

## ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ در آملوبلاستومای داخل استخوانی توپر، یونی سیستیک و محیطی

نگار بابایی<sup>۱</sup>، صفورا سیفی<sup>۲</sup>، نگار صرافان<sup>۳</sup>، جهان‌شاه صالحی‌نژاد<sup>۴</sup>، همت قلی‌نیا<sup>۵</sup>، حمید عباس‌زاده<sup>۶\*</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۹/۲۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** آملوبلاستوما توموری با رشد آهسته و تهاجم موضعی و احتمال عود بالا می‌باشد. مکانیسم تهاجم آملوبلاستوما به‌طور کامل شناخته نشده و به درمان مشخصی برای هر یک از انواع آملوبلاستوما در مطالعات قبلی اشاره نشده است. ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) مخصوصاً MMP-2 منجر به تخریب ماتریکس و در نتیجه افزایش تهاجم و القای انژیوژنز می‌شوند. به همین دلیل در این مطالعه به ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی MMP-2 در آملوبلاستومای داخل استخوانی توپر، یونی سیستیک و محیطی پرداخته‌ایم.

**مواد و روش کار:** بلوک‌های پارافینه شامل ۱۰ مورد آملوبلاستوما توپر (۵ مورد فولیکولار و ۵ مورد پلکسی فرم)، ۲۰ مورد آملوبلاستومای یونی سیستیک (۵ مورد لومینال و ۵ مورد اینترالومینال و ۱۰ مورد مورال) و ۱۰ مورد آملوبلاستومای محیطی که در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده بود مورد استفاده قرار گرفت. پس از تأیید نمونه‌ها به‌وسیله بازنگری لام‌های موجود، نمونه‌ها با طول کافی اپیتلیوم با روش IHC برای مارکر MMP-2 رنگ‌آمیزی شدند.

**یافته‌ها:** تمام نمونه‌های آملوبلاستومای توپر بیان مثبت MMP-2 را نشان دادند. آملوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال بیان بالای این آنزیم را بروز دادند که به‌طور معناداری با آملوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک لومینال و اینترالومینال اختلاف داشت. ( $p < 0.05$ )

**بحث و نتیجه‌گیری:** در این مطالعه نشان داده شد که بروز بالاتری از بیان MMP-2 در انواع توپر و یونی سیستیک مورال وجود دارد. این نتایج می‌تواند رفتار کلینیکی تهاجمی‌تر و نیاز به درمان تهاجمی‌تر برای این انواع از آملوبلاستوما را نشان دهد. درحالی‌که انواع محیطی و یونی سیستیک لومینال و یونی سیستیک اینترالومینال با بیان کمتر این پروتئاز احتمال بروز رفتار بالینی خوش‌خیم‌تر و پاسخ مناسب به درمان‌های محافظه‌کارانه را دارند.

**کلیدواژه‌ها:** آملوبلاستوما، پروتئین MMP-2، ایمونوهیستوشیمیایی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره یازدهم، ص ۹۹۵-۹۸۷، بهمن ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، تلفن: ۰۹۱۵۸۰۰۲۵۸۰

Email: hamidabbaszade@yahoo.com

### مقدمه

می‌دهند توپر (مولتی سیستیک، یونی سیستیک و خارج استخوانی (محیطی). پترن‌های فولیکولار و پلکسی فرم شایع‌ترین انواع میکروسکوپی آملوبلاستومای توپر می‌باشند (۴). آملوبلاستومای یونی سیستیک بر اساس پترن رشدی اپی تلیوم آملوبلاستوماتوز به سه ساب تایپ میکروسکوپی لومینال، اینترالومینال و مورال

آملوبلاستوما یک تومور خوش‌خیم فکی با تهاجم موضعی، شدیداً مخرب و احتمال بالای عود می‌باشد. سلول‌های این تومور توانایی تهاجم به استخوان اسفنجی اطراف مارجین تومور را دارند (۱-۳). آملوبلاستوماها به سه شکل متفاوت بالینی-راديوگرافیک رخ

<sup>۱</sup> دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

<sup>۲</sup> دانشیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده‌دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۴</sup> استاد گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد آمار، پژوهشکده‌ی سلامت دانشگاه علوم پزشکی بابل- ایران

<sup>۶</sup> استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

(نویسنده مسئول)

شدند. از هر بلوک، مقاطع ۴ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین-اوزین رنگ آمیزی شد تا از صحت تشخیص های داده شده اطمینان حاصل گردد. اسلایدهای میکروسکوپی حاصله توسط ۲ پاتولوژیست مستقل بدون آگاهی از اطلاعات بالینی به منظور تأیید تشخیص، بررسی شده و نوع هیستوپاتولوژیک آملوبلاستوما داخل استخوانی توپر (فولیکولار، پلکسی فرم) و نیز آملوبلاستوما یونی سیستمیک (لومینال، اینترالومینال و مورال) تعیین گردید. در مواردی که اختلاف نظر وجود داشت، نمونه توسط پاتولوژیست سومی مورد بررسی قرار گرفته و نتیجه نهایی گزارش شد. نمونه هایی که تشخیص آن ها بعد از بررسی توسط پاتولوژیست، با تشخیص اولیه مطابقت نداشتند، از مطالعه خارج شدند. همچنین نمونه هایی که بافت آن ها برای مطالعه کافی نبوده یا دارای کیفیت یا فیکساسیون نامناسب بودند، در مطالعه وارد نشدند. در ادامه مقاطع ۴ میکرونی دیگری از بلوک ها تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی آنتی MMP-2 (Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Matrix Metalloproteinase 2; Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom, Product Code: NCL-MMP2-507, Clone: 17B11, Ig Class: IgG2a, kappa) (Dilution: 1: 80) در آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان روحانی بابل رنگ آمیزی انجام شد. یک نمونه breast cancer به عنوان کنترل مثبت برای MMP-2 استفاده شد و کنترل منفی مشتمل بر مقاطع بافتی انکوبه شده با PBS به جای آنتی بادی اولیه بوده است. در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی جهت بازیابی آنتی ژنی، مقاطع بافتی در بافر سیترات 10 mM (PH = 6) غوطه ور شده و در میکروویو oven در ۹۵°C به مدت پنج دقیقه گرما داده شدند. برای بلوکه نمودن فعالیت پراکسیداز اندوژنوس محلول آب اکسیژنه ۳ درصد روی لام ها ریخته شد. باند شدن آنتی بادی اولیه توسط سیستم ردیابی Polymer Detection Systems Novolink™ شناسایی شده و دی آمینوبنزدین (diaminobenzidin) به عنوان کروموزن استفاده شد. لام های رنگ آمیزی شده توسط دو پاتولوژیست مستقل با میکروسکوپ نوری Olympus CX21 (Olympus corporation, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی 100X و 400X مورد ارزیابی قرار گرفتند؛ در صورت وجود اختلاف نظر بین دو پاتولوژیست، لام ها مجدداً توسط پاتولوژیست سومی مورد ارزیابی قرار گرفته و نتیجه نهایی گزارش داده شد.

(mural) تقسیم بندی شده است. از آنجایی که تفاوت در اپی تلیوم پوششی رفتار بیولوژیک را پیشگویی می کند، ساب تایپ کردن یک آملوبلاستوما یونی سیستمیک ضروری است که در نتیجه رویکرد درمانی مختص هر مورد را ناگزیر می سازد (۵).

تحقیقات متعددی نشان داده اند که توانایی تهاجم بالای امولوبلاستوما در ارتباط با آزادسازی مولکول هایی مانند ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP) است؛ خانواده ای از آنزیم های پروتئولیتیک وابسته به روی و کلسیم که میتوزن های آزاد شده را مورد تهاجم قرار داده و تکثیر سلول های امولوبلاستوما را تحریک می کنند (۶، ۷). مطالعات اخیر شواهدی مبنی بر نقش اصلی MMP-2 در تخریب ماتریکس و به دنبال آن القای تهاجم، متاستاز و انژیوژنز فراهم کرده اند (۵، ۱۲-۷). بنابراین مهار فعالیت MMP-2 می تواند به عنوان هدف درمانی نوین در مدیریت کلینیکال امولوبلاستوما باشد (۱۱، ۱۷-۱۳). بیماران مبتلا به امولوبلاستوما با روش های درمانی متعددی که از یک انوکلیشن ساده و کورتاژ تا enblock resection متغیر است، درمان شده اند. روش درمانی مناسب مخصوصاً برای امولوبلاستوما یونی سیستمیک با گسترش به دیواره فیبروزه کیست (نوع مورال) همواره موضوع مورد بحث و تناقض بوده است (۴).

درک مناسب از مکانیسم پاتوژنتیک دخیل در آملوبلاستوما و پرولیفراسیونش، به بنا نهادن درمان مناسب کمک می کند (۱۳). بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی MMP-2 در آملوبلاستوما داخل استخوانی توپر، یونی سیستمیک و محیطی و ساب تایپ های میکروسکوپی آن هاست تا نقش احتمالی MMP-2 در پاتوژنز انواع مختلف آملوبلاستوما و مکانیسم تهاجم موضعی و رفتار بیولوژیک آن ها را دریابیم و با توجه به بحث های موجود بر سر درمان انواع مختلف آملوبلاستوما و ساب تایپ های شان، از نتایج حاصل از مطالعه حاضر جهت نیل به انتخاب مناسب ترین پروتکل درمانی بهره جوییم.

## مواد و روش کار

جامعه مورد مطالعه شامل ۴۰ مورد انواع مختلف آملوبلاستوما متشکل از ۱۰ مورد آملوبلاستوما یونی توپر (شامل ۵ مورد آملوبلاستوما یونی فولیکولار و ۵ مورد آملوبلاستوما یونی پلکسی فرم)، ۲۰ مورد آملوبلاستوما یونی سیستمیک (شامل ۵ مورد نوع لومینال، ۵ مورد نوع اینترالومینال و ۱۰ مورد نوع مورال)، ۱۰ مورد آملوبلاستوما محیطی که از بین بلوک های پارافینه موجود بازیابی

مختلف آملوبلاستوما استفاده شد. در مقایسه دوه‌دوی بین گروه‌ها از نظر بیان MMP-2 از آزمون Mann-Whitney و LSD استفاده شد.

### یافته‌ها

اطلاعات کلینیکی مربوط به هر گروه از نمونه‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

در مطالعه ما به‌طور غالب MMP-2 در سلول‌های پارانشیمال شبه آملوبلاست بیان شده بود. درحالی‌که تعداد کمتری از سلول‌های پارانشیمال شبه رتی‌کولوم ستاره‌ای در مرکز جزایر اپیتلیالی بیان MMP-2 را نشان دادند. هم‌چنین بروز MMP-2 در سلول استرومال هم وجود داشت، اما میزان بیان در این سلول‌ها به شدت سلول‌های پارانشیمال نبوده است.

بالاترین میانگین درصد سلول‌های رنگ گرفته در گروه‌های آملوبلاستوما توپر و یونی سیستمیک مورال وجود داشت. اختلاف معنی‌داری بین میانگین درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها در بین ۴ گروه مشاهده شد (جدول ۲). درصد رنگ‌پذیری آملوبلاستوما توپر و مورال به‌طور معناداری بالاتر از گروه یونی سیستمیک (لومینال و اینترال‌رینال) و محیطی بوده است ( $p < 0.05$ ).

گروه آملوبلاستوما توپر به‌طور معناداری در طبقه‌بندی نیمه کمی از گروه آملوبلاستوما یونی سیستمیک (لومینال و اینترال‌رینال) و محیطی بالاتر بوده است. همچنین اختلاف گروه آملوبلاستوما یونی سیستمیک مورال با دو گروه آملوبلاستوما یونی سیستمیک (لومینال و اینترال‌رینال) و محیطی نیز معنادار بوده است (جدول ۳).

از لحاظ شدت رنگ‌پذیری تنها تفاوت معنادار بین دو گروه آملوبلاستوما توپر و یونی سیستمیک (لومینال و اینترال‌رینال) مشاهده شد ( $p = 0.009$ ).

در بررسی score ترکیبی گروه آملوبلاستوما محیطی و یونی سیستمیک کمترین امتیاز را داشتند و گروه آملوبلاستوما توپر و یونی سیستمیک مورال به‌طور بارزی بالاتر از دو گروه ذکر شده بودند. زیرگروه‌های آملوبلاستوما توپر (فولیکولار و پلکسی فرم) و زیرگروه آملوبلاستوما یونی سیستمیک (لومینال و اینترال‌رینال) در هیچ‌یک از ارزیابی‌های صورت گرفته (درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها، طبقه‌بندی نیمه کمی درصد سلول‌های رنگ گرفته، شدت رنگ‌پذیری و score ترکیبی) اختلاف معناداری بروز ندادند (جدول ۴).

در این بررسی، درصد سلول‌های رنگ گرفته و شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها مورد توجه بوده است. رنگ‌پذیری سیتوپلاسمیک برای نشانگر، مثبت در نظر گرفته شد.

در بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی 100X، پنج فیلد به‌عنوان Hot spot (فیلدهایی که در آن‌ها سلول‌های تومورال بیشترین رنگ‌پذیری را داشته باشند) انتخاب و با بزرگنمایی 400X درصد سلول‌های رنگ گرفته محاسبه شد. درصد سلول‌های رنگ گرفته با استفاده از یک مقیاس نیمه کمی ۴ نمره‌ای ارزیابی شدند:

۰: عدم رنگ‌پذیری سلول‌ها در هیچ‌کدام از فیلدهای میکروسکوپی؛ ۱: رنگ‌پذیری کم‌تر از ۱۰ درصد سلول‌ها؛ ۲: رنگ‌پذیری ۱۰-۵۰٪ سلول‌ها؛ ۳: رنگ‌پذیری بیش‌تر از ۵۰ درصد سلول‌ها.

شدت رنگ‌پذیری سیتوپلاسمیک سلول‌ها نیز به‌صورت نیمه کمی به چهار گروه طبقه‌بندی شد:

۰: عدم رنگ‌پذیری؛ ۱: رنگ‌پذیری خفیف؛ ۲: رنگ‌پذیری متوسط؛ و ۳: رنگ‌پذیری شدید.

Score ترکیبی (نسبت سلول‌های رنگ گرفته ضرب در شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها) به‌صورت زیر ارزیابی می‌شود:

۰: (-)؛ ۱، ۲، ۳، ۴: (+)؛ ۵، ۶، ۹: (+++)

Score ترکیبی مساوی یا بیشتر از (+) به‌عنوان مثبت برای MMP-2 تعریف شد.

همچنین محل بروز نشانگر به‌صورت پارانشیمال (در صورت بروز نشانگر در سلول‌های تومورال) و استرومال (در صورت بروز نشانگر در فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال) تقسیم‌بندی شدند؛ بروز پارانشیمال نشانگر، خود به‌صورت بروز در سلول‌های شبه آملوبلاست و در سلول‌های شبه رتی‌کولوم ستاره‌ای دسته بندی شده است.

در پایان اطلاعات حاصله وارد نرم‌افزار SPSS21 شده و توسط تست‌های آماری ANOVA، Kruskal-Wallis، Man-Whitney و LSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری،  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

برای مقایسه چهار گروه آملوبلاستوما مولتی سیستمیک، یونی سیستمیک مورال، یونی سیستمیک (لومینال و اینترال‌رینال) و محیطی از نظر شدت رنگ‌پذیری و درصد سلول‌های رنگ گرفته از آزمون Kruskal-Wallis و برای مقایسه این چهار گروه از نظر score ترکیبی از آزمون ANOVA استفاده شد. از آزمون Man-Whitney برای ارزیابی ارتباط بین بیان MMP-2 و انواع

**جدول (۱): اطلاعات کلینیکی نمونه‌های انتخاب‌شده**

| جنسیت | محل  |      |            |             |              | میانگین سنی | تعداد | نوع نمونه   |
|-------|------|------|------------|-------------|--------------|-------------|-------|---|
|       | مؤنث | مذکر | خلف مندیبل | قدام مندیبل | خلف ماگزایلا |             |       |   |
|       | ۷    | ۳    | ۶          | ۲           | ۱            | ۴۵          | ۱۰    | توپر (۵ مورد فولیکولار + ۵ مورد پلکسی فرم)          |
|       | ۲    | ۸    | ۸          | ۰           | ۲            | ۲۰          | ۱۰    | یونی سیستیک (۵ مورد لومینال + ۵ مورد اینترالومینال) |
|       | ۶    | ۴    | ۹          | ۱           | ۰            | ۵۱          | ۱۰    | یونی سیستیک مورال                                   |
|       | ۵    | ۵    | ۸          | ۲           | ۰            | ۴۹          | ۱۰    | محیطی   |

**جدول (۲): میانگین درصد رنگ‌پذیری انواع مختلف آملوبلاستوما**

| نوع نمونه    | SD (%)±Mean | Mean Rank | P valu |
|--------------|-------------|-----------|--------|
| مولتی سیستیک | ۷۱۲۰ ± ۱۷   | ۳۸,۵۵     | <0.001 |
| مورال        | ۶۹ ± ۱۳     | ۳۷        |        |
| یونی سیستیک  | ۳۷ ± ۳۰     | ۲۵        |        |
| محیطی        | ۲۸ ± ۲۲     | ۲۱        |        |

Kruskal\_wallis test

**جدول (۳): بیان mmp-2 در انواع مختلف آملوبلاستوما**

| Score ترکیبی mmp2 | شدت رنگ‌پذیری |     |     |          | طبقه‌بندی نیمه کمی رنگ‌پذیری |     |     |          |   |   |   |              |
|-------------------|---------------|-----|-----|----------|------------------------------|-----|-----|----------|---|---|---|--------------|
|                   | (++)          | (+) | (-) | (۰)      | (۳)                          | (۲) | (۱) | (۰)      |   |   |   |              |
| ۷                 | ۳             | ۰   | ۰   | ۵        | ۳                            | ۲   | ۰   | ۸        | ۲ | ۰ | ۰ | مولتی سیستیک |
| ۰                 | ۴             | ۴   | ۲   | ۰        | ۱                            | ۷   | ۲   | ۳        | ۴ | ۳ | ۰ | یونی سیستیک  |
| ۶                 | ۳             | ۰   | ۱   | ۳        | ۴                            | ۲   | ۱   | ۸        | ۲ | ۰ | ۰ | مورال        |
| ۱                 | ۳             | ۴   | ۲   | ۱        | ۵                            | ۲   | ۲   | ۲        | ۶ | ۲ | ۰ | محیطی        |
| P=۰,۰۰۰*          |               |     |     | P=۰,۰۰۱* |                              |     |     | P=۰,۰۰۰* |   |   |   |              |

\* تفاوت معنی‌دار در بیان mmp-2 بین گروه‌ها

**جدول (۴): بیان mmp-2 در انواع مختلف هیستولوژیکی آملوبلاستومای توپر و یونی سیستیک**

| Score ترکیبی | شدت رنگ‌پذیری |      |     |     | طبقه‌بندی نیمه کمی |     |     |         |   |   |   |               |
|--------------|---------------|------|-----|-----|--------------------|-----|-----|---------|---|---|---|---------------|
|              | (+++)         | (++) | (+) | (-) | (۳)                | (۲) | (۱) | (۰)     |   |   |   |               |
| ۳            | ۲             | ۰    | ۰   | ۳   | ۱                  | ۱   | ۰   | ۴       | ۱ | ۰ | ۰ | پلکسی فرم     |
| ۴            | ۱             | ۰    | ۰   | ۳   | ۲                  | ۱   | ۰   | ۴       | ۱ | ۰ | ۰ | فولیکولار     |
| P=1          |               |      |     | P=1 |                    |     |     | P=1     |   |   |   |               |
| ۰            | ۱             | ۳    | ۱   | ۰   | ۰                  | ۴   | ۱   | ۱       | ۳ | ۱ | ۰ | لومینال       |
| ۰            | ۳             | ۱    | ۱   | ۰   | ۱                  | ۳   | ۱   | ۲       | ۱ | ۲ | ۰ | اینترالومینال |
| P=0.714      |               |      |     | P=1 |                    |     |     | P=0.571 |   |   |   |               |

## بحث و نتیجه‌گیری

املوبلاستوما تومور ادنوتونیک شایع با منشأ اپیتلیالی است که میزان بالای عود و نیز امکان تهاجم موضعی از ویژگی‌های منحصر به فرد این تومور خوش‌خیم محسوب می‌شود (۱۸). آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) منجر به تخریب ماتریکس و در نتیجه تقویت تهاجم و متاستاز و هم‌چنین القای آنژیوژنز می‌شود (۱۲).

طبق مطالعات اخیر ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (MMP-2) ارتباط نزدیکی با تهاجم املوبلاستوما دارد (۵،۸). تاکنون هیچ گزارشی از میزان بروز این آنزیم در انواع مختلف املوبلاستوما ارائه نشده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان بروز این آنزیم در املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال بسیار بالاست. ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی MMP-2 در املوبلاستومای نوع توپر (مولتی سیستیک) موضوع مورد بحث در بسیاری از مطالعات قبلی بوده است. در اکثر آن‌ها در ۱۰۰ درصد نمونه‌ها بروز MMP-2 گزارش شده است (۲۱-۱۹). که با یافته‌های ما تطابق دارد.

در مطالعه حاضر در اکثر نمونه‌های املوبلاستومای توپر بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها رنگ‌پذیری داشته‌اند. بروز بالای MMP-2 در تقریباً تمامی نمونه‌های املوبلاستومای توپر دال بر نقش این ماتریکس متالوپروتئیناز در رفتار بیولوژیک تهاجمی و عود پس از درمان این املوبلاستوما است. طبق یافته‌های مابین ساب تایپ‌های هیستولوژیکی املوبلاستومای توپر (فولیکولار و پلکسی فرم) و املوبلاستومای یونی سیستیک (لومینال و اینترالومینال) بیان MMP-2 تفاوت معناداری را نشان نداد. Zhang.B نیز در مطالعه خود اختلافی به لحاظ بیان MMP-2 بین ساب تایپ‌های هیستولوژیک املوبلاستومای توپر نیافت (۱۱).

Sah.p و همکاران انواع املوبلاستومای یونی سیستیک را از نظر بروز انواع مارکرهای پرولیفراتیو، آنژیوژنز و پروتئاز بررسی کردند. طبق یافته‌های آن‌ها املوبلاستومای یونی سیستیک نوع مورال نسبت به دو نوع لومینال و اینترالومینال به‌طور معناداری درصد بروز بالاتری از این مارکرها را نشان دادند. که نشان از رفتار تهاجمی‌تر این نوع املوبلاستوما دارد (۵). به همین خاطر در مطالعه حاضر املوبلاستومای یونی سیستیک مورال در یک گروه مستقل از املوبلاستومای یونی سیستیک لومینال و اینترالومینال جهت بررسی رنگ‌پذیری MMP-2 مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های ما نیز بروز بالاتر این مارکر در املوبلاستومای یونی سیستیک مورال نسبت به املوبلاستومای یونی سیستیک لومینال و اینترا لومینال و املوبلاستومای محیطی نشان داده است.

آنزیم‌های فعال ماتریکس متالوپروتئیناز معمولاً به‌طور غالب در اطراف بافت‌های بدخیم نسبت به بافت‌های نرمال، خوش‌خیم، و یا

پیش بدخیمی تجمع بیشتری دارند و بیان آن‌ها بیشتر سطوح میانی تومور و استروما که از نظر تهاجم فعال می‌باشند رخ می‌دهد (۲۲). در مطالعه ما رنگ‌پذیری این آنزیم در سلول‌های تومورال و استرومال اطراف آن مشاهده شد که با یافته‌های مطالعات قبلی تطابق دارد (۲۳، ۲۴، ۷). از طرفی Pinheiro در یافته‌های خود بروز MMP-2 در سلول‌های پارانشیمال بیشتر از سلول‌های استرومال بیان کرده است که با یافته‌های ما مشابه است (۷).

حضور MMP-2 در بافت استرومال احتمالاً به دلیل القای سلول‌های تومورال می‌باشد. سلول‌های نئوپلاستیک پروتئینی از خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌ها به نام extra cellular matrix metalloproteinase inducer تولید می‌کنند؛ این فاکتور می‌تواند القاکننده ترشح ماتریکس متالو پروتئینازها از سلول‌های استرومال باشد (۲۲).

Da rosa در مطالعه خود بیان غالب این آنزیم را در سیتوپلاسم سلول‌های شبه رتیکولوم ستاره‌ای گزارش داد. (24) در حالی که یافته‌های مطالعه ما و مطالعات دیگر بیان بیشتر این آنزیم را در سیتوپلاسم سلول‌های شبه املوبلاستوما محیطی جزایر اپیتلیالی نئوپلاستیک در مقایسه با سلول‌های شبه رتیکولوم ستاره‌ای نشان داده‌اند (۲۹-۲۶، ۲۰).

در مجموع ثابت شده است که حضور فراوان MMP-2 در سلول‌های نئوپلاستیک و یا سلول‌های استرومال منجر به رفتار تهاجمی‌تر این تومور مانند تخریب استخوان کورتیکال می‌شود. که این امر می‌تواند یک فاکتور تعیین‌کننده مهم در روند تهاجم املوبلاستوما باشد. (۱۳)

اخیراً مداخلات درمانی جهت مهار ماتریکس متالوپروتئینازها و تأثیر آن بر تهاجم املوبلاستوما موضوع مورد بحث برخی مطالعات invitro و invivo بوده است (۱۷-۱۳، ۱۱). در مطالعه‌ای که Liang.Q انجام داد از (Reversion Inducing RECK With Kazal Motif) Cysteine Rich Protein به‌عنوان سرکوب‌کننده تومور که متاستاز را آنژیوژنز را مهار می‌کند استفاده کرده است. یافته‌های آن‌ها RECK را به عنوان عامل مهار فعالیت MMP-2 و MMP-9 و در نتیجه کاهش تهاجم فعالیت تهاجمی تومور معرفی کرد. طبق نتایج آن‌ها RECK می‌تواند یک هدف جدید برای درمان املوبلاستوما باشد (۱۳). در مطالعه دیگری ZHANG و همکاران نتایجی مشابه Liang را گزارش دادند (۱۱). Wang A از (Tissue inhibitor of mmp-2 (TIMP-2) برای مهار فعالیت MMP-2 استفاده کرد. طبق نتایج مهار فعالیت این آنزیم موجب مهار تهاجم موضعی املوبلاستوما به‌صورت invitro شده و یک هدف درمانی جدید برای املوبلاستوما می‌تواند باشد (۱۴).

راهکار درمانی مناسب و نوین برای انواع آملوبلاستوما با بروز بیشتر این آنزیم‌ها و تهاجم بیشتر در نظر گرفته شود.

### نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه درصد بالایی از بروز MMP-2 در آملوبلاستومای توپر (مولتی سیستیک) و یونی سیستیک مورال وجود دارد که بیانگر رفتار بالینی تهاجمی‌تر این دو نوع آملوبلاستوما در مقایسه با آملوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال) اینترالومینال) می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۳۳۸۲۱۸ که پایان‌نامه دانشجویی در دانشکده دندانپزشکی بابل بوده است می‌باشد و کلیه هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است. نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از خانم ابراهیم پور به خاطر انجام کارهای لابراتواری به عمل می‌آورند.

طبق یافته‌های مطالعه حاضر بروز MMP-2 به‌طور معنی‌داری در گروه آملوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال نسبت به آملوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال و اینترالومینال) بالاتر بوده است. آملوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال و اینترالومینال) پایین‌ترین میانگین از لحاظ درصد رنگ‌پذیری و score ترکیبی را نشان دادند. اختلاف معناداری بین این دو گروه مشاهده نشد. بنابراین طبق این مطالعه رفتار تهاجمی‌تری از آملوبلاستومای توپر (فولیکولار و پلکسی فرم) و یونی سیستیک مورال نسبت به آملوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال و اینترا لومینال) قابل‌انتظار است. از این‌رو به‌کارگیری درمان‌های تهاجمی‌تر برای دو نوع آملوبلاستومای که بیشترین بروز مارکر MMP-2 را داشته‌اند، مناسب‌ترین راه برای کاهش عود پس از درمان به نظر می‌رسد.

از طرفی استفاده از روش‌هایی که فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها را مهار می‌کنند (target therapy) مانند آن چه که در مطالعه Wang, A و Liang, Qi ذکر شد (۱۴،۱۳)، می‌تواند یک

### References:

- Rastogi V, Pandilwar PK, Maitra S. Ameloblastoma: an evidence based study. J Maxillofac Oral Surg 2010;9(2): 173-7.
- Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. J Oral Maxillofac Surg 2006;64(3): 484-94.
- Ghandhi D, Ayoub AF, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank LM, Moos KF. Ameloblastoma: a surgeon's dilemma. J Oral Maxillofac Surg 2006;64(7): 1010-4.
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & maxillofacial pathology. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2016. chapter: 15. P. 705-710.
- Sah P, Menon A, Kamath A, Chandrashekar C, Carnelio S, Radhakrishnan R. Role of immunomarkers in the clinicopathological analysis of unicystic ameloblastoma. Dis Markers 2013;35(5): 481-8.
- Nagatsuka H, Han PP, Tsujigiwa H, Siar CH, Gunduz M, Sugahara T, et al. Heparanase gene and protein expression in ameloblastoma: possible role in local invasion of tumor cells. Oral Oncol 2005;41(5): 542-8.
- Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. Histopathol 2004;45(1): 65-72.
- Zhang B, Zhang J, Huang HZ, Chen WL, Tao Q, Zeng DL, et al. Inhibition of ameloblastoma invasion in vitro and in vivo by inhibitor of metalloproteinase-2 activity. J Oral Pathol Med 2009;38(9): 731-6.
- Wu CY, Wu MS, Chen YJ, Chen CJ, Chen HP, Shun CT, et al. Clinicopathological significance of MMP-2 and TIMP-2 genotypes in gastric cancer. Europ J Canc 2007;43(4): 799-808.
- Baum O, Hlushchuk R, Forster A, Greiner R, Clézardin P, Zhao Y, et al. Increased invasive potential and up-regulation of MMP-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the b3 integrin subunit. Int J Oncol 2007;30(2): 325-32.

11. Zhang B, Zhang J, Xu ZY, Xie HL. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC Canc* 2009;9(1): 10-17.
12. Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncol* 2005;41(6): 637-44.
13. Liang QX, Liang YC, Xu ZY, Chen WL, Xie HL, Zhang B. RECK overexpression reduces invasive ability in ameloblastoma cells. *J Oral Pathol Med* 2014;43(8): 613-8.
14. Wang A, Zhang B, Huang H, Zhang L, Zeng D, Tao Q, Wang J, Pan C. Suppression of local invasion of ameloblastoma by inhibition of matrix metalloproteinase-2 in vitro. *BMC Canc* 2008;8(1): 1-10
15. Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Canc Res* 1994;54(17): 4726-8.
16. Watson SA, Morris TM, Parsons SL, Steele RJ, Brown PD. Therapeutic effect of the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, in a human colorectal cancer ascites model. *British J Canc* 1996;74(9): 1354-8.
17. Rao JS, Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Lakka SS. MMP-9 short interfering RNA induced senescence resulting in inhibition of medulloblastoma growth via p16INK4a and mitogen-activated protein kinase pathway. *Canc Res*.2007;67(10): 4956-64.
18. Barnes L. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC; 2005.
19. Shen LC, Chen YK, Hsue SS, Shaw SY. Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2010;39(3): 242-9.
20. Khalifa GA, Shokier HM, Abo-Hager EA. Evaluation of neoplastic nature of keratocystic odontogenic tumor versus ameloblastoma. *J Egypt Nati Canc Inst* 2010;22(1): 61-72.
21. Farias LC, Gomes CC, Rodrigues MC, de Castro WH, Lacerda JC, e Ferreira EF, et al. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma. *BMC Clin Pathol* 2012;12(1): 11-6.
22. Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):52-60.
23. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2003;32(2): 114-20.
24. da Rosa MR, Falcão AS, Fuzii HT, da Silva Kataoka MS, Ribeiro AL, Boccardo E, et al. EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma. *Tumor Biol* 2014;35(11): 11107-20.
25. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Review Cell Dev Biol* 2001;17: 463.
26. Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2000;70(4):419-28.
27. Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol Oncol Res* 2009;15(2): 231-40.
28. Zhong M, Han YP, Wang J, Li ZJ, Bao G, Yue YL. Expression of matrix metalloproteinases and tissue

inhibitor of metalloproteinase in ameloblastoma.  
Shanghai Kou Qiang Yi Xue 2003;12(6): 427-31.

29. Zhong Y, Guo W, Wang L, Chen X. Molecular markers of tumor invasiveness in ameloblastoma: An update. Ann Maxillofac Surg 2011;1(2): 145-9.



## EVALUATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE 2 IN SOLID INTRAOSSEOUS, UNICYSTIC AND PERIPHERAL AMELOBLASTOMAS

Negar Babaie<sup>1</sup>, Safoura Seifi<sup>2</sup>, Negar Sarrafan<sup>3</sup>, Jahanshah Salehinejad<sup>4</sup>,  
Hemmat Gholinia<sup>5</sup>, Hamid Abbaszadeh<sup>6\*</sup>

Received: 20 Oct, 2016; Accepted: 20 Dec, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Ameloblastoma is a slow growing, locally invasive epithelial odontogenic tumor and high rate of recurrence. Mechanisms involving ameloblastoma invasiveness are poorly understood, and no definitive treatment procedures for individual variants are mentioned in the literature. Matrix metalloproteinases (MMPs) especially MMP-2 causes degradation of the matrix thereby promoting invasion and also in the induction of angiogenesis. Therefore, in this study we aimed to evaluate immunohistochemical expression of MMP-2 in intraosseous multicystic, unicystic and peripheral ameloblastoma.

**Materials & Methods:** In this study, paraffinized blocks including 10 multicystic ameloblastoma (5 plexiform type, 5 follicular type), 10 mural unicystic, 10 unicystic (5 luminal type, 5 intraluminal type) and 10 peripheral were used. After preparing 4 micrometer blocks, the samples were stained by immunohistochemistry method for marker MMP-2.

**Result:** All samples showed positive MMP-2 expression. Multicystic ameloblastoma and mural unicystic ameloblastoma showed strong expression, significantly different with peripheral and luminal, intraluminal unicystic types ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** According to higher rate of MMP-2 expression in solid ameloblastoma and mural unicystic type, more aggressive clinical behavior and treatment is expected in these types. In contrast peripheral and luminal, intra luminal unicystic types by lower expression of this protease are more likely to have benign clinical behavior and respond to more conservative treatment.

**Keywords:** Ameloblastoma, Matrixmetalloproteinase-2, Immunohistochemistry

**Address:** Oral and Maxillofacial Pathology Department, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran

**Tel:** +989158002580

**Email:** Hamidabbaszade@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2017; 27(11): 995 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>5</sup> Master of Science, Health research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran (Corresponding Author)