تحقیقی

مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ۵۱-۵۸

# بررسی رابطه بیان دو نشانگر Bcl-2 و COX-2 در لیکن پلان دهانی

دکتر نسیم تقوی[۱] - دکتر نازنین مهدوی[۲] - دکتر مریم شهلا[۳]

۱- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران

۲- متخصص آسیب شناسی دهان و فک و صورت

۳- دستیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران

## چکیده

***زمینه و هدف:*** *Cyclooxygenase-2 (COX-2) آنزیم اصلی در فرآیندهای التهابی است. افزایش همزمان B cell CLL/lymphoma-2 (BCL-2) و COX-2 در برخی بدخیمیها نشان داده شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی رابطه بروز این دو نشانگر در لیکن پلان دهانی (OLP) و نقش احتمالی آنها در بروز تغییرات دیسپلاستیک می‌باشد.*

***روش بررسی:*** *این مطالعه آزمایشگاهی بر روی ۴۷ بلوک پارافینی با تشخیص OLP و ۱۶ نمونه Irritation Fibroma (گروه شاهد) انجام گردید و مارکرهای COX-2 و Bcl-2 از طریق رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌های فوق مورد ارزیابی قرار گرفتند. از نمونه‌های کولیت اولسراتیو برای کنترل مثبت COX-2 و از بافت لوزه برای Bcl-2 استفاده شد. از ضریب همبستگی Spearman جهت استنباط بین بروز مارکرها Cox-2 و Bcl-2 با شدت دیسپلازی و سایر پارامترهای هیستولوژیک استفاده گردید. از آزمون Mann-Whitney جهت مقایسه دو گروه مورد و شاهد استفاده شد.*

***یافته‌ها:*** *در بررسی حاضر بین شدت انفیلترای التهابی تحت اپیتلیالی و شدت دژنرسانس میعانی لایه بازال ارتباط معنادار به دست آمد (P=۰/۰۴۸). تفاوت معنادار در بیان دو مارکر Bcl-2 و COX-2 در دو گروه مورد و شاهد تنها در مورد انفیلترای التهابی تحت اپی تلیالی مشاهده شد (P=۰/۰۰۳ ، P <۰/۰۰۱). میزان و شدت بیان دو نشانگر فوق در ارتشاح التهابی تحت اپی‌تلیالی با یکدیگر نیز ارتباط معناداری نشان دادند (P=۰/۰۱۳، P=۰/۰۱۹).*

***نتیجه‌گیری:*** *نتایج به دست آمده نشانگر نقش مؤثر Bcl-2 در کاهش اپوپتوز در ارتشاح التهابی بر خلاف اپیتلیوم است. همچنین با توجه به نتایج فوق، شاید بتوان ادعا کرد که این دو نشانگر به صورت غیر مستقیم از طریق تداوم التهاب سبب بروز تخریب لایه بازال و فعال شدن مکانیسم‌های کارسینوژنز مرتبط با آن باشد.*

***کلید واژه‌ها:*** *Bcl-2 ، COX-2 ، لیکن پلان دهانی*

وصول مقاله: ۱۳۹۲/۳/۱۸ اصلاح نهایی: ۱۳۹۲/۷/۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۸/۱۶

**نویسنده مسئول:** دکتر نازنین مهدوی، متخصص آسیب شناسی دهان و فک و صورت

e.mail:mahdavinazanin@yahoo.com

## مقدمه

لیکن پلان یک بیماری پوستی، مخاطی مزمن با واسطه سیستم ایمنی است که شیوع آن تا ۲٪ گزارش شده و اغلب مخاط دهان را درگیر می‌کند. لیکن پلان دهانی (OLP) از لحاظ بالینی به اشکال رتیکولر، پلاک مانند، آتروفیک، اروزیو و بولوز دیده می‌شود. شایعترین فرم آن «رتیکولر» بوده و در مورد انواع «اروزیو» و «آتروفیک» احتمال ایجاد تغییرات دیسپلاستیک و تبدیل شدن به بدخیمی (کارسینوم سلول سنگفرشی) مطرح می‌باشد. (۱-۳)، در مطالعات مختلف بسته به دوره زمانی پیگیری بیمار، درصد بدخیمی بین ۰/۶۵٪- ۶/۵٪ گزارش شده است (۴-۵)، هرچند که برخی اصولاً احتمال ایجاد بدخیمی را در ضایعات OLP رد می‌کنند. (۲و۶)، در مورد عوامل شروع کننده بیماری فرضیه‌های متعددی مطرح شده است. عامل تحریک هر چه باشد از طریق تولید سایتوکین‌هایی چون Interleukin-1 (IL-1) , Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) و Interferon-α (IFN-α) همچنین افزایش بیان ملکول‌های چسبندگی در سطح لنفوسیت‌ها و اندوتلیوم باعث مهاجرت لنفوسیت‌ها می‌شود به طوری که در این بیماری لنفوسیت‌ها به کراتینوسیت‌های لایه بازال حمله کرده و باعث القای اپوپتوز در آنها می‌شوند. ( ۱)

Cyclooxygenase 2 (COX-2) آنزیمی است که در بافتهای

Archive of SID

www.SID.ir

طبیعی وجود نداشته و در حقیقت یک نوع آنزیم القایی است که طی پدیده‌های پاتولوژیک چون التهاب و بدخیمیها به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. (۱۲)، افزایش بیان COX-2 در کارسینوم معده ، پانکراس و ریه (۷) نشان داده شده است و به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های عملکردی آن مهار اپوپتوز در سلول‌های تومورال می‌باشد که در برخی از تومورها مثل لنفوما مستقل از Bcl-2 و در برخی دیگر، وابسته به Bcl- 2 می‌باشد. (۸)

B cell lymphoma-2 (BCL-2) نیز یکی از اعضای آنتی اپوپتوتیک خانواده Bcl-2 است که از طریق اتصال مستقیم با غشای خارجی میتوکندری و مهار اعضای پرواپوپتوتیک خانواده Bcl-2 باعث حفظ تمامیت غشا خارجی میتوکندری و مهار اپوپتوز می‌شوند. افزایش همزمان Bcl-2 و COX-2 در برخی بدخیمیها مانند سرطان کولون نشان داده شده است. (۹)، لذا با توجه به نقش این دو نشانگر در مکانیسم اپوپتوز و ایجاد تغییرات دیسپلاستیک، بدخیمی و همچنین مکانیسم ایجاد بیماری لیکن پلان و اپوپتوزیس سلول‌های لایه بازال توسط لنفوسیت‌ها در این بیماری، هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش هر یک از دو نشانگر فوق در بروز تغییرات دیسپلاستیک در OLP و بررسی رابطه بروز آنها با یکدیگر در این بیماری است.

## روش بررسی

این مطالعه بر روی ۴۷ بلوک پارافینی بخش آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی شهیدبهشتی که به عنوان OLP تشخیص داده شده‌اند (گروه مورد) و تعداد ۱۶ نمونه با تشخیص Irritation Fibroma (گروه کنترل) انجام شد و نمونه‌هایی که اطلاعات پرونده‌هایشان کافی نبود و یا تشخیص قطعی برای آنها گذاشته نشده و یا بافت کافی در دسترس نبود، از مطالعه خارج شدند. برای هر نمونه یک پرسشنامه شامل اطلاعات دموگرافیک و بررسیهای هیستولوژیک با توجه به رنگ آمیزی H&E و رنگ‌آمیزی IHC تهیه شد.

در بررسی هیستوپاتولوژیک، نمونه‌ها از نظر وضعیت کراتوز سطحی (بدون کراتوز، ارتوکراتوز، پاراکراتوز، ارتو/پاراکراتوز)، مورفولوژی محل اتصال بافت همبند- اپیتلیوم (Papillary, Flat)، وجود و یا عدم وجود اکانتوز، اسپونژیوز، گرانولوز و اگزوسیتوز لنفوسیتی به طور جداگانه بررسی شدند.

نمونه‌های مزبور از لحاظ میزان دژنرسانس هیدروپیک لایه بازال به سه دسته I (کمتر از ۲۵٪)، II (۲۵٪-۵۰٪)، III (بیشتر از ۵۰٪) و از نظر شدت التهاب تحت اپیتلیالی به سه گروه خفیف، متوسط و شدید تقسیم شدند.

وضعیت نمونه‌ها از نظر وجود تغییرات دیسپلاستیک و بدخیمی به صورت عدم وجود دیسپلازی، دیسپلازی خفیف، دیسپلازی متوسط، دیسپلازی شدید و وجود کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) ثبت گردید.

جهت انجام مطالعات ایمونوهیستوشیمی از نمونه‌های فیکس شده در فرمالین ۱۰٪ که در بلوک پارافین قرار داشتند، به وسیله دستگاه میکروتوم برشهای چهار میکرونی تهیه شد سپس لامها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت در دمای شصت درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا پارافین اضافی از روی لام زدوده شود. پس از آن Deparaffinization& Rehydration توسط قراردادن نمونه‌ها در xylen 100% و الکل درجه‌بندی شده انجام شد. سپس آنتی‌ژن‌ها به وسیله قرار دادن اسلایدها در بافر TBS درون دستگاه مایکروویو (۱۵ دقیقه برای Bcl-2 و۲۲ دقیقه برای COX-2) بازیابی گردید. آنگاه آنتی‌بادی‌های اولیه Bcl-2 (monoclonal antibody clone 3.1, UK, Novocastra, ready to use) و COX-2(monoclonal mouse Anti-Human, clone 4H12, UK, Novocastra)به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. برای COX-2 بر طبق استاندارد شرکت سازنده با استفاده از محلول رقیق کننده آنتی بادی به نسبت ۱/۵۰ - ۱/۱۰۰ رقیق شد. در ادامه در ظرف حاوی TBS با PH=۷/۶ به مدت پنج دقیقه شسته شده و به مدت یک ساعت درون EnVision tube (شرکت Dako) قرار گرفتند و در بافر TBS شسته شدند و پس از قرار دادن DAB روی آنها با آب جاری شستشو داده شدند و پس از انجام رنگ آمیزی افتراقی مانت گردیدند.

بررسی درصد سلول‌های رنگ گرفته با نشانگر Bcl-2 به صورت شمارش در ده شان تصادفی با بزرگنمایی دویست بر اساس سیستم زیر انجام گرفت (۱۰):

۰٪= ، ۱٪-۱۰٪ = + ، ۱۱٪-۲۵٪=++ ، ۲۶٪-۵۰٪=+++ ، بیشتر از ۵۰٪= +++

همچنین درصد سلول‌های رنگ گرفته در نشانگر COX-2 ،



www.SID.ir

مشابه Bcl-2 و بر اساس سیستم زیر محاسبه گردید (۱۱): ۰٪ : 0 ، ۱٪–۱۹٪ :I ، ۲۰٪–۴۹٪: II و بیشتر از ۵۰٪ : III به منظور کنترل مثبت برای COX-2 از نمونه‌های کولیت اولسراتیو و برای Bcl-2 از بافت لوزه استفاده شد. رنگ پذیری اندوتلیوم عروق خونی به عنوان کنترل داخلی برای COX-2 در نظر گرفته شد. شدت رنگ‌پذیری هر دو نشانگر بر اساس سه درجه خفیف، متوسط و شدید مورد ارزیابی قرار گرفت.

قابل ذکر است که درصد سلول‌های رنگ گرفته در لایه‌های بازال، سوپرابازال و ارتشاح لنفوسیتی به طور جداگانه محاسبه گردید.

نتایج به دست آمده توسط نرم افزار آماری PASW ویرایش ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ارتباط بین بروز مارکرهای COX-2 و Bcl-2 با یکدیگر، شدت دیسپلازی و سایر پارامترهای هیستولوژیک به کمک ضریب همبستگی Spearman سنجیده و از آزمون Mann-Whitney جهت مقایسه دو گروه مورد و شاهد استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه سن بیماران دامنه‌ای بین ۲۱–۶۸ سال (با میانگین ± انحراف معیار: ۱۳/۱۵±۴۶/۵۲) را نشان داده است. سی مورد معادل ۶۸/۲٪ ضایعات در زنا ن و ۱۴ مورد برابر با ۳۱/۸٪ در مردها دیده شد. بررسی محل وقوع ضایعات نشان داد که اکثر نمونه‌ها (۳۳ مورد معادل ۷۵٪) در مخاط باکال قرار داشتند و کف دهان با یک مورد (۲/۳٪) کمترین فراوانی را نشان داد. نوع بالینی ضایعه در ۲۷ مورد برابر با ۶۴/۳٪ از نوع اروزیو/ آتروفیک، ۱۳ مورد معادل ۳۱٪ از نوع رتیکولر و در دو مورد (۴/۸٪) از نوع بولوز بود. نتایج بررسیهای میکروسکوپیک در جدول ۱ آورده شده است. در بررسی ویژگیهای هیستولوژیک نمونه‌های مورد بررسی، تنها ارتباط معنادار آماری بین شدت التهاب و درجه دژنرسانس میعانی لایه‌بازال (P=۰/۰۴۸) مشاهده گردید. (جدول ۲)

در بررسیهای ایمونوهیستوشیمی، درصد و شدت رنگ‌پذیری Bcl-2 و COX-2 در اپیتلیوم و ارتشاح التهابی تحت اپیتلیالی در جدول ۳ و تصاویر ۱ و۲ نشان داده شده‌اند. تفاوت معنادار در بیان دو مارکر Bcl-2 و COX-2 در دو گروه مورد و شاهد تنها در مورد انفیلترای التهابی مشاهده شد (P=۰/۰۰۳، P <۰/۰۰۱) و

**جدول ۱: پراکندگی نمونه‌ها بر اساس ویژگیهای هیستولوژیک**

| متغیر | | تعداد (٪) |
|---|---|---|
| کراتوز | پاراکراتوز | ۳۲(٪۶۸/۱) |
| | ارتوکراتوز | ۸(٪۱۷) |
| | پارا و ارتوکراتوز | ۷(٪۱۴/۹) |
| اکانتوز | ندارد | ۱۵(٪۳۱/۹) |
| | دارد | ۳۲(٪۶۸/۱) |
| گرانولوز | ندارد | ۲۲(٪۴۶/۸) |
| | دارد | ۲۵(٪۵۳/۲) |
| اسپونژیوز | ندارد | ۳۲(٪۶۸/۱) |
| | دارد | ۱۵(٪۳۱/۹) |
| اگزوسیتوز | ندارد | ۶(٪۱۲/۸) |
| | دارد | ۴۱(٪۸۷/۲) |
| دژنرسانس میعانی | < ۲۵٪(I) | ۵(٪۱۰/۶) |
| | ٪۵۰–٪۲۵ (II) | ۲۶(٪۵۵/۳) |
| | < ۵۰٪(III) | ۱۶(٪۳۴/۰) |
| جداشدگی اپی تلیوم | ندارد | ۲۴(٪۵۱/۱) |
| | دارد | ۲۳(٪۴۸/۹) |
| مرز اپی تلیوم و همبند | پاپیلری | ۳۲(٪۶۸/۱) |
| | صاف | ۱۵(٪۳۱/۹) |
| شدت التهاب | خفیف | ۳(٪۶/۴) |
| | متوسط | ۲۴(٪۵۱/۱) |
| | شدید | ۲۰(٪۴۲/۶) |
| دیسپلازی | ندارد | ۲۷(٪۵۷/۴) |
| | خفیف | ۱۲(٪۳۵/۵) |
| | متوسط | ۵(٪۱۰/۶) |
| | شدید | ۲(٪۴/۳) |
| | کارسینوم سلول سنگفرشی | ۱(٪۲/۱) |

بیان دو نشانگر فوق در اپیتلیوم گروه مورد، تفاوت معناداری را با گروه شاهد نشان نداد. همچنین میزان بیان هیچ یک از دو نشانگر فوق با دژنرسانس لایه بازال، شدت التهاب و دیسپلازی رابطه معنادار آماری نداشتند. (جدول ۲)

در بررسیهای ایمونوهیستوشیمی نشانگر Bcl-2، تفاوت معنادار آماری در میزان و شدت بیان Bcl-2 در اپی تلیوم گروه مورد و شاهد مشاهده نگردید (جدول ۳)، در صورتی که این تفاوت در مورد ارتشاح التهابی تحت اپیتلیالی، در دو گروه مورد بررسی، معنادار بود (P=۰/۰۲۹، P <۰/۰۰۱).



Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲: رابطه دژنرسانس هیدروپیک ، شدت التهاب و دیسپلازی با میزان و شدت بروز نشانگرهای BCL-2,COX-2

| - | | درجه دیسپلازی | شدت التهاب | دژنرسانس هیدروپیک |
|---|---|---|---|---|
| دژنرسانس هیدروپیک | | ۰/۰۵ | ۰/۰۴۸* | |
| شدت التهاب | | ۰/۲۶ | | ۰/۰۴۸ |
| درجه دیسپلازی | | | ۰/۲۶ | ۰/۵۵۰ |
| شدت رنگ پذیری Bcl-2 | اپی تلیوم | ۰/۳۲۵ | ۰/۶۶۲ | ۰/۱۴۵ |
| | ارتشاح التهابی | ۰/۲۸۱ | ۰/۳۶۷ | ۰/۲۴۵ |
| درصد سلول‌های رنگ گرفته با Bcl-2 | بازال | ۰/۹۱۲ | ۰/۱۶۳ | ۰/۱۹۸ |
| | سوپرابازال | ۰/۲۹۸ | ۰/۵۵۷ | ۰/۲۶۹ |
| | ارتشاح التهابی | ۰/۵۷۴ | ۰/۰۹۹ | ۰/۹۸۵ |
| شدت رنگ پذیری COX-2 | اپی تلیوم | ۰/۵۱۹ | ۰/۱۱۵ | ۰/۲۵۳ |
| | ارتشاح التهابی | ۰/۸۱۶ | ۰/۳۴۱ | ۰/۷۶۱ |
| درصد سلول‌های رنگ گرفته با COX-2 | بازال | ۰/۸۶۰ | ۰/۳۶۲ | ۰/۶۶۶ |
| | سوپرابازال | ۰/۳۰۴ | ۰/۲۸۸ | ۰/۸۶۲ |
| | ارتشاح التهابی | ۰/۵۸۲ | ۰/۴۸۸ | ۰/۳۴۵ |

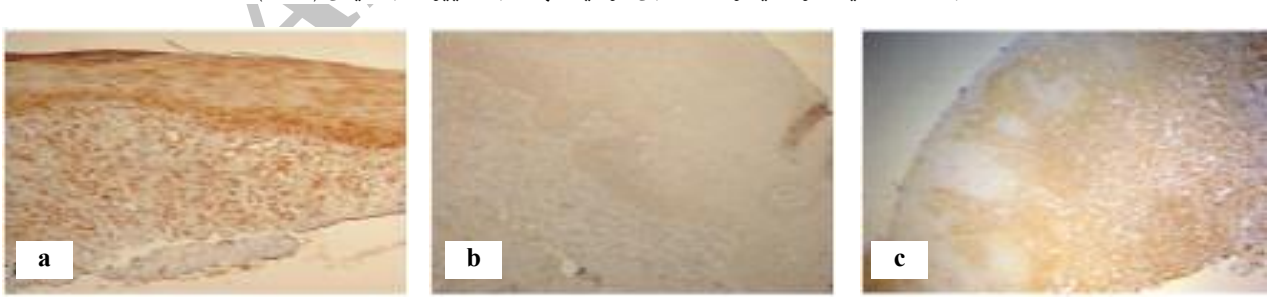
* نشان‌دهنده وجود رابطه آماری معنادار است.

شکل ۱: رنگ پذیری Bcl-2،

a : با شدت متوسط در ارتشاح التهابی تحت اپی تلیالی و اپی تلیوم در لیکن پلان بدون دیسپلازی (۴۰×) .

b : با شدت شدید در انفیلترای التهابی در لیکن پلان با دیسپلازی خفیف (۱۰۰×) .

c : با شدت خفیف در انفیلترای التهابی در لیکن پلان با تغییرات بدخیمی (۱۰۰×) .




شکل ۲: رنگ پذیری با COX-2

a : با شدت متوسط در اپیتلیوم و انفیلترای التهابی در لیکن پلان با دیسپلازی متوسط (۱۰۰×) .

b : با شدت خفیف در اپیتلیوم و ارتشاح التهابی در لیکن پلان با دیسپلازی شدید (۲۰۰×) .

c : در انفیلترای التهابی با شدت شدید در لیکن پلان با تغییرات بدخیمی (۱۰۰×) .



www.SID.ir

همان طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌کنید، میزان و شدت بیان نشانگر COX-2 در اپی تلیوم، همانند Bcl-2، تفاوت معنادار آماری بین دو گروه مورد و شاهد نشان نداد، درحالی‌که تفاوت میزان بیان نشانگر COX-2، در ارتشاح التهابی تحت اپی تلیالی در دو گروه، معنادار بود (P=۰/۰۰۳). میزان بیان هیچ یک از دو نشانگر فوق با میزان دژنرسانس لایه بازال، شدت التهاب‌و دیسپلازی رابطه معنادار آماری نشان نداد. (جدول ۲)

همچنین در بررسی رابطه بیان دو نشانگر Bcl-2 و COX-2 ، ارتباط مستقیم معنادار بین میزان و شدت بیان این دو نشانگر در ارتشاح التهابی تحت اپی تلیالی مشاهده شد (P=۰/۰۱۳، P=۰/۰۱۹) در اپی تلیوم، فقط شدت رنگ پذیری Bcl-2 و COX-2 رابطه معنادار مستقیم نشان دادند (P=۰/۰۴۳). شدت بیان Bcl-2، در ارتشاح التهابی تحت اپی تلیالی نیز با میزان بیان COX-2 در لایه بازال (P=۰/۰۲۸)، سوپرابازال (P=۰/۰۲۱) و ارتشاح التهابی تحت اپی تلیالی (P=۰/۰۰۲)، ارتباط معنادار آماری نشان داد. (جدول ۴)

**جدول ۳: میزان، شدت و رابطه بیان Bcl-2 و COX-2 در اپیتلیوم و ارتشاح لنفوسیتی در دو گروه مورد شاهد**

| | | | شدت رنگ پذیری Bcl-2 | | | | درصد سلول‌های رنگ گرفته با Bcl-2 | | | | | شدت رنگ پذیری COX-2 | | | | درصد سلول‌های رنگ گرفته با COX-2 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | خفیف | متوسط | شدید | P.V | - | -- | --- | ---- | P.V | خفیف | متوسط | شدید | P.V | I | II | III | P.V |
| اپی تلیوم | شاهد | بازال | ۷ | ۲ | ۱ | | ۵ ٪۳۲/۳ | ۲ ٪۱۳/۲ | ۱ ٪۶/۷ | ۰ ٪۰/۰ | | ۳ | ۶ | ۷ | | ۰ ٪۰/۰ | ۲ ٪۱۳/۳ | ۳ ٪۲۰/۰ | |
| | | سوپرابازال | ۷ ٪۳۳/۸ | ۳ ٪۱۴/۳ | ۱ ٪۴/۸ | | ۳ ٪۴۲/۷ | - ٪۰/۰ | - ٪۰/۰ | - ٪۰/۰ | | ۸ ٪۳۸/۱ | ۳ ٪۱۴/۳ | ۱ ٪۴/۸ | | ۳ ٪۱۴/۳ | ۸ ٪۳۸/۱ | ۲ ٪۹/۵ | |
| | مورد | بازال | ۸ | ۱۲ | ۴ | ۰/۷۸۹ | ۱۵ ٪۲۱/۴ | ۲ ٪۱۰/۵ | ۰ ٪۰/۰ | ۱ ٪۴/۳ | ۰/۳۴۵ | ۴ ٪۱۹/۰ | ۱۲ ٪۵۷/۱ | ۴ ٪۱۹/۰ | ۰/۸۵۱ | ۱ ٪۴/۳ | ۵ ٪۲۱/۷ | ۳ ٪۱۳/۰ | ۰/۴۱۶ |
| | | سوپرابازال | ۱۰ ٪۳۱/۲ | ۱ ٪۳/۱ | ۰ ٪۰/۰ | | ۱۰ ٪۳۱/۲ | ۰ ٪۰/۰ | ۱ ٪۳/۱ | ۹ ٪۲۸/۱ | ۱/۰۰۰ | ۴ ٪۱۲/۹ | ۱۱ ٪۳۵/۵ | ۶ ٪۱۹/۳ | ۰/۳۵۹ | ۴ ٪۱۲/۹ | ۱۱ ٪۳۵/۵ | ۶ ٪۱۹/۳ | |
| ارتشاح التهابی | شاهد | | ۱ ٪۴/۳ | ۸ ٪۳۴/۸ | ۱۴ ٪۶۰/۹ | | ۸ ٪۳۴/۸ | ۳ ٪۱۳/۰ | ۱ ٪۴/۳ | ۱۱ ٪۴۷/۸ | | ۱ ٪۴/۳ | ۸ ٪۳۴/۸ | ۱۴ ٪۶۰/۹ | | ۱ ٪۴/۳ | ۸ ٪۳۴/۸ | ۱۴ ٪۶۰/۹ | |
| | مورد | | ۱ ٪۴/۱ | ۲۲ ٪۵۶/۱ | ۱۷ ٪۴۳/۵ | ۰/۰۲۹ | ۸ ٪۲۰/۵ | ۷ ٪۱۷/۹ | ۲ ٪۵/۱ | ۲۳ ٪۵۹/۰ | ۰/۰۰۰ | ۰ ٪۰/۰ | ۲۲ ٪۵۶/۱ | ۱۷ ٪۴۳/۵ | ۰/۰۰۲ | ۰ ٪۰/۰ | ۱۰ ٪۲۵/۶ | ۲۵ ٪۶۴/۱ | ۰/۰۰۲ |

* به معنای وجود رابطه معنادار آماری است

**جدول ۴: رابطه بیان دو مارکر Bcl-2 و COX-2**

| | | درصد سلول‌های رنگ گرفته با COX-2 | | شدت رنگ پذیری COX-2 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ارتشاح التهابی | سوپرابازال | بازال | ارتشاح التهابی | اپی تلیوم |
| شدت رنگ پذیری Bcl-2 | اپی تلیوم | ۰/۳۸۳ | ۰/۲۸۳ | ۰/۴۱۸ | ۰/۵۲۹ | *۰/۰۴۳ |
| | ارتشاح التهابی | * ۰/۰۰۲ | *۰/۰۲۱ | *۰/۰۲۸ | *۰/۰۱۹ | ۰/۳۷۹ |
| درصد سلول‌های رنگ گرفته با Bcl-2 | بازال | ۰/۲۸۹ | ۰/۱۰۱ | ۰/۲۶۹ | ۰/۵۲۱ | ۰/۱۰۹ |
| | سوپرابازال | ۰/۹۵۷ | ۰/۱۶۱ | ۰/۹۰۶ | ۰/۴۵۲ | ۰/۵۴۰ |
| | ارتشاح التهابی | *۰/۰۱۳ | ۰/۱۹۶ | *۰/۰۲۱ | ۰/۰۵۹ | ۰/۱۹۰ |

## بحث

در بیماری لیکن پلان، لنفوسیت‌ها به کراتینوسیت‌های لایه بازال حمله کرده که این ارتشاح لنفوسیتی تقریباً به طور کامل از سلول‌های T تشکیل شده و اغلب سلول‌های T موجود در داخل اپی تلیوم و مجاورت لایه بازال از نوع سلول‌های CD8 فعال است. (۱)، به نظر می‌رسد این سلول‌ها از طریق



www.SID.ir

رسپتورهای سطحی خود به نام Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) به Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) موجود در سطح کراتینوسیت‌ها متصل شده و باعث القا اپوپتوز در آنها می‌شوند. اپوپتوز یک مکانیسم کلیدی در جلوگیری از بروز بدخیمیهاست و در بسیاری از ضایعات بدخیم و پیش بدخیم به طرق مختلف این مکانیسم غیر فعال می‌شود. (۱۲)، در مطالعات مختلف، میزان اپوپتوز در OLP با روشهایی چون TUNEL assay ، بیان Caspase 3و میکروسکوپ نوری (۱۳) مورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج بسیاری از این مطالعات نشان می‌دهد علی رغم بالاتر بودن میزان اپوپتوز نسبت به مخاط نرمال، اصولاً میزان اپوپتوز در OLP پایین است، (۱۰و ۱۳)، برخی معتقدند این کاهش، ثانویه به افزایش میزان پروتئین آنتی اپوپتوتیک Bcl-2 در لایه بازال در OLP است. (۱۴)، در مطالعه حاضر Bcl-2 در ۵۷/۴٪ موارد در لایه بازال و در ۷۴/۵٪ موارد در لایه‌های سوپرابازال بیان نشد به طوری که بیان آن در دو گروه مورد و شاهد تفاوت معناداری را نشان نداد که مطابق با دیگر مطالعات انجام شده مبنی بر عدم بیان یا بیان خفیف Bcl-2 در اپیتلیوم بوده است. (۱۰، ۱۳-۱۵)، بنابراین به نظر می‌رسد مکانیسم کاهش اپوپتوز در اپیتلیوم در OLP احتمالاً مستقل از اثرات آنتی اپوپتوتیک Bcl-2 باشد.

در این مطالعه، میزان بیان COX-2 در اپیتلیوم (لایه بازال و سوپرابازال) در انواع مختلف OLP و گروه شاهد اختلاف معناداری نشان نداد که مغایر با نتایج Neppelberg و Renconen می‌باشد. (۱۶)، این مغایرت را شاید بتوان به کمتر بودن تعداد نمونه‌های دیسپلاستیک و موارد همراه با تغییرات بدخیمی در این مطالعه و یا متفاوت بودن روش رنگ آمیزی در مقایسه با مطالعات فوق نسبت داد.

اما در این مطالعه یک ارتباط معنادار آماری بین شدت بیان دو نشانگر Bcl-2 وCOX-2 در اپیتلیوم مشاهده شد. با توجه به محل قرارگیری COX-2 در رتیکولوم اندوپلاسمیک و غشا هسته، این پروتئین به صورت رنگ پذیری غشا هسته بیان می‌گردد (۱۷- ۱۹) و با افزایش بیان، به صورت سیتوپلاسمی دیده می‌شود. (۲۰)، اما عموماً در ارزیابی بیان COX-2، مواردی که رنگ پذیری در سیتوپلاسم اتفاق افتاده باشد، مثبت تلقی می‌گردد که خود درواقع گویای افزایش شدت بیان این نشانگر است. به طوری که در روشهای کنونی، میزان بیان COX-2، تابعی از شدت بیان این نشانگر است و شاید جایگزین کردن شدت بیان COX-2 و Bcl-2 در اپیتلیوم به جای میزان بیان آنها، روش دقیقتری در بررسی این دو نشانگر باشد. در بررسی سایر مطالعات، هیچ گونه تحقیقی در زمینه بررسی رابطه شدت بیان این دو نشانگر، یافت نشد و مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است.

همچنین به نظر می‌رسد مکانیسم‌های حفاظتی در اپیتلیوم مانع اثر القایی COX-2 بر Bcl-2 می‌شوند. مطالعه Bascones افزایش بیان پروتئین p21 در سلول‌های لایه بازال در OLP را نشان داده است. (۱۳)، این پروتئین در لایه بازال اپیتلیوم نرمان بروز نمی‌کند و بیان آن در OLP نشان‌دهنده توقف پرولیفراسیون سلولی در لایه بازال و ترمیم DNA است. (۲۱-۲۳)، مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که افزایش بیان p21 سبب افزایش مقاومت به اپوپتوز می‌شود. (۲۳)، اما علی رغم آن که این اثر همراستا با تأثیرات ضد اپوپتوز Bcl-2 می‌باشد، بین بیان این دو پروتئین یک رابطه معکوس مشاهده شده به طوری که افزایش بیان p21 با کاهش بیان Bcl-2 همراه است. (۲۴- ۲۵)

بر خلاف اپیتلیوم، در ارتشاح التهابی تحت اپیتلیالی، میزان بیان COX-2 و Bcl-2 تفاوت معناداری را با گروه شاهد نشان دادند به طوری که در ۵۳/۲٪ موارد در سلول‌های التهابی، میزان رنگ‌پذیری بیشتر از ۵۰٪ (Score III) دیده شد. این میزان در مورد Bcl-2 ، ۶۳/۸٪ بود. این نتایج همراستا با نتایج مطالعات دیگری است که به پایین بودن میزان اپوپتوز در ارتشاح لنفوسیتی OLP اشاره کرده (۹، ۲۶-۲۷) و پیشنهاد می‌کنند که کاهش اپوپتوز در انفیلترای التهابی OLP به علت اثرات ضد اپوپتوز پروتئین Bcl-2 است. (۲۷-۲۸)، در این مطالعه نیز میزان و شدت بیان Bcl-2 در ارتشاح التهابی در OLP در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معناداری نشان داد (P=۰/۰۲۹، P=۰/۰۰۰) که با توجه به افزایش همزمان بیان COX-2 در ارتشاح التهابی در OLP در مقایسه با گره شاهد و اثرات القایی COX-2 بر Bcl-2 قابل توجیه می‌باشد.

از طرف دیگر با توجه به رابطه مثبت معنادار بین شدت و میزان بیان دو نشانگر فوق، به نظر می‌رسد افزایش مقاومت به اپوپتوز در ارتشاح التهابی بر خلاف اپیتلیوم، از طریق مکانیسم‌های وابسته به Bcl-2 باشد. به طوری که کاهش اپوپتوز سلول‌های التهابی در کنار افزایش تکثیر آنها و اضافه شدن سلول‌های جدید التهابی عامل مهمی در پایداری التهاب



www.SID.ir

در OLP می‌باشد. (۱۰و ۲۴)، انفیلتراسیون التهابی ممکن است مسئول مهار اپوپتوز و افزایش پرولیفراسیون سلول‌های التهابی در این بیماری از طریق مهار Rantes chemochine Inhibition factor, Macrophage و COX-2 باشد. (۱۰)

بررسی رابطه میزان بیان نشانگرهای Bcl-2 و COX-2 با میزان دژنرسانس میعانی لایه بازال (که نشان‌دهنده شدت تخریب اپیتلیوم است) ارتباط معناداری را نشان نداد، در حالی که ارتباط مثبت و معناداری بین میزان دژنرسانس میعانی لایه بازال و شدت التهاب تحت اپیتلیالی مشاهده گردید که شاید این نکته بتواند بیانگر آن باشد که شدت التهاب عامل اصلی تعیین کننده شدت تخریب اپیتلیوم است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، افزایش تکثیر سلولی و کاهش میزان اپوپتوز در اپیتلیوم در OLP بارز و اثبات شده است. (۱۰و ۱۳)، برخی محققان پیشنهاد کرده‌اند این دو عامل در پاسخ به تخریب اپیتلیوم و به عنوان مکانیسم‌های جبرانی جهت حفظ تمامیت اپیتلیوم آسیب دیده فعال شده‌اند ولی نتیجه این فعالیت افزایش احتمال بروز تغییرات دیسپلاستیک و گاهاً بدخیمی در اپیتلیوم را نیز ممکن است به همراه داشته باشد. (۱۰و ۱۳)، اگر چه در این مطالعه ارتباط معناداری بین شدت التهاب و کاهش احتمال وقوع تغییرات دیسپلاستیک در اپیتلیوم خواهد شد. لذا هرچند بین میزان بیان COX -2 با شدت تخریب اپیتلیوم ارتباط مستقیمی دیده نشد، اما مصرف داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAID) از طریق مهار آنزیم COX-2 و کاهش شدت التهاب شاید سبب کاهش ریسک بروز تغییرات دیسپلاستیک و بدخیمی در این ضایعات گردد، اگرچه مطالعات گسترده‌تر و با نمونه‌های دیسپلاستیک بیشتر جهت تأیید نظریه فوق ضروری می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که میزان بیان Bcl-2، در ارتشاح التهابی تحت اپی تلیالی در OLP، بر خلاف اپیتلیوم نقش مؤثری در کاهش میزان اپوپتوز دارد. همچنین شدت بیان Bcl-2 در اپیتلیوم ومیزان بیان Bcl-2 در ارتشاح التهابی با میزان بیان COX-2 مرتبط می‌باشد اگرچه در این مطالعه میزان بیان COX-2، مستقیماً با تخریب لایه بازال و بروز تغییرات دیسپلاستیک در اپی تلیوم ارتباطی نشان نداد، اما به دلیل ارتباط مستقیم شدت التهاب و میزان دژنرسانس و تخریب لایه بازال، شاید بتوان ادعا کرد که COX-2 به صورت غیرمستقیم از طریق تداوم التهاب سبب بروز تخریب اپیتلیوم و فعال شدن مکانیسم‌های کارسینوژنز مرتبط با آن شود.

دیسپلازی به دست نیامد اما چون این مکانیسم‌ها در پاسخ به تخریب اپیتلیوم فعال می‌شوند و میزان تخریب اپیتلیوم با شدت التهاب رابطه مستقیم دارد، به نظر می‌رسد عاملی که باعث کاهش شدت التهاب گردد به طور غیرمستقیم منجر به

## REFERENCES


1. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RC. Oral Pathology. 5th ed. Missouri: Saunders; 2008, 90-5.
2. Neville B, Damm D, Allen C, Bouquqot E. Oral and Maxillofacial Pathology. 3rd ed. Philadelphia, Pensylvania: Elsevier; 2009, 782-8.
3. Rödström PO , Jontell M, Mattsson U, Holmberg E. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. Oral Oncol. 2004Feb; 40(2):131–8.
4. Eisen D. The clinical features, malignant potential and systemic associations of oral lichen planus: A study of 723 patients. J Am Acad Dermatol. 2002Feb; 46(2):207-14.
5. Mignogna MD, Lo Russo L, Fedele S. Gingival involvement of oral lichen planus in a series of 700 patients. J Clin Periodontol. 2005Oct; 32(10):1029-33.
6. Wang D, DuBois RN. Prostaglandins and cancer. Gut. 2006Jan; 55(1): 115–122.
7. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998; 38:97-120.
8. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): A potential role in the pathogenesis of lymphoma. Leuk Res. 2004Feb; 28(2):179-90.
9. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. Cancer Res. 1998Oct; 58(19):4245–9.
10. González-Moles MA, Bascones-Ilundain C, Gil Montoya JA, Ruiz-Avila I, Delgado-Rodríguez M, Bascones-Martínez A.Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus:




Archive of SID
www.SID.ir

Molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. Arch Oral Biol. 2006Dec; 51(12):1093-103.
11. Pires I, Garcia A, Prada J, Queiroga FL. COX-1 and COX-2 Expression in canine cutaneous, Oral and ocular melanocytic tumors. J Comp Path. 2010Aug-Oct; 143(2-3):142-9.
12. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. Cell Mol Life Sci. 1999Jan; 55(1):64-75.
13. Bascones C, Gonzalez-Moles MA, Esparza G, Bravo M, Acevedo A, Gil-Montoya JA. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. Arch Oral Biol. 2005Oct; 50 (10):873-81.
14. Tanda N, Mori S, Saito K, Ikawa K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical studies. J Oral Pathol Med. 2000 Sept; 29:385-93.
15. Sklavounou-Andrikopoulou A, Chrysomali E, Iakovou M, Garinis GA, Karameris A. Elevated serum levels of the apoptosis related molecules TNF-alpha, Fas/Apo-1 and Bcl-2 in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2004Aug; 33(7): 386-90.
16. Neppelberg E, Johannessen AC. DNA content, Cyclooxygenase-2 expression and loss of E-cadherin expression do not predict risk of malignant transformation in oral lichen planus. Eur Arch Otorhinolaryngol .2007Oct; 264 (10):1223-30.
17. Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaefers HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. Int J Biochem Cell Biol. 1999; 31:551–7.
18. Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, Tsukui T, Miyake K, Futagami S. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. Gut. 2000Jun; 46(6):782–9.
19. Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, et al. Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma. Histopathology. 2004Apr; 44(4): 353–9.
20. Wang W, Bergh A, Damber JE. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic infammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. Clin Cancer Res. 2005May; 11(9):3250– 6.
21. Poluha W, Poluha DK, Chang B, Crosbie NE, Schonhoff CM, Kilpatrick DL, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1) is required for survival of differentiating neuroblastoma cells. Mol Cell Biol. 1996Apr; 16(4):1335-41.
22. Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV, Fontana JA. Mechanisms of regulation of waf1/Cip 1 gene expression in human breast carcinoma: Role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. Oncogene. 1994Dec; 9(12):3407-15.
23. Wang J, Walsh K. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. Science. 1996 Jul; 273(5273):359-61.
24. Bukholm IK, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U, Børresen-Dale AL. Interaction between bcl-2 and p21 (WAF1/CIP1) in breast carcinomas with wild-type p53. Int J Cancer. 1997Sept; 73(1):38-41.
25. Mańdziuk S, Dudzisz-Sledź M, Korszeń-Pilecka I, Milanowski J, Wojcierowski J, Korobowicz E. Expression of p21 and bcl-2 proteins in paraffin-embedded preparations of non-small cell lung cancer in stage IIIA after Etoposide and Cisplatin induced chemotherapy. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med. 2003; 58(1):149-53.
26. Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, MacPhail LA, Bloom CY, Regezi JA. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 1997Apr; 26(4):170-5.
27. Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R. Apoptosis in oral lichen planus. Eur J Oral Sci. 2001Oct; 109(5): 361-4.
28. Hirota M, Ito T, Okudela K, Kawabe R, Yazawa T, Hayashi H. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2002Apr; 31(4):204-12.
29. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Seymour GJ. Disease mechanisms in oral lichen planus. A possible role for autoimmunity. Australas J Dermatol. 1993; 34(2):63-9.

Archive of SID



www.SID.ir