

بررسی بیان نشانگر BCL-2 در کیست فولیکولار و ادنتوژنیک کراتوسیست

دکتر صفورا سیفی^۱ - دکتر سلیمان محبوب^۲ - دکتر انسیه شفیق^۳ - محمدجعفر صادق^۴

۱- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل.

۲- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل.

۳- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی عمومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل.

۴- دانشجوی دندانپزشکی.

چکیده

زمینه و هدف: ادنتوژنیک کراتوسیست، کیست ادنتوژنیک تکاملی با رفتار تهاجمی و تمایل به عود بالاست. اپی تلیوم این کیست دارای توان رشدی بیشتری نسبت به کیست فولیکولار می باشد. BCL-2 پروتئین ضد آپوپتوتیک است و باعث افزایش طول عمر سلول های اپی تلیالی می گردد. مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه واکنش ایمنی شاخص ضد آپوپتوتیک BCL-2 در لایه های مختلف اپی تلیوم و کل پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار و ادنتوژنیک کراتوسیست انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه گذشته نگر و توصیفی - تحلیلی، بر روی بیست بلوک پارافینه مرتبط با ادنتوژنیک کراتوسیست و بیست بلوک پارافینه کیست فولیکولار، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر BCL-2 به کمک آنتی بادی Anti BCL-2 (Clone 124, 1 Sotype: IgG, Kappa, DAKO, Denmark) انجام شد. تعداد سیتوپلاسم سلول های اپی تلیالی رنگ گرفته شده در ناحیه بازال، میانی و سطحی اپی تلیوم پوشاننده هر دو کیست و کل پوشش اپی تلیالی آنها در هزار سلول اپی تلیالی شمارش شده و در نهایت نتایج به صورت (انحراف معیار $\pm$ درصد میانگین) بیان گردید. داده های به دست آمده وارد SPSS شده و با استفاده از آنالیز Roc curve و Student- t-test تحلیل شد و با یکدیگر مقایسه گردید.

یافته ها: رنگ پذیری با نشانگر BCL-2 در لایه بازال و میانی ادنتوژنیک کراتوسیست به ترتیب $1/4 \pm 9/5\%$ و $3/2 \pm 12/1\%$ بوده اما در لایه های سطحی عدم رنگ پذیری مشاهده شد. رنگ پذیری با نشانگر BCL-2 در لایه بازال کیست فولیکولار $1/9 \pm 2/1\%$ بود ولی در لایه های میانی و سطحی عدم رنگ پذیری مشاهده شد. اختلاف میانگین رنگ پذیری با نشانگر BCL-2 در لایه های مختلف پوشش اپی تلیالی ادنتوژنیک کراتوسیست از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/001$). اما اختلاف میانگین رنگ پذیری با نشانگر BCL-2 در لایه های مختلف پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0/05$). میانگین رنگ پذیری در کل پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار $0/63 \pm 0/7\%$ و در ادنتوژنیک کراتوسیست $1/5 \pm 36/8\%$ بود. اختلاف میانگین رنگ پذیری با نشانگر BCL-2 در کل پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار و ادنتوژنیک کراتوسیست از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/001$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر بیانگر نقش BCL-2 در پاتوژنز ادنتوژنیک کراتوسیست بوده و افزایش بیان نشانگر BCL-2 در لایه بازال ادنتوژنیک کراتوسیست مرتبط با عود و رفتار تهاجمی بیشتر آن نسبت به کیست فولیکولار است. همچنین می توان از افزایش بیان نشانگر BCL-2 در لایه بازال به عنوان شاخص کمکی جهت افتراق کیست فولیکولار از ادنتوژنیک کراتوسیست استفاده کرد.

کلید واژه ها: پروتئین BCL-2 - ادنتوژنیک کراتوسیست - کیست فولیکولار - ایمونوهیستوشیمی.

پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۳۱

اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۲/۴

وصول مقاله: ۱۳۸۶/۱۰/۱۰

نویسنده مسئول: گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل e.mail:Sf_Seify@yahoo.com

مقدمه

شایعترین نوع کیست های رشدی تکاملی ادنتوژنیک است که حدود ۲۰٪ کل کیست های مفروش از اپی تلیوم فکین را شامل

اکثر کیست های فکی توسط اپی تلیومی پوشیده شده است که منشا آن اپی تلیوم ادنتوژنیک می باشد. کیست فولیکولار

بیست بلوک پارافینه ادنتوزنیک کراتوسیست از بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی بابل در فاصله سالهای ۸۲ - ۸۶ و از بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل در فاصله سالهای ۷۰ - ۸۶ استفاده گردید. نمونه‌ها براساس ضوابط لازم جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بعد از حذف عوامل بازدارنده (خونریزی، نکروز، ثبوت نامناسب، حجم ناکافی بافت) از بین تمام نمونه‌های موجود انتخاب شدند، سپس بلوک پارافینه آنها از بایگانی خارج و اطلاعات بالینی (سن، جنس، محل ضایعه) از پرونده بیماران استخراج شد؛ آن گاه از هر بلوک یک برش چهار میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین-اؤزین رنگ آمیزی گردید و مجدداً توسط پاتولوژیست دهان مورد بازبینی قرار گرفت. بلوک‌های مناسب محتوی حداکثر طول اپی تلیوم کیست‌ها انتخاب و از هر یک برش سه میکرونی تهیه شده همچنین در صورت مشاهده التهاب در دیواره کیست‌های مذکور با وجود طول کافی اپی تلیوم در مطالعه وارد شدند و ایمونوهیستوشیمی با روش استاندارد Avidine Biotine peroxidase انجام گرفت.

قبل از شروع روش ایمونوهیستوشیمی، راه اندازی روش مذکور بر روی ۱۵ بلوک پارافینه (داکتال کارسینومای پستان، کارسینوم سلول سنگفرشی، ادنتوزنیک کراتوسیست) که به دو گروه هفت و هشت تایی تقسیم شدند، در زمانهای متفاوت انکوباسیون آنتی بادی اولیه و PH مختلف مربوط به بافر سیترات امتحان گردید و در نهایت بهترین شرایط برای روش مذکور انتخاب شد و ایمونوهیستوشیمی به روش توصیف شده در زیر بر روی بلوک‌های پارافینه انجام گردید.

ابتدا برشهای مذکور را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در فور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس بیست دقیقه در فور با دمای هشتاد درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس برشها دوبار در گزین برای دیپارافینه شدن و بعداً در درجات مختلف اتانول به ترتیب ۹۶٪ - ۱۰۰٪ و ۷۰٪ - ۸۰٪ قرار داده شدند. به منظور آشکارسازی آنتی‌ژن‌های بافتی، برشها در بافر سیترات (pH ۱۰) به مدت ده دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و دو اتمسفر) قرار گرفتند و بعد از این مرحله و رسیدن به دمای آزمایشگاه و شستشو با بافر PBS (Phosphate buffered salin, PH 7.4) برای حذف فعالیت پراکسیداز با منشا داخلی، محلول هیدروژن پراکسید

می‌شود و در اثر جدا شدن فولیکول دندان از سطح تاج دندان نهفته و تجمع مایع بین تاج و اجزای اپی تلیالی ایجاد می‌شود. (۱)، ادنتوزنیک کراتوسیست از کیست‌های نسبتاً شایع فکی بوده که تقریباً ۵٪ - ۱۵٪ تمام کیست‌های ادنتوزنیک را تشکیل می‌دهد (۲) و از بقایای تیغه دندان منشأ می‌گیرد. (۱)، این کیست توان رشدی به مراتب بیشتر نسبت به سایر کیست‌های ادنتوزنیک دارد و می‌تواند به اندازه‌های بزرگی رسیده و تخریب قابل توجهی در استخوان ایجاد کند و میزان عود آن بین ۲۵٪ - ۶۰٪ است. (۳)

مکانیسم رشدی و رفتار بیولوژیکی متفاوت آن نسبت به کیست فولیکولار ممکن است به دلیل وجود عوامل ناشناخته ذاتی در اپی تلیوم یا فعالیت آنزیمی بافت همبندی فیبروی جدار کیست (۱) یا محتویات مایع کیستی آن (۴) باشد.

ژن BCL-2 یک پروتئین ۲۶ کیلو دالتون بوده و در غشای میتوکندری، رتیکولوم آندو پلاسمیک و پوشش هسته قرار دارد (۵) و از طریق اثر مستقیم روی میتوکندری و کنش با دیگر پروتئین‌های سیتوزول باعث توقف مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها، بدون القای تکثیر سلولی می‌گردد. (۶)، بروز بیش از حد BCL-2 مرحله مهم در کارسینوژنیز بوده (۴) و اولین بار در لنفوم سلول B با روش ایمونوهیستوشیمی تعیین شده است. (۷)، در مطالعه Piatelli و همکاران بر روی ۵۳ نمونه کیست ادنتوزنیک، همه کراتوسیست‌ها با نشانگر BCL-2 رنگ‌پذیر بودند در حالی که کیست‌های رادیولار و دنتی ژورس عدم رنگ‌پذیری را نشان دادند. (۴)

از آنجا که ادنتوزنیک کراتوسیست دارای رفتار تهاجمی و تمایل به عود بیشتری نسبت به کیست فولیکولار می‌باشد. (۱)، هدف از این مطالعه بررسی دقیق و مقایسه واکنش ایمونوهیستوشیمی از نظر بیان پروتئین ضد آپوپتوتیک BCL-2 در لایه‌های مختلف پوشش اپی تلیالی و در کل پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار و ادنتوزنیک کراتوسیست می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی با روش مقطعی، در ماههای تیر و مهر سال ۱۳۸۶ در آزمایشگاه ایمونوهیستوشیمی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام شد. به تعداد بیست بلوک پارافینه کیست فولیکولار،

(H202)، ۰/۰۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شده همچنین به منظور حذف اتصالات غیراختصاصی آنتی‌بادی با آنتی‌ژن‌های بافتی، از معرف بلاکینگ شرکت Dako استفاده شد. در مرحله بعد، برشها با آنتی‌بادی منوکلنال (Clone BCL-2, Sotype: IgG, Kappa, Dako, Denmark) به مدت شصت دقیقه در اتاقک مرطوب انکوبه شده و بعد از شستشو با PBS، آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه شده (شرکت Dako) به مدت سی دقیقه در دمای آزمایشگاه اضافه گردید و بعد از شستشو با PBS، محلول Streptarvin- Horse Peroxidase به برشها اضافه شده و عمل شستشو با PBS بعد از سی دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه انجام شد و سپس کروموژن DAB (دی آمینوبنزیدین هیدروکلراید) به عنوان سوبسترای آنزیم به برشها اضافه گردید تا واکنش رنگی ایجاد شود. بعد از مرحله شستشو و توقف واکنش، از رنگ همتاکسیلین مایرز برای رنگ آمیزی زمینه استفاده شد. سپس عمل رطوبت‌گیری با درجات مختلف اتانل از رقیق به غلیظ ۱۰۰٪ انجام شد و برشها دو بار در گزین قرار داده شدند و در نهایت با لامل پوشیده شدند. به عنوان شاهد منفی از بافر PBS (PH 7.4) به جای آنتی‌بادی منوکلنال استفاده گردید و شاهد مثبت نیز داکتال کارسینوما پستان در نظر گرفته شد. همچنین جهت افزایش دقت مطالعه از ارتشاح لنفوسیت‌ها در بافت همبندی دیواره کیست به عنوان Internal Positive Control استفاده شد.

تمامی اسلایدهای رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری Olympus (B×41) با بزرگ نمایی چهار برابر مشاهده شدند. قسمتهایی از جدار کیست که شامل هزار سلول اپی تلیالی پشت سر هم در یک سطح بودند، انتخاب و شمارش تعداد سیتوپلاسم سلول‌های رنگ گرفته در کل ضخامت اپی تلیوم و به طور جداگانه در لایه‌های بازال (شامل طبقه بازال و دو ردیف بالای آن)، میانی (شامل سلول‌های گرد بزرگ که بین لایه بازال و سطحی هستند)، سطحی (شامل سلول‌های چند وجهی یا صاف شامل یک تا سه لایه که فقط زیر سطح اپی تلیوم هستند) اپی تلیوم جدار دو کیست انجام و با یکدیگر مقایسه شدند. به منظور جلوگیری از خطاهای شمارش کننده، هر مقطع دو بار شمرده شده و متعاقب آن شمارش سلولی توسط پاتولوژیست دیگر کنترل شد و در نهایت نتایج شمارش به صورت (انحراف معیار ± درصد

میانگین) محاسبه شد. در صورتی که بیشتر از ۱۰٪ سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی رنگ‌پذیر باشند، مثبت و کمتر از ۱۰٪ منفی در نظر گرفته شد. اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزاری آماری SPSS و آزمون Student- t test در دو کیست مذکور مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت اختلاف میانگین رنگ‌پذیری در لایه‌های مختلف اپی تلیوم هر کیست از آزمون آماری Chi-Square استفاده شد.

یافته‌ها

از بین چهل نمونه انتخاب شده در این بررسی، بیست مورد کیست فولیکولار (۱۳ مورد در جنس مذکر و هفت مورد در جنس مؤنث) و بیست مورد اندتوزنیک کراتوسیست (۱۴ مورد در جنس مذکر و شش مورد در جنس مؤنث) بود. سن بیماران در گروه کیست فولیکولار از ۱۰-۳۶ سال ($22/5 \pm 7$) و در گروه اندتوزنیک کراتوسیست از ۱۸-۶۴ سال ($35/1 \pm 13$) بود. از نظر محل آناتومیکی هشت مورد کیست فولیکولار در قدام فک بالا و ۱۲ مورد در فک تحتانی بودند. اندتوزنیک کراتوسیست ۱۶ مورد در فک تحتانی و چهار مورد فک بالا مشاهده شدند. همچنین تمامی اندتوزنیک کراتوسیست‌ها پاراکراتینیزه و غیرسندرمیک بودند.

در بررسی لام‌ها با روش ایمونوهیستوشیمی، در رنگ آمیزی با آنتی بادی BCL-2 رنگ قهوه‌ای یکنواخت در سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی لایه بازال اندتوزنیک کراتوسیست مشاهده شد. میانگین تعداد سلول‌های BCL-2 مثبت در ناحیه بازال اپی تلیوم پوشاننده اندتوزنیک کراتوسیست $1/4 \pm 9/5\%$ و در ناحیه میانی $3/2 \pm 12/1\%$ ولی در ناحیه سطحی عدم رنگ‌پذیری دیده شد. (شکل ۱) بین میانگین تعداد سلول‌های BCL-2 مثبت در لایه بازال و میانی و سطحی کیست مذکور اختلاف معنی‌داری وجود داشت. ($p < 0/001$)، به عبارتی دیگر تراکم بیشتری از سلول‌های BCL-2 مثبت در اپی تلیوم پوشاننده اندتوزنیک کراتوسیست در لایه بازال مشاهده شد. میانگین سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی دارای رنگ‌پذیری مثبت با نشانگر BCL-2 در کل ضخامت اپی تلیوم کیست $36/8 \pm 1/5\%$ بود. میانگین تعداد سلول‌های رنگ‌پذیر شده با BCL-2 در ناحیه بازال اپی تلیوم پوشاننده کیست فولیکولار $2/1 \pm 1/9\%$ بود ولی در لایه‌های میانی و سطحی عدم رنگ‌پذیری مشاهده

در مقایسه اپی تلیوم پوشاننده دو کیست (فولیکولار و کراتوسیست) اختلاف معنی‌داری بین میانگین تعداد سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی رنگ پذیر شده با BCL-2 در کل لایه‌های اپی تلیالی پوشاننده این دو کیست مشاهده شد. ($P < 0.001$) به این معنی که میانگین تعداد سلول‌های BCL-2 مثبت در اپی تلیوم پوشاننده ادنتوژنیک کراتوسیست بیشتر از کیست فولیکولار بود. (جدول ۱)

جدول ۱: رنگ پذیری با نشانگر BCL-2 در لایه‌های مختلف پوشش اپی تلیوم و کل ضخامت اپی تلیوم کیست فولیکولار (دنتی ژورس) و ادنتوژنیک کراتوسیست (انحراف معیار $\pm$ درصد میانگین)

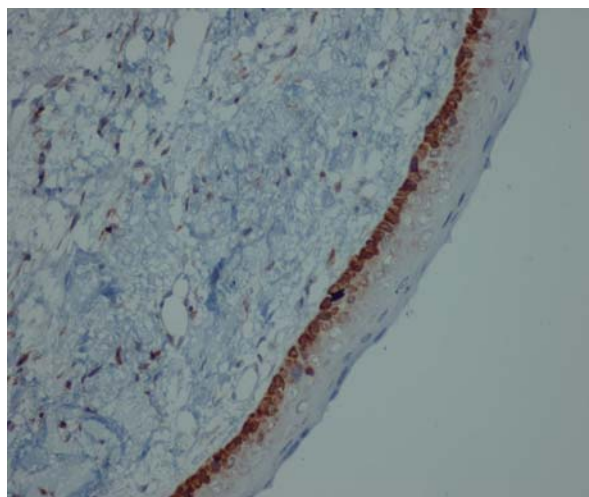
لایه‌های مختلف اپی تلیوم کیست	کیست فولیکولار	ادنتوژنیک کراتوسیست
لایه بازال	$2/1 \pm 1/9$ **	$98/5 \pm 1/4$ *
لایه میانی	**	$12/1 \pm 3/2$ *
لایه سطحی	**	*
کل ضخامت اپی تلیوم	$0/7 \pm 0/63$ ***	$36/8 \pm 1/5$ ***

* $P < 0.001$
** $P < 0.05$
*** $P < 0.001$

بحث

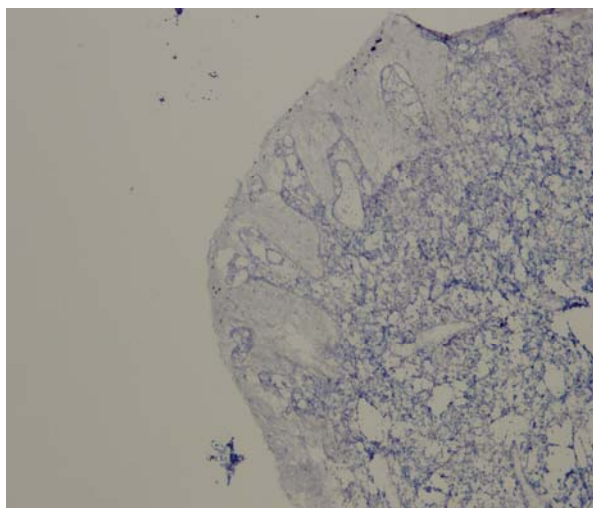
یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت ضد آپوپتوتیک در اپی تلیوم پوشاننده ادنتوژنیک کراتوسیست بیشتر از اپی تلیوم پوشاننده کیست فولیکولار است که نتایج مطالعه حاضر در توافق با نتایج Kichi و همکاران در دانشگاه Mokokoida ژاپن بوده که با بررسی عوامل پرولیفراسیون و مرتبط با آپوپتوز در ادنتوژنیک کراتوسیست و دنتی ژورس (فولیکولار) کیست مطرح کردند که شدت و میزان رنگ‌پذیری با BCL-2 در ادنتوژنیک کراتوسیست بیشتر از کیست دنتی ژورس بود. (۸)، در این مطالعه تفاوت فعالیت ضد آپوپتوتیک در ناحیه بازال ادنتوژنیک کراتوسیست $98/5 \pm 1/4$ بیشتر از لایه‌های میانی $12/1 \pm 3/2$ و سطحی (۰) بود.

Muzio و همکاران (۹) و Kichi و همکاران (۸) رنگ پذیری با BCL-2 را فقط محدود به لایه بازال ادنتوژنیک کراتوسیست گزارش کردند. اما Piatelli و همکاران (۴) و جهان‌شانی و همکاران (۱۰) رنگ پذیری با BCL-2 را در



شکل ۱: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر BCL-2 در ادنتوژنیک کراتوسیست ($\times 40$) رنگ‌پذیری سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی با نشانگر BCL-2

شد. (شکل ۲) چون در تمام موارد میانگین رنگ‌پذیری با BCL-2 در سیتوپلاسم سلول‌های لایه بازال، میانی و سطحی $10\% <$ بود، می‌توان مطرح کرد که هیچ کدام از لایه‌های اپی تلیالی کیست فولیکولار با نشانگر BCL-2 رنگ‌پذیری نشان ندادند. میانگین سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی رنگ‌پذیر شده با BCL-2 در کل ضخامت پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار $0/7 \pm 0/63$ بود.



شکل ۲: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر BCL-2 در کیست دانتی ژور ($\times 40$) عدم رنگ‌پذیری با نشانگر BCL-2 در کیست دانتی ژور ملتهب

لایه‌های بازال و میانی ادنتوزنیک کراتوسیست بیان کردند که در توافق با مطالعه حاضر می‌باشد. Kim و همکاران در توجیه عود و رفتار تهاجمی نوع چند حفره‌ای کراتوسیست در مقایسه با کیست فولیکولار از روش ایمونوهیستوشیمی و نشانگرهای پرولیفراتیو و آپوپتوتیک BCL-2 استفاده کردند که این نشانگرها به طور عمده در لایه‌های میانی و سطحی هر دو کیست مشاهده شدند و گزارش کردند که خروج ناکامل اپی تلیوم ادنتوزنیک کراتوسیست در حین جراحی بیشتر از عوامل مؤثر در رشد و آپوپتوز سلولی دلیل عمده رفتار تهاجمی نوع چند حفره‌ای آن می‌باشد. (۱۱) BCL-2 به طور نرمال در لایه سلول‌های Progenitor یا Stem Cell اپلی تلیالی بیان می‌شود. BCL-2 متوقف کننده آپوپتوز در مسیر تمایز بعد از میتوزی بوده و باعث افزایش طول عمر سلول‌های پیش ساز می‌شود. (۱۲-۱۳)

همچنین نقشهای مهمی در هموستاز نرمال، مورفوژنیز جنینی و انکوژنیز دارد. (۱۴-۱۵) بیان آن در بافتهای نرمال و بیمار ادنتوزنیک شامل جوانه دندانی، ادنتوزنیک کراتوسیست و آمولوبلاستوما (۱۶-۱۷) همچنین در کارسینوژنیز (۷) مشاهده شده است.

در مطالعه مذکور رنگ‌پذیری با BCL-2 در لایه‌های مختلف اپی تلیوم ادنتوزنیک کراتوسیست از لایه بازال به لایه‌های میانی و سطحی کاهش یافت که نشان‌دهنده آن است که رنگ‌پذیری با این نشانگر با درجه تمایز سلول‌های اپی تلیالی رابطه معکوس دارد به این معنی که با افزایش تمایز سلول‌های اپی تلیالی، میزان بیان نشانگر BCL-2 کاهش می‌یابد.

جهانشاهی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد بیان BCL-2 در بیست مورد ادنتوزنیک کراتوسیست، بیست مورد کیست دنتی ژورس و بیست مورد رادیکولار کیست با روش ایمونوهیستوشیمی تحقیق کردند که ۱۹ مورد از بیست نمونه کراتوسیست و یک نمونه از بیست مورد رادیکولار کیست و دنتی ژورس کیست رنگ‌پذیری مثبت با این نشانگر را مطرح کردند و ایمونو راکتیویتی با نشانگر BCL-2 را به طور عمده در لایه بازال و بعضاً بازال - سوپرابازال کراتوسیست گزارش کردند. (۱۰)، در مطالعه حاضر درصد رنگ‌پذیری با BCL-2 به طور جداگانه در لایه‌های بازال، میانی و سطحی و کل پوشش اپی تلیوم دو کیست محاسبه شد اما مطالعات دیگر (۴ و ۱۰) فقط رنگ‌پذیری BCL-2 را در

کل ضخامت اپی تلیوم کیست گزارش کردند. در این مطالعه عدم رنگ‌پذیری با BCL-2 در کیست فولیکولار مطرح شد اما در مطالعه جهانشاهی و همکاران (۱۰) در یک مورد کیست فولیکولار رنگ‌پذیری با نشانگر فوق مثبت بود.

رنگ‌پذیری با نشانگر BCL-2 در لایه سوپرابازال اپی تلیوم ادنتوزنیک کراتوسیست نشان‌دهنده پرولیفراسیون غیر معمول پوشش اپی تلیالی آن بوده و ممکن است بیانگر بی نظمی اپی تلیالی مشابه با دیسپلازی در اپی تلیوم اسکواموس دهانی باشد. (۴)، در این مطالعه همه ادنتوزنیک کراتوسیست‌ها پاراکراتینیزه و غیرسندرمیک بودند و حداقل معیار رنگ‌پذیری با نشانگر BCL-2 در سیتوپلاسم سلول‌های اپی تلیالی ۱۰٪ بود و کمتر از آن منفی در نظر گرفته می‌شد که در این موارد با گزارش Piatelli و همکاران (۴) در توافق می‌باشد اما Muzio و همکاران رنگ‌پذیری با BCL-2 را در انواع سندرمیک و غیرسندرمیک کراتوسیست بررسی کردند. (۹)

Piateelli و همکاران از نشانگر BCL-2 به عنوان مارکر کمک کننده در تمایز کراتوسیست از کیست‌های ادنتوزنیک دیگر نام بردند و بروز بیش از حد BCL-2 را دو لایه بازال ادنتوزنیک کراتوسیست به کنترل غیرنرمال چرخه سلولی نسبت دادند. (۴)، در مطالعه مذکور رنگ‌پذیری با BCL-2 در سیتو پلاسم سلول‌های لایه بازال ادنتوزنیک کراتوسیست بیشتر از فولیکولار کیست بود که خود بیان کننده آن است که آپوپتوز در لایه بازال اپی تلیوم ادنتوزنیک کراتوسیست اتفاق نمی‌افتد و نتایج به دست آمده در مورد رنگ‌پذیری با نشانگر BCL-2 در کیست‌های فولیکولار ضعیف بوده و عدم رنگ پذیری در نظر گرفته شده که در توافق با نتایج Tosios و همکاران بود. (۵)، میانگین رنگ‌پذیری با نشانگر BCL-2 در کل پوشش اپی تلیالی ادنتوزنیک کراتوسیست بیشتر از میانگین رنگ‌پذیری در کل پوشش اپی تلیوم کیست فولیکولار بود که این مورد به نوعی توجیه کننده تمایل به عود و رفتار تهاجمی کراتوسیست است. Shear و همکاران روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی را در مورد بیان نشانگرهای Ki67, P53, BCL-2, PCNA در کراتوسیست سندرمیک و غیرسندرمیک و کیست فولیکولار انجام داد و علت عود و رفتار تهاجمی کراتوسیست را با مطالعات دقیق ژنتیکی و پرولیفراسیون سلولی توجیه کردند که به نوعی در توافق با مطالعه حاضر می‌باشد. BCL-2 با جلوگیری کردن

نتیجه‌گیری

نشانگر BCL-2 در پاتوژنز ادنتوژنیک کراتوسیست نقش عمده‌ای داشته و از آنجا که فعالیت ضد آپتوتیک در ادنتوژنیک کراتوسیست بیشتر از کیست فولیکولار است به نوعی افزایش بیان این نشانگر باعث افزایش طول عمر سلول‌های اپی تلیالی شده و در عود بالای ادنتوژنیک کراتوسیست نقش دارد. همچنین می‌توان از پروتئین ضد آپتوتیک BCL-2 به عنوان روش کمکی در افتراق ادنتوژنیک کراتوسیست (کیست‌های با رفتار تهاجمی بالا) از کیست‌های ادنتوژنیک دیگر (با میزان عود کمتر) استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل که این پژوهش با حمایت مادی آن معاونت انجام شد و کلیه همکاران دخیل در راه‌اندازی آزمایشگاه ایمونوهیستوشیمی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از آقای دکتر علی بیژنی که محاسبات آماری تحقیق را بر عهده داشتند، سپاسگزاریم. از خانم گوران که در امور آزمایشگاهی ما را یاری کردند، قدردانی می‌گردد.

از آپتوتوز باعث تسهیل پرولیفراسیون سلولی در لایه بازال می‌گردد در حالی که آپتوتوز حفظ‌کننده هموستاز ضخامت پوشش اپی تلیالی است و باعث سنتز میزان بالای کراتین در لایه‌های سطحی ادنتوژنیک کراتوسیست می‌گردد که این سیستم خود باعث ایجاد تعادل بین پرولیفراسیون و مرگ سلولی در پوشش اپی تلیالی کیست می‌شود. سیستم هموستاز بین پرولیفراسیون و مرگ سلولی در پوشش اپی تلیالی کیست فولیکولار تشخیص داده شده است، اما به میزان کمتری در ادنتوژنیک کراتوسیست دیده می‌شود. (۸)، در این مطالعه از آنجا که تقریباً بیش از ۹۸٪ سلول‌های لایه بازال رنگ‌پذیری با نشانگر BCL-2 را نشان دادند و افزایش بیان این نشانگر باعث افزایش طول عمر سلول‌های اپی تلیالی بدون تأثیر بر روی پرولیفراسیون سلولی می‌شود. بنابراین به نوعی بیانگر رفتار تهاجمی ادنتوژنیک کراتوسیست نسبت به کیست فولیکولار می‌باشد.

از آنجا که در مطالعات ایمونوهیستوشیمی متد و روش کار به طور مؤثری بر روی نتایج مربوط به آزمایشها اثر دارد، شاید علت برخی از تفاوت‌های نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر مرتبط با شرایط متفاوت روش اجرا شامل PH مناسب جهت سیترات بافر، مدت زمان قرار دادن برشها در محلول پروکسید هیدروژن، رقت پراکسید هیدروژن، مدت زمان انکوباسیون آنتی بادی اولیه در اتوکلاو و نوع آنتی بادی استفاده شده باشد.

REFERENCES

1. Neville BW, Dam DD, Allen CM, Bougaot JE. Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia:WB Saunders; 2002, 590-91.
2. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology clinical pathologic correlations. 4th ed. USA:WB Saunders; 2003, 250.
3. Shear M. The Aggressive nature of odontogenic keratocyst is it a benign cystic neoplasm? Part 2: Proliferation and genetic studies. Oral Oncology 2002 Jun; 38 (4): 323-31.
4. Piatelli A, Fomni M, Rubini C. Differentiation of odontogenic keratocyst from other odontogenic cysts by the expression of BCL 2 immunoreactivity. Oral Oncology 1998 Sep; 34(5):404-407.
5. Tosis KI, Kakarantza- Angelopolon E, Kapranos N. Immunohistochemical study of BCL 2 protein, Ki67 antigen and P53 protein in epithelium of glandular odontogenic cyst and dentigerous cyst. J Oral Pathol Med. 2000 Mar; 29 (3):139-44.
6. Robbins S, Cotran Rs, Kumar V, Collins T. Pathologic basis of disease. 6th ed. [S.L]:WB Saunders; 1999, 22.

7. Lomuzio L, Mignogna MD, Pannone G, Rubini C, Grassi R, Nocini PF. Expression of BCL 2 in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study of 90 cases with clinico- pathological correlations. *Oncol Rep.* 2003 March; 10(2):285-91.
8. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factor in odontogenic keratocysts and in dentigerous cyst. *J Oral Pathol Med.* 2005 May; 34(5):280-60.
9. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Bucci P, Nocini PF, Bucci E, et al. Expression of cell cycle and apoptosis related proteins in sporadic odontogenic, keratocyst and odontogenic keratocysts associated nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res.* 1999 Jul; 78 (7): 1345-53.
10. Jahanshahi Gh, Talebi A, Shirvani A. Expression of Bcl-2 in the epithelial lining of odontogenic keratocysts. *J of Dentistry, Tehran Univ of Medical Sciences.* 2006 Nov; 3(1), 30-35.
11. Kim DK, Ahn SG, Kim J, Yoon JH. Comparative ki67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. *Yonsei Med J.* 2003 Oct; 44 (5): 841-463.
12. Vaux DL, Cory S, Adams JM. BCL 2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with C- myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988 Sep; 335 (6189):440-2.
13. Jockenbergh D, Nues G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. BCL 2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990 Nov; 384 (6299): 334-6.
14. Lebrun DP, Wornke RA, Cleary ML. Expression of BCL 2 in fetal tissue suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol.* 1993 Mar; 142 (3):743-53.
15. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The BCL 2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol.* 1995 Jan; 146(1):20-6.
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. 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.