

## بررسی ایمونوهیستوشیمیایی آنتی ژن Ki-67 و پروتئین‌های MCM3 و p27 در آملوبلاستوما

فاطمه شاهسواری\*، اسامه قاسمی\*\*، محمود حبیب زاده\*\*\*، نسیم قشلاقی آذر\*\*\*\*

\* استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گیلان و دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران  
 \*\* دندانپزشک  
 \*\*\* استادیار آسیب شناسی، آزمایشگاه رازی رشت  
 \*\*\*\* گروه اندودانتیکس، مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گیلان

### چکیده

**بیان مساله:** آملوبلاستوما توموری است، که به طور موضعی مهاجم است و همیشه مورد توجه پژوهشگران بوده تا رفتار زیست شناختی آن را بهتر بشناسند. یکی از نشانگرهایی که به تازگی توسط پژوهشگران در زمینه‌ی زیست شناختی سرطان‌ها مطرح شده، Minichromosome Maintenance 3 است، که بیان بیشتر از اندازه‌ی آن در سرطان‌های گوناگون گزارش شده اما پژوهشی در مورد MCM3 بر روی آملوبلاستوما انجام نگرفته است.

**هدف:** هدف از این پژوهش، بررسی بیان MCM3، Ki-67 و p27 در آملوبلاستوما بود.

**مواد و روش:** در این بررسی توصیفی تحلیلی ۱۸ مورد آملوبلاستوما از بایگانی انتخاب گردیدند. اطلاعات بالینی - آسیب شناسی از پرونده‌ها استخراج و مقاطع لازم از بلوک‌ها فراهم و رنگ‌آمیزی نشانگرهای Ki-67، p27 و MCM3 انجام شد. سلول‌های رنگ گرفته در 10HPF (High Power Field) شمارش و Labeling Index (LI) ارزیابی گردید. سطح‌های رنگ‌پذیری به چهار گروه شدید ( $LI > 50$ )، متوسط ( $25 < LI \leq 50$ )، ضعیف ( $5 < LI \leq 25$ ) و منفی ( $LI \leq 5$ ) رده‌بندی شدند. محاسبه‌های آماری با نرم افزار SPSS ۱۳ و آزمون‌های رگرسیون رتبه‌ای و فریدمن (Freidman) انجام و  $p < 0/05$  معنادار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** در مورد Ki-67، پنج نمونه (۲۷/۸ درصد) منفی و ۱۳ نمونه (۷۲/۲ درصد) ضعیف رنگ گرفتند و Ki-67 بیشتر در لایه‌ی آملوبلاستی دیده شد. در مورد p27، پنج نمونه (۲۷/۸ درصد) منفی، ۱۱ نمونه (۶۱/۱ درصد) ضعیف و دو نمونه (۱۱/۱ درصد) رنگ‌پذیری متوسط را نشان دادند و p27 بیشتر در سلول‌های رتیکولوم ستاره‌ای دیده شد. هیچ یک از نمونه‌ها با MCM3 رنگ نگرفت. از نظر آماری میان بیان این پروتئین‌ها در آملوبلاستوما تفاوت دیده شد، اما میان سن، جنس و اندازه‌ی تومور با هیچ یک از پروتئین‌ها پیوند معنادار یافت نگردید.

**نتیجه‌گیری:** با بیان ضعیف Ki-67 و p27 نمی‌توان نتیجه‌ی قطعی گرفت، که آسیب‌های ما چه رفتار زیست شناختی خواهند داشت، زیرا نبود p27 و یا ضعیف رنگ گرفتن آن برعکس Ki-67 به نفع تکثیر سلولی است و اثبات این موضوع که آیا تومور رفتار تهاجمی و عود خواهد داشت یا خیر، نیاز به بررسی‌های نشانگرهای بیشتر و نیز پی گیری بیماران در بالین دارد. با منفی شدن همه‌ی نمونه‌ها برای MCM3، به نظر می‌رسد که MCM3 در پاتوژنز آملوبلاستوما نقشی نداشته باشد.

**واژگان کلیدی:** آملوبلاستوما، Ki-67، p27، MCM3، ایمونوهیستوشیمی، نشانگرهای زیستی، یونی سیستیک آملوبلاستوما

## درآمد

رفتار زیست‌شناختی هر آسیب، عاملی مهم در تعیین روند و روش درمان آن آسیب است. بدبختانه به علت وجود محدودیت‌های فراوان در شناخت دقیق رفتار زیست‌شناختی هر آسیب، نه می‌توان روند آسیب را پیش‌بینی نمود و نه به درمان دقیق و اختصاصی برای آن آسیب پرداخت. با پیشرفت‌هایی که به تازگی در علم زیست‌شناسی سلولی و مولکولی شده است، دانشمندان در پی بررسی ریز مولکولی در آسیب‌های گوناگون و در نهایت به دنبال درمان ویژه برای آن آسیب هستند. جالب و پر اهمیت آن است، که نتایج این بررسی‌ها نه تنها در امر درمان موثر بوده، بلکه می‌تواند در امر تشخیص این آسیب‌ها نیز مفید واقع شود.

به کمک ایمونوهیستوشیمی می‌توان پروتئین‌های موثر در چرخه‌ی سلولی را بررسی کرد. از میان این پروتئین‌ها p27 عضوی از خانواده‌ی مهار کننده‌ی یونیورسال سایکلین‌های وابسته به کیناز (CDK) است، که در سال ۱۹۹۴ به عنوان یک عضو تازه از این خانواده شناخته شد<sup>(۱، ۲)</sup>. این پروتئین مانع گذر سلول از فاز G<sub>1</sub> به S می‌شود<sup>(۳)</sup>. در مورد بیان p27، بررسی‌های زیادی انجام گرفته است و در بیشتر بررسی‌ها کاهش آن در تومورهای بدخیم گزارش شده<sup>(۴)</sup> و حضور آن نشان دهنده‌ی تمایز سلولی بوده و در افتراق تومورهای خوش خیم و بدخیمی که نمای میکروسکوپی همانندی دارند نیز می‌تواند کمک کننده باشد<sup>(۵)</sup>.

یکی دیگر از نشانگرهایی که به تازگی توسط پژوهشگران در زمینه‌ی زیست‌شناسی سرطان‌ها مطرح شده، مینی کروموزم مینتانتس MCM3 (Minichromosome Maintenance3) است که عاملی بنیادین در آغاز نسخه‌برداری DNA بوده<sup>(۶، ۷)</sup> و در آغاز با عنوان پروتئین‌های مورد نیاز برای نسخه‌برداری در ساکارومایسس سرویزیا (*Saccaromyces cerevisiae*) شناسایی گردیدند. کلاس‌های همانندی از این پروتئین در مورین (Murine)، زنبوبوس (*Xenopus*) و سلول‌های انسانی یافت شده‌اند<sup>(۸-۱۲)</sup>. در انتقال فاز G<sub>1</sub> به S نسخه‌برداری DNA توسط کینازهای وابسته به سایکلین فاز S و Cdc7 آغاز می‌شود. این پروتئین‌ها آهسته از کروماتین جدا شده و فاز S جلو می‌رود. این جداشدن سبب می‌شود، که نسخه برداری تنها یک بار در چرخه‌ی سلولی رخ دهد. این پروتئین‌ها در طول چرخه‌ی سلولی برجا مانده و پس از ورود سلول به استراحت (G<sub>0</sub>) یا مرحله‌ی تمایز نهایی در بافت از میان می‌روند<sup>(۱۳-۱۶)</sup>. بیان بیشتر از اندازه‌ی این پروتئین در

سرطان‌های گوناگون انسانی همچون لوکمی، لنفوما، کارسینوما، گردن رحم، کولون، ریه، معده، کلیه، پستان و ملانوم بدخیم گزارش شده است<sup>(۱۷)</sup>.

یکی دیگر از شناخته شده‌ترین پروتئین‌های در پیوند با چرخه‌ی سلولی که در آسیب‌شناسی تشخیصی استفاده می‌شود Ki-67 است، که در سلول‌های در حال تکثیر ظاهر می‌شود، اما زمانی که سلول وارد حالت استراحت می‌شود به سرعت ناپدید می‌گردد. از این خصوصیت به گونه‌ی گسترده در آسیب‌شناسی و بررسی‌های سرطان برای برآورد و تعیین تقسیم رشدی در یک جمعیت سلولی استفاده می‌شود. بررسی‌های بالینی این آنتی ژن را به عنوان یک نشانگر پروگنوستیک جداگانه در بسیاری از نئوپلاسم‌های گوناگون انسانی نشان داده‌اند<sup>(۱۸ و ۱۹)</sup>.

MCM3 و Ki-67 در سلول‌های در حال تکثیر بیان می‌شوند ولی تنظیم منفی (Down-regulation) این پروتئین دیرتر از Ki-67 انجام می‌گیرد و مثبت شدن آن در سلولی که Ki-67 آن منفی شده نشانه‌ی آن است که سلول وارد مرحله‌ی استراحت گردیده که می‌تواند دوباره وارد چرخه‌ی سلولی شده، Ki-67 آن مثبت شود و یا تمایز یافته‌ی p27 آن مثبت گردد. از سویی، بررسی هم زمان Ki-67 و p27 می‌تواند در تعیین رفتار آسیب‌ها کمک کننده باشد، در حالی که بررسی یک عامل به تنهایی می‌تواند گمراه کننده باشد. برای نمونه در مدولای آدرنال طبیعی درصد رنگ‌پذیری برای Ki-67 همانند نوروبلاستوماست، در حالی که تفاوت عمده‌ای در درصد رنگ‌پذیری p27 در آن‌ها دیده می‌شود، پس بررسی هم زمان این پروتئین‌ها می‌تواند ارزش تشخیصی و درمانی هم داشته باشد<sup>(۲۰)</sup>. تومورهای ادنتوژنیک از آن دسته آسیب‌هایی هستند، که در روند حرفه‌ی دندانپزشکی ممکن است با آن‌ها برخورد شود. در راس این تومورها آملوبلاستوما قرار دارد، که شایع‌ترین تومور اپی‌تلیالی ادنتوژنیک است که خوش خیم اما در جایگاه قرارگیری مهاجم بوده و به درمان گسترده‌تری نیاز دارد و به همین علت بیشتر مورد توجه پژوهشگران است<sup>(۲۱)</sup>.

با توجه به بررسی‌های انجام شده با استفاده از منابع موجود، پژوهشی در مورد بیان MCM3 بر روی آملوبلاستوما انجام نگرفته است، از این رو آن را در این پژوهش بررسی کرده و هم زمان Ki-67 (عامل شناخته شده که تکثیر سلولی را نشان می‌دهد) و p27 (عامل شناخته شده که تمایز را نشان می‌دهد) نیز، بررسی گردیدند.

## مواد و روش

در این پژوهش توصیفی و تحلیلی، پرونده‌ی بیماران مبتلا به آمولوبلاستوما طی یک دوره هفت ساله (۱۳۷۹ تا ۱۳۸۶) از بایگانی آسیب‌شناسی آزمایشگاه رازی رشت و دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران بررسی گردید و شمار ۱۸ عدد بلوک پارافینه برای بررسی ایمنوهیستوشیمی انتخاب شدند. نمونه‌هایی که خصوصیات میکروسکوپی آمولوبلاستوما را داشتند<sup>(۲۱)</sup> و آسیب به گونه‌ی کامل بیرون آورده شده بود وارد بررسی گردید و نمونه‌های مشکوک از نظر تشخیص، با ثبوت نامناسب و دارای خونریزی، نکروز و آماس فراوان کنار گذاشته شدند. اطلاعات بیماران همچون سن، جنس، جا و اندازه‌ی آسیب از پرونده‌ی آن‌ها استخراج شدند. از همه‌ی بلوک‌های پارافینه دوباره لام هماتوکسیلین-انئوزین (Hematoxylin & Eosin: H&E) فراهم و بررسی گردید.

در این بررسی، ۱۸ نمونه از بلوک‌های پارافینه (۱۲ مورد آمولوبلاستوما و ۶ مورد یونی سیستمیک آمولوبلاستوما) انتخاب شدند. بررسی ایمنوهیستوشیمی نمونه‌های یاد شده، 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 (MIB1-Dako Denmark) انجام گرفت. روش رنگ آمیزی برای نمونه‌ها به گونه‌ی زیر انجام گردید: ۱- برش ۳ میکرونی از بلوک‌های مربوط به لام انتخابی، روی لام‌های آماده شده انجام شد. ۲- لام‌ها در فور ۷۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه قرار دادند (پارافین زدایی). ۳- لام‌ها در دو ظرف گزیرول هر یک به مدت ۵ دقیقه و دو ظرف الکل مطلق هر یک به مدت ۵ دقیقه و دو ظرف الکل ۹۶ درصد هر یک به مدت ۲ دقیقه قرار دادند. ۴- مرحله‌ی آشکار سازی آنتی‌ژن (Antigen retrieval): لام‌ها را در درون بافرسیترات (Citrate/ HCL Buffer 10 mMol) با PH=۶/۰ برده و به مدت ۱ ساعت در بن ماری جوش قرار داده شد. (نمونه‌های مربوط به p27 در محلول Tris / HCL Buffer با PH=۹/۰ به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو قرار گرفتند). ۵- لام‌ها درون بافر فسفات قرار داده و سپس بیرون آورده و روی آن‌ها آب اکسیژنه‌ی ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ریخته شد. ۶- شست و شوی دوباره با بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) انجام گردید. ۷- پرایمر آنتی بادی‌ها به مدت ۶۰ دقیقه روی لام‌ها ریخته شد.

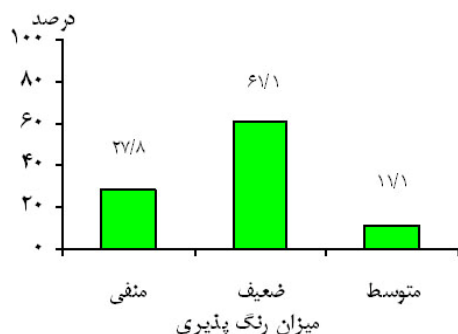
غلظت آنتی بادی، MCM3 و p27 ۵۰:۱ بود و آنتی‌بادی (Ki-67/MIB1) از پیش آماده گردیده بود. ۸- پس از این مرحله لام‌ها با PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته و خشک گردیدند و به مدت یک ساعت محلول (Envision+ Dual link system peroxidase) ریخته شد. ۹- شست و شوی لام‌ها در بافر فسفات انجام گردید. ۱۰- DAB (3,3 Diamino Benziedine Hydrochloride) به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی لام‌ها ریخته شد (کروموزن). ۱۱- شست و شو با آب مقطر انجام گردید. ۱۲- برای رنگ آمیزی زمینه، لام‌ها درون هماتوکسیلین برده شد. ۱۳- مراحل آب‌گیری (بردن در الکل) انجام گردید. ۱۴- جهت شفاف سازی لام‌ها در گزیرول قرار داده شدند. ۱۵- قرار دادن لامل و چسباندن لام‌ها با چسب ویژه‌ی به منظور بررسی ایمنوهیستوشیمی انجام گرفت.

در هر دور انجام ایمنوهیستوشیمی، شاهد مثبت (نمونه‌ی لوزه برای p27 و MCM3 و نمونه‌ی کارسینوم پستان برای Ki-67) و شاهد منفی (از میان بردن آنتی بادی آغازین) به کار برده شدند. هسته‌ی سلول‌های رنگ گرفته با آنتی بادی‌ها (هسته‌های قهوه‌ای شده) مثبت در نظر گرفته شدند. شمار سلول‌های رنگ شده با Ki-67، p27 و MCM3 با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus CX21 و درشت‌نمایی ۴۰۰ در ۱۰۰۰ سلول شمرده شده و بر پایه‌ی درصد سلول‌های رنگ گرفته (Labeling Index : LI) به ۴ درجه‌ی شدید ( $LI > 50$ )، متوسط ( $25 < LI \leq 50$ )، ضعیف ( $5 < LI \leq 25$ ) و منفی ( $LI \leq 5$ ) بخش گردیدند<sup>(۵)</sup>. اندازه‌ی تومورها به دو دسته‌ی کمتر و مساوی ۲ سانتی‌متر و بیشتر از ۲ سانتی‌متر و سن بیماران نیز به دو رده‌ی سنی کمتر از ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال بخش گردید.

ارزیابی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 13 و آزمون‌های رگرسیون رتبه‌ای (برای مقایسه‌ی توزیع فراوانی نشانگرها به تفکیک سن، جنس و اندازه‌ی تومور) و فریدمن (برای مقایسه‌ی توزیع فراوانی سه نشانگر) انجام و  $p < 0.05$  معنادار انگاشته شد.

## یافته‌ها

جنبه‌های بالینی: از ۱۸ نمونه، ۹ بیمار مرد (۵۰ درصد) و ۹ بیمار زن (۵۰ درصد) بودند. گروه سنی بیماران از ۹ تا ۷۵ سال با متوسط سنی ۳۰/۶۱ سال بود. همه‌ی نمونه‌ها مربوط به فک پایین بودند.



**نمودار ۲:** توزیع فراوانی سطوح رنگ پذیری نشانگر p27 در نمونه‌های مورد بررسی



**نمودار ۱:** توزیع فراوانی سطوح رنگ پذیری نشانگر Ki-67 در نمونه‌های مورد بررسی

رنگ پذیری ضعیف تا منفی (یک مورال آمولبلاستوما رنگ پذیری منفی) و بیشتر آمولبلاستوماهای توپر (۸ مورد) رنگ پذیری ضعیف نشان دادند.

**MCM3:** از نظر رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نمونه‌ها جهت پروتئین MCM3، ۱۸ مورد (۱۰۰ درصد) نمونه‌ها رنگ‌پذیری منفی را نشان دادند (نمودار ۳ و نگاره‌ی ۲).

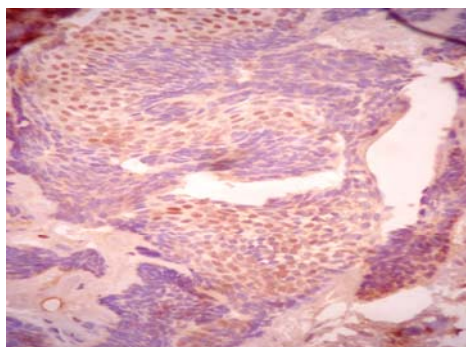
بیان این پروتئین‌های گوناگون در آمولبلاستوما از نظر آماری معنادار بود ( $p < 0/0001$ ). هیچ یک از نمونه‌ها با MCM3 رنگ نپذیرفت در حالی که نمونه‌های آمولبلاستوما با p27 و Ki-67 رنگ گرفتند. ارتباط میان شدت رنگ‌پذیری Ki-67 و p27 از نظر آماری معنادار نبود ( $p = 0/504$ ).

ارتباط میان جنس، سن، اندازه‌ی آسیب (بزرگترین بعد بر پایه‌ی سانتی‌متر) با شدت رنگ‌پذیری Ki-67، p27 و MCM3 توسط آزمون رگرسیون رتبه‌ای بررسی گردیدند و از نظر آماری پیوند معنادار میان جنس، سن، اندازه‌ی آسیب (بزرگترین بعد بر پایه‌ی سانتی‌متر) با هیچ یک از نشانگرها یافت نشد. شدت رنگ‌پذیری میان نمونه‌های آمولبلاستومای توپر و یونی سیستیک

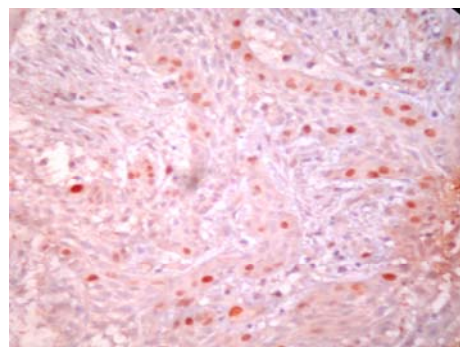
**جنبه‌های بافت شناسی:** همه‌ی نمونه‌ها از نظر میکروسکوپی هماهنگ با معیارهای یاد شده بودند. نمونه‌های آمولبلاستوما شامل آمولبلاستومای پلکسی فرم و فولیکولر بودند. نمونه‌های یونی سیستیک آمولبلاستوما به جز یک مورد مورال آمولبلاستوما همگی لومینال گزارش شد.

**جنبه‌های ایمونوهیستوشیمی Ki-67:** از نظر رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای نشانگر Ki-67، ۵ مورد (۲۷/۸ درصد) منفی و ۱۳ مورد (۷۲/۲ درصد) رنگ‌پذیری ضعیف را نشان دادند (نمودار ۱). مثبت شدن سلول‌ها عمدتاً در لایه‌ی شبه آمولبلاستی دیده شد (نگاره‌ی ۱-الف). بیان Ki-67 در شکل فولیکولر آمولبلاستوما بیشتر از گونه‌های پلکسی فرم بود، اما اختلاف آماری معنادار نبود. **p27:** از نظر رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای پروتئین p27، ۵ مورد (۲۷/۸ درصد) از نمونه‌ها منفی، ۱۱ مورد (۶۱/۱ درصد) ضعیف و دو مورد (۱۱/۱ درصد) رنگ‌پذیری متوسط را نشان دادند (نمودار ۲). سلول‌های رنگ شده با p27 عمدتاً در رتیکولوم ستاره‌ای دیده شدند (نگاره‌ی ۱-ب).

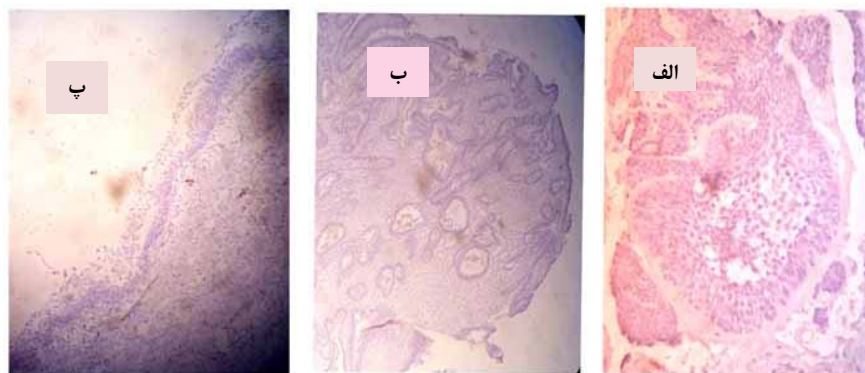
در این بررسی، ۶ مورد یونی سیستیک آمولبلاستوما



**نگاره‌ی ۱-ب:** آمولبلاستومای فولیکولر با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر، مثبت شدن هسته‌ها با p27 در وسط جزایر تومورال دیده می‌شود.



**نگاره‌ی ۱-الف:** آمولبلاستومای پلکسی فرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر، مثبت شدن هسته‌ها با Ki-67 در لایه‌ی آمولبلاستی دیده می‌شود.



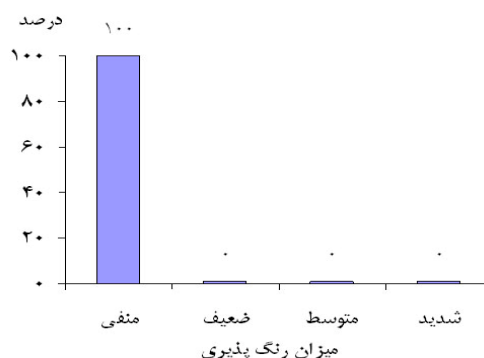
**نگاره‌ی ۲-الف:** آملوبلاستومای فولیکولر، **ب:** آملوبلاستومای پلکسی فرم، **پ:** یونی سیستیک آملوبلاستوما با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر (در هیچ یک از نگاره‌ها هسته‌ها با MCM3 رنگ نگرفته‌اند)

در جدول ۱ آمده است. شدت رنگ‌پذیری هیچ یک از نشانگرها میان نمونه‌های آملوبلاستومای توپر و یونی سیستیک تفاوت معنادار نداشت.

### بحث

آملوبلاستوما به دلیل رفتار مهاجم و ویژگی‌های زیست‌شناختی ویژه‌ی خود<sup>(۲۱)</sup> همواره هدف بررسی‌های پژوهشگران بی‌شماری بوده است. از گذشته تا امروز بررسی‌های گوناگونی در مورد توانایی رشدی آملوبلاستوما انجام شده و عوامل بسیاری را در این مساله دخیل دانسته‌اند.

تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد اهمیت پیش‌آگهی دهنده و تشخیصی p27 در آسیب‌های گوناگون انجام گرفته است. تقریباً همه‌ی بررسی‌ها کاهش p27 را در تومورهای پیشرفته‌تر گزارش نموده‌اند یا به بیانی دیگر p27 را عمدتاً در تومورهایی که تمایز بهتری دارند یافته‌اند<sup>(۲۲)</sup>. بسیاری از بررسی‌ها استفاده از p27 را به عنوان نشانگر تشخیصی و پیش‌بینی کننده اثبات کرده‌اند. در بیشتر پژوهش‌ها داده‌های بالینی آسیب‌شناسی نیز مورد بررسی قرار گرفته و اثر ماندگاری پیش‌بینی‌کننده‌ی p27، بررسی گردیده و نتایج نسبتاً همانندی در تومورهای گوناگون آرایه شده است<sup>(۲۳-۲۵)</sup>. بیشترین نشانگر تکثیر که در بررسی‌ها استفاده شده‌اند PCNA و Ki-67 است. بیان Ki-67 به گونه‌ی ویژه جهت تشخیص چندین سرطان انسانی همچون لنفومای غیرهوچکین، سرطان پروستات، مننژیوماها، سرطان سینه و سارکوماهای بافت نرم و سرطان‌های غدد بزاقی استفاده می‌شود<sup>(۲۶-۲۸)</sup>. نتایج بررسی نشان داد، که میان بیان این سه پروتئین تفاوت معنادار وجود دارد. رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی نشان داد، که Ki-67 و p27 در



**نمودار ۳:** توزیع فراوانی سطوح رنگ‌پذیری نشانگر MCM3 در نمونه‌های مورد بررسی

**جدول ۱:** توزیع فراوانی سطوح رنگ‌پذیری Ki-67، p27 و MCM3 در آملوبلاستومای توپر و یونی سیستیک آملوبلاستوما

نشانگر	گونه‌ی تومور رنگ‌پذیری	آملوبلاستومای توپر شمار (درصد)	آملوبلاستومای یونی سیستیک شمار (درصد)
p27	منفی	۲ (۱۶/۷)	۳ (۵۰)
	ضعیف	۸ (۶۶/۷)	۳ (۵۰)
	متوسط	۲ (۱۶/۷)	۰
	شدید	۰	۰
	جمع	۱۲ (۱۰۰)	۶ (۱۰۰)
Ki-67	منفی	۳ (۳۳/۳)	۲ (۳۳/۳)
	ضعیف	۹ (۶۶/۶)	۴ (۶۶/۶)
	متوسط	۰	۰
	شدید	۰	۰
	جمع	۱۲ (۱۰۰)	۶ (۱۰۰)
MCM3	منفی	۱۲ (۱۰۰)	۱۲ (۱۰۰)
	ضعیف	۰	۰
	متوسط	۰	۰
	شدید	۰	۰
	جمع	۱۲ (۱۰۰)	۶ (۱۰۰)

ندادند، اما جای بیان آن‌ها متفاوت بود. در اینجا چون رفتار بالینی آسیب‌ها بررسی نگردیده این پیوند شدنی نبود. نتایج بررسی کوماموتو (Kumamoto) و همکاران<sup>(۳۱)</sup> نیز، نشان داد که بیان پروتئین p27 عمدتاً در سلول‌های پلی‌هیدرال مرکزی و سلول‌های کراتینیزه در جوانه‌ی دندان‌ی و آمولبلاستوما است، که همانند یافته‌های بررسی کنونی بود. روی هم رفته، با توجه به منابع به نظر می‌رسد که در آمولبلاستوما در مقایسه با جوانه‌ی دندان‌ی چرخه‌ی تکثیر سلولی زیر اثر مهارکننده‌های کینازی وابسته به سایکلین (CDKI) است<sup>(۳۱)</sup>. در این پژوهش نیز، p27 که یک مهارکننده‌ی سایکلین‌های وابسته به کیناز است بررسی گردید و نتایج همانند نشان داده شد. از آن جایی که آسیب‌های پژوهش کنونی در دو دسته گونه‌ی توپر آمولبلاستوما و یونی سیستیک آمولبلاستوما قرار داشتند. بررسی بیان این نشانگرها به تفکیک نیز انجام شد و نتایج نشان داد، که بیان این نشانگرها در دو گروه تفاوتی نداشتند. لی (Li) و همکاران<sup>(۳۹)</sup> بیان نمودند، که Ki-67 در مناطق گوناگون یونی سیستیک آمولبلاستوما متفاوت بوده و در گونه‌ی مورال بیشتر بود. بدبختانه در نمونه‌های پژوهش کنونی، بررسی آن شدنی نبود، زیرا تنها ۶ مورد یونی سیستیک آمولبلاستوما در دسترس قرار داشت، که یک مورد مورال (با رنگ‌پذیری منفی برای Ki-67) بود و مقایسه‌ی نتایج ارزش آماری نداشت. لی و همکاران<sup>(۳۹)</sup>، بیان Ki-67 را در آمولبلاستومای توپر بیشتر از شکل کیستیک گزارش نمودند، اما در بررسی کنونی تفاوتی میان آمولبلاستومای توپر و یونی سیستیک دیده نشد.

در مورد p27 نیز، تفاوتی میان یونی سیستیک آمولبلاستوما (UA) و آمولبلاستومای توپر دیده نشد. در این بررسی، ۶ مورد UA رنگ‌پذیری منفی تا ضعیف نشان دادند. تنها یک مورد مورال آمولبلاستوما رنگ‌پذیری منفی داشت. بیشتر آمولبلاستوماها (۸ مورد) رنگ‌پذیری ضعیف نشان دادند. از آن جایی که بیان بیشتر p27 با تمایز بیشتر و پیش‌آگهی بهتر همراه بوده کاهش یا منفی بودن آن به نفع تکثیر سلولی است. در این بررسی، بیشتر آسیب‌ها با نسبت ۱۶ به ۱۸ رنگ‌پذیری منفی یا ضعیف داشتند که اگر نتایج تنها بر پایه‌ی p27 ارزیابی شود، پیش‌بینی می‌شود که رفتار تهاجمی داشته باشند. با توجه به بیان ضعیف p27 بر آورده می‌شود که این آسیب‌ها رشد تکثیری داشته باشند اما در مقایسه با Ki-67 که بیان کمی را نشان داد روی هم رفته نمی‌توان رفتار این آسیب‌ها را کاملاً پیش‌بینی نمود. Ki-67،

تومورهای مورد بررسی مثبت شدند، اما MCM3 در هیچ یک از نمونه‌ها رنگ نگرفت. در مورد MCM3 با توجه به نتایج این بررسی به نظر می‌رسد، که این پروتئین در روند ایجاد آمولبلاستوما نقشی نداشته باشد. در مورد Ki-67، مثبت شدن سلول‌ها عمدتاً در لایه‌ی آمولبلاستی دیده شد (نگاره‌ی ۱)، که این نتایج همانند نتایج پژوهشگران پیشین است<sup>(۳۰، ۳۹)</sup>. علت بیان بیشتر نشانگر Ki-67 در این ناحیه را می‌توان به تکثیر سلول‌های شبه‌آمولبلاست در این تومور نسبت داد، به بیانی دیگر می‌توان گفت که این سلول‌ها در حال تکثیر هستند.

اونگوتی (Ong'uti) و همکاران<sup>(۳۰)</sup> گزارش نمودند، که Ki-67 در شکل فولیکولر آمولبلاستوما بیشتر از گونه‌های پلکسی فرم و آکانتوماتوز است. در بررسی کنونی هر چند این اختلاف دیده شد، اما از نظر آماری تفاوت معنادار گزارش نگردید. ممکن است این یافته تایید کننده‌ی این مطلب باشد، که گونه‌های میکروسکوپی آمولبلاستوما اثری بر روی رفتار بالینی و درمان ندارد.

از سویی نتایج این بررسی نشان داد که سلول‌های رنگ شده با p27 عمدتاً در رتیکولوم ستاره‌ای دیده شدند (نگاره‌ی ۲)، همان‌گونه که در بررسی‌های پیشین این پروتئین بیشتر در تومورهای تمایز یافته تر یافت شده بود<sup>(۳۰، ۳۹)</sup>. در اینجا نیز دیده شدن این پروتئین در لایه‌ی رتیکولوم ستاره‌ای تایید کننده‌ی این مطلب است، که سلول‌های این لایه تمایز بیشتری را نشان می‌دهند. این همان چیزی است، که به نظر می‌رسد در روند طبیعی رشد اپی تلیالی نیز وجود داشته باشد، یعنی سلول‌های طبقات بالاتر تمایز بیشتری از سلول‌های طبقات پایین‌تر دارند. با کنار هم قرار دادن این یافته (بیان بیشتر p27 در رتیکولوم ستاره‌ای) و بیان بیشتر Ki-67 در لایه‌ی شبه‌آمولبلاست شاید بتوان نتیجه گرفت، که سلول‌های تکثیر شونده در این تومور لایه‌ی شبه‌آمولبلاستی است و تمایز بیشتر آنها خود را به گونه‌ی رتیکولوم ستاره‌ای نشان می‌دهد.

تومورهایی که پروتئین p27 را بیشتر بیان می‌کنند در بالین رفتار تهاجمی کم‌تر خواهند داشت. البته همان‌گونه که در پیش بیان شد، بررسی p27 در کنار Ki-67 می‌تواند کمک کننده‌تر باشد. بدبختانه در بررسی کنونی به علت محدودیت‌های موجود، رفتار بالینی و عود بعدی آسیب‌ها بررسی نگردیده است. گرچه در بررسی کنونی، میزان بیان Ki-67 و p27 تفاوت معنادار را نشان

### نتیجه گیری

از آن جایی که بیشتر نمونه‌ها هم با Ki-67 و هم با p27 به گونه‌ی ضعیف رنگ گرفتند نمی‌توان نتیجه‌ی قطعی گرفت، که آسیب‌های بررسی کنونی چه رفتاری خواهند داشت. زیرا نبود p27 و با ضعیف رنگ گرفتن آن به نفع تکثیر سلولی بوده و بر عکس، ضعیف رنگ گرفتن با Ki-67 به معنای آن است، که تومور فعالیت تکثیری کمی دارد. اثبات این موضوع که آیا تومور رفتار تهاجمی و عود خواهد داشت یا خیر، نیاز به بررسی نشانگرهایی که دخالت زیادی در چرخه‌ی سلولی دارند، واکاوی‌های ترکیبی و نیز پی گیری این بیماران در بالین دارد. اما با کنار هم قرار دادن نتایج بررسی کنونی و بررسی‌های پیشین می‌توان نتیجه گرفت، که دست کم بخشی از روند تهاجمی آمولوبلاستوما به علت کاهش بیان p27 (تمایز نداشتن سلول‌ها) است. با منفی شدن همه‌ی نمونه‌ها برای MCM3 به نظر می‌رسد، که MCM3 در پاتوژنز آمولوبلاستوما نقشی نداشته باشد.

### پیشنهادها

پی گیری بیماران پس از استفاده از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای نشانگرهای Ki-67 و p27 و نیز استفاده از حجم نمونه‌ی بالا همراه با واکاوی‌های ترکیبی پیشنهاد می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود از نشانگرهای دیگر ایمنوهیستوشیمی همچون دیگر پروتئین‌های موثر در چرخه‌ی سلولی و دیگر نشانگرهایی که روز به روز در آسیب‌های ادنتوژنیک و غیرادنتوژنیک بیشتر در حال شناسایی است و نیز، از روش‌های مولکولی دیگر همچون PCR (Polymerization Chain Reaction) برای شناسایی بیشتر و بهتر زیست شناختی و رفتار این آسیب‌ها استفاده شود.

### سپاسگزاری

با سپاس فراوان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان که این بررسی را پشتیبانی مالی نمودند. دکتر صبا هدی و دکتر زهره ملکی در آزمایشگاه رازی رشت که درآماده سازی (Set up) آنتی بادی‌ها و همه‌ی مراحل ما را بسیار یاری نمودند و خانم زهره هادی‌پور که رنگ‌آمیزی نمونه‌ها را انجام دادند و همچنین از دکتر آبتین حیدرزاده مشاور آماری این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

رنگ پذیری ضعیفی (۷۲/۲ درصد) داشته (یعنی تکثیر کم)، اما p27 رنگ پذیری منفی (۲۷/۸ درصد) تا ضعیف (۶۱/۱ درصد) یعنی تکثیر زیاد را نشان داد. با بررسی رفتار این تومورها در بالین، حجم نمونه‌ی بالاتر (استفاده از واکاوی‌های ترکیبی) و نشانگرهای دیگر که احتمالاً در چرخه‌ی سلولی و رفتار این آسیب‌ها موثر هستند می‌توان بهتر پیش بینی نمود، که پیش‌آگهی آسیب‌ها چگونه خواهد بود.

ژونگ (Zhong) و همکاران، به بررسی چند پروتئین موثر در چرخه‌ی سلولی با روش بررسی هیبریدیزاسیون درجا- In situ hybridization و ایمنوهیستوشیمی پرداخته و بیان نمودند، که به وجود آمدن ژنسیس (Genesis) و تهاجم آمولوبلاستوما همراه با تکثیر و نبود تمایز است و توسط بیان بیشتر سایکلین (Cyclin E) و بیان کمتر p27(KIP1) و p21(WAF) انجام می‌گیرد. همچنین بیان hTERT (ترانس کریپتاز معکوس تلومراز انسانی: Human telomerase reverse transcripase) در آمولوبلاستوما با تنظیم p16(INK4) mRNA ، p21(WAF) mRNA و پروتئین p27(KIP1) در پیوند است (۳۳ و ۳۲). با کنار هم قرار دادن یافته‌های پژوهش کنونی در کنار این دو بررسی می‌توان نتیجه گرفت، که تمایز نداشتن و بیان ضعیف p27 که در بررسی کنونی دیده شده، دست کم مسوول بخشی از روند تهاجمی آمولوبلاستوماست. ارتباط میان سن با رنگ‌پذیری این پروتئین‌ها (p27, Ki-67) بررسی گردید. آزمون رگرسیون رتبه‌ای نشان داد، که پیوندی میان سن بیماران با بیان این پروتئین‌ها وجود ندارد. گرچه ممکن است نبود این پیوند به علت شمار نمونه‌های مورد بررسی باشد یعنی با افزایش افراد مورد بررسی شاید بتوان نتایجی دیگر یافت.

در بررسی کنونی، پیوند میان اندازه‌ی آسیب و p27 و Ki-67 ارزیابی گردید. برای این کار اندازه‌ی تومورها به دو دسته‌ی کمتر و مساوی ۲ سانتی‌متر و بیشتر از ۲ سانتی‌متر بخش شدند و پیوندی میان این پروتئین‌ها و اندازه‌ی آسیب دیده نشد. هر چند که در این بررسی پیوندی یافت نشد، اما ممکن است با افزایش حجم نمونه نتایج متفاوتی یافت. برخی بررسی‌ها در آسیب‌های تومورال میان افزایش اندازه‌ی تومور و p27 و Ki-67 پیوند یافته‌اند (۴۹ و ۵). منفی شدن همه‌ی نمونه از نظر رنگ‌پذیری برای MCM3 نشان داد، که احتمالاً این پروتئین در روند پاتوژنز این تومور نقشی ندارد.

## References

1. Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW. p27 kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; 154: 313-323.
2. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.
3. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27 Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3: 227-230.
4. Nagler RM, Ben-Izhak O, Ostrovsky D, Golz A, Hershko DD. The expression and prognostic significance of Cks1 in salivary cancer. *Cancer Invest* 2009; 27: 512-520.
5. Shahsavari F, Eslami M, Baghaie F, Tirgari F, Motahary P. Immunohistochemical evaluation of p27 (kip1) in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas of the minor salivary glands. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6: 527-530.
6. Chong JP, Thömmes P, Blow JJ. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 102-106.
7. Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 649-686.
8. Maine GT, Sinha P, Tye BK. Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 1984; 106: 365-385.
9. Tye BK. Minichromosome maintenance as a genetic assay for defects in DNA replication. *Methods* 1999; 18: 329-334.
10. Thömmes P, Fett R, Schray B, Burkhart R, Barnes M, Kennedy C, et al. Properties of the nuclear P1 protein, a mammalian homologue of the yeast MCM3 replication protein. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1069-1074.
11. Dutta A, Bell SP. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 293-332.
12. Kearsy SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1398: 113-136.
13. Krude T, Musahl C, Laskey RA, Knippers R. Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1 MCM3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci* 1996; 109: 309-318.
14. Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3 -related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor. *Cell* 1995; 81: 601-609.
15. Chong JP, Mahbubani HM, Khoo CY, Blow JJ. Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature* 1995; 375: 418-421.
16. Madine MA, Khoo CY, Mills AD, Laskey RA. MCM3 complex required for cell cycle regulation of DNA replication in vertebrate cells. *Nature* 1995; 375: 421-424.
17. 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 15; 10: 8386-8395.
18. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
19. Kolár Z, Geierová M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrđý P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 75-80.



20. Endl E, Kausch I, Baack M, Knippers R, Gerdes J, Scholzen T. The expression of Ki-67, Mcm3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J Pathol* 2001; 195: 457-462.
21. Neville BW, Dam DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & maxillofacial pathology*. 3rd ed., Philadelphia: BW Saunders; 2009. 702-710.
22. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 199-206.
23. Miyabe S, Okabe M, Nagatsuka H, Hasegawa Y, Inagaki A, Ijichi K, et al. Prognostic significance of p27 Kip1, Ki-67, and CRTCl-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma: a molecular and clinicopathologic study of 101 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 1432-1441.
24. Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N and et al. Localization and expression of p27 (kip1) in multi stage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 114-122.
25. Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N and et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (kip1) is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 542-548.
26. 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; 78: 460-465.
27. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. *Cancer* 1998; 82: 2262-2269.
28. Ben-Izhak O, Akriş S, Nagler RM. Ki67 and salivary cancer. *Cancer Invest* 2008; 26: 1015-1023.
29. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Expression of PCNA and ki-67 in unicystic ameloblastoma. *Histopathology* 1995; 26: 219-228.
30. Ong'uti MN, Cruchley AT, Howells GL, Williams DM. Ki-67 antigen in ameloblastoma: correlation with clinical and histological parameters in 54 cases from Kenya. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26: 376-379.
31. Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Detection of cell cycle-related factors in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 309-315.
32. Zhong M, Liu J, Gong YB, Liu JD, Wang J, Zhang B. Expression of p21WAF1, p27 KIP1 and cyclin E in ameloblastoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2005; 40: 306-309.
33. Zhong M, Wu L, Wang J, Zhang B, Hou L. Expression of cyclin D1 and its inhibitors and hTERT in ameloblastoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2006; 24: 495-498.