

## بررسی مقایسه‌ای بروز سیکلین D1 در لیکن پلان و کارسینومای سلول سنگفرشی دهان به روش ایمونوهیستوشیمی

معصومه زرگران\*#، شگوفه جمشیدی\*، آذر برادران\*\*، عباس مقیم بیگی\*\*\*، مهرانز علی خاصی\*\*\*\*

\* استادیار، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

\*\* دانشیار آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز پزشکی الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

\*\*\* دانشیار، مرکز تحقیقات مدل‌سازی بیماری‌های غیر واگیر، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

\*\*\*\* استادیار، گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

تاریخ ارائه مقاله: ۹۲/۵/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۲

### Comparative Investigation of Cyclin D1 Expression in Oral Lichen Planus and Squamous Cell Carcinoma by Immunohistochemistry Technique

Massoumeh Zargaran\*#، Shokoofeh Jamshidi\*، Azar Baradaran\*\*، Abbas Moghimbeigi\*\*\*،  
Mehrnaz Alikhassi\*\*\*\*

\* Assistant Professor, Dental Research Center, Dep of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\*\* Associate Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, AL Zahra Medical Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

\*\*\* Associate Professor, Research Center for Modeling of Noncommunicable Disease, Dept of Biostatistics & Epidemiology, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\*\*\*\* Assistant Professor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Received: 22 August 2013 ; Accepted: 12 May 2013

**Introduction:** Oral lichen planus (OLP) is suggested as a lesion capable of transforming to oral squamous cell carcinoma (OSCC). However malignancy potential of the lesion and its relationship to OSCC is a matter of controversy. Since uncontrolled cell proliferation is an indicator of malignant transformation, the aim of this study was to compare cyclin D1 expression in OLP and OSCC lesions.

**Materials & Methods:** In this descriptive-analytical study, cyclin D1 expression among 3 groups of epithelial hyperplasia, OLP and OSCC each having 21 samples was investigated using immunohistochemistry staining through quantitative and semi-quantitative methods. One-way ANOVA, Kruskal Wallis, Mann-Withney and Chi-square were used for statistical analysis.

**Results:** Quantitatively, cyclin D1 expression for epithelial hyperplasia, OLP and OSCC were  $13.69 \pm 6.00\%$ ,  $28.38 \pm 3.53\%$  and  $66.94 \pm 14.49\%$ , respectively. Semi- quantitatively, number of stained cells for epithelial hyperplasia and OLP were less than 35% while for OSCC it was more than 35%. Through quantitative and Semi- quantitative comparison, cyclin D1 expression among the three studied groups overall and either bilaterally was significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results showed that cell proliferation of OLP significantly was less than that of OSCC suggesting that is no relationship between the two although pre-malignancyability of OLP is not exactly ruled out. It seems that increasing cell proliferation might be related to malignancy transformation of OLP; therefore, continuous follow-up of the lesion is necessary.

**Key words:** Immunohistochemistry, cyclin D1, oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus.

# Corresponding Author: massoumehzargaran@gmail.com, mm.zargaran@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2014; 38(1): 17-28 .

## چکیده

**مقدمه:** لیکن پلان دهانی (OLP) به عنوان ضایعه‌ای با قابلیت تبدیل شدن به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (OSCC) پیشنهاد گردیده است. اما پتانسیل بدخیمی این ضایعه و ارتباط آن با OSCC مورد اختلاف نظر می‌باشد. از آنجا که تکثیر کنترل نشده سلولی شاخص وقوع تغییر بدخیمی به شمار می‌رود، هدف از مطالعه حاضر مقایسه بروز سیکلین D1 در ضایعات OLP و OSCC بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی به دو شیوه کمی و نیمه کمی بروز سیکلین D1 در سه گروه هیپرپلازی اپی تلیالی، OLP و OSCC هر یک با ۲۱ نمونه بررسی گردید. در تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آنالیز واریانس، کروسکال والیس، من ویتنی و کای دو استفاده شد ( $\alpha=0.05$ )

**یافته‌ها:** در روش کمی بروز سیکلین D1 در هیپرپلازی اپی تلیالی، OLP و OSCC به ترتیب برابر  $13/69 \pm 6/00$ ،  $28/38 \pm 3/53$  و  $66/94 \pm 14/49$  درصد بود. در روش نیمه کمی تعداد سلول‌های رنگ گرفته در هیپرپلازی اپی تلیالی و OLP کمتر از ۳۵٪ و در OSCC بیشتر از ۳۵٪ بود. مقایسه کمی و نیمه کمی بروز سیکلین D1 بین سه گروه و به صورت دو به دو بین گروه‌ها دارای تفاوت معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد تکثیر سلولی در OLP به طور معنی‌داری کمتر از OSCC می‌باشد و ارتباطی بین این دو وجود ندارد، گرچه پیش‌بدخیم بودن OLP را نیز به صورت قطعی رد نمی‌کند. به نظر می‌رسد افزایش تکثیر سلولی ممکن است با وقوع تغییر بدخیمی در OLP مرتبط باشد. از این رو پیگیری مستمر ضایعه را می‌طلبد.

**واژه‌های کلیدی:** ایمونوهیستوشیمی، سیکلین D1، کارسینوما سلول سنگفرشی دهانی، لیکن پلان دهانی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۳ دوره ۲۸ / شماره ۱: ۲۸-۱۷.

## مقدمه

OLP یک بیماری مزمن التهابی پوستی - مخاطی و از شایع‌ترین اختلالات درماتولوژیکی می‌باشد که حفره دهان را درگیر می‌سازد، به طوری که حتی ممکن است این جایگاه تنها مکان ابتلا به ضایعه باشد.<sup>(۱)</sup> OLP در ۲-۳٪ جمعیت و اکثراً در بزرگسالان بالای ۴۰ سال، رخ می‌دهد<sup>(۲)</sup> و زنان با نسبت تقریبی ۱/۴ به ۱ بیش از مردان مبتلا می‌شوند.<sup>(۳)</sup> برخلاف مشی بالینی لیکن پلان پوستی که اساساً خطر تغییر بدخیمی ندارد<sup>(۴)</sup> برخی مطالعات نشان داده‌اند که بیماران مبتلا به OLP در خطر ابتلا به OSCC هستند.<sup>(۵-۱۰)</sup>

سرطان‌زایی (کارسینوژنیز) یک فرایند چندمرحله‌ای است که با وقوع جهش‌های پی در پی و ناهنجاری‌های اپی‌ژنتیک در ژن‌های متعدد حادث می‌گردد که در این میان ژن‌های کنترل‌کننده چرخه سلولی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. پیشرفت منظم سلول‌ها طی چرخه سلولی به دقت به وسیله یک سری پروتئین به نام سیکلین‌ها هدایت می‌شود که نقش خود را با اتصال و فعال نمودن کینازهای وابسته به سیکلین (CDK) به انجام

کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (OSCC) یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سرتاسر جهان می‌باشد.<sup>(۱)</sup> OSCC همچنین یک مشکل و معضل بهداشتی جوامع جهانی به شمار می‌رود که بروز موارد جدید آن سالیانه روبه افزایش است.<sup>(۲)</sup> این تومور بدخیم مهاجم، ناتوانی و مرگ و میر قابل توجه بیماران مبتلا را در پی دارد.<sup>(۳)</sup> با وجود پیشرفت‌های فراوان، متوسط بقای ۵ ساله آن بسیار کم بوده و در طی چند دهه اخیر بهبودی نیافته است.<sup>(۴)</sup> از این رو تشخیص سریع و زودهنگام آن جهت اعمال روش‌های درمانی مناسب در مراحل اولیه بروز ضایعه و بهبود پیش‌آگهی بیمار ضروری است.<sup>(۵)</sup>

بسیاری از OSCC‌ها به دنبال یک ضایعه پیش‌سرطانی شروع می‌شوند.<sup>(۶)</sup> این ضایعات بالقوه بدخیم دهانی هر چند لزوماً به کارسینوم تبدیل نمی‌گردند<sup>(۷)</sup>، اما به طور قابل ملاحظه‌ای با افزایش خطر بروز OSCC همراه هستند.<sup>(۸)</sup> لیکن پلان دهانی (OLP) به عنوان یکی از این ضایعات مطرح شده است.<sup>(۹)</sup>

می‌رسانند.<sup>(۱۱)</sup>

### مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع گذشته‌نگر و توصیفی - تحلیلی بود که به روش مقطعی انجام گردید. پس از بررسی آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان و بیمارستان الزهراء اصفهان طی یک دوره ۱۰ ساله (۱۳۹۰-۱۳۸۰) نمونه‌های مطالعه براساس مندرجات پرونده و گزارش آسیب‌شناسی بیماران انتخاب شدند. سپس کلیه نمونه‌ها توسط ۲ پاتولوژیست مورد بازبینی قرار گرفت. قابل ذکر است جهت تأیید تشخیص ضایعات OLP از معیارهای تعریف شده توسط Eisenberg استفاده شد.<sup>(۱۷)</sup> نمونه‌های واجد تغییرات دیسپلازی، مشکوک از نظر تشخیص، با ثبوت نامناسب، دارای خونریزی و نکروز کنار گذاشته شدند. همچنین ثبت ریسک فاکتورهای مداخله‌گر چون مصرف سیگار، الکل و دارو در پرونده یا تشخیص همزمان ضایعات دیگر (همراه با نمونه‌های اصلی) جزء معیارهای خروج از مطالعه بود.

۶۳ نمونه متشکل از ضایعات هیپرپلازی اپی‌تلیالی (گروه کنترل)، لیکن پلان و کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی انتخاب شدند (۲۱ نمونه در هر گروه). قابل ذکر است نمونه‌های هیپرپلازی انتخاب شده فاقد دیسپلازی بودند و گروه کارسینوم سلول سنگفرشی متشکل از ۱۳ نمونه (۶۱/۹۰٪) دارای تمایز خوب تا متوسط (Grade I&II) و ۸ مورد (۳۸/۱۰٪) با درجه تمایز ضعیف (Grade III) بود. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نمونه‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضدسیکلین D1 آماده استفاده (دانمارک DAKO، ready-to-use، Code N16187) و به روش پراکسیداز-آنتی پراکسیداز به شرح ذیل انجام گردید:

از هر نمونه برش ۴ میکرونی تهیه شده و بر روی لام‌های آماده شده قرار گرفت. لام‌ها در دمای ۵۸°C در

سیکلین D1 پروتئینی ۴۵ کیلودالتونی است و به وسیله ژن CCND1، واقع بر کروموزوم ۱۱q۱۳ کد می‌گردد.<sup>(۱۱و۱۲)</sup> در طول مراحل مختلف چرخه سلولی ( $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ ) سیکلین D1 بخشی از سیستم مولکولی است که در تنظیم عبور چرخه سلولی از مرحله  $G_1$  به S (نقطه بازرسی  $G_1/S$ ) نقش دارد.<sup>(۱۱و۱۳)</sup> به طوری که این پروتئین بعد از تولید مجموعه‌هایی را با CDK4 و CDK6 تشکیل داده، سبب فسفوریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما (RB) می‌شود. با فسفریله شدن RB مهار فعالیت عامل رونویسی  $E_2F$  برداشته شده و سلول وارد مرحله S می‌شود.<sup>(۱۱و۱۳و۱۴)</sup>

برخلاف عملکرد طبیعی سیکلین D1 به عنوان یک پروتئین کلیدی و تنظیم‌کننده‌ای مثبت بر پیشرفت منظم چرخه سلولی<sup>(۱۱و۱۳و۱۴)</sup>، بروز بیش از حد آن سبب کوتاه شدن مرحله  $G_1$  و وابستگی کمتر سلول به عوامل رشد می‌گردد.<sup>(۱۱)</sup> چنین شرایطی منجر به از دست رفتن کنترل طبیعی چرخه سلولی و به تبع آن تکثیر (پرولیفراسیون) سلولی کنترل نشده می‌شود.<sup>(۱۱و۱۲)</sup>

با توجه به آن که تکثیر کنترل نشده سلول یکی از مهمترین مکانیسم‌های بیولوژیک کارسینوژنیز به شمار می‌رود<sup>(۱۵)</sup> و تغییر در بروز پروتئین‌های مرتبط با آن از شاخصه‌های مهم تعیین پتانسیل واقعی تغییر بدخیمی ضایعات به شمار می‌رود،<sup>(۱۲و۱۶)</sup> در پژوهش حاضر با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) بروز سیکلین D1 در ضایعات OLP و OSCC مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت تا شاید با استفاده از نتایج این مطالعه بتوان احتمال وقوع تغییرات بدخیمی آتی را در OLP پیش بینی نمود.

نمونه محاسبه شد (بررسی کمی). همچنین بروز نشانگر (مارکر) سیکلین D1 به روش نیمه کمی نیز بررسی شد. بر این اساس تعداد سلول‌های رنگ پذیرفته به انواع کمتر از ۱٪ رنگ گرفته = ۰، ۱-۱۰٪ برابر یک مثبت، ۱۰-۳۵٪ برابر دو مثبت، ۳۵-۷۰٪ برابر سه مثبت و نمونه‌های بیش از ۷۰٪ رنگ گرفته به عنوان چهار مثبت رتبه‌بندی شده و مورد مطالعه قرار گرفتند.<sup>(۱۸)</sup>

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون‌های آماری One way ANOVA و Tukey (جهت مقایسه متغیرهای کمی بین گروه‌ها)، Kruskal-Wallis و Mann-Whitney (به منظور مقایسه متغیرهای نیمه کمی بین گروه‌ها) و Fisher Exact (جهت مقایسه متغیرهای کیفی بین گروه‌ها) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در همه آزمون‌ها سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

یافته‌های مربوط به توزیع فراوانی نمونه‌ها (جنس، سن، محل ضایعه) در جدول ۱ ارائه شده است. آزمون  $\chi^2$  نشان داد که در سه گروه از نظر جنسیت اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد ( $P=0/169$ ). اما از نظر سن بیماران (با استفاده از آزمون One way ANOVA) و محل ابتلای ضایعات (با به کار بردن آزمون Fisher Exact) بین سه گروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ( $P<0/001$ ).

در بررسی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی رنگ‌پذیری هسته‌ای با نشانگر سیکلین D1 (رنگ‌پذیری مثبت) در تمامی گروه‌ها (۱۰۰٪) مشاهده گردید (تصاویر ۴-۱) و شمارش سلولی مطابق آنچه در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد صورت گرفت.

Oven به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و سپس از دو ظرف گزلیل هر یک به مدت ۵ دقیقه به منظور پارافین‌زدایی و از الکل با درجات مختلف (از الکل مطلق تا ۷۰ درجه) جهت آب‌دهی عبور داده شدند. بعد از شستشو با آب مقطر در مرحله بعد به منظور بازیافت آنتی‌ژنی لام‌ها در محلول بافرسیترات با PH=9 گذاشته شد. این مجموعه ابتدا به مدت ۵ دقیقه با توان ۸۰ وات و سپس ۱۵ دقیقه با توان ۴۵۰ وات در مایکروویو قرار گرفت. پس از شستشوی لام‌ها (به مدت ۱۵ دقیقه) و خشک شدن آن‌ها جهت مهار پراکسیداز داخلی تمامی نمونه‌ها در هیدروژن پراکساید ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از این مرحله و در حد فاصل مراحل بعدی که به ترتیب شامل افزودن آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه، کروموزن دی‌آمینوبنزیدین (DAB) و هماتوکسیلین جهت رنگ‌آمیزی بود به منظور شستشو از محلول بافر فسفات (Phosphate buffered saline: PBS) استفاده شد. در مرحله نهایی نمونه‌ها در الکل با درجات مختلف به منظور آب‌گیری و سپس گزلیل به منظور شفاف‌سازی قرار داده شدند و نهایتاً مانت شدند. در تمام مراحل از نمونه Mantle cell lymphoma به عنوان کنترل مثبت برای اطمینان از صحت رنگ‌آمیزی استفاده گردید. هسته سلول‌های رنگ گرفته با آنتی‌بادی (هسته‌های قهوه‌ای شده) به عنوان رنگ‌پذیری مثبت در نظر گرفته شد. جهت شمارش سلول‌های رنگ شده با سیکلین D1 از میکروسکوپ نوری (Olympus BX41, Tokyo, Japan) استفاده شد. ابتدا لام‌ها در درشت‌نمایی پایین ( $\times 40$ ) مشاهده شده و مناطق با حداکثر رنگ‌پذیری تعیین شدند. سپس با درشت‌نمایی  $\times 400$  در این نواحی تعداد ۱۰۰۰ سلول اپی‌تلیالی شمارش گردید و درصد سلول‌های رنگ‌گرفته، لیبل ایندکس (Label Index: LI)، برای هر

یافته‌های مربوط به مطالعه بروز نشانگر سیکلین D1 به روش نیمه کمی (رتبه‌بندی) در گروه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

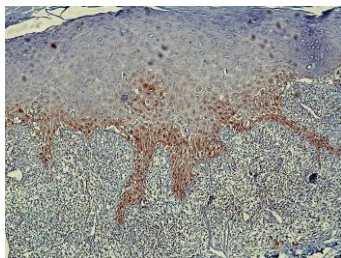
اختلاف آماری معنی‌داری به لحاظ رتبه‌بندی نشانگر سیکلین D1 بین سه گروه مورد مطالعه وجود داشت ( $P < 0/001$ , آزمون Kurskal Wallis). این تفاوت آماری معنی‌دار در بررسی دو به دو بین گروه‌ها نیز دیده شد ( $P < 0/05$ , آزمون Mann-Whitney).

قابل ذکر است با توجه به جدول ۲ رنگ‌پذیری کمتر از ۳۵٪ در تمام موارد گروه هیپرپلازی اپی‌تلیالی و OLP (۱۰۰٪ نمونه‌ها) مشاهده شد در حالی که همه نمونه‌های گروه OSCC (۱۰۰٪ موارد) رنگ‌پذیری بیشتر از ۳۵٪ را نشان دادند.

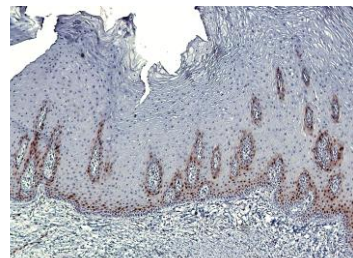
میانگین درصد بروز نشانگر سیکلین D1 در گروه هیپرپلازی اپی‌تلیالی  $13/69 \pm 6/00$ ، در گروه OLP  $28/38 \pm 3/53$  و در گروه OSCC  $66/94 \pm 14/49$  بود. با توجه به اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال نبوده و به سمت راست چوله بودند، از تبدیل لگاریتم استفاده شد که برای گروه هیپرپلازی اپی‌تلیالی  $1/09 \pm 0/22$ ، OLP  $1/45 \pm 0/06$  و OSCC  $1/82 \pm 0/10$  به دست آمد و شرایط آزمون One way ANOVA برقرار شد. این آزمون نشان داد اختلاف معنی‌داری به لحاظ بروز سیکلین D1 در گروه‌های تحت مطالعه وجود دارد ( $P < 0/001$ ). همچنین با استفاده از آزمون Tukey میانگین درصد رنگ‌پذیری سیکلین D1 در بررسی دودویی گروه‌ها با یکدیگر نیز دارای تفاوت آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار سن، توزیع فراوانی جنس و محل ضایعه به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

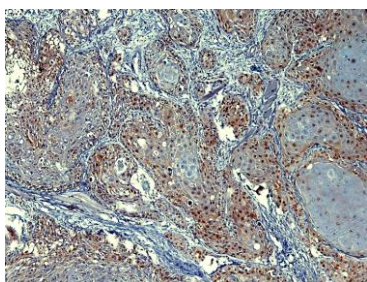
گروه	تعداد	مرد تعداد (درصد)	زن تعداد (درصد)	سن انحراف معیار ± میانگین	مخاط باکال	بوردر زبان	کف دهان	ریج آلوتول منذیل	لته
هیپرپلازی اپیتلیالی	۲۱	۸ (۳۸/۰۹)	۱۳ (۶۱/۹)	$28/19 \pm 12/02$	۱۰	۱	۲	۰	۸
لیکن پلان دهانی	۲۱	۱۰ (۴۷/۶۱)	۱۱ (۵۲/۳۸)	$32/71 \pm 12/37$	۱۱	۴	۴	۲	۰
کارسینوم سلول سنگفرشی	۲۱	۱۴ (۶۶/۶۶)	۷ (۳۳/۳۳)	$62/19 \pm 10/33$	۰	۱۵	۲	۳	۱
نتیجه آزمون		$P = 0/169$ $\chi^2 = 3/556$		One-way ANOVA $P < 0/001$			Exact test: $P < 0/001$		



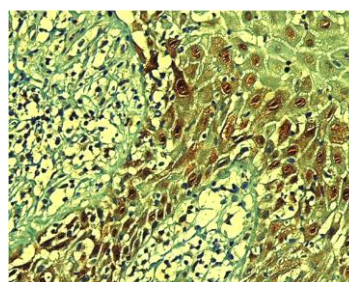
تصویر ۲: بروز سیکلین D1 در نمونه لیکن پلان دهانی - (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر)



تصویر ۱: بروز سیکلین D1 در نمونه هیپرپلازی اپیتلیالی - (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر)



تصویر ۴: بروز سیکلین D1 در نمونه کارسینومای سلول سنگفرشی دهان - (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)



تصویر ۳: بروز سیکلین D1 در نمونه لیکن پلان دهانی - (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)

جدول ۲: توزیع فراوانی رتبه بندی نشانگر سیکلین D1 در گروه‌های تحت مطالعه برحسب سلول‌های اپی تلیالی مثبت

گروه	تعداد	۰	+۱	+۲	+۳	+۴
هیپرپلازی اپیتلیالی	۲۱	۰ (۰/۰)	۶ (۲۸/۵)	۱۵ (۷۱/۵)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
لیکن پلان دهانی	۲۱	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)	۲۱ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
کارسینوم سلول سنگفرشی	۲۱	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)	۱۱ (۵۲/۴)	۱۰ (۴۷/۶)
کل	۶۳	۰ (۰/۰)	۶ (۹/۵)	۳۶ (۵۷/۱)	۱۱ (۱۷/۴)	۱۰ (۱۶/۰)

Kurskal Wallis test ,  $P < 0.001$

## بحث

یکی از ضایعاتی که امروزه به عنوان شرایط پیش‌بدخیم مطرح می‌گردد لیکن پلان دهانی است.<sup>(۸-۱۰)</sup> بر این اساس اگرچه OLP به لحاظ بالینی نماهای خاص (تپیک) و کاملاً قابل تشخیص دارد<sup>(۱۰)</sup> اما بیوپسی این ضایعه جهت بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و رد وجود آتپبی سلولی و علائم بدخیمی توصیه شده است.<sup>(۱)</sup> ولی از آنجا که تنها نماهای بالینی یا میکروسکوپی تعیین‌کننده

پیشرفت و تبدیل یک ضایعه پیش‌بدخیم به بدخیمی نمی‌باشد، یافتن و شناسایی نشانگرهای مولکولی که می‌توانند معرف چنین ویژگی باشند ضروری به نظر می‌رسد.<sup>(۱۹)</sup> از دست رفتن کنترل چرخه سلولی و به تبع آن افزایش تکثیر سلولی اساس تغییر بدخیمی به شمار می‌رود<sup>(۲۰)</sup> و به عنوان یکی از شاخصه‌های وجود ناهنجاری‌های ژنتیکی مرتبط با پیشرفت ضایعات پیش‌بدخیم و بدخیم استفاده می‌شود.<sup>(۱۲)</sup> میزان فعالیت

بروز سیکلین D1 در تمامی نمونه‌های گروه OLP (۱۰۰٪) دیده شد اما میزان تکثیر سلولی بدست آمده بیشتر از پرولیفراسیون گروه OLP در مطالعه Hirota و همکاران بود.<sup>(۲۱)</sup> همچنین در مقایسه با دیگر مطالعات (انجام شده با سایر مارکهای پرولیفراسیون) نتیجه شمارش ما بسیار نزدیک به مطالعه Lee و همکاران<sup>(۲۸)</sup> (مارکر PCNA) و کمتر از مطالعه Taniguchi و همکاران<sup>(۲۹)</sup> (مارکر Ki67) بود.

در تحقیق حاضر بروز سیکلین D1 در ۱۰۰٪ نمونه‌های گروه OSCC وجود داشت. این یافته مغایر با مطالعه Turatti و همکاران<sup>(۲۳)</sup> و Bascones-Martinez و همکاران<sup>(۲۲)</sup> بود که به ترتیب بروز این مارکر را در ۶۶/۶٪ و ۶۶/۶٪ نمونه‌های OSCC گزارش نمودند.

در مقایسه میزان پرولیفراسیون گروه OSCC مطالعه حاضر با مطالعات موجود نیز مشخص گردید که نسبت به مطالعه Kotelnikov و همکاران<sup>(۱۸)</sup> (نمونه‌های مورد استفاده: SCCهای سر و گردن، مارکر سیکلین D1) و Kurokawa و همکاران<sup>(۲۵)</sup> (مارکر Ki67)، بیشتر ولی مشابه با مطالعه Saito و همکاران<sup>(۳۰)</sup> (مارکر Ki67) بود. ضمن در نظر گرفتن ناهمگونی بافت‌های مورد بررسی و گاهی استفاده از نشانگرهای مختلف، تفاوت‌ها در مطالعات فوق (به ویژه در مواردی که نشانگر مورد استفاده مشابه بوده است) شاید بیانگر وجود مشکلات در بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی برش‌های بافتی حاصل از بلوک‌های پارافینی باشد. به نظر می‌رسد عوامل متعددی چون استفاده از مواد و روش‌های غیراستاندارد در نگهداری، ثابت کردن بافت‌ها و طی مراحل تهیه بلوک پارافینی، کاربرد روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، نوع آنتی‌بادی به کار برده شده (مونوکلونال/ پلی کلونال) و شرکت سازنده آن می‌تواند

تکثیر سلولی را می‌توان با مارکهای معرف آن چون Ki67، PCNA و سیکلین D1 و به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی نمود<sup>(۱۲)</sup> که در این مطالعه از مارکر سیکلین D1 استفاده شد.

در مطالعه حاضر تمامی نمونه‌های گروه کنترل (۱۰۰٪) رنگ‌پذیری با سیکلین D1 را نشان دادند که مشابه مطالعه Kotelnikov و همکاران<sup>(۱۸)</sup> و Hirota و همکاران<sup>(۲۱)</sup> می‌باشد. مغایر با این مطالعات، Bascones-Martinez و همکاران<sup>(۲۲)</sup> و Turatti و همکاران<sup>(۲۳)</sup> بروز این نشانگر را در هیچ یک از نمونه‌های گروه کنترل خود گزارش نکردند.

همچنین میزان تکثیر سلولی گروه کنترل بررسی ما نسبت به مطالعه Hirota و همکاران<sup>(۲۱)</sup> بیشتر بود. این برتری در مقایسه با پرولیفراسیون گروه کنترل برخی مطالعات دیگر (تعیین شده با مارکر Ki67) نیز مشاهده گردید.<sup>(۲۴-۲۶)</sup>

قابل ذکر است در پژوهش حاضر به دلایل اخلاقی و عدم وجود بلوک مخاط نرمال در آرشیو از نمونه‌های هیپرپلازی اپی‌تلیالی بعنوان جایگزین گروه کنترل واقعی (مخاط طبیعی دهان) استفاده شد در حالی که در مطالعات مقایسه شده گروه کنترل مخاط نرمال بوده است.<sup>(۲۶-۲۴ و ۲۱)</sup>

در هیپرپلازی عوامل رشدی (Growth factors) تولید می‌شوند که با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی در سطح سلول‌ها مسیرهای پیام‌رسانی خاصی را در داخل سلول فعال ساخته و منجر به تحریک تکثیر سلولی می‌گردند. در حالی که در یک بافت نرمال سلول در یک وضعیت ثابت (همئوستازیس) بسر می‌برد<sup>(۲۷)</sup> این امر شاید بتواند علت بیشتر بودن تکثیر سلولی گروه کنترل پژوهش حاضر را نسبت به مطالعات دیگر<sup>(۲۶-۲۴ و ۲۱)</sup> توضیح دهد.

در مطالعه ما همچون گزارش Hirota و همکاران<sup>(۲۱)</sup>

بر نتایج حاصل از این شیوه بررسی تاثیرگذار باشد. در مطالعه حاضر میزان تکثیر سلولی گروه‌ها به دو روش کمی و نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت که حاکی از افزایش معنی‌دار پرولیفراسیون از گروه کنترل تا OSCC بود.

در بررسی دوجه دو بین گروه‌ها نیز تکثیر سلولی گروه OLP از گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود که این یافته با نتایج حاصل از مطالعات موجود (البته با گروه کنترل مخاط نرمال و کاربرد یکی از مارکرهای پرولیفراسیون) مشابهت داشته است.<sup>(۳۱-۳۴ و ۲۹ و ۲۸ و ۲۱)</sup> در این مطالعه بیشتر بودن پرولیفراسیون گروه OLP در مقایسه با هیپرپلازی اپی‌تلیالی را شاید بتوان با التهاب مزمن، آزاد شدن واسطه‌های التهابی و سیتوکاین‌های اختصاصی از سلول‌های التهابی موجود در این دسته از ضایعات مرتبط دانست.

در OLP برخی از سیتوکاین‌های پیش التهابی (کموکاین‌ها) توسط سلول‌های لنفوسیت T ترشح می‌شود که می‌توانند ماست‌سل‌ها را به داخل ضایعه جذب کرده و دگرانولاسیون آن‌ها را تحریک نمایند.<sup>(۵)</sup> دگرانولاسیون ماست‌سل‌ها با آزاد شدن TNF- $\alpha$  و کیمازها همراه است که خود سبب افزایش تنظیمی (UP-regulation) لنفوسیت‌های T جهت ترشح مجدد کموکاین‌ها می‌گردد<sup>(۵)</sup>، بنابراین در حالی که هیپرپلازی اپی‌تلیالی یک سازگاری سلولی محسوب می‌شود که به موجب آن وضعیتی تغییر یافته اما با ثبات جدید حاصل شده است<sup>(۲۷)</sup> در لیکن پلان دهانی چرخه‌ای معیوب در حال تکرار شدن است که ضمن مزمن نمودن التهاب به نظر می‌رسد می‌تواند تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی را نیز متاثر سازد.<sup>(۳۱، ۳۵ و ۵)</sup>

ارتباط بین سرطان و التهاب در مطالعات بسیاری

بررسی شده و یافته‌ها به رابطه‌ای مثبت بین التهاب مزمن و سرطان اشاره دارد.<sup>(۳۶-۳۸)</sup> ارتشاح التهابی به عنوان یک ریسک فاکتور قوی برای ایجاد بدخیمی در وضعیت‌های التهابی مزمن چون کولیت اولسراتیو، مری بارت و گاستریت آتروفیک در نظر گرفته شده است و اخیراً نیز پیشنهاد گردیده که OLP را هم می‌توان به این گروه اضافه نمود.<sup>(۳۴)</sup> سلول‌های التهابی و انواع واسطه‌های التهابی آنها چون سیتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و آنزیم‌ها از طریق تسهیل رگزایی، افزایش تولید ماتریکس متالوپروتئینازها، تخریب غشاء پایه و افزایش تکثیر سلولی میکرو محیطی مناسب برای شروع تغییرات بدخیمی و ایجاد سرطان به وجود می‌آورند.<sup>(۳۹)</sup>

افزایش تکثیر سلولی بعنوان یکی از اولین شاخصه‌های بدخیمی مطرح شده و یک رویداد کلیدی در ایجاد سرطان به شمار می‌رود.<sup>(۲۰)</sup> از این رو شاید بتواند جزء تغییراتی محسوب شود که حتی با عدم وجود نماهای بالینی و هیستوپاتولوژیک یک نئوپلاسم بدخیم، بیانگر وقوع مرحله ابتدایی کار سینوزیزیس بوده و نشان دهد که یک ضایعه ظاهراً خوش‌خیم تحت تغییرات بدخیمی واقع گردیده است.<sup>(۴)</sup> اما در مطالعه حاضر تکثیر سلولی در OSCC به طور معنی‌داری بیشتر از OLP بود که مشابه نتایج حاصل از مطالعات de Sousa و همکاران<sup>(۹ و ۲۰)</sup> و Lee و همکاران<sup>(۲۸)</sup> می‌باشد (مارکر مورد استفاده مطالعات PCNA). در مقایسه با OSCC کمتر بودن پرولیفراسیون سلولی OLP در پژوهش حاضر شاید حاکی از آن باشد که در این گروه از ضایعات هنوز برخی مکانیسم‌های حفاظتی فعال بوده و نقش خود را به طور مناسب و کارآمد ایفاء می‌نمایند.

به عنوان مثال، تکثیر سلولی در OLP تلاشی جهت حفظ ضخامت اپی‌تلیوم و جلوگیری از زخم شدن آن



بدخیمی در OLP را رد نمی‌کند. بسیار مهم است به این نکته اشاره نماییم که در ضایعات التهابی مزمن محصولاتی توسط سلول‌های التهابی تولید می‌شوند که می‌توانند از طریق آسیب به DNA سلولی، نقص در پاسخ‌های محافظت‌کننده وابسته به P53 (ژن سرکوبگر تومور) و تجمع جهش‌های (موتاسیون‌های) انکوژنیک به عنوان عوامل موتاسیون‌زا برای سلول‌های اپی‌تلیالی عمل نمایند.<sup>(۳۹)</sup> بنابراین هر چه میزان تکثیر سلولی در لیکن پلان دهانی بیشتر باشد احتمال وجود سلول‌های موتاسیون یافته افزایش می‌یابد که می‌تواند ایجاد بدخیمی در این ضایعه را به دنبال داشته باشد.<sup>(۳۴)</sup>

در این زمینه یافته‌های حاصل از بررسی نیمه کمی بروز نشانگر سیکلین D1 در نمونه‌های OLP و OSCC تحقیق حاضر حائز اهمیت است.

در تمامی نمونه‌های OLP مورد بررسی میزان بروز سیکلین D1 کمتر از ۳۵٪ بود در حالی که در گروه OSCC تمامی نمونه‌ها رنگ‌پذیری بیشتر از ۳۵٪ را نشان دادند. بر مبنای این نتیجه شاید بتوان حد متمایزکننده (Cut-off) تکثیر سلولی ضایعات OLP و OSCC را از یکدیگر رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی به میزان ۳۵٪ با نشانگر سیکلین D1 در نظر گرفت و پیشنهاد نمود که در نمونه‌های OLP با بروز کمتر از ۳۵٪ به احتمال زیاد مکانیسم‌های حفاظت‌کننده بدرستی عملکرد خود را انجام می‌دهند، توانایی و ظرفیت حذف سلول‌های واجد موتاسیون و تغییرات ژنتیکی را دارند و بنابراین ثبات ژنومی این ضایعات حفظ می‌گردد.

در حالی که اگر تکثیر سلولی بیش از ۳۵٪ باشد (عبور از نقطه Cut-off) به دلیل همپوشانی و شباهت با میزان پروليفراسیون سلولی ضایعات OSCC، احتمال وجود سلول‌های جهش یافته و نقص در ساز و کارهای

عنوان شده است.<sup>(۳۴و۳۵)</sup> اما به نظر می‌رسد مکانیسم‌هایی حفاظت‌کننده مانع از تکثیر بی‌رویه سلول می‌شوند. یکی از آن‌ها حذف سلول‌ها از طریق فعال شدن مسیر آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) می‌باشد. به عنوان مثال Fan و همکاران<sup>(۴۰)</sup> نشان دادند که بروز بیش از حد Bax (پروتئین القاء کننده آپوپتوز) با مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های اپی‌تلیالی در OLP مرتبط است. de Sousa و همکاران<sup>(۹)</sup> هم گزارش نمودند که با تکثیر سلولی بیشتر در ضایعات OLP بروز Bax بیشتری نیز مشاهده شده است.<sup>(۹)</sup> این امر به ویژه اجازه به حذف سلول‌هایی می‌دهد که دارای آسیب ژنتیکی غیرقابل برگشت هستند و از این طریق از فعالیت کارسینوژن‌ها بر روی اپی‌تلیوم کاسته می‌شود.<sup>(۹)</sup>

مکانیسم دیگر در مقابله با افزایش تکثیر سلولی ناشی از التهاب در OLP شاید افزایش قابل ملاحظه در گیرنده‌های (رسپتورهای) TNF- $\alpha$  سلول‌های اپی‌تلیالی این ضایعه باشد که می‌تواند در مهار پروليفراسیون نقش داشته باشد.<sup>(۳۱)</sup>

از طرفی، عنوان شده رابطه مستقیمی بین میزان بروز P16 (پروتئین مهارکننده چرخه سلولی) و درجه التهاب بافتی وجود دارد. بروز بیش از حد این پروتئین در تحریکات التهابی مزمن (چون OLP) با میزان بالای TNF- $\alpha$  مرتبط بوده و در راستای محدود کردن تکثیر سلولی صورت می‌گیرد تا از رشد کنترل نشده سلول‌های اپی‌تلیالی شبه بدخیم (Malignant-Like) جلوگیری نماید.<sup>(۴۱)</sup>

در مجموع می‌توان چنین انگاشت که در پی وقوع تکثیر سلولی در OLP این روند کنترل شده بوده و بین تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی آن تعادل وجود دارد. اما باید در نظر داشت که این یافته‌ها الزاماً ایجاد تغییرات

نمونه‌های OSCC می‌باشد. این مساله هشدار برای کلینیسین‌ها خواهد بود که بیماران مبتلا به OLP، به ویژه آن دسته که دارای افزایش تکثیر سلولی هستند، را همواره تحت پیگیری‌های دوره‌ای منظم و معاینات دقیق و مستمر قرار دهند تا کوچکترین تغییر ایجاد شده در ضایعات آن‌ها در همان مراحل اولیه شناسایی شود و درمان مناسب صورت گیرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر حمایت مالی از این پژوهش تقدیر و تشکر می‌نمایند. شایان ذکر است این مقاله منتج از پایان نامه دکتر مهرناز علی خاصی با شماره ۸۱ جهت دریافت درجه دکترای تخصصی دندانپزشکی در رشته آسیب شناسی دهان، فک و صورت به راهنمایی دکتر معصومه زرگران و دکتر شکوفه جمشیدی می‌باشد.

محافظت کننده بیشتر شده و امکان وقوع تغییرات بدخیمی در این دسته از ضایعات OLP افزایش می‌یابد.

البته باید به این نکته نیز توجه داشت هرچند افزایش تکثیر سلولی به عنوان یکی از مهمترین علائم شروع کارسینوژنیزس مطرح گشته است،<sup>(۱۵و۲۰)</sup> اما تایید و استفاده از Cut-off پیشنهاد شده با در نظر گرفتن محدودیت‌های انجام مطالعه حاضر، از قبیل تعداد کم نمونه‌ها و همچنین عدم وجود مطالعه‌ای مشابه نیازمند انجام تحقیقات بیشتر و گسترده‌تر می‌باشد

### نتیجه‌گیری

اگرچه پیشنهاد شده است بیماران مبتلا به OLP در خطر ابتلای بیشتری به OSCC هستند، اما درخصوص ارتباط بین OLP و OSCC اختلاف نظر وجود داشته و پتانسیل بدخیمی OLP هنوز اثبات نشده است. یافته‌های پژوهش حاضر با نشانگر سیکلین D1 حاکی از آن بود که تکثیر سلولی در ضایعات OLP به طور معنی‌داری کمتر از

### منابع

1. Wilkey JF, Buchberger G, Saucier K, Patel SM, Eisenberg E, Nakagawa H, et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Mol Carcinog* 2009; 48(9): 853-61.
2. Ma LW, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. Phospholipase C- $\gamma$ 1 expression correlated with cancer progression of potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2013; 42(1): 47-52.
3. Ahmed MM. Expression profile of apoptotic mediators and proliferative markers in oral squamous cell carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2009; 21(2): 85-92.
4. Acay RR, Felizzola CR, de Araújo N, de Sousa SO. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol* 2006; 42(5): 475-80.
5. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus-a review. *J Oral Pathol Med* 2010; 39(10): 729-34.
6. Sousa FA, Rosa LE. Oral lichen planus: Clinical and histopathological considerations. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008; 74(2): 284-92.
7. Gorsky M, Epstein JB. Oral lichen planus: Malignant transformation and human papilloma virus: A review of potential clinical implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 111(4): 461-4.
8. Jaafari-Ashkavandi Z, Mardani M, Pardis S, Amanpour S. Oral mucocutaneous diseases: Clinicopathologic analysis and malignant transformation. *J Craniofac Surg* 2011; 22(3): 949-51.

9. de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13(5): 308-12.
10. Rajentheran R, McLean NR, Kelly CG, Reed MF, Nolan A. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25(5): 520-3.
11. Saawarn S, Astekar M, Saawarn N, Dhakar N, Gomateshwar Sagari S. Cyclin D1 expression and its correlation with histopathological differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Sci World J* 2012; 2012: 978327.
12. Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 2000; 36(2): 145-51.
13. Das SN, Khare P, Singh MK, Sharma SC. Correlation of cyclin D1 expression with aggressive DNA pattern in patients with tobacco-related intraoral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res* 2011; 133: 381-6.
14. Huang SF, Cheng SD, Chuang WY, Chen IH, Liao CT, Wang HM, et al. Cyclin D1 overexpression and poor clinical outcomes in Taiwanese oral cavity squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 40.
15. Motta Rda R, Zettler CG, Cambuzzi E, Jotz GP, Berni RB. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009; 75(4): 544-9.
16. Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci* 2009; 51(1): 117-21.
17. Eisenberg E. Oral lichen planus: A benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58(11): 1278-85.
18. Kotelnikov VM, Coon JS 4th, Mundle S, Kelanic S, LaFollette S, Taylor S IV, et al. Cyclin D1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997; 3(1): 95-101.
19. Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: Review. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(10): 737-52.
20. de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE B. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14(11): 563-7.
21. Hirota M, Ito T, Okudela K, Kawabe R, Yazawa T, Hayashi H, et al. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2002; 31(4): 204-12.
22. Bascones-Martínez A, López-Durán M, Cano-Sánchez J, Sánchez-Verde L, Díez-Rodríguez A, Aguirre-Echegarria P, et al. Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. *Oncol Lett* 2012; 3(6): 1319-25.
23. Turatti E, da Costa Neves A, de Magalhães MH, de Sousa SO. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci* 2005; 47(2): 71-6.
24. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(9): 513-21.
25. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T, et al. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(10): 602-7.
26. Montebugnoli L, Badiali G, Marchetti C, Cervellati F, Farnedi A, Foschini MP. Prognostic value of Ki67 from clinically and histologically 'normal' distant mucosa in patients surgically treated for oral squamous cell carcinoma: A prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38(11): 1165-72.
27. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Co. 2010. P. 5-9.
28. Lee JJ, Kuo MY, Cheng SJ, Chiang CP, Jeng JH, Chang HH, et al. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(4): 471-8.
29. Taniguchi Y, Nagao T, Maeda H, Kameyama Y, Warnakulasuriya KA. Epithelial cell proliferation in oral lichen planus. *Cell Prolif* 2002; 35(1): 103-9.
30. Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle - associated proteins P16, pRb, P53, P27 and ki67 in oral cancer and precancer with special referece to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(5): 226-32.
31. da Silva Fonseca LM, do Carmo MA. Identification of the Ag-NORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Dis* 2001; 7(6): 344-8.

32. Flatharta CO, Flint S, Toner M, Mabruk M. hTR RNA component as a marker of cellular proliferation in oral lichen planus. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008; 9(2): 287-90.
33. Tipoe GL, Jin Y, White FH. The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32(1): 24-31.
34. González Moles MA, Esteban F, Ruiz-Avila I, Gil Montoya JA, Brener S, Bascones-Martínez A, et al. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Dis* 2009; 15(2): 162-9.
35. Karatsaidis A, Schreurs O, Helgeland K, Axéll T, Schenck K. Erythematous and reticular forms of oral lichen planus and oral lichenoid reactions differ in pathological features related to disease activity. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(5): 275-81.
36. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow?. *Lancet* 2001; 357(9255): 539-45.
37. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004; 14(6): 433-9.
38. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860-7.
39. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4(4): 221-33.
40. Fan Y, Zhan Z, Peng T, Song XL, Feng ZQ. The expression of apoptosis-associated proteins Bcl-2, Bax in oral leukoplakia and lichen planus. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2004; 13(6): 497-501. (Chinese)
41. Montebugnoli L, Venturi M, Gissi DB, Leonardi E, Farnedi A, Foschini MP. Immunohistochemical expression of p16 (INK4A) protein in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112(2): 222-7.