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

نگار بابایی[۱]، صفورا سیفی[۲]، نگار صرافان[۳]، جهانشاه صالحی‌نژاد[٤]، همت قلی‌نیا[٥]، حمید عباس‌زاده[٦]*

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 املوبلاستوما در مطالعات قبلی اشاره نشده است. ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) مخصوصاً MMP-2 منجر به تخریب ماتریکس و درنتیجه افزایش تهاجم و القای انژیوژنز می‌شوند. به همین دلیل در این مطالعه به ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی MMP-2 در املوبلاستومای داخل استخوانی توپر، یونی سیستیک و محیطی پرداخته‌ایم.

مواد و روش کار: بلوک‌های پارافینه شامل ۱۰ مورد املوبلاستوما توپر (۵مورد فولیکولار و ۵ مورد پلکسی فرم)، ۲۰ مورد املوبلاستومای یونی سیستیک (۵ مورد لومینال و ۵ مورد اینترالومینال و ۱۰ مورد مورال) و ۱۰ مورد املوبلاستومای محیطی که در فرمالین ۱۰درصد 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 املوبلاستومای توپر بیان مثبت MMP-2 را نشان دادند. املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال بیان بالای این آنزیم را بروز دادند که به‌طور معناداری با املوبلاستومای 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 املوبلاستوما را نشان دهد. درحالی‌که انواع محیطی و یونی سیستیک لومینال و یونی سیستیک اینترا لومینال با بیان کمتر این پروتئاز احتمال بروز رفتار بالینی خوش‌خیم‌تر و پاسخ مناسب به درمان‌های محافظه‌کارانه را دارند.

کلیدواژه‌ها: املوبلاستوما، 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

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

[۱] دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

[۲] دانشیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکدهدندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

[۳] استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[٤] استاد گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[٥] کارشناس ارشد آمار، پژوهشکده‌ی سلامت دانشگاه علوم پزشکی بابل- ایران

[٦] استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران (نویسنده مسئول)

(mural) تقسیم‌بندی شده است. ازآنجایی‌که تفاوت در اپی تلیوم پوششی رفتار بیولوژیک را پیشگوئی می‌کند، ساب تایپ کردن یک آملوبلاستومای یونی سیستیک ضروری است که درنتیجه رویکرد درمانی مختص هر مورد را ناگزیر می‌سازد (۵).

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که توانایی تهاجم بالای املوبلاستوما در ارتباط با آزادسازی مولکول‌هایی مانند ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP) است؛ خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک وابسته به روی و کلسیم که میتوژن‌های آزادشده را موردتهاجم قرار داده و تکثیر سلول‌های املوبلاستوما را تحریک می‌کنند (۷،۶). مطالعات اخیر شواهدی مبنی بر نقش اصلی MMP-2 در تخریب ماتریکس و به دنبال آن القای تهاجم، متاستاز و انژیوژنز فراهم کرده‌اند (۵، ۱۲-۷). بنابراین مهار فعالیت MMP-2 می‌تواند به‌عنوان هدف درمانی نوین در مدیریت کلینیکال املوبلاستوما باشد (۱۱، ۱۷-۱۳). بیماران مبتلا به املوبلاستوما با روش‌های درمانی متعددی که از یک انوکلئیشن ساده و کورتاژ تا enblock resection متغیر است، درمان شده‌اند. روش درمانی مناسب مخصوصاً برای املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک با گسترش به دیواره فیبروزه کیست (نوع مورال) همواره موضوع موردبحث و تناقض بوده است (۴).

درک مناسب از مکانیسم پاتوژنتیک دخیل در آملوبلاستوما و پرولیفراسیونش، به بنا نهادن درمان مناسب کمک می‌کند (۱۳). بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیان ایمونوهیستوشیمیایی MMP-2 در آملوبلاستومای داخل استخوانی توپر، یونی سیستیک و محیطی و ساب تایپ‌های میکروسکوپیک آن‌هاست تا نقش احتمالی MMP-2 در پاتوژنز انواع مختلف آملوبلاستوما و مکانیسم تهاجم موضعی و رفتار بیولوژیک آن‌ها را دریابیم و با توجه به بحث‌های موجود بر سر درمان انواع مختلف آملوبلاستوما و ساب تایپ‌هایشان، از نتایج حاصل از مطالعه حاضر جهت نیل به انتخاب مناسب‌ترین پروتکل درمانی بهره‌جوییم.

مواد و روش کار

جامعه موردمطالعه شامل ۴۰ مورد انواع مختلف آملوبلاستوما متشکل از ۱۰ مورد آملوبلاستومای توپر (شامل ۵ مورد آملوبلاستومای فولیکولار و ۵ مورد آملوبلاستومای پلکسی فرم)، ۲۰ مورد آملوبلاستومای یونی سیستیک (شامل ۵ مورد نوع لومینال، ۵ مورد نوع اینترالومینال و ۱۰ مورد نوع مورال)، ۱۰ مورد آملوبلاستومای محیطی که از بین بلوک‌های پارافینه موجود بازیابی شدند. از هر بلوک، مقاطع ۴ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شد تا از صحت تشخیص‌های داده‌شده اطمینان حاصل گردد. اسلایدهای میکروسکوپی حاصله توسط ۲ پاتولوژیست مستقل بدون آگاهی از اطلاعات بالینی به‌منظور تأیید تشخیص، بررسی‌شده و نوع هیستوپاتولوژیک آملوبلاستومای داخل استخوانی توپر (فولیکولار، پلکسی فرم) و نیز آملوبلاستومای یونی سیستیک (لومینال، اینترالومینال و مورال) تعیین گردید. در مواردی که اختلاف‌نظر وجود داشت، نمونه توسط پاتولوژیست سومی موردبررسی قرار گرفته و نتیجه نهایی گزارش شد. نمونه‌هایی که تشخیص آن‌ها بعد از بررسی توسط پاتولوژیست، با تشخیص اولیه مطابقت نداشتند، از مطالعه خارج شدند. همچنین نمونه‌هایی که بافت آن‌ها برای مطالعه کافی نبوده یا دارای کیفیت یا فیکساسیون نامناسب بودند، در مطالعه وارد نشدند. در ادامه مقاطع ۴ میکرونی دیگری از بلوک‌ها تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی آنتی (Novocastra™ Lyophilized Mouse MMP-2 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 رنگ‌آمیزی انجام شد. یک نمونه breast cancer به‌عنوان کنترل مثبت برای MMP-2 استفاده شد و کنترل منفی مشتمل بر مقاطع بافتی انکوبه شده با PBS به‌جای آنتی‌بادی اولیه بوده است. در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی جهت بازیابی آنتی‌ژنی، مقاطع بافتی در بافر سیترات 10 mM (PH = 6) غوطه‌ور شده و در میکروویو oven در ۹۵°C به مدت پنج دقیقه گرما داده شدند. برای بلوکه نمودن فعالیت پراکسیداز اندوژنوس محلول آب‌اکسیژنه ۳ درصد روی لام‌ها ریخته شد. باند شدن آنتی‌بادی اولیه توسط سیستم ردیابی Polymer Detection Systems Novolink™ شناسایی‌شده و دی آمینوبنزیدین (diaminobenzidin) به‌عنوان کروموژن استفاده شد. لام‌های رنگ‌آمیزی 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 اختلاف‌نظر بین دو پاتولوژیست، لام‌ها مجدداً توسط پاتولوژیست سومی مورد ارزیابی قرار گرفته و نتیجه نهایی گزارش داده شد.

در این بررسی، درصد سلول‌های رنگ گرفته و شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها موردتوجه 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 میکروسکوپیک؛ ۱: رنگ‌پذیری کم‌تر از ۱۰درصد سلول‌ها ؛ ۲: رنگ‌پذیری ۱۰_۵۰٪ سلول‌ها؛ و 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: (+) و ۳، ۴: (++) و 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 تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

برای مقایسه چهار گروه آملوبلاستومای مولتی سیستیک، یونی سیستیک مورال، یونی سیستیک (لومینال و اینترالرمینال) و محیطی ازنظر شدت رنگ‌پذیری و درصد سلول‌های رنگ گرفته از آزمون Kruskal-Wallis و برای مقایسه این چهار گروه ازنظر score ترکیبی از آزمون ANOVA استفاده شد. از آزمون Man-Whitney برای ارزیابی ارتباط بین بیان MMP-2 و انواع مختلف آملوبلاستوما استفاده شد. در مقایسه دوبه‌دوی بین گروه‌ها ازنظر 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 املوبلاست 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 املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال وجود داشت. اختلاف معنی‌داری بین میانگین درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها در بین ۴ گروه مشاهده شد (جدول۲). درصد رنگ‌پذیری املوبلاستومای توپر و مورال به‌طور معناداری بالاتر از گروه یونی سیستیک (لومینال و اینترالرمینال) و محیطی بوده است ($p<0.05$).

گرو املوبلاستومای توپر به‌طور معناداری در طبقه‌بندی نیمه کمی از گروه آملوبلاستومای یونی سیستیک (لومینال و اینترالرمینال) و محیطی بالاتر بوده است. همچنین اختلاف گروه آملوبلاستومای یونی سیستیک مورال با دو گروه آملوبلاستومای یونی سیستیک (لومینال و اینترالرمینال) و محیطی نیز معنادار بوده است (جدول ۳).

ازلحاظ شدت رنگ‌پذیری تنها تفاوت معنادار بین دو گروه املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک (لومینال و اینترا لومینال) مشاهده شد ($p=0.009$).

در بررسی score ترکیبی گروه املوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک کمترین امتیاز را داشتند و گروه املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال به‌طور بارزی بالاتر از دو گروه ذکر شده بودند.

زیرگروه‌های املوبلاستومای توپر (فولیکولار و پلکسی فرم) و زیرگروه املوبلاستومای یونی سیستیک (لومینال و اینترا لومینال) 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).

جدول (۱): اطلاعات کلینیکی نمونه‌های انتخاب‌شده

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

جدول (۲): میانگین درصد رنگ‌پذیری انواع مختلف آملوبلاستوما

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

Kruskal_wallis test

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

	طبقه‌بندی نیمه کمّی رنگ‌پذیری				شدت رنگ‌پذیری				Score ترکیبی mmp2			
	(۰)	(۱)	(۲)	(۳)	(۰)	(۱)	(۲)	(۳)	(-)	(+)	(++)	(++)
مولتی سیستیک	۰	۰	۲	۸	۰	۲	۳	۵	۰	۰	۳	۷
یونی سیستیک	۰	۳	۴	۳	۲	۷	۱	۰	۲	۴	۴	۰
مورال	۰	۰	۲	۸	۱	۲	۴	۳	۱	۰	۳	۶
محیطی	۰	۲	۶	۲	۲	۲	۵	۱	۲	۴	۳	۱
	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

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

بحث و نتیجه‌گیری

املوبلاستوما تومور ادنتوژنیک شایع با منشأ اپیتلیالی است که میزان بالای عود و نیز امکان تهاجم موضعی از ویژگی‌های منحصربه‌فرد این تومور خوش‌خیم محسوب می‌شود (۱۸). آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) منجر به تخریب ماتریکس و درنتیجه تقویت تهاجم و متاستاز و هم‌چنین القای انژیوژنز 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 موردبحث در بسیاری از مطالعات قبلی بوده است. در اکثران‌ها 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 هیستولوژیکاملوبلاستومای توپر نیافت (۱۱).

Sah.p و همکاران انواع املوبلاستومای یونی سیستیک را ازنظر 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 ازنظر 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 طرفیPinheiro 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 به‌دلیل 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) درحالی‌که 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).

درمجموع 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 تأثیران بر تهاجم املوبلاستوما موضوع موردبحث برخی مطالعات invitro و invivo بوده است (۱۷-۱۳،۱۱). در مطالعه‌ای که Liang.Q انجام داد از RECK (Reversion Inducing Cysteine Rich Protein With Kazal Motif) به‌عنوان سرکوب‌کننده تومور که متاستاز ر انژیوژنز را مهار می‌کند استفاده کرده است. یافته‌های آن‌ها RECK را به. عنوان عامل مهار فعالیت MMP-2 و MMP-9 و درنتیجه 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).

طبق یافته‌های مطالعه حاضر بروز MMP-2 به‌طور معنی‌داری در گروه املوبلاستومای توپر و یونی سیستیک مورال نسبت به املوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال و اینترالومینال) بالاتر بوده است. املوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال و اینترالومینال) پایین‌ترین میانگین ازلحاظ درصد رنگ‌پذیری و score ترکیبی را نشان دادند. اختلاف معناداری بین این دو گروه مشاهده نشد. بنابراین طبق این مطالعه رفتار تهاجمی‌تری از املوبلاستومای توپر (فولیکولاو و پلکسی فرم) و یونی سیستیک مورال نسبت به املوبلاستومای محیطی و یونی سیستیک (لومینال و اینترا لومینال) قابل‌انتظار است. ازاین‌رو به‌کارگیری درمان‌های تهاجمی‌تر برای دو نوع املوبلاستومایی 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) مانندان چه که در مطالعه Liang.Qiو Wang. A ذکر شد (۱۴،۱۳)، می‌تواند یک راهکار درمانی مناسب و نوین برای انواع املوبلاستوما با بروز بیشتر این آنزیم‌ها و تهاجم بیشتر در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

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

References:

1. Rastogi V, Pandilwar PK, Maitra S. Ameloblastoma: an evidence based study. J Maxillofac Oral Surg 2010;9(2): 173-7.
2. Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. J Oral Maxillofac Surg 2006;64(3): 484-94.
3. 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.
4. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & maxillofacial pathology.4th ed. philadelphia: Saunders; 2016.chapter: 15. P. 705-710.
5. Sah P, Menon A, Kamath A, Chandrashekar C, Carnelio S, Radhakrishnan R. Role of immunomarkers in the clinicopathological analysis of unicysticameloblastoma. Dis Markers 2013;35(5): 481-8.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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

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.

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

Original Article

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

*Negar Babaie[1], Safoura Seifi[2], Negar Sarrafan[3], Jahanshah Salehinejad[4], Hemmat Gholinia[5], Hamid Abbaszadeh[6]**

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 pelxiform type, 5 follicular type), 10 mural unicystic, 10 unisystic (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

[1] *Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*

[2] *Associate Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*

[3] *Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

[4] *Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

[5] *Master of Science, Health research Instute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*

[6] *Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran (Corresponding Author)*