

Różnicowanie procesów rozrostowych dziąseł na podstawie oceny ekspresji genów pobudzanych przez IFN γ przy użyciu techniki RT-PCR

Differential diagnosis of gingival hyperplasia based on IFN γ -stimulated gene expression using RT-PCR

Iwona Niedzielska¹, Daniel Sypniewski², Daria Wziątek-Kuczmik¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Śląska Akademia Medyczna, Katowice (Department of Maxillofacial Surgery, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

²Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna, Katowice (Department of Molecular Biology and Medical Genetics, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

Streszczenie

Wstęp: Nadziąślaki stanowią grupę rozrostów łagodnych dziąsła o nieznanej etiopatogenezie, niesprecyzowanej klasyfikacji oraz niejasnych zasadach leczenia. Obecnie przeważa pogląd, że są to guzy zapalne niemające wiele wspólnego z procesem nowotworowym. W literaturze brakuje opisu molekularnego tych guzów. Celem pracy było porównanie rozrostów łagodnych (nadziąsłaki) i złośliwych dziąseł (raki) pod względem aktywności genów apoptozy, proliferacji i zapalenia metodą RT-PCR.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 70 pacjentów z nadziąsłakami i 15 z rakami płaskonabłonkowymi dziąsła. U każdego z nich pobierano materiał z guza, obrzeża i zdrowej tkanki. Metodą RT-PCR oceniano poziom ekspresji genów apoptozy (BCL-2, BAX, BCL-2/BAX), proliferacji (histon H3) oraz procesu zapalnego (IFN γ , IFN γ R1, IFN γ R2, IFN γ R1/IFN γ R2).

Wyniki: Wykazano podobieństwo w aktywacji genów procesu apoptozy i proliferacji między nadziąsłakami olbrzymiokomórkowymi a rakami wysokozróżnicowanymi dziąsła.

Wnioski: W ocenie molekularnej przeprowadzonej za pomocą techniki RT-PCR wykazano, że nadziąsłak olbrzymio-komórkowy jest guzem nowotworowym, a pozostałe nadziąsłaki guzami zapalnymi.

Słowa kluczowe: nadziąsłak, rak płaskonabłonkowy dziąsła, RT-PCR, IFN γ , apoptoza, proliferacja

Abstract

Background: Epulis is a benign gingival tumour of unknown etiopathogenesis. Classification is inconsistent, and standard management strategies are lacking. Epulis are generally believed to be inflammatory rather than neoplastic lesions. The literature does not present any molecular analysis of the tumours' characteristics. Aim of study: The purpose of the present study was to compare benign (epulis) and malignant (cancer) gingival hyperplasias with regard to the activity of the genes of apoptosis, proliferation, and inflammation using RT-PCR.

Material and methods: The investigation involved 70 patients with epulis and 15 patients with gingival squamous cell carcinoma. Each subject had specimens collected from the tumour, tissue margin (incision line), and healthy tissue. Molecular investigations by RT-PCR were used to evaluate expression levels of the genes of apoptosis (BCL-2, BAX, BCL-2/BAX), proliferation (H3 histone), and inflammatory processes (IFN γ , IFN γ R1, IFN γ R2, IFN γ R1/IFN γ R2).

Results: Correlations were discovered between apoptosis and proliferation gene expression in giant cell epulis and high-differentiated gingival squamous cell carcinoma.

Conclusions: In RT-PCR molecular analysis, giant cell epulis shows characteristics of a neoplastic lesion while other epulis types seem to be inflammatory tumours.

Key words: epulis, gingival squamous cell carcinoma, RT-PCR, IFN γ , apoptosis, proliferation

Wstęp

Nadziąślaki (ziarniniaki) są najczęściej spotykanymi guzami dziąsłowymi. Etiopatogeneza tej grupy rozrostów nie jest jasna, natomiast klasyfikacja nieujednoliconą [1–4]. W piśmiennictwie można zauważyć duże rozbieżności dotyczące oceny przynależności tych guzów [1, 4–10]. Przeważa pogląd, że są to bardziej guzy zapalne niż nowotworowe. Udowodniano to na podstawie badań klinicznych, histologicznych i immunohistochemicznych [11]. Brakuje podobnych badań molekularnych. Celem pracy było wykazanie podobieństw i różnic w grupie rozrostów łagodnych (nadziąślaki) i złośliwych dziąseł (raki) na podstawie oceny ekspresji genów procesu apoptozy, proliferacji i zapalenia metodą RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*).

Materiał i metody

Do badań opartych na analizie molekularnej przeprowadzonej za pomocą techniki RT-PCR włączono 70 pacjentów z nadziąślakami i 15 z rakami płaskonabłonkowymi dziąseł. W obrębie pierwszej grupy, na podstawie weryfikacji histopatologicznej, utworzono trzy podgrupy pacjentów z: nadziąślakami olbrzymiokomórkowymi (grupa I — 11 osób), nadziąślakami włóknistymi (grupa II — 34 osoby) oraz nadziąślakami zapalnymi (grupa III — 25 osób). Materiał do badań molekularnych stanowiły wycinki pobrane podczas wykonywania zabiegu operacyjnego z guza, obrzeża (marginesu tkankowego) i tkanki zdrowej (po przeciwległej stronie zmiany). Rozpoznano 7 raków dziąseł w stadium GI (rak wysokozróżnicowany), 6 w GII i 2 w GIII (ze względu na małą liczbę przypadków GII i GIII scalono w jedną grupę raka niskozróżnicowanego). Tkanę zdrową pobierano z dziąsła po przeciwległej stronie guza dziąsłowego i raka z zgodą pacjentów na podstawie zezwolenia Komisji Bioetycznej Śląskiej Akademii Medycznej (L.dz.NN-013-313/I/03).

W tej części analizy molekularnej wyznaczano profil ekspresji genów kodujących podjednostki receptorowe IFN γ , genu histonu H3 — wskaźnika proliferacji oraz genów BCL-2, BAX — wskaźników apoptozy techniką RT-PCR w 210 biopsjach grupy nadziąślaków i 45 biopsjach w grupie raków. Analiza molekularna dotycząca techniki RT-PCR obejmowała trzy etapy: ekstrakcję RNA, amplifikację i ilościową detekcję produktów amplifikacji oraz ocenę specyficzności produktów amplifikacji.

Przeprowadzono analizę statystyczną na podstawie testów: Shapiro-Wilka, U Manna-Whitneya, Friedmana oraz Wilcoxona.

Wyniki

Mediana dla BCL-2 w grupie nadziąślaków była wyższa niż w grupie raków. W przypadku nadziąślaków najwyższą wartość odnotowano w tkance zdrowej (17 495), następnie na obrzeżu guza (10 532), potem w samym guzie (10 215). W przypadku raków wartość mediany dla BCL-2 była najwyższa w guzie (6183), najniższa na obrzeżu zmiany nowotworowej (3401).

Background

Epuli (granulomas) are the most frequently observed gingival tumours. The etiopathogenesis of the hyperplasia is not yet clear, and classification inconsistent [1–4]. The literature on the subject presents considerable discrepancies regarding the tumours' origin [1, 4–10]. Based on the results of clinical, histological, and immunohistochemical studies, epuli are generally believed to be inflammatory rather than neoplastic lesions [11]. However, the literature does not present any molecular profile of the tumours. The purpose of the present study was to compare benign (epulis) and malignant (cancer) gingival hyperplasias with regard to the activity of the genes of apoptosis, proliferation, and inflammation using RT-PCR.

Material and methods

Molecular investigations involved 70 patients with epuli (Group I) and 15 patients with gingival squamous cell carcinoma (Group II). Based on the histopathology result, Group I was further divided into three subgroups, *i.e.*, giant cell epulis (Subgroup I — 11 subjects), fibrous epulis (Subgroup II — 34 subjects), and inflammatory epulis (Subgroup III — 25 subjects). Molecular investigations were carried out on intraoperative specimens collected from three sites: the lesion, tissue margin (incision line), and healthy tissue (opposite to lesion site; in the tables referred to as Control).

Among Group II subjects, GI (high-differentiated carcinoma) was diagnosed in 7 cases, GII in 6, and GIII in 2 cases (due to low number of cases, GII and GIII patients were further treated as one group of low-differentiated cancer). Healthy tissue was sampled from the gingiva opposite to the epulis or cancer site. Informed consent was obtained from the patients; the investigations were approved by the Bioethic Committee of the Medical University of Silesia (L.dz.NN-013-313/I/03).

This phase of molecular analysis used RT-PCR to determine expression profile of genes encoding IFN γ receptor subunits, H3 histone gene (proliferation marker), and BCL-2, BAX (apoptosis markers); the analysis was carried out in 210 biopsies from the epulis group, and 45 biopsies from gingival squamous cell carcinoma. Molecular analysis (RT-PCR) consisted of three stages: RNA extraction, amplification and quantification of amplification products, and, finally, evaluation of amplification product specificity.

A statistical analysis was carried out using the Shapiro-Wilk, U Mann-Whitney, Friedman, and Wilcoxon tests.

Results

The BCL-2 median was higher in the epulis than in the cancer group. For the epuli, the highest values were noted in healthy tissue samples (17 495), followed by tissue margins (10 532), and lesions (10 215). For cancer, the BCL-2 median was the highest in lesions (6183), and the lowest in tissue margins (3401).

Mediana dla BAX w grupie nadziąsłaków malała od tkanki zdrowej (9546), poprzez obrzeże zmiany (8508) do przekroju guza (7505). W przypadku raków najwyższą ekspresję BAX stwierdzono w guzie (17 478), najniższą na obrzeżu zmiany nowotworowej (7336).

Wartości mediany dla histonu H3 były niższe w grupie nadziąsłaków niż w grupie raków. W grupie nadziąsłaków najwyższą medianę dla histonu H3 odnotowano na obrzeżu guza (5417), najniższą w tkance zdrowej (3144). W grupie raków mediana dla histonu H3 była najwyższa w tkance zdrowej (12 242), najniższa w guzie (2915).

Wartości mediany dla IFN γ R1 były zdecydowanie wyższe w grupie raków w porównaniu z grupą nadziąsłaków. W nadziąsłakach wartość ta malała od tkanki zdrowej (990), poprzez obrzeże (650), do guza (615). W rakach mediana dla IFN γ R1 malała od obrzeża (5968), poprzez guz (5297), do tkanki zdrowej (3685).

Wartości mediany dla IFN γ R2 były również wyższe w grupie raków niż w grupie nadziąsłaków. W grupie nadziąsłaków najwyższą medianę odnotowano na obrzeżu (3945), najniższą w guzie (2236). Mediana dla IFN γ R2 w grupie raków była najwyższa w guzie (15 297), najniższa na obrzeżu zmiany (6746).

Mediana dla IFN γ osiągnęła najwyższą wartość w tkance zdrowej obu badanych grup (nadiąsłaki — 8072, raki — 14 032). Najniższą wartość odnotowano w guzie (4009) w grupie nadziąsłaków oraz na obrzeżu zmiany (1722) w grupie raków. W przypadku nadziąsłaków mediana dla ilorazu obu receptorów IFN γ jest niska w porównaniu z grupą raków i nie przekracza 0,26. Dla raków zawiera się w przedziale 0,43–0,77.

Wyniki porównania ekspresji genów między nadziąsłakami i rakami oraz ich podgrupami

Na granicy guza i tkanki zdrowej odnotowano znamienne różnicę w ekspresji genu BCL-2/BAX między nadziąsłakiem zapalnym, włóknistym, olbrzymiokomórkowym a rakiem wysokozróżnicowanym (GI). W guzie stwierdzono różnicę w ekspresji BCL-2/BAX między nadziąsłakiem włóknistym a zapalnym ($p = 0,007$) i rakiem o wyższym stopniu złośliwości ($p = 0,02$). Wykazano różnicę w ekspresji IFN γ między nadziąsłakiem zapalnym, olbrzymiokomórkowym i rakiem wysokozróżnicowanym. W procesie proliferacji (histon H3) oraz w ekspresji obu receptorów dla IFN γ różnice dotyczyły wszystkich podtypów nadziąsłaków i raka niskozróżnicowanego. Wartość ilorazu IFN γ R1/IFN γ R2 nie różniła w poszczególnych podgrupach nadziąsłaków między sobą, jak też przy porównaniu nadziąsłaka olbrzymiokomórkowego z rakiem wysokozróżnicowanym (GI). Znamienne różnice występowały między nadziąsłakiem zapalnym i włóknistym oraz rakami niezależnie od stopnia złośliwości (tab. I).

Dyskusja

Na podstawie analizy przeprowadzonej techniką RT-PCR podgrupy nadziąsłaków różniły się istotnie w ekspresji IFN γ . W nadziąsłaku olbrzymiokomórkowym stwier-

In the epulis group, the BAX median decreased from the highest level in healthy tissue (9546), to tissue margins (8508) to the lowest in tumour sections (7505). For cancer, the highest BAX expression was found in the lesion group (17 478), and the lowest in tissue margins (7336).

The values of H3 histone median were lower in the epulis than in the cancer group. For epulis, the highest H3 histone median was noted in tissue margins (5417), and the lowest in healthy tissue (3144). For cancer, the highest H3 histone median was observed in healthy tissue specimens (12 242), and the lowest in the lesion group (2915).

The values of IFN γ R1 median were markedly higher in the cancer than in the epulis group. In the latter, the values decreased from healthy tissue (990), tissue margin (650) to the lowest in the tumour sections (615). For cancer, IFN γ R1 median values went down from tissue margin (5968), tumour (5297), and to healthy tissue (3685).

The values of the IFN γ R2 median were also higher in cancer subjects. In the epulis group, the highest median was noted in the tissue margin (3945), and the lowest in the lesion group (2236). For cancer, the highest IFN γ R2 median was found in tumour sections (15 297), and the lowest in tissue margins (6746).

IFN γ median reached highest values in the healthy tissue specimens from both study groups (epulis — 8072; cancer — 14032). The lowest values were found in tumour sections of the epulis group (4009), and in the tissue margins of the cancer subjects (1722). The median of the IFN γ R1/IFN γ R2 quotient was low in the epulis group (did not rise over 0.26) whereas it was between 0.43 and 0.77 for cancer patients.

Comparison of gene expression levels between the epulis and cancer groups, and their subgroups

Significant difference in BCL-2/BAX expression was found in tissue margins between inflammatory, fibrous, and giant cell epulis, and high-differentiated carcinoma (GI). The tumour expression of BCL-2/BAX was significantly different for fibrous and inflammatory epulis ($p = 0.007$), and low-differentiated carcinoma ($p = 0.02$). Differences were also discovered as to IFN γ expression between inflammatory and giant cell epulis, and high-differentiated carcinoma. With regard to the proliferation process (H3 histone), and expression of both IFN γ receptor subunits, differences were found between all epulis types and low-differentiated carcinoma. The IFN γ R1/IFN γ R2 quotient was not significantly different among particular epulis types, and between giant cell epulis and high-differentiated carcinoma (GI). Significant differences were found between inflammatory and fibrous epulis, and cancers, irrespective of malignancy grading (Tab. I).

Discussion

Based on molecular analysis by RT-PCR, epulis types showed significant differences regarding IFN γ expression. Proliferation and apoptosis gene expression was weaker

Tabela I. Analiza porównawcza ekspresji badanych genów między podgrupami badanych grup (dla zmiennych istotnych statystycznie)**Table I. Comparison of gene expression profiles between Group I and II subgroups (statistically significant variables)**

Wielkość Parameter	Miejsce Site	Ogólnie General	Porównanie między grupami Between-subgroups comparison									
			n.o.—n.w. gce-fe	n.o.—n.z. gce-ie	n.o.—r.w. gce-hdc	n.o.—r.n. gce-lhc	n.w.—n.z. fe-ie	n.w.—r.w. fe-hdc	n.w.—r.n. fe-lhc	n.z.—r.w. ie-hdc	n.z.—r.n. ie-lhc	r.w.—r.n. hdc-lhc
	Guz Lesion	NS (p = 0,72)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BCL-2	Obrzeże Margin	NS (p = 0,37)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Kontrola Control	NS (p = 0,34)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Guz Lesion	NS (p = 0,29)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Bax	Obrzeże Margin	NS (p = 0,74)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Kontrola Control	NS (p = 0,54)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Guz Lesion	p = 0,03	NS (p = 0,31)	NS (p = 0,80)	NS (p = 0,90)	NS (p = 0,22)	p = 0,007	NS (p = 0,31)	p = 0,02	NS (p = 0,58)	NS (p = 0,37)	NS (p = 0,15)
BCL-2/BAX	Obrzeże Margin	p = 0,01	NS (p = 0,32)	NS (p = 0,95)	p = 0,03	NS (p = 0,34)	NS (p = 0,19)	p = 0,003	p = 0,04	p = 0,01	NS (p = 0,13)	NS (p = 0,67)
	Kontrola Control	p = 0,006	NS (p = 0,19)	NS (p = 0,34)	NS (p = 0,13)	NS (p = 0,15)	p = 0,003	NS (p = 0,52)	NS (p = 0,43)	p = 0,002	p = 0,01	NS (p = 0,78)
	Guz Lesion	p = 0,03	NS (p = 0,69)	NS (p = 0,11)	NS (p = 0,91)	NS (p = 0,43)	p = 0,002	NS (p = 0,94)	NS (p = 0,19)	NS (p = 0,07)	NS (p = 0,67)	NS (p = 0,25)
Histon H3	Obrzeże Margin	NS (p = 0,44)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Kontrola Control	NS (p = 0,29)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Guz Lesion	p = 0,03	NS (p = 0,33)	NS (p = 0,65)	NS (p = 0,64)	p = 0,04	NS (p = 0,33)	NS (p = 0,15)	p = 0,008	NS (p = 0,13)	p = 0,009	NS (p = 0,09)
IFN γ R1	Obrzeże Margin	p = 0,02	p = 0,03	NS (p = 0,34)	NS (p = 0,16)	p = 0,001	NS (p = 0,28)	NS (p = 0,94)	p = 0,004	NS (p = 0,88)	NS (p = 0,08)	NS (p = 0,25)
	Kontrola Control	p = 0,003	p = 0,02	p = 0,03	NS (p = 0,13)	p = 0,001	NS (p = 0,35)	NS (p = 0,89)	p = 0,02	NS (p = 0,73)	p = 0,001	p = 0,05
	Guz Lesion	p = 0,03	NS (p = 0,57)	NS (p = 0,20)	NS (p = 0,13)	p = 0,002	NS (p = 0,28)	NS (p = 0,43)	p = 0,01	NS (p = 0,84)	p = 0,02	p = 0,03
IFN γ R2	Obrzeże Margin	NS (p = 0,17)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Kontrola Control	p = 0,02	NS (p = 0,07)	NS (p = 0,10)	NS (p = 0,72)	p = 0,001	NS (p = 0,70)	NS (p = 0,43)	p = 0,02	NS (p = 0,39)	p = 0,009	p = 0,03
	Guz Lesion	p = 0,03	NS (p = 0,36)	NS (p = 0,63)	NS (p = 0,29)	NS (p = 0,27)	NS (p = 0,66)	p = 0,02	p = 0,03	p = 0,01	p = 0,02	NS (p = 0,48)
IFN γ R1/ IFN γ R2	Obrzeże Margin	NS (p = 0,11)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Kontrola Control	NS (p = 0,23)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Guz Lesion	p = 0,005	NS (p = 0,21)	p = 0,003	NS (p = 0,41)	NS (p = 0,06)	p = 0,01	NS (p = 0,15)	NS (p = 0,24)	p = 0,024	NS (p = 0,28)	p = 0,02
IFN γ	Obrzeże Margin	p = 0,02	NS (p = 0,46)	p = 0,001	NS (p = 0,10)	NS (p = 0,79)	NS (p = 0,07)	NS (p = 0,08)	NS (p = 0,79)	p = 0,008	NS (p = 0,31)	NS (p = 0,25)
	Kontrola Control	NS (p = 0,34)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

n.o. — nadziąsłak olbrzymiokomórkowy; n.w. — nadziąsłak włóknisty; n.z. — nadziąsłak zapalny; r.w. — rak wysoko zróżnicowany; r.n. — rak niskozróżnicowany; gce — giant cell epulus; fe — fibrous epulus; ie — inflammatory epulus; hdc — high-differentiated carcinoma; lhc — low-differentiated carcinoma

dzono słabszą ekspresję genów apoptozy i proliferacji w porównaniu z innymi nadziąślakami oraz porównywalną do raka wysokozróżnicowanego. Uznany wskaźnikiem proliferacji obok PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), Ki 67 jest histon H3 [12–14]. Sakamoto i wsp. stwierdzili wysokie stężenie H3 w raku płaskonabłonkowym, średnie w dysplazji i hiperplazji oraz niskie w normalnym nabłonku języka [15]. W hiperplastycznym nabłonku histon H3 występował tylko w strefie zapalnej [13]. Ponieważ w normalnym nabłonku brak histonu H3 (występuje natomiast z dużym nasileniem w tkance nowotworowej), wybranie go jako wskaźnika różnicującego odmienne jednostki chorobowe pochodzące z tej samej tkanki wydawało się słuszne. Różną ekspresję histonu H3 wykazywali nadziąślak zapalny i włóknisty. Ponieważ w nadziąślakach zapalnych mediana dla histonu H3 osiągnęła wyższe wartości niż w nadziąślakach włóknistych, potwierdza to wcześniejszą opinię autorów, że na większą ekspresję histonu H3 wpływa proces zapalny. Nie stwierdzono natomiast różnic między nadziąślakami olbrzymiokomórkowymi a rakami płaskonabłonkowymi dziąsła, co sugerowały wstępne badania przeprowadzone na mikromacierzach oligonukleotydowych (dane jeszcze nieopublikowane). Uważano początkowo, że histon H3 nie jest zbyt czułym wskaźnikiem w różnicowaniu łagodnych i złośliwych procesów nowotworowych lub że w obu jednostkach chorobowych proces proliferacji przebiega podobnie.

Gen BCL-2 należy do rodziny BCL-2, do której zalicza się geny pobudzające (BAX, BAD, BAK, BIK, BID) i hamujące apoptozę (MCL-1, BCL-X, BCL-2). Fizjologiczna rola tego białka polega na hamowaniu apoptozy towarzyszącej zarówno procesom fizjologicznym, jak i nowotworowym [14]. Mechanizm jego działania nie jest jasny. W przeprowadzonym badaniu różnice w ekspresji tego genu między nadziąślakami, a rakami dziąsła były zaznaczone głównie w tkance zdrowej i w marginesie operacyjnym, wyższe w nadziąślakach niż rakach.

W rakach płaskonabłonkowych dziąsła wartości ekspresji tego genu malały od raka wysokozróżnicowanego, przez niskozróżnicowany, do tkanki zdrowej, co jest zgodne z wynikami Drenninga i wsp. [16]. Przeprowadzone badania molekularne zmieniły pogląd na temat ogólnej przyjętej klasyfikacji nadziąślaków. Nadziąślak olbrzymiokomórkowy w ocenie molekularnej przypominał proces nowotworowy. Różnił się pod tym względem od nadziąsłaka zapalnego i włóknistego, które można zaliczyć do reakcji o charakterze czysto zapalnym. W związku z tym słuszne jest wykonywanie bardziej radykalnych zabiegów operacyjnych w nadziąsłaku olbrzymiokomórkowym w porównaniu z pozostałymi podgrupami.

Wnioski

W ocenie molekularnej stwierdzono, że nadziąślak olbrzymiokomórkowy jest guzem nowotworowym, natomiast inne nadziąsłaki są guzami zapalnymi.

in giant cell epulis when compared to other epulis types; however, the gene expression levels were similar to those observed for high-differentiated carcinoma. Another recognized proliferation marker, apart from PCNA, Ki 67, is H3 histone [12–14]. Sakamoto *et al.* [15] found high, medium and low-level H3 expression in squamous cell carcinoma, dysplasia/hyperplasia, and normal lingual epithelium, respectively. In hyperplastic epithelium, H3 was only disclosed in the areas of inflammation [13]. Since H3 histone is absent in a normal epithelium and abundant in neoplastic tissue, it was selected as a marker differentiating between specific disease entities originating from the same tissue. Different H3 histone expression patterns were determined for inflammatory and fibrous epuli. The fact that H3 histone median reached higher values in inflammatory than in fibrous epulis seems to confirm our previous suggestions that H3 histone expression is characteristic of inflammatory conditions. Thus, it could be concluded that H3 histone is not sensitive enough to differentiate between benign and malignant processes, or that the processes are characterized by similar proliferation courses.

BCL-2 belongs to the family of BCL-2 genes, which involves proapoptotic (BAX, BAD, BAK, BIK, BID), and anti-apoptotic (MCL-1, BCL-X, BCL-2) proteins. The function of BCL-2 consists of inhibiting apoptosis as seen in both physiological and neoplastic processes [14]. However, the mechanism of its action is not clear. Differences in BCL-2 expression between the epuli and gingival carcinomas, found in our study, were more pronounced in healthy tissue and tissue margins and more distinct in the epulis than in the cancer group.

In gingival squamous cell carcinoma, BCL-2 expression levels decreased from high-differentiated through low-differentiated carcinoma, and were the lowest in healthy tissue, which is in accordance with the results of Drenning *et al.* [16]. Molecular investigations carried out have changed attitudes towards the so-far accepted epulis classification. The molecular characteristics of giant cell epulis reminds one of a neoplastic process; thus, more radical intervention seems recommended than in the case of inflammatory and fibrous forms.

Conclusions

In RT-PCR molecular analysis, giant cell epulis shows the characteristics of a neoplastic lesion while other epulis types seem to be inflammatory tumours.

Piśmiennictwo (References)

1. Anderson DR, Jones SV. The fibrous epulis: neoplasm or inflammatory mass. *S Afr Cancer Bull.* 1970; 4: 192–196.
2. Axhausen G. *Die Allgemeine Chirurgie in der Zahn-Mund und Kieferheilkunde.* J.T. Lehmann, Munchen-Berlin 1940.

3. Bernier JL, Cahn LR. Peripheral giant cell reparative granuloma. J Am Dent Assoc. 1954; 49: 141–148.
4. Demetriou NA. Several statistical observations on the clinical and histopathological characteristics of epulides. Odontiatiki F. 1973; 3: 164–170.
5. Eversole LR, Rovin S. Reactive lesions of the gingiva. J Oral Pathol. 1972; 1: 30–38.
6. Eversole LR, Rovin S. Diagnosis of gingival tumefactions. J Periodontol. 1973; 44: 429–435.
7. Stones H. Oral and dental diseases. E. and S. Livigstone Ltd., Edinburgh and London 1962.
8. Thoma KH, Goldman HM. Oral Pathology, ed. 5. Henry Kimpton, London 1960.
9. Thoma KH. Oral Surgery. Mosby Comp, St. Louis 1963.
10. Tyldesley WR. Oral medicine for the dental practitioner. Inflammatory overgrowths and neoplasms. Br Dent J. 1974; 136: 111–116.
11. Pammer J, Weninger W, Hulla H. *et al.* Expression of regulatory apoptotic proteins in peripheral giant cell granulomas and lesions containing osteoclast-like giant cells. J Oral Pathol Med. 1998; 27: 267–271.
12. Baumach L, Stein GS, Stein JL. Regulation of human histone gene expression: transcriptional and potranscriptional control of the coupling of histone messenger RNA stability with DNA replication. Biochemistry 1987; 26: 6178–6187.
13. Bosch FX, Udvarhelyi N, Venter E. *et al.* Expression of the histone H3 gene in benign, semi-malignant and malignant lesions of the head and neck: a reliable proliferation marker. Eur J Cancer. 1993; 29A: 1454–1461.
14. Isenberg I. Histones. Ann Rev Biochem. 1979; 48: 159–191.
15. Sakamoto R, Nitta T, Kamikawa Y. *et al.* The assessment of cell proliferation during 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced hamster tongue carcinogenesis by means of histone H3 mRNA in situ hybridization. Med Electron Microsc. 2004; 37: 52–61.
16. Drenning SD, Marcovitch AJ, Johnson DE. *et al.* Bcl-2 but not Bax expression is associated with apoptosis in normal and transformed squamous epithelium. J Oral Pathol Med. 2001; 30: 309–315.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr med. Iwona Niedzielska
ul. Mysłowska 4/12
43–100 Tychy
e-mail: stomgab@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 20.06.2005 r.