

بررسی میزان IFN- δ و IL-4 در بزاق مبتلایان به لیکن پلان دهانی

دکتر شیما نفرزاده^۱، دکتر امراالله مصطفی زاده^۲، دکتر علی بیژنی^۳، دکتر محسن صدیق^۴

۱- استادیار بخش آسیب شناسی دهان، فک و صورت و عضو مرکز تحقیقات مواد دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- دانشیار بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- پزشک عمومی و مشاور آمار، مرکز تحقیقات بیماریهای غیرواگیر کودکان امیرکلا

۴- دندانپزشک

خلاصه:

سابقه و هدف: گزارشات متفاوتی در رابطه با تغییرات سطح بزاقی اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به لیکن پلان وجود دارد اما همواره پاتوژن این بیماری مورد سوال است. هدف از این مطالعه ارزیابی سطح بزاقی این نشانگر، در بیماران مبتلا به لیکن پلان دهانی بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی بزاق ۸۴ نمونه شامل ۳۰ بیمار مبتلا به لیکن پلان دهانی و ۵۴ فرد سالم که ضایعه مخاطی نداشتند بررسی شد. نمونه های بزاقی جهت ارزیابی میزان اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما به روش الایزا بررسی شدند و یافته ها با آزمون Mann-U-Whitney و آزمون های همبستگی پیرسون و اسپیرمن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میزان اینترفرون گاما در مبتلایان به لیکن پلان دهانی و افراد سالم به ترتیب، $(4/48 \pm 4/3)$ و $(3/54 \pm 2/7)$ و میزان اینترلوکین ۴ به ترتیب $(3/28 \pm 1/07)$ و $(2/86 \pm 6/3)$ بود. $(P = 0/8)$ و $(P = 0/06)$ و تفاوت معنی داری بین دو گروه دیده نشد. متغیرهای فوق در لیکن پلان رتیکولر و اروزیو نیز تفاوت معنی داری نداشت. $(P = 0/2)$

نتیجه گیری: به نظر می رسد تغییرات اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ بزاقی نقشی در پاتولوژی لیکن پلان دهانی ندارد.

کلید واژه ها: لیکن پلان دهانی، اینترلوکین-۴، اینترفرون گاما

وصول مقاله: ۹۱/۷/۴ اصلاح نهایی: ۹۱/۱۰/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۱۸

مقدمه:

باشند و شیوع لیکن پلان دهانی نیز بین ۰/۱ تا ۲/۲ درصد و در سنین ۶۰-۳۰ سال گزارش شده است. اگرچه علت این بیماری نامعلوم است اما از لحاظ هیستوپاتولوژیکی، دژنره یا انحطاط اپیتلیوم سلول بازال بعنوان علت احتمالی آن مطرح شده است.^(۴) OLP از نظر بالینی نمودهای متفاوتی دارد اما عمدتاً به سه صورت رتیکولار، اروزیو و بولوز دیده می شود که شکل رتیکولار آن شایع تر از سایر اشکال است.^(۴-۱) هر چند در یک مطالعه نوع اروزیو بعنوان رایج ترین شکل OLP مطرح شده است. از نظر میکروسکوپی OLP بوسیله هایپرکراتوزیس، دژنراسیون سلول های قاعده ای مخاط دهان، ضخیم شدگی غشای پایه و تجمع لنفوسیت های زیر مخاطی مشخص می

لیکن پلان دهانی (OLP)، یک بیماری نسبتاً شایع و مزمن پوستی-مخاطی است که غالباً مخاط دهان را گرفتاری کند.^(۱) لیکن پلان عموماً یک بیماری ایمونولوژیک در نظر گرفته می شود که از نظر میکروسکوپی شبیه به یک واکنش ازدیاد حساسیت با دخالت سلول های T می باشد.^(۲) عواملی چون استرس، دیابت، هپاتیت C، تروما و ازدیاد حساسیت به دارو و فلزات می توانند کوفاکتورهای ایجاد کننده لیکن پلان باشند. اکثر بیماران مبتلا به لیکن پلان، بالغین میان سال می باشند. زنان نیز به نسبت ۳ به ۲، بیشتر از مردان گرفتار می شوند.^(۳) در حدود ۱ درصد جمعیت، دارای لیکن پلان پوستی می

ممکن است بیماری‌های خودایمنی در ارگان‌های مشخصی ایجاد کند.^(۸) همچنین فعال شدن نامناسب سلول‌های Th2 به شروع بیماری‌های اتوپیک و آلرژیک کمک می‌کند^(۸،۵)، بنابراین نظریه عدم تعادل فعالیت Th2/Th1 به عنوان یک مکانیسم بیماری‌های التهابی/خودایمنی مطرح است و نسبت اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ به عنوان نشان دهنده وضعیت تمایز Th2/Th1 حائز اهمیت می‌باشد.^(۹)

Khan و همکاران افزایش بیان اینترفرون گاما مترشحه از Tcell را در ضایعات OLP نشان دادند.^(۱۰) Rhodus و همکاران نشان دادند که سایتوکاین‌های التهابی در سطوح افزایش یافته‌ای در مایعات دهانی بیماران با OLP یافت می‌شوند.^(۱۱) Simark-Mattson و همکاران تنها در ۱ درصد یا کمتر از سلول‌های بافتی لیکن پلان دهانی، mRNA مثبت اینترفرون گاما را یافتند که بروز پایین این ماده را نشان می‌دهد.^(۱۲) با توجه به یافته‌های متفاوت مطالعات قبلی، در این مطالعه به بررسی میزان اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما در مبتلایان به OLP پرداختیم.

مواد و روش‌ها:

این تحقیق یک مطالعه موردی-شاهدی بود که پس از تایید کمیته اخلاق، طی سالهای ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰ در دانشکده دندانپزشکی بابل بر روی بزاق ۳۰ فرد مبتلا به لیکن پلان دهانی که تشخیص قطعی آن از طریق بیوپسی تأیید شده بود و بزاق ۵۴ فرد سالم که در معاینه کلینیکی فاقد هر نوع ضایعه مخاطی بودند، انجام شد. عدم ابتلا به هر نوع بیماری سیستماتیک و عدم استعمال سیگار و همچنین عدم وجود ضایعه بافت نرم دهان در ۳ ماه گذشته معیارهای ورود به مطالعه بودند.

افراد برای یک ساعت قبل از زمان نمونه‌گیری (ساعت ۱۲-۸)، از خوردن، آشامیدن و جویدن آدامس منع شدند و سپس بزاق خود را قورت داده و سر خود را به سمت جلو چرخانده و تمام بزاق خود را برای مدت ۵ دقیقه بدون قورت دادن در لوله‌های فالكون استریل ۵۰ سی‌سی ریختند. سپس در سانتریفیوژ در

شود.^(۱) علت دقیق بیماری OLP ناشناخته است. مشکلات سیستم ایمنی سلولی با بیماری زایی OLP مرتبط بوده است. داده‌های کنونی نشان می‌دهند که OLP یک بیماری خودایمنی سلول واسطه T است که در آن سلول‌های T کشنده CD8+ علیه سلول‌های پوششی دهان حمله می‌کنند.^(۳) اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ سایتوکاین‌های شاخص T helper 1 و T helper 2 هستند و احتمالاً در پاتوژنز لیکن پلان دهانی دخیل می‌باشند.^(۴) اینترلوکین ۴ محرک گسترش سلول‌های Th2 از سلول‌های تی CD4+ است و بعنوان یک عامل رشد اتوکراین برای سلول‌های Th2 تمایز یافته عمل می‌کند.^(۵)

نقش اینترفرون گاما در ایمنی وابسته به سلول علیه میکروب‌های درون سلولی مهم است. تا به امروز نتیجه مطالعات بر روی هر دو سایتوکاین در لیکن پلان دهانی متناقض بوده است.^(۵،۶) بنابراین، منطقی است با استفاده از یک روش کاملاً کمی میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ در ضایعات لیکن پلان دهانی بررسی شود با این کار نقش واقعی تری از آنها در بافتهای موضعی لیکن پلان دهانی یافت می‌شود.^(۶) سلول‌های تی CD4+ انواع مشخصی از سایتوکاین‌ها را تولید و به واسطه آن‌ها پاسخ‌های ایمنی متفاوتی در OLP ایجاد می‌گردد.^(۶) نشان داده شده که اینترفرون گاما به عنوان سایتوکاین شاخص Th1 و اینترلوکین-۴ به عنوان سایتوکاین شاخص Th2 در یکسری از بیماری‌های التهابی خود ایمنی اثر مہاری متقابل از خود نشان می‌دهند.^(۵) اینترلوکین ۴ برای تمایز سلول‌های Th2 ضروری است و تنظیم کننده تولید آنتی بادی و پاسخ‌های ایمنی مسئول در التهابات موکوزال موضعی می‌باشد.^(۴)

هنوز مشخص نشده است که این طرح مہاری در پاتوژنز OLP وجود دارد یا خیر.^(۶) اینترفرون گاما در فعال کردن سلول‌های تی سایتوتوکسیک نقش دارد و در شروع و مزمن شدن OLP تأثیر گذار است و پلی مورفسم ژنتیکی اینترفرون گاما می‌تواند به عنوان یک عامل خطر ساز مهم در شروع بیماری نقش داشته باشد.^(۷) پیامدهای پاتولوژیک بی‌نظمی در پاسخ ایمنی سلول‌های Th1 یا فعال شدن بیش از اندازه آن،

جدول ۱- میزان شاخص های IFN- γ و IL-4 بر حسب گروه های مورد مطالعه

شاخص ها	شاهد تعداد = ۵۴	مورد تعداد = ۳۰	آزمون من ویتنی
IFN- γ	۴/۴۸±۴/۳۷	۳/۵۱±۲/۷۲	P = ۰/۸۷
IL -4	۳/۲۸±۱۱/۰۷	۲/۸۶±۶/۳۳	P = ۰/۰۶

همانگونه که در جدول فوق مشاهده می شود اختلاف میانگین غلظت اینترلوکین ۴ ، بین گروه مبتلا به لیکن پلان دهانی و گروه کنترل معنادار نبود. (جدول ۱)

جدول ۲- میزان شاخص های IFN- γ و IL-4 بر حسب انواع بالینی لیکن پلان دهانی

شاخص ها	لیکن پلان رتیکولر تعداد = ۲۰	لیکن پلان آروزیو تعداد = ۱۰	آزمون من ویتنی
IFN- γ	۳/۲۷±۲/۹۴	۳/۹۹±۲/۲۸	P = ۰/۲۷
IL -4	۳/۰۴±۵/۶۴	۲/۴۹±۷/۸۷	P = ۰/۲۲

همچنین از نظر میزان این دو عامل بین لیکن پلان رتیکولر و آروزیو نیز تفاوت معناداری دیده نشد. (P=۰/۲)
همچنین نتیجه آزمون همبستگی پیرسون برابر ۰/۲۸۶ بود (P = ۰/۰۰۸) و ضریب همبستگی اسپیرمن برابر ۰/۱۴۲ بود. (P = ۰/۱۹۶)

بحث

در مطالعه حاضر، میزان اینترفرون گاما در بزاق مبتلایان به OLP کمی پایین تر از گروه کنترل بود و همچنین میزان اینترلوکین ۴ در بزاق بیماران مبتلا به OLP در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد، اما تفاوت از نظر آماری معنی دار

شرایط ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. هر نمونه به ۲ کرایوتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و در دردمای ۸۰- درجه جهت آنالیز نهایی نگهداری شدند. سپس تمام نمونه ها جهت تعیین غلظت اینترلوکین ۴ ، اینترفرون گاما، با کیت الیزا - Bender med system - ساخت کشور آمریکا، آزمایش شدند. روش کار به طور خلاصه بدین ترتیب بود. اضافه کردن Assay buffer در مورد کیت اینترلوکین ۴ و Sample Diluent در مورد کیت اینترفرون گاما ، اضافه کردن کونژوگه ، اضافه کردن HRP- Streptavidin ، اضافه کردن TMB سوپسترا، اضافه کردن stop solution و در نهایت خوانده شدن در طول موج ۴۵۰ نانومتر و ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader و ارایه نتایج بر حسب پیکوگرم بر میلی لیتر. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS17 مورد آنالیز قرار گرفت. بدین منظور از آزمون Mann-U- Whitney و ضرایب همبستگی پیرسون و اسپیرمن استفاده شد. (P < ۰/۰۵) به عنوان معیار معنی دار بودن نتایج آماری در نظر گرفته شد.

یافته ها:

در این مطالعه ۸۴ نمونه مربوط به ۳۰ بیمار دارای لیکن پلان دهانی (۲۰ مورد لیکن پلان رتیکولر و ۱۰ مورد لیکن پلان آروزیو) و ۵۴ فرد سالم بررسی شدند و سن مبتلایان به لیکن پلان دهانی ۸/۴ ± ۴۵/۲ سال و سن افراد سالم ۱۰/۴ ± ۴۲/۳ بوده است. (P < ۰/۲) در گروه شاهد ۶۱ درصد زن و ۳۹ درصد مرد و در گروه مورد ۶۳/۳ درصد زن و ۳۶/۷ درصد مرد بودند. (P < ۰/۸) نمونه ها از لحاظ سن و جنس در دو گروه تفاوت آماری نداشتند. محل ضایعه لیکن پلان در گروه مورد ۲۶/۷ درصد زبان و ۷۳/۳ درصد مخاط گونه بوده است

نمود. این امر شاید به تعداد نمونه ها و تعلق بیشتر آنها به نوع رتیکولر مربوط باشد.

لیکن پلان دهانی یک بیماری مزمن التهابی است که با پاسخ ایمنی سلول های T علیه سلول های اپی تلیالی شناخته می شود.^(۶)

نتایج مطالعه Yamamoto و همکارانش مشابه مطالعه حاضر می باشد. آن ها نیز میزان کمتر اینترفرون گاما را در مبتلایان به OLP در مقایسه با افراد سالم مشاهده کردند که این کاهش معنی دار نبود، با این تفاوت که تحقیق آن ها بر روی خون افراد انجام شده بود.^(۱۳) نتایج مطالعه Pekiner و همکاران نیز مشابه تحقیق حاضر بود ولی بر روی سرم بیماران انجام شده بود.^(۱۴)

نتایج مطالعه Karagouni E و همکارانش متفاوت از مطالعه حاضر بود. آنها مطالعه ای در مورد تغییر در عملکرد سلول های مونونوکلئار در خون و سایتوکاین های سرم ۳۱ بیمار با لیکن پلان دهانی انجام دادند و با ۲۳ مورد سالم مقایسه کردند. آنها دریافتند اینترفرون گاما و اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۶ در خون بیماران OLP کاهش معنی داری می یابد.^(۱۵)

Simark-Mattson و همکارانش تنها در ۱ درصد یا کمتر از سلول های بافت ضایعات mRNA, OLP مثبت اینترفرون گاما یافتند که بروز پایین این ماده را نشان می دهد که می تواند با یافته ما همخوانی داشته باشد^(۱۶) Xie و همکاران افزایش سطح IL-17 و کاهش سطح اینترفرون گاما را در سرم مبتلایان به لیکن پلان دهانی در مقایسه با افراد سالم، مشاهده کردند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.^(۱۷)

Khan و همکارانش مشخص کردند که سلول های تی در ضایعات OLP، اینترفرون گاما ترشح می کنند اما ترشح اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۰، TGF- β مشاهده نشد. یافته قسمت اول تحقیق آنها متضاد با نتایج این تحقیق است.^(۱۰)

Yamamoto و همکارانش افزایش معنی داری در اینترلوکین ۴ در نمونه های بافت ضایعه و افزایش خفیف میزان اینترلوکین ۴ را در بزاق مبتلایان نشان دادند که یافته آنها متضاد با نتایج

تحقیق حاضر می باشد.^(۱۳) تفاوت مشاهده شده ممکن است به خاطر تفاوت در کیت های استفاده شده و وجود آنزیم هایی که سبب اختلال در عملکرد کیت و واکنش آنتی ژن - آنتی بادی شده است، باشد. Xiao و همکارانش افزایش اینترلوکین ۴ در بزاق بیماران مبتلا به OLP را نشان دادند که می تواند نقش احتمالی آن را پاتوژنز OLP نشان دهد.^(۶)

Liu و همکارانش میزان بیشتری از اینترلوکین ۴ در بزاق مبتلایان به OLP ارتیماتوز/ اولسراتیو در مقایسه با گروه رتیکولر را مشاهده کردند که این یافته متفاوت از نتایج این تحقیق است.^(۱۸) تفاوت مشاهده شده شاید به دلیل تفاوت تعداد نمونه های این دو تحقیق و ابتلای بیشتر نمونه های آنها به لیکن پلان دهانی نوع اروزیو بوده باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به یافته های این مطالعه و عدم مشاهده تفاوت معنی دار بین میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ در بزاق مبتلایان به لیکن پلان دهانی و افراد سالم، به نظر نمی رسد این دو فاکتور بزاقی در پاتوژنز لیکن پلان دخیل باشند. با توجه به نتایج متفاوت سایر مطالعات انجام تحقیقات دیگر در زمینه شناسایی نقش مدیاتورها در نمونه های بافتی و بزاقی بیماران مبتلا به لیکن پلان لازم می باشد.

تقدیر و تشکر:

این مقاله حاصل طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی بابل به شماره ۸۱۲۱۱۷۶ در دانشکده دندانپزشکی بوده و کلیه هزینه ها از جانب معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه پرداخت شده است که جا دارد کمال تشکر بعمل آید. همچنین از آقای محسن آقاجانپور که زحمت انجام تست الایزا را بعهده داشتند نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References:

- 1- Neville Bw , Damm DD, Allen C. Bouqot JE .Oral and Maxillofacial Pathology, 3rd ed .Philadelphia:W.B.Saunders ; 2009.p: 782-788.
- 2- RegeziJA,Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral Pathology.5nd ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008.p: 98.
- 3- Ismail SB, Kumar SK, Zain RB.Oral Lichen Planus and LichenoidReactions:Etiopathogenesis,Diagnosis,Malignanttransformation:Review. J Oral Sci. 2007 Jun;49(2):89-106.
- 4- Abol K.A. Cellular and Molecular Immunology, 1nd ed. Hayan Co; 2005.p:253-255.
- 5- NeurathMF,FionttoS,GlimcherLH.The role of Th1/Th2 Polarization in Mucosal Immunity . Nat Med. 2002 Jun;8(6):567-73
- 6- Tao XA, Li CY, Rhodus NL, Xia J, Yang XP, Cheng B. Simultaneous detection of INF-gamma and IL-4 in lesional tissues and whole unstimulated saliva from patients with oral lichen planus . J Oral Pathol Med. 2008 Feb;37(2):83-7
- 7- Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. Nat Immunol. 2003 Jul;4(7):616-23.
- 8- Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, et al . Interleukin-4therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease . Nat Med. 2003 Jan;9(1):40-6
- 9- Kalogerakou F, Albanidou-Farmaki E, Markopoulos AK, Antoniadis DZ. Detection of Tcellssecreting Type 1 and Type2 cytokines in the peripheral blood of patients with oral lichen planus . Hippokratia. 2008;12(4):230-5.
- 10- Khan A.Farah CS, Savage NW,WalshLJ,HarbrowDJ,Sugerman PB.Th1 cytokines in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2003 Feb;32(2):77-83.
- 11- Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. Clin Immunol. 2005 Mar;114(3):278-83.
- 12- Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Eklund C, Seymour GJ, Sugerman PB,etal. Distribution of interleukin-2, -4, -10, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus. Arch Oral Biol. 1999 Jun;44(6):499-507
- 13- Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Hirota J, Osaki T. Serum cytokine levels in patients with oral mucous membrane disorders. J Oral Pathol Med. 1991 Jul;20(6):275-9.
- 14- Pekiner FN,DEMirel GY,Boralan MO, Ozbayrak S. Cytokine profiles in serum of patients with oral lichen planus. Cytokine. 2012 Dec;60(3):701-6.
- 15- Karagouni EE, Dotsika EN, SklavounouA.Alteration in peripheral blood mononuclear cell function and serum cytokines in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 1994 Jan;23(1):28-35.
- 16- Simark Mattsson C, Jontell M, Bergenholtz G, Heyden M, Dahlgren UI. Distribution of interferon-gamma mRNA-positive cells in oral lichen planus lesions. J Oral Pathol Med. 1998 Nov;27(10):483-8.
- 17- Xie S, Ding L, Ziong Z, Zhu S . Implications of Th1 and Th17 cells in pathogenesis of oral lichen planus. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2012 Jun;32(3):451-7.
- 18- Liu W, Dan H, Wang Z, Jiang L, Zhou Y, Zhao M,etal. IFN-gamma and IL-4 in saliva of patients with oral lichen planus: A study in an ethnic chinese population. Inflammation. 2009 Jun;32(3):176-81