فراوانی نسبی حضور ژنوم ویروس هپاتیت C در لیکن پلان دهانی

سید محمد رضوی [*] – پریچهر غلیانی [**] - مریم نعمت بخش [***]

[*] استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده‌ی دندانپزشکی علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان
[**] دانشیار گروه تشخیص بیماری‌های دهان ودندان دانشکده‌ی دندانپزشکی علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان
[***] دندانپزشک

چکیده

بیان مساله: لیکن پلان دهانی، یک بیماری مزمن پوستی مخاطی است. عواملی گوناگون، چون فشار، دیابت، هپاتیت C، ضربه، افزایش حساسیت و عوامل ایمن شناختی از عوامل موثر، درایجاد لیکن پلان دهانی (Oral Lichen Planus (OLP)) هستند. در سال‌های اخیر، توجه زیاد به پیوند میان این عارضه و ویروس هپاتیت C شده است.

هدف: از آنجا که، کار ویروس‌ها متاثر از شرایط جغرافیایی، قومی و نژادی است، هدف از انجام این پژوهش، تعیین فراوانی نسبی حضور ژنوم ویروس هپاتیت C (HCV) در آسیب‌های لیکن پلان دهانی بود.

مواد و روش: شمار 43 بلوک پارافینی (29 مورد مربوط به لیکن پلان دهانی (OLP) و 14 مورد مربوط به مخاط طبیعی دهان) فراهم شد. بلوک‌های OLP از آرشیو بخش آسیب شناسی دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان گردآوری گردید. پس از فراهم آوردن لام بافت شناسی از هر بلوک پارافینی، گونه‌ی آسیب به وسیله‌ی آسیب شناس تایید شد. همه‌ی نمونه‌ها برای بررسی حضور ژنوم به وسیله‌ی روش تشخیصی PCR آزمایش شدند. داده‌ها به وسیله‌ی نرم افزار آماری SPSS و آزمون دقیق آماری فیشر (Fisher's Exact Test) با سطح معنادار $p = 0/05$ واکاوی گردید.

یافته ها: از 29 نمونه‌ی گروه آزمایش (OLP)، سه نمونه از لحاظ حضور ژنوم ویروسی مثبت و 26 نمونه منفی و از 14 نمونه‌ی آزمایش شده مربوط به مخاط طبیعی دهان، همه از لحاظ حضور ژنوم HCV منفی بودند.

نتیجه گیری: برپایه‌ی نتایج این بررسی، ارتباطی معنادار میان حضور ژنوم ویروس هپاتیت C و لیکن پلان دهانی دیده نشد ($p > 0/05$). بنابراین، انجام بررسی‌های دیگر بر روی دیگر ویروس‌های مؤثر در بیماری‌های دهان و پژوهشی با شمار نمونه‌ی بیشتر و انجام PCR در نمونه‌ی خون و سرم افراد مبتلا به OLP پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: HCV ، لیکن پلان دهانی، PCR

تاریخ دریافت مقاله: 86/11/8 تاریخ پذیرش مقاله: 87/4/22 *Shiraz Univ Dent J 2009; 9(4): 378-383* **مقاله‌ی پژوهشی اصیل**

نویسنده‌ی مسوول مکاتبات: سید محمد رضوی. اصفهان- خیابان هزار جریب- دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان- گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت **تلفن**: 0311-7922877 **پست الکترونیک**: razavi@dnt.mui.ac.ir

درآمد

لیکن پلان دهانی یک بیماری مزمن التهابی پوستی مخاطی است [1]. شیوع لیکن پلان دهانی از 0/1 تا 2/2 درصد بیان شده است [2]. عواملی چون فشار، دیابت ، هپاتیت C ، ضربه و افزایش حساسیت به دارو و فلزات می‌توانند از عوامل مشارکت کننده (Co-Factor) در ایجاد آن باشند [1].

امروزه، در متون علمی تازه بر اثر ویروس‌ها در ایجاد آسیب‌های گوناگون به ویژه نئوپلاسم‌ها و آسیب‌های پیش سرطانی توجه زیاد شده است. بر آورد میزان بدخیمی‌های انسانی، که مستقیماً از عفونت‌های ویروسی پدید می‌آید، در حدود 10 تا 20 درصد است [2]. بررسی‌های انجام شده نشان داده، که +CD8 سلول‌های T در لیکن پلان دهانی فعال شده و سلول‌های +CD8 جایگزین کراتینوسیت‌های آپوپتتیک می‌گردد. از سویی، سلول‌های سایتوتوکسیک +CD8 باعث آپپتوز سلول‌های آلوده به ویروس می‌شود. بر این پایه، می‌توان گفت، که عفونت‌های ویروسی مخاط دهان ممکن است در بیماریزایی لیکن پلان دهانی نقش داشته باشد [3].

ویروس هپاتیت C نیز، یک RNA ویروس است، که برای نخستین بار از سرم افرادی با عنوان هپاتیت (NonA-NonB) جدا شد. روش‌های ایمونوهیستوشیمیای، روشی ناکافی برای کشف این ویروس بوده و PCR، دقیق‌ترین روش برای جداسازی آن است [4].

به تازگی، همراهی لیکن پلان دهانی با بیماری مزمن کبدی مطرح شده است. در سال 1991 وجود همزمان لیکن پلان و ویروس هپاتیتC به وسیله‌ی سوجرمن (Sugerman) و همکاران گزارش شد. آنها دریافتند، در نواحی‌ای، که عفونت HCV شایع‌تر است، مانند جنوب اروپا و شمال کیوشو در ژاپن، 12 تا 62 درصد بیماران با لیکن پلان دهانی، به ویروس HCV آلوده بوده‌اند [3].

ناگائو (Nagao) و همکاران پژوهشی بر روی 43 بیمار مبتلا به هپاتیت C مزمن انجام دادند، که 23 نفر آنها دارای آسیب‌های لیکن پلان دهانی بودند و20 نفر آنها این آسیب‌ها را نداشتند. بنابراین، گزارش شد، که لیکن پلان دهانی بیشتر نتیجه‌ی عوامل میزبان است تا عوامل ویروسی [5].

برپایه‌ی پژوهشی دیگر در ایتالیا، که به وسیله‌ی کاروزو (Carrozzo) و همکاران انجام گرفت، مشخص گردید، که HCV مهم‌ترین عامل آسیب‌شناختی ایجاد لیکن پلان دهانی در افراد ایتالیایی به شمار می‌آید و بیان شد، که HCV می‌تواند در بیماری‌زایی لیکن پلان دهانی مداخله کند [6].

کوروکاوا (Kurokawa) و همکاران، پژوهشی در زمینه‌ی بررسی ویروس هپاتیت C در آسیب‌های LP بیماران با هپاتیت C مزمن انجام دادند و بیان کردند، که آسیب‌های LP همراه HCV می‌توانند جاهایی برای همانندسازی ژنوم ویروس داشته باشند [7].

قدسی و همکاران، HCV را در ظاهر عاملی سبب شناختی برای LP مطرح کردند [8] و رهنما و همکاران، در پژوهشی در کرمان، بیان کردند، که عفونت HCV ضرورتاً در همه‌ی بیماران مبتلا به LP وجود ندارد و به نظر می‌رسد، که وجود HCV را نتوان به عنوان عامل سبب شناختی بیان کرد [9].

با توجه به گزارش‌هایی، که منطقه‌ی جغرافیایی را نیز، مؤثر دانسته‌اند [6, 9, 10 و 11]، این پژوهش با هدف بررسی شیوع ویروس هپاتیت C در آسیب‌های لیکن پلان دهانی بیماران در شهر اصفهان انجام شد. از هدف‌های دیگر این بررسی، مثبت شدن HCV در نمونه‌های بافتی و در جایی است، که دقیقا ریخت شناسی لیکن پلان مشاهده گردید.

مواد و روش

این یک بررسی توصیفی- تحلیلی و از گروه بررسی‌های مشاهده‌ای و گذشته‌نگر است. جمعیت مورد بررسی از نمونه‌های با تشخیص LP مراجعه کننده به گروه آسیب‌شناسی دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در سال‌های 1385 و 1386 و روش نمونه‌گیری آسان بود.

معیارهای ورود نمونه‌های لیکن پلان‌دهانی به بررسی شامل وجود مقدار کافی بافت، که بتوان رنگ آمیزی H&E و آزمایش PCR را انجام داد و نیز، تایید گونه‌ی آسیب هر بلوک از سوی آسیب‌شناس بود. برای ورود نمونه‌ها به بررسی، پیشینه‌ی بیمار بررسی شد و در صورت داشتن بیماری سیستمیک در گروه شاهد هم لحاظ شد. افزون بر آن، معیارهای خروج از بررسی، شامل پیشینه‌ی مصرف دارو از سوی بیمار یا وجود هر گونه پر کردگی آمالگام در کنار آسیب بود و به این ترتیب، همه‌ی نمونه‌هایی که دارای این معیارها بودند، به عنوان Lichenoid Drug Reaction انگاشته و از بررسی کنار گذاشته شد. همچنین، در موارد ابتلا سیستمیک به هپاتیتC نمونه‌از بررسی کنار گذاشته می‌شد.

گروه شاهد از نظر سن وجنس با گروه اصلی همخوانی داده شده بود. از این گروه برای برداشت نمونه رضایت نامه‌ی کتبی گرفته شد.

جای برداشت نمونه‌های گروه آزمون و شاهد در جدول 1 آورده شده است. این نمونه‌ها از بافت طبیعی پیرامون آسیب‌های غیر لیکن پلانی، که نمونه‌برداری می‌شد و نیز، از بیمارانی، که برای جراحی لثه و جراحی‌های دهان و فک و صورت مراجعه می‌کردند، به دست آمد.

حجم نمونه در گروه آزمایش، شامل 29 بلوک لیکن پلان دهانی و در گروه شاهد شامل 14 بلوک از بافت طبیعی دهان بود.

به هر بلوک پارافینی یک رمز داده شد و از هر بلوک پارافینی به شیوه‌ی زیر مقاطع مورد نظر فراهم گردید. در آغاز، میکروتوم زیر هود بیولوژیک قرار گرفت و سپس، با گزیلل و الکل پاک گردید، به گونه‌ای، که هیچ گونه آلودگی بر روی آن نباشد. برای هر نمونه، تیغه‌ی کاملا پاک شده و با گزیلل و الکل کاملا شست و شو داده شد. پنس مورد استفاده یکبار مصرف بود و پس از فراهم آوردن هر نمونه، دستکش عوض گردید.

مقاطع به شیوه‌ی پیوسته انتخاب شدند. به سخن دیگر، از مقطع نخست با ضخامت چهار میکرون برای رنگ آمیزی H&E و از مقاطع بعدی با ضخامت 10 میکرون برای PCR استفاده گردید، به گونه‌ای، که نزدیک‌ترین مقاطع، به مقطع H&E تایید شده از سوی آسیب شناس باشد. هر لام H&E در صورت تایید تشخیص و کیفیت از سوی آسیب شناس به بررسی وارد شد. مقاطع مربوط به H&E به روی لام معمولی و مقاطع مربوط به PCR، به میکروتیوب منتقل شدند [12].

نخستین مرحله‌ی استخراج RNA ویروس هپاتیت C از بلوک‌های پارافینی شامل سه بخش پارافین زدایی، لیز سلولی و استخراج RNA بود. RNA به دست آمده به ماشین PCR انتقال داده شد (PCR Kit مورد استفاده از شرکت Fermentaz آلمان است). در این مرحله، آغازگرها (پرایمرها) در جای مناسب بر روی قطعه‌ی RNA هدف قرار گرفته و سپس، تکثیر آغازگرها به وسیله‌ی آنزیم Tag، به تکثیر قطعه‌ی ویژه‌ی رشته‌ی DNA منجر می‌شود. در پایان، فراورده‌ی PCR الکتروفورز شده و پس از آن، با استفاده از دستگاه Transilluminator، که نور فرابنفش ساطع می‌کند، باندها مشاهده شد (نگاره‌ی یک).

آن شمار از نمونه‌ها، که بر روی ژل آگارز دو درصد باند داده و باندها در موقعیت درست نسبت به مارکر و شاهد مثبت قرار داشته، HCV مثبت و آلودگی ویروسی داشتند. در کنار هر نمونه، یک شاهد مثبت و یک شاهد منفی نیز، به‌عنوان شاهدPCR به‌کار رفت تا در درستی کار شکی برجای نماند. به عنوان شاهد مثبت از آغازگرهای میکروگلوبولین بتا RT:CCCAACACTACTCGGCTA

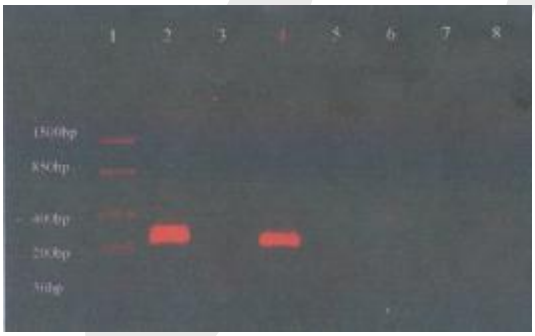
P1:AGTCTTGCGGCCGCACGCCCAAATC

P19:GCCATGCGTTAGTATGAGTCGTGC

و به عنوان شاهد منفی، از محلول PCR، شامل همه‌ی مواد به جز DNA استفاده شد. مقایسه‌ی داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون دقیق فیشر و سطح معنادار (p <0/05) انجام گرفت [13].

جدول 1: *مقایسه‌ی نمونه های پژوهش برپایه‌ی جای برداشت نمونه‌های گروه آزمون و شاهد*

گروه	جای آسیب					جمع
	مخاط باکال	کف دهان	لثه	لب	زبان	
لیکن پلان دهانی	22 %75/9	2 %6/9	1 %3/4	1 %3/4	3 %10/3	29 %100
شاهد	8 %57/1	0 %0	4 %28/6	1 %7/1	1 %7/1	14 %100
جمع	30 %69/8	2 %4/7	5 %11/6	2 %4/7	4 %9/3	43 %100



نگاره ی یک: *تصویر الکتروفورز*

یافته ها

از مجموع 43 نمونه‌ی مورد بررسی، 29 مورد در گروه لیکن پلان دهانی و 14 مورد در گروه شاهد جا داشتند. شمار 29 نمونه گروه لیکن پلان دهانی شامل 12 مرد و17 زن با میانگین سنی

13/92 ± 49/55 سال بود و14 نمونه‌ی گروه شاهد شامل هفت مرد و هفت زن با میانگین سنی 10/18 ± 48/5 سال گزارش شد. از 29 نمونه‌ی گروه لیکن پلان دهانی، سه مورد از نظر حضور ژنوم HCV مثبت بودند، که شامل دو زن و یک مرد بود و در گروه شاهد، همه‌ی موارد منفی گزارش شد. آزمون دقیق فیشر انجام گردید و با توجه به P.value به دست آمده (p =0/539) ارتباطی معنادار میان حضور HCV و ابتلا این عارضه به دست نیامد.

در جدول 2، فراوانی حضور ژنوم در نمونه‌های مورد پژوهش مشاهده می‌شود. سه نمونه‌ی مثبت از نظر HCV، به کف دهان و لثه و مخاط باکال مربوط بودند.

جدول 2: *مقایسه‌ی حضور ژنوم HCV در نمونه های مورد پژوهش*

گروه	حضور ژنوم HCV		جمع
	مثبت	منفی	
لیکن پلان	%10/3	%89/7	%100
دهانی	3	26	29
شاهد	% 0	%100	%100
	0	14	14
جمع	%7	%93	%100
	3	40	43

بحث

لیکن پلان دهانی (LP) از آسیب‌های به نسبت شایع مخاط دهانی است. عواملی، چون فشار، دیابت، هپاتیت C، ضربه و افزایش حساسیت به دارو و فلزات می‌توانند از عوامل ایجادکننده‌ی آن باشند [1]. در لیکن پلان دهانی شماری از ویروس‌ها، به عنوان عامل سبب‌شناختی مطرح شده بر روی آنها بررسی انجام شده است از این ویروس‌ها می‌توان HCV، HBV و $HPV_{16,18}$ را نام برد [3].

محبوب (Mahboob) و همکاران، ژنوم HCV را در 43 بیمار از 184 بیمار مبتلا به LP به دست آوردند (23/4 درصد) [14] و در بررسی کلانریت (Klanrit) و همکاران، شیوع ناچیز (پنج بیمار)، ولی معنادار ابتلا به HCV به دست آمد [10]. در پژوهشی که به وسیله‌ی قدسی و همکاران برای یافتن ضد ویروس به وسیله‌ی نسل سوم ELISA و آزمایش کارکرد کبد انجام شد، ضد HCV در هفت بیمار (4/8 درصد) مثبت به دست آمد و بیان کردند، که HCV در ظاهر، یک عامل سبب شناختی برای LP در بیماران ایرانی است [8]. ولی در بررسی کنونی تفاوتی معنادار از نظر آلودگی به HCV در بیماران لیکن پلان دهانی به دست نیامد و P.value به دست آمده گویای آن است، که اگر شمار نمونه‌ها تا چندین برابر نیز، افزایش یابند، ارتباط معنادار آماری وجود نخواهد داشت.

تغییرات بدخیمی، بیشتر در گونه‌ی اروزیو LP ، به علت نفوذ به لایه های عمقی تر اپی تلیوم گزارش شده است و موارد لیکن پلان دهانی با تغییرات دیسپلاستیک در مخاط باکال شایع‌تر هستند [1]. کاروزو (Carrozzo) و همکاران نیز، عفونت HCV را با شیوع بیشتر در بیماران با این عارضه اروزیو به دست آورند (85/7 درصد) و در گروه افراد با این عارضه‌ی غیر اروزیو، این شیوع کمتر (13/2 درصد) به دست آمد [6]. در بررسی کنونی، تفکیک میان انواع گوناگون لیکن پلان دهانی انجام نشد، شاید با افزایش شمار نمونه‌های بیماران با لیکن پلان دهانی گونه‌ی اروزیو را بتوان تفاوت معنادار به دست آورد.

بسیاری از پژوهشگران در بررسی‌های خود به این نتیجه رسیده‌اند، که ویژگی‌های نژادی و جغرافیایی ممکن است بر ویروس‌ها اثر گذارند [3]، به گونه‌ای که ناگائو (Nagao) و همکاران بیان کردند، که بیماری‌زایی لیکن پلان دهانی بیشتر نتیجه‌ی عوامل میزبان است تا عوامل ویروسی [5]. در بررسی کاراولیوگلو (Karavelioglu) و همکاران در ترکیه، از 41 بیمار لیکن پلان دهانی، تنها دو نفر دارای HCV-RNA مثبت بودند. بنابراین، بیان شد که هیچ رابطه‌ای میان HCV و OLP در منطقه‌ی جغرافیایی ترکیه (آنکارا) وجود ندارد [11]. رهنما و همکاران از روش ELISA برای مشخص کردن ضد HCV استفاده کردند و با توجه به نتایج به دست آمده، بیان کردند، که عفونت HCV ضرورتاً در همه‌ی بیماران مبتلا به LP وجود ندارد [9].

نتایج پژوهش کنونی با گروه دوم پژوهشگران که نبود ارتباط میان HCV و تظاهرات بالینی لیکن پلان دهانی را اعلام کرده بودند، همخوانی داشت و در آزمون آماری دقیق فیشر نیز، p =0/539 به دست آمد، که فاصله‌ای زیاد با عدد 0/05 دارد. بنابراین، نمی‌توان پنداشت، که افزایش شمار نمونه‌ها، حتی تا چندین برابر نیز، می‌توانست ارتباطی معنادار به دست دهد. همچنین، در این بررسی ارتباطی میان هپاتیت C و جای آسیب به دست نیامد. افزون بر آن، با توجه به p =1 در گروه مردان و زنان به تفکیک جنس ارتباطی میان ابتلا به HCV در بیماران لیکن پلان دهانی با جنس به دست نیامد.

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان می‌دهد، که نقش ویروس هپاتیت C در سبب شناسی لیکن پلان دهانی بسیار کم رنگ است، اما به علت هزینه‌ی بالای آزمایش PCR و نیز، دشواری فراهم کردن نمونه‌ی منطبق با معیارهای ورود این بررسی، افزایش شمار نمونه امکان‌پذیر نبود. بنابراین، پیشنهاد می شود:1- بررسی‌های گسترده‌تر بر روی بیماران در نقاط دیگر ایران انجام شود تا مشخص گردد، که آزمایش عفونت با HCV برای این بیماران OLP ضروری هست یا نه؟ 2- پژوهشی با طراحی متفاوت انجام شود تا بتوان از نمونه‌های غیر پارافینه استفاده کرد تا احتمال از میان رفتن ویروس در مراحل لام‌سازی و سپس، پارافین زدایی نباشد. 3- بررسی‌های گسترده‌تر و با شمار نمونه‌ی بیشتر برای بررسی دیگر ویروس‌های محتمل در ایجاد لیکن پلان دهانی انجام شود. 4- در بررسی‌های با استفاده از روش PCR کمی که مقدار حضور ژنوم را نیز، تعیین کند، حضور HCV در لیکن پلان بررسی شود.

سپاسگزاری

این طرح با شماره 385126 درشورای پژوهشی دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه به انجام رسیده است.

References

1. Bhattacharyya I, Cohen DM, Silverman S.Jr. Red and white lesions of the oral mucosa. In: Greenberg Ms,Gllick M.Burket's Oral medicine: diagnosis and treatment. 10th ed. Hamilton, Ontario: Bc Decker; 2003. p.85-125.
2. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial pathology.2nd ed. New York: W.B.Saunders co; 2002. p.213-252.
3. Sugerman PB, Savage NW. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. Aust Dent J 2002; 47: 290-297.
4. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute Viral Hepatitis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine.15th ed. New York: Mc Graw Hill; 2001. p.1725-1726.
5. Nagao Y, Sata M, Itoh K, Tanikawa K, Kameyama T. Quantitative analysis of HCV RNA and genotype in patients with chronic hepatitis C accompanied by oral lichen planus. Eur J Clin Invest 1996; 26: 495-498.
6. Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Broccoletti R, Garzino-Demo P, Ghisetti V. Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. J Oral Pathol Med 1996; 25: 527-533.
7. Kurokawa M, Hidaka T, Sasaki H, Nishikata I, Morishita K, Setoyama M. Analysis of hepatitis C virus (HCV) RNA in the lesions of lichen planus in patients with chronic hepatitis C: detection of anti-genomic- as well as genomic-strand HCV RNAs in lichen planus lesions. J Dermatol Sci. 2003; 32: 65-70.
8. Ghodsi SZ, Daneshpazhooh M, Shahi M, Nikfarjam A. Lichen planus and Hepatitis C: a case-control study. BMC Dermatol 2004; 20: 4-6.
9. Rahnama Z, Esfandiarpour I, Farajzadeh S. The relationship between lichen planus and hepatitis C in dermatology outpatients in Kerman, Iran. Int J Dermatol. 2005; 44: 746-748.
10. Klanrit P, Thongprasom K, Rojanawatsirivej S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Hepatitis C virus infection in Thai patients with oral lichen planus. Oral Dis 2003; 9: 292-297.
11. Karavelioğlu D, Koytak ES, Bozkaya H, Uzunalimoğlu O, Bozdayı AM, Yurdaydın C. Lichen planus and HCV infection in Turkish patients. Turk J Gastroenterol 2004; 15: 133-136.
12. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res. 1999; 27: e12.
13. Poornaghshband Z., An Introduction to PCR. 1th ed. Tehran: Sanam Publications; 2001. p.75-95.
14. Rehan N. Frequency of anti-HCV antibodies in patients with lichen planus. J Coll Physicians Surg Pak 2003; 13: 248-251.