳۶/۰۳	۱۵	OKC
		۱۱/۷۶	۲۵/۵۱	۱۵	DC
۰/۳۴	۱/۱۰	۱۷/۰۵	۵۹/۰	۱۵	OKC
		۱۵/۷۱	۵۳/۲۸	۱۵	DC



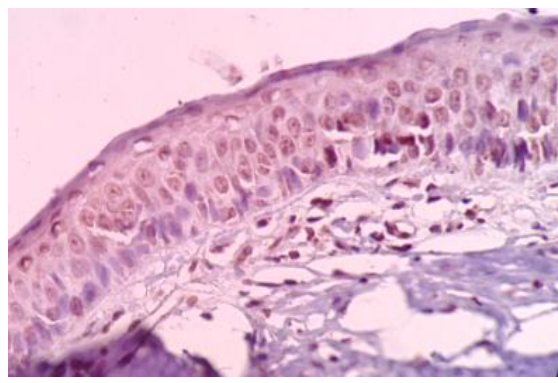
تصویر ۳: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از نشانگر P53 در کیست دنتی ژروس (با شدت رنگ پذیری خفیف) (X۴۰۰)



تصویر ۱: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از نشانگر P53 در ادنتوژنیک کراتوسیست (با شدت رنگ پذیری متوسط) (X۴۰۰)



تصویر ۴: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از نشانگر MDM2 در کیست دنتی ژروس (با شدت رنگ پذیری شدید) (X۴۰۰)



تصویر ۲: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از نشانگر MDM2 در ادنتوژنیک کراتوسیست (با شدت رنگ پذیری خفیف) (X۴۰۰)

بحث

P53 منفی شد. در مطالعه ما، تظاهر P53 در تمامی کیست‌های دنتی ژروس قابل مشاهده بود که از این نظر با مطالعه De Oliveira و همکارانش^(۷) کاملاً همخوانی دارد. در مطالعاتی نظیر^(۹) Gaballah،^(۱۲) Sajeewan و^(۱۱) Piattelli به ترتیب در ۳۳/۳، ۷۷/۵ و ۹/۱ درصد کیست‌های دنتی ژروس تظاهر P53 مشخص گردید. در مطالعه حاضر MDM2 همانند P53 در کلیه نمونه‌های OKC تظاهر یافت که از این نظر مطالعات بسیار اندکی جهت

در مطالعه حاضر تظاهر P53 در کلیه نمونه‌های OKC مشاهده شد که از این نظر با نتایج مطالعات^(۳) Gadbail،^(۷) De Oliveira،^(۶) Sharifi sistani و همکارانشان همخوانی دارد.^(۵-۷) در چندین مطالعه دیگر^(۸-۹) نیز تظاهر P53 در OKC از ۴۱ درصد تا ۹۱/۹ درصد موارد گزارش شده است. در مطالعات^(۱۳) Carvalhais و^(۱۴) Galvao نیز به صورت کلی تظاهر

همخوانی دارد. دلیل این تشابه را می‌توان نبود ارتباط مستقیم بیان P_{53} با میتوز دانست.^(۱۵) از طرفی مطالعات هیستوشیمی و هیستولوژی نشان داده‌اند که در اپی‌تلیوم OKC سلول‌های لایه بازال نسبت به سلول‌های سوپرابازال تمایز یافته‌تر می‌باشند.^(۱۲) از طرفی سلول‌های لایه سوپرابازال در مرحله‌ای از سیکل سلولی که بیان بالاتری را نشان می‌دهند قرار دارند، چرا که سلول‌های لایه بازال اغلب به شکل سلول‌های بنیادی با سیکل سلولی آهسته و فاز G_1 طولانی می‌باشند.^(۱۶) مطالعه مشابهی جهت مقایسه بیان MDM_2 در OKC نیافتیم. تظاهر MDM_2 و P_{53} در کیست‌های دنتیژروس در مطالعه اخیر، در لایه‌های سوپرابازال بیشتر از لایه بازال (با اختلاف آماری معنی‌دار) مشاهده شد که با مطالعه De oliveira^(۷) مشابه بود. ولی مطالعه مشابه دیگری جهت مقایسه بیان MDM_2 در لایه‌های مختلف در کیست دنتیژروس یافت نشد. مطالعات Gadball^(۸) (بدون اختلاف معنی‌دار)، Tosios^(۷) و Piattelli^(۱۱) علیرغم نتایج ما تظاهر P_{53} را بیشتر در لایه بازال گزارش کردند که دلیل اختلاف این مسأله همانطور که ذکر شد به عدم ارتباط مستقیم بیان P_{53} با میتوز می‌باشد. در این مطالعه، میانگین سلول‌های اپی‌تلیالی P_{53} مثبت در OKC‌ها بیشتر از دنتیژروس کیست‌ها بود. که از این نظر با نتایج مطالعات Gadball^(۸)، Gaballah^(۹)، Ogden^(۱۰) و Piattelli^(۱۱) مطابقت داشت. افزایش پرولیفراسیون سلولی احتمالاً نقشی در تکامل کیست‌ها و تومورهای ادونتوژنیک دارد. موتاسیون ژن P_{53} ممکن است یکی از عوامل پرولیفراسیون سلول‌های دخیل در این مسأله باشد.^(۱۱) P_{53} همچنین در کنترل ترمیم سلولی نقش دارد که این فعالیت می‌تواند به صورت کنترل منفی رشد یا تهاجم عمل کند.^(۱۴) بیان بالای P_{53} در پوشش اپی‌تلیالی OKC ممکن است به معنای فعالیت پرولیفراتیو بیشتر

مقایسه یافتیم. در مطالعه شریفی سیستانی و همکاران^(۵) در ۸۰ درصد موارد OKC‌های مورد مطالعه MDM_2 و در مطالعه Galvao و همکاران^(۱۳) هیچ یک از OKC‌های مورد مطالعه برای MDM_2 رنگ نشدند، شاید دلیل این نتایج ضد و نقیض در بیولوژی پیچیده P_{53} ، دسترسی به آنتی‌بادی، تأثیر آماده سازی بافت و پروتکل استفاده شده برای ایمونوهیستوشیمی نظیر روش‌های فیکس شدن، روش Retrieval (بازیافت) آنتی‌ژن از بلوک‌های پارافینی و نوع آنتی‌بادی مورد استفاده باشد. چنانچه همه این فاکتورها به دقت نتایج نسبت داده می‌شود.^(۱۲ و ۱۱ و ۹ و ۷) غیاب یا بیان کم P_{53} می‌تواند به وسیله نیمه عمر کوتاه پروتئین P_{53} در بافت نرمال باشد که توسط ایمونو هیستوشیمی قابل تشخیص نیست^(۹) به این علت در این تحقیق از آنتی‌بادی DO-7/IS616 استفاده کرده‌ایم که به عنوان حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش برای تشخیص ایمونو هیستوشیمی پروتئین P_{53} در بافت‌های فیکس شده در فرمالین شناخته شده است و P_{53} وحشی و موتاسیون یافته را نشان می‌دهد.^(۱۳) تعدادی از مطالعات ارتباط نزدیک ما بین افزایش بیان P_{53} و موتاسیون ژن P_{53} و آسیب سلولی را به عنوان القاگر بالقوه نوع وحشی P_{53} دانسته‌اند که سبب ثبات و تشخیص ایمونو هیستوشیمی P_{53} می‌گردد.^(۱۲) در تمام کیست‌های دنتیژروس مورد مطالعه اخیر، MDM_2 تظاهر یافت که متأسفانه هیچ مطالعه‌ای از این نظر جهت مقایسه نیافتیم و لزوم انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه را یادآور می‌گردد. در مطالعه حاضر، تظاهر MDM_2 و P_{53} در OKC‌های مورد مطالعه در لایه‌های پارابازال بیشتر از لایه بازال مشاهده شد که این اختلاف معنی‌دار بود. تظاهر بیشتر P_{53} در لایه پارابازال با نتایج مطالعات Sharifi Sistani^(۵)، Gadball^(۸)، De Oliveira^(۷)، Gurgel^(۸)، Ogden^(۱۰)، Piattelli^(۱۱) و Sajeevan^(۱۲)

کراتوسیست‌ها الگوی غالب رنگ‌پذیری متوسط و در گروه کیست‌های دنتی ژروس، خفیف بود. با مارکر MDM₂ در گروه OKC و دنتی ژروس الگوی غالب رنگ‌پذیری شدید بود. در مطالعه Sajeevan و همکاران^(۱۲) الگوی غالب رنگ‌پذیری P₅₃ در Mild, OKC (۵۰ درصد موارد) بود. در مطالعه ساغروانیان و همکاران^(۱۸) الگوی غالب رنگ‌پذیری MDM₂ در کیست دنتی ژروس خفیف (۶۵ درصد موارد) بود، که با نتایج مطالعه ما مغایر است. از طرفی همانگونه که در قبل ذکر شد، نوع آنتی‌بادی‌های بکار رفته و روش‌های آماده‌سازی بافتی و فیکساسیون نیز ممکن است در نتایج متفاوت نیمه کمی مؤثر باشد.^(۱۲) در این مطالعه ارزیابی‌های نیمه کمی در دو گروه مورد مطالعه و با مارکرهای فوق اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. هرچند مقادیر ارزیابی شده با مطالعه شریفی سیستانی و همکاران^(۵) که از همین روش ارزیابی استفاده کرده‌اند، متفاوت بود (MDM₂ ۶۰ درصد و P₅₃ ۶۷٪ درصد در OKC) ولی با این حال همانند مطالعه ما بیشترین مقادیر در مطالعه آنها نیز در گروه (++) بود. صرفنظر از تفاوت در روش ارزیابی نیمه کمی مورد استفاده، نتایج مطالعه ما با نتایج مطالعه Gurgle^(۸) مشابه و با نتایج مطالعه Gaballah^(۹) مغایرت دارد. بررسی‌های کیفی الگوی رنگ‌پذیری نشان داد که با مارکر P₅₃ در گروه ادونتوزنیک کراتوسیست‌ها الگوی غالب رنگ‌پذیری متوسط و در گروه کیست‌های دنتی ژروس، خفیف بود، با مارکر MDM₂ در گروه OKC‌ها و دنتی ژروس الگوی غالب رنگ‌پذیری شدید بود.

مطالعه به صورت کامل کمی، نیمه کمی و کیفی از نقاط قوت این مطالعه بود. لیکن بهتر است در آینده از مارکرهای تکثیری دیگر و کیست‌ها و تومورهای ادونتوزنیک دیگری جهت مقایسه استفاده شود.

اپی‌تلیوم OKC باشد که این امر ممکن است علت عود بالا و یا رفتار نئوپلاستیک OKC باشد.^(۱۳) از طرفی محرک اصلی تشکیل کیست‌های دنتی ژروس به طور واضح مشخص نیست؛ اما اغلب یک ارتشاح التهابی در کپسول کیست مشاهده می‌گردد که سبب القای سلول‌های اپی‌تلیالی به تکثیر شدن ابتدائی می‌گردد. این مسأله (پاسخ به تحریک التهابی) ممکن است سبب فرایند رویشی کیست گردد، ولی انتشار سلول‌ها ممکن است غیرمداوم بوده و تنها در دوره‌های کوتاهی از زمان باشد که احتمالاً سبب کمتر شدن بیان P₅₃ در کیست‌های دنتی ژروس می‌گردد.^(۷) مغایر با نتایج مطالعه اخیر و مطالعات فوق در مطالعه De Oliveira و همکاران^(۷) میانگین درصد سلول‌های P₅₃ در سایر کیست‌های ادونتوزنیک مورد مطالعه (رادیکولار، گورلین و دنتی ژروس) بیشتر از OKC بود. هرچند P₅₃ توسط سلول‌های در حال انتشار بیان می‌گردد ولی تجمع آن در سلول ممکن است بوسیله فاکتورهایی نظیر استرس سلولی باشد چرا که P₅₃ به عنوان تعدیل‌کننده اولیه پاسخ سلولی به استرس می‌باشد. بنابراین بیان P₅₃ در کیست دنتی ژروس می‌تواند ناشی از استرس سلولی تولید شده توسط محرک التهابی باشد، هرچند که این کیست منشأ تکاملی دارد.^(۷) مشابه مطالعه حاضر در مطالعه Piattelli^(۱۱) و Gadball^(۶) و همکارانشان میزان بروز P₅₃ در ادونتوزنیک کراتوسیست بیشتر از کیست دنتی ژروس بود. موتاسیون ژن P₅₃ می‌تواند همراه با افزایش پرولیفراسیون سلولی باشد،^(۸) بیان بالای این پروتئین در پوشش اپی‌تلیالی ادونتوزنیک کراتوسیست ممکن است به معنای فعالیت تکثیری بیشتر و در نتیجه رفتار بیولوژیک تهاجمی‌تر این ضایعه نسبت به کیست دنتی ژروس باشد.^(۱۱) بررسی‌های کیفی الگوی رنگ‌پذیری نشان داد که با مارکر P₅₃ در گروه ادونتوزنیک

نتیجه گیری

در این مطالعه میزان بروز مارکر MDM2 و P53 در ادنتوژنیک کراتوسیست از کیست دنتی ژروس بیشتر بود. بر اساس نتایج بدست آمده می توان چنین نتیجه گیری کرد که افزایش بیان P53 و MDM2 در ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست دنتی ژروس ممکن است با پاتوژنز OKC و کیست دنتی ژروس در ارتباط باشد و می تواند نشان دهنده

رفتار بیولوژیک این دو کیست باشد.

تشکر و قدردانی

با تقدیر و تشکر فراوان از مساعدت های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند. شایان ذکر است که این مقاله از پایان نامه دوره دکترای تخصصی به شماره ۱۲۷، استخراج گردیده است.

منابع

1. Ganbariha M, Shahsavari F, Baghaei F. Oral and Maxillofacial Pathology. 3rd ed. Tehran: Ghazal Javan Co; 2009. P. 636-42.
2. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan Rck. Oral Pathology-Clinical Pathologic Correlation. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2012. P. 251, 255-9.
3. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. China: Mosby Co; 2013. P. 30, 290-2.
4. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. The MDM₂-P₅₃ pathway revisited. J Biomed Res 2013; 27(4): 254-71.
5. Sharifi-Sistani N, Zartab H, Babakohi S, Saghravanian N, Jamshidi S, Esmaili H, et al. Immunohistochemical comparison of the expression of P₅₃ and MDM₂ proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. J Craniofac Surg 2011; 22(5): 1652-6.
6. Gadbaal AR, Chaudhary M, Patil S, Gawande M. Actual proliferating index and P53 protein expression as prognostic marker in odontogenic cysts. Oral Dis 2009; 15(7): 490-8.
7. De Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves Ac, Rados PV, Sant' Ana Filho M. Immunohistochemical analysis of the patterns of P53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. Med Oral Pathol Orol Cir Bucal 2008; 13(5): 275-80.
8. Gurgel CA, Ramos EA, Azevedo RA, Sarmento VA, Da Silva Carvalho AM, Dos Santos JN. Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: An immunohistochemical study. J Mol Histol 2008; 39(3): 311-6.
9. Gaballah ET, Tawfik MA. Immunohistochemical analysis of P53 protein in odontogenic cysts. Saudi Dent J 2010; 22(4): 167-70.
10. Ogden GR, Chisholom DM, Kiddie RA, Lane DP. P53 Protein in odontogenic cysts: Increased expression in some odontogenic keratocysts. J Clin Pathol 1992; 45(11): 1007-10.
11. Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. P53 protein expression in odontogenic cyst. J Endod 2001; 27(7): 459-61.
12. Sajeevan TP, Saraswathi TR, Ranganathan K, Joshua E, Rao UD. Immunohistochemical study of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in odontogenic keratocyst and periapical cyst. J Pharm Bioallied Sci 2014; 6(1): 52-7.
13. Galvao HC, Gordon-Nunez MA, de Amorim RF, Freitas Rde A, de souza LB. Immunohistochemical expression of protein P53, 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; 24(3): 369-74.
14. Carvalhais J, Aguiar M, Araujo V, Gomez R. P53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumors. Oral Dis 1999; 5(3): 218-22.
15. Deyhimi P, Hashemzade Z. Comparative study of TGF-alpha and P53 markers' expression in odontogenic keratocyst and orthokeratinized odontogenic cyst. Dent Res J 2012; 9(1): 39-44.
16. Kannan S, Jagadeesh Chandran G, Raveendran Pillai K, Babu M, Sujathan K, Nalinakumary R, et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: Correlation with expression of Ki67. Clin Mol Pathol 1996; 49(3): 170-5.

17. Tosios KI, Kakarantza-Angelopoulou E, Kapranos N. Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 antigen and p53 protein in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. J Oral Pathol Med 2000; 29(3): 139-44.
18. Saghravanian N, Habibi A, Mohtasham N, Afzal-Aghaie M, Shiva A, Babazadeh S. Evaluation of MDM₂ and P53 expression in dentigerous,radicular and residual cysts by immunu histochemistry. J Mash Dent Sch 2009; 33(2): 145-52. (Persian)