

دراسة تعبيرية Ki-67 في آفات الحزاز المنبسط الفموي محتملة الخباثة
(دراسة كيميائية مناعية نسيجية)

* * أ.د. شريف بركات

*د. عامر طقم

(الإيداع: 12 تموز 2018 ، القبول: 21 تشرين الأول 2018)

ملخص:

يُعدّ الحزاز المنبسط مرضاً جلدياً مخاطياً مزمنًا شائعاً نسبياً، أدخلت منظمة الصحة العالمية (WHO) الحزاز المنبسط كحالة قبييل سرطانية. يتم التعبير عن مستضد Ki-67 في جميع مراحل الدورة الخلوية أثناء التكاثر الخلوي. تقترح الدراسات المختلفة العلاقة بين التحول الخبيث للآفات قبييل سرطانية ووجود هذا البروتين. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم تعبيرية Ki-67 في الحزاز المنبسط الفموي باستخدام الجسم المضاد لبروتين Ki-67، ومقارنة هذه التعبيرية في البشرة الفموية الطبيعية كعينة شاهدة. تألفت العينة من 20 عينة مثبتة بالفورمول ومدمجة بالبارافين للحزاز المنبسط الفموي و20 للبشرة الفموية الطبيعية، والتي لونت تقليدياً "الهيماتوكسيلين والإيوزين ومناعياً" بالضد متعدد النسيلة لمشعر الانقسام الخلوي Ki-67. وجدت تعبيرية Ki-67 في جميع حالات البشرة الفموية الطبيعية، وتوضعت التعبيرية في الطبقة القاعدية من البشرة. في حالات الحزاز المنبسط، تعبيرية Ki-67 كانت أعلى من المخاطية الفموية. اعتبار Ki-67 واسم للتكاثر، زيادة تعبيرية Ki-67 في بشرة مجموعة الحزاز المنبسط الفموي يشير إلى معدل مرتفع من التكاثر في آفات الحزاز المنبسط.

الكلمات المفتاحية: الحزاز المنبسط الفموي OLP، مستضد Ki-67، البشرة الفموية الطبيعية. NOE

* طالب ماجستير في قسم النسيج والتشريح المرضي الخاص بالفم والأسنان - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق

* * أستاذ - قسم النسيج والتشريح المرضي الخاص بالفم والأسنان - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق

**precancerous lesions Study of Ki-67 Expression in oral lichen planus
(An immunohistochemical study)**

Dr. Amer Taqem

Prof. Dr. Sharif Barakat

(Received: 12 July 2018, Accepted: 21 October 2018)

Abstract:

lichen planus is a chronic, relatively common, dermal mucosa disease. The World Health Organization (WHO) has introduced lichen planus as a premalignant condition. The Ki-67 antigen is expressed in all the phases of the cellular cycle in proliferative cells. Different studies have suggested the relationship between incidences of malignancy in precancerous lesions and the occurrence of this protein.

This study aimed to evaluate the Ki-67 expression in oral lichen planus using an antibody the Ki-67 protein, and compare it with Ki-67 expression in normal oral epithelium as control. The sample consisted of 20 formalin_fixed, paraffin_embedded specimens of oral lichen planus lesions and 20 normal oral epithelium that were conventionally stained with H&E and immunohistochemically stained with a polyclonal Ki-67 antigen antibody.

The Ki-67 expression was found in all the cases of normal oral epithelium studied and was found to be restricted to the basal layer of the epithelium. In Lichen planus cases, the Ki-67 expression was more than the normal mucosa.

Considering Ki-67 is a proliferation marker, the increased expression of Ki-67 in the oral lichen planus group's epithelium indicates a high proliferation rate in lichen planus lesions.

Key words: oral lichen planus (OLP), Ki-67 antigen, normal oral epithelium (NOE).

1- المقدمة:

الحزاز المنبسط (Lichen planus) هو مرض مزمن، شائع نسبياً، وهو مرض جلدي يصيب الغشاء المخاطي أيضاً، نسبة حدوثه 0.5-2% عند البالغين مع معدل إصابة الإناث إلى الذكور 3:1، أسبابه لا تزال مجهولة السبب. ومع ذلك قد تلعب الأدوية - المواد السنية- الحساسية من بعض الأطعمة - أو حتى الإصابة الجرثومية أو الفيروسية، بالإضافة للحساسية المناعية دوراً في المساهمة الإمرضية (1). هناك أيضاً علاقة قد ذكرت بالمقالات وهي وجود ارتباط بين الحزاز المنبسط الفموي والتهابات الكبد C، أما دور التوتر كسبب لهذا المرض لا يزال موضع جدل (2). يتظاهر الحزاز المنبسط بعدة مظاهر سريرية تشمل النمط الشبكي، الحطاطي واللويحي، أفات حمامي، تآكل، وبثور وتتوضع بشكل أساسي على الغشاء المخاطي، وبنية اللثة واللسان، وعلى الرغم انه يعتقد ان سببه مناعي ذاتي والخلايا T تتواسط هذا المرض، مازال السبب الأساسي الدقيق قيد المناقشة كما يتصف هذا المرض بالموت الخلوي المبرمج وزيادة التكاثر الخلوي (3).

ذكرت أول حالة من السرطان شائك الخلايا الفموي عام 1910، منذ ذلك الحين، أجريت العديد من الأبحاث للكشف عن تطور وتقدم الحزاز المنبسط إلى سرطان شائك خلايا فموي. قامت منظمة الصحة العالمية WHO بإدخال الحزاز المنبسط كآفات قبيل سرطانية (4). يؤدي التلف الخلوي الحاد في الحزاز المنبسط الفموي إلى تكاثر البشرة للحفاظ على السلامة الهيكلية، التحول الذي يحدث اثناء دورة الخلية في الحزاز المنبسط الفموي يؤدي إلى تطور الآفة نحو الخباثة (5). وقد أظهرت العديد من الدراسات الجزيئية أدلة على زيادة معدل التكاثر الخلوي في الخلايا البشرية للحزاز المنبسط الفموي (6). والنشاط التكاثري البشري في الحزاز المنبسط الفموي بسبب تأثيرات الالتهاب التي تسبب تدمير المادة الوراثية في الخلايا (7). تسيطر عدة بروتينات مختلفة على دورة الخلية، Ki-67 هو واحد من هذه البروتينات الذي يمكن تحديده واكتشافه في المراحل النشطة من دورة الخلية مثل، G1، S، G2، M ومع نشاط أكبر في مراحل G2، M. أول من قام بالتعرف على ضد الـ Ki-67 هو Geredes وزملائه في العام 1983 باستخدام أصداد فأرية وحيدة النسيلة تم توليدها من خلال تمنيع immunizing الفئران بنوى سلالة خلوية مأخوذة من لمفوما هودجكن، وقد تم اشتقاق اسم البروتين من اسم المدينة التي اكتشف فيها وهي مدينة كيل Kiel ومن رقم السلالة الأصلية التي نمت في الطبق رقم 67 في المختبر وقد أقرحوا أنه يمكن استخدامه كواسم للتكاثر الخلوي (8).

Ki-67 هو بروتين نووي، يمكن العثور عليه بشكلين من الإيزوفورم مع أوزان جزيئية 356 كيلودالتون و 320 كيلو دالتون، يقع جين هذا البروتين على الصبغي 10 ويمكن إيجاده في انوية الخلايا المنقسمة (4). ان نصف العمر المقدر لمستضد الـ Ki-67 هو 60-90 دقيقة. تبدأ تعبيرية المستضد Ki-67 في الطور S من الانقسام ويزداد بشكل تدريجي في هذا الطور والطور G2 حتى يصل لمستوى مستقر في الانقسام. بعد انقسام الخلية تعود الخليتين الى الطور G1 مع تناقص لمستويات مستضد الـ Ki-67 بشكل سريع ضمن هذا الطور (9)

وقد تبين في الآونة الأخيرة أن جين Ki-67 له تعبيرية عالية في نوى الخلايا البشرية من الآفات الفموية قبيل الخبيثة والآفات الخبيثة (10). يعتقد ان السيطرة على عملية التكاثر الخلوي مقفودة في السرطان، والعديد من الدراسات ذكرت ان تكاثر الخلايا غير الطبيعي يظهر ليكون في الآفات قبيل السرطانية ومؤشراً على التكون الورمي (11). وتحديد المؤشرات الحيوية للكشف عن التحول الخبيث له دور مهم في تطوير الفحص القياسي وتحسين المتابعة للمريض في الآفات قبيل السرطانية (12).

يشير واسم Ki-67 إلى النسبة المئوية للأنوية التي يشغلها هذا البروتين، باستخدام هذا اللواسم يسمح لنا بتقييم سرعة التكاثر. بالنظر إلى الدور الرئيسي للـ Ki-67 في تنظيم دورة الخلية وبأنه واحد من شروط الآفات ما قبل السرطانية المحتملة ويعبر عن التكاثر البشري، لذلك فإننا من هذه الدراسة قمنا بتقييم تعبيرية بروتين Ki-67 في المرضى الذين يعانون من الحزاز المنبسط الفموي.

2-الهدف من البحث:

1_ تحري وجود واسم التكاثر الخلوي في عينات الحزاز المنبسط الفموي وفي عينات البشرة الفموية الطبيعية باستخدام مشعر Ki-67.

2_ مقارنة تعبيرية واسم ال Ki-67 بين عينات الحزاز المنبسط والعينة الشاهدة.

3-المواد والطرائق:

أجريت دراسة راجعة Retrospective cohort study لعينة البحث المؤلفة من 20 عينات وهذه العينات محفوظة في قوالب شمع البارافين، وقد تم الحصول عليها من أرشيف قسم النسيج والتشريح المرضي في كلية طب الأسنان بجامعة دمشق. وتم أخذ العينة اعتماداً على التشخيص المسبق لها على أنها خزعات من آفات مشخصة على أنها حزاز منبسط فموي على الحزاز المنبسط الفموي. وبعد تلوينها تقليدياً بـ H&E والتأكد من تشخيصها لونت مناعياً بمستضد Ki-67. أما العينة الشاهدة فقد تألفت من 20 عينات لنسج فموية سليمة أخذت حديثاً من المخاطية المغشية للأرجاء الثالثة خلال قلع الأرجاء المنظرة، تم الحصول عليها عن طريق مشفى جراحة الفم والفكين _ جامعة دمشق بعد الحصول على موافقة المريض والموافقات القانونية والأخلاقية. وقد تُبِتت خزعات العينة الشاهدة بالفورمالين 10% بهدف حفظها ونقلها إلى مكان إجراء الدراسة.

طريقة العمل:**طريقة تحضير الشرائح:**

1- يثبت القالب الشمعي على البشرة النسيجية، ويقطع بسماكة 4 ميكرون.

2- توضع المقاطع البارفينية في محم مائي 40°.

3- توضع على الشرائح الزجاجية.

4- توضع الشرائح الزجاجية على سخان.

التلوين بالهيماتوكسيلين والإيوزين: توضع الشرائح في حمامين من الاكزيلول 2 د، ثم الوضع في الكحول المطلق، ثم الكحول 95%، ثم 70%، 50% لمدة 2 د لكل حمام. بعدها يتم الغسل في الماء وتوضع في الهيماتوكسيلين بضع دقائق ثم تُغسل، ثم توضع في الايوزين 1-1.5 د، تغسل بالماء، ثم توضع في حمامات الكحول والاكزيلول المتعاقبة وبعدها يتم الستر باستخدام بلسم كندا.

التلوين المناعي: بعد القطع بالبشرة النسيجية يتم تسخين السلايدات في فرن 65° لمدة ساعة، ثم يتم الوضع في الإكزيلول والإيتانول ثم المحلول الدارئ. توضع السلات الحاوية على السلايدات والمحلول المظهر للمستضد في المايكرويف بدرجة حرارة 125 ثم 90. تترك السلايدات لتبرد بدرجة حرارة الغرفة. تزال السلايدات وتغسل بالمحلول الدارئ. توضع السلايدات في البيروكسيداز لمدة لمدة 5 د. تغسل السلايدات بالمحلول الدارئ 3 مرّات ثم يتم وضع الضد الأولي (Primary Antibody) لمدة 45 د، استخدم الضد الأولي Ki-67 antibody من شركة Bio-SB. ثم تغسل 3 مرّات بالمحلول الدارئ، يغطي النسيج بـ HRP لمدة 45 د، والغسل بالمحلول الدارئ، ثم يُحضّر الـ chromogen ويُطبّق على النسيج 10 د وتغسل السلايدات بالماء المقطّر 5 مرات، بعدها تلوّن السلايدات بالهيماتوكسيلين.

طرائق دراسة الشرائح النسيجية:

العينة الشاهدة: تم فحص شرائح العينة الشاهدة الملونة ب Ki-67 بالمجهر الضوئي بهدف التعرف على كيفية ظهور تعبيرية الملون في الخلايا الطبيعية المتكاثرة، ووجد أن معظم هذه الخلايا تبدي تعبيرية نووية للملون. لذا وبالاستناد إلى دراسات سابقة اعتبرت كل خلية تبدي تعبيرية نووية هي خلية في مرحلة الانقسام والتكاثر (13).

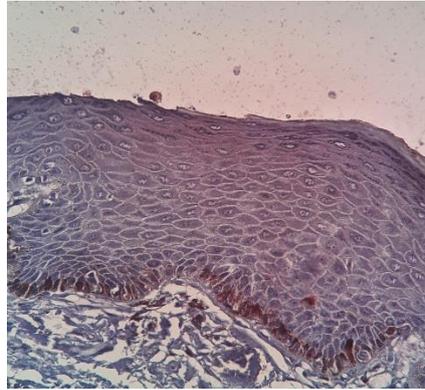
العينات الحزاز المنبسط الفموي:

تم فحص الشرائح الملونة ب Ki-67 بالمجهر الضوئي. درست خمس ساحات نسيجية من كل محضّر على العدسة 400X، تم إحصاء عدد الخلايا يدوياً التي تبدي تعبيرية نووية لل Ki-67 في الطبقات النسيجية من الحزاز المنبسط الفموي، وبعد الإنتهاء من عدّ الخلايا للساحات الخمس المدروسة من كل محضّر يتم وضع الأعداد الناتجة ضمن الحقل المناسب لها في جداول مصممة على برنامج Microsoft Excel. اعتُبر أنّ نسبة الخلايا في كلّ محضّر هي متوسط نسبتها في الساحات الخمس المدروسة.

الطرائق الإحصائية: تم استخدام برنامج SPSS v.19 لتحليل البيانات التي حصلنا عليها إحصائياً، كما استعنّا ببرنامج (MS Excel 2010) لإنجاز الرسوم البيانية، وبرنامج G*power لحساب حجم العينة، كما تم إجراء اختبار توكي Tukey test، حيث صيغت الفرضيات التي يختبرها بالشكل التالي: فرضية العدم H0 : العينات المدروسة تعود إلى المجتمع نفسه، أي لا يوجد فرق معنوي بين العينات أو لا توجد فروق معنوية بين متوسطات المجموعات. الفرضية البديلة H1 : العينات المدروسة تعود إلى مجتمعات مختلفة، أي يوجد فرق معنوي بين العينات أو توجد فروق معنوية بين متوسطات المجموعات.

4-النتائج:**العينة الشاهدة:**

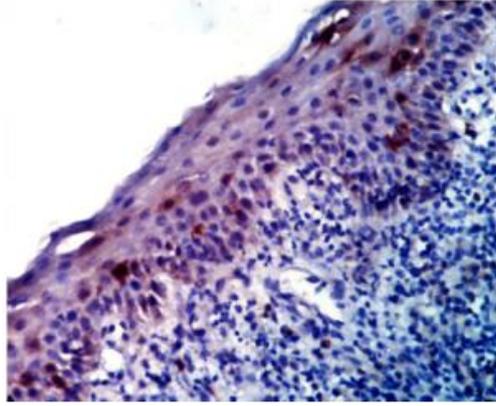
أبدى تلوّن بمشعر Ki-67 تعبيرية نووية في الخلايا المتكاثرة، حيث أبدت جميع العينات تعبيرية إيجابية لل Ki-67 وتوزعت التعبيرية الإيجابية في مجموعة من نوى الخلايا القاعدية فقط ، حيث تعتبر الطبقة المولدة للخلايا، كما في الصورة (1)



الشكل رقم (1): تعبيرية نووية لل Ki-67 في البشرة الفموية الطبيعية

العينات الحزاز المنبسط الفموي:

جميع عينات الحزاز المنبسط الفموي أظهرت تعبيرية إيجابية لل Ki-67، وتوزعت التعبيرية في طبقات البشرة، كما في الصورة رقم 2.



الشكل رقم (2): تعبيرية Ki-67 في عينات الحزاز المنبسط الفموي

حيث تم حساب مقدار تعبيرية الـ Ki-67 لكل خزعة من الخزعات النسيجية المدروسة في عينة البحث وفقاً للمتوسط الحسابي المدروس: يوضح الجدول رقم 1 أهم الإحصاءات الوصفية لنسبة التعبيرية النووية للـ Ki-67 في كل العينات المدروسة:

الجدول رقم (1): مقدار تعبيرية Ki-67 في عينة الدراسة

الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا ذات التعبيرية النووية لمشعر Ki-67					
الحد الأعلى	الحد الأدنى	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	عدد الخزعات النسيجية	نوع العينة
25	19	2.06	22.05	20	البشرة الفموية الطبيعية (العينة الشاهدة)
80	20	12.19	44.15	20	الحزاز المنبسط الفموي

وللتحقق من وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيرية النووية ما بين مجموعة الحزاز المنبسط الفموي ومجموعة البشرة الفموية الطبيعية أجرينا اختبار توكي Tukey test.

الجدول رقم (2): نتيجة اختبار توكي للمقارنة الثنائية.

نتيجة اختبار Tukey test للمقارنة الثنائية بين مجموعة الحزاز المنبسط الفموي ومجموعة الشاهدة					
الاستنتاج	مستوى الدلالة P value	الخطأ المعياري	متوسط الفرق	المجموعة الثانية	المجموعة الأولى
توجد فروق دالة إحصائياً	0.0001	3.06156	22.1000	الحزاز المنبسط الفموي	البشرة الفموية الطبيعية

5- المناقشة:

كان الهدف من هذه الدراسة هو تفسير وجود علاقة بين مشعر Ki-67 وزيادته في حالات الحزاز المنبسط الفموي ومقارنتها بالبشرة الفموية الطبيعية. ووجدنا ان تعبيرية Ki-67 كانت موجودة في جميع حالات البشرة الفموية الطبيعية وقد توضعت الإيجابية النووية للـ Ki-67 في الطبقة القاعدية، ونفس ذلك بإن الخلايا المولدة تتوضع في الطبقة القاعدية. وقد توافقت نتائج دراستنا مع دراسة Kumar وزملاؤه حيث وجد تعبيرية إيجابية للـ Ki-67 في بشرة المخاطية الفموية الطبيعية وتوزعت الإيجابية في الطبقة القاعدية (14). وقد تقاربت نتائج دراستنا مع دراسة Birajdar وزملاؤه حيث قام بالتحري عن تعبيرية مشعر التلوين للـ Ki-67 في البشرة الفموية الطبيعية ووجد ان التعبيرية النووية تتوضع في الطبقة القاعدية وبعض خلايا فوق القاعدية (13).

في دراستنا، تعبيرية Ki-67 كانت إيجابية في جميع عينات الحزاز المنبسط الفموي وتوزعت الإيجابية النووية في طبقات البشرة، مع وجود فروق دالة إحصائياً بين مجموعة البشرة الفموية الطبيعية ومجموعة الحزاز المنبسط حيث كانت $P=0.0001$ ، وهذه النتائج تتوافق مع دراسة سابقة (15). كما توافقت مع دراسة Hosseini وزملاؤه اللين قاموا بالتحري عن تعبيرية بروتين Ki-67 على 44 مريض حزاز منبسط فموي وتمت مقارنة التعبيرية على 30 حالة لبشرة فموية طبيعية، وكشفت النتيجة ان تعبيرية Ki-67 كانت أعلى في عينة الحزاز المنبسط الفموي مقارنة بالبشرة الفموية الطبيعية (16). يَعد الحزاز المنبسط الفموي مرضاً جليدياً مخاطياً مناعياً مزمنياً وإمكانية التحول الخبيث من الحزاز المنبسط هو موضوع مستمر للدراسة ومثير للجدل في الأدبيات. ووجود خلل التنسج في الحزاز المنبسط الفموي يزيد من خطر التحول للخباثة (17)، وهذا يفسر زيادة في النشاط التكاثري أي زيادة عدد الخلايا المتكاثرية وبالتالي زيادة في تعبيرية مشعر Ki-67. اهم عامل يشير إلى ما إذا كان الآفة تتقدم نحو الخباثة هو وجود وشدة سوء التصنع لذلك من الضروري العثور على علامات لهذه التغيرات (18).

Ki-67 هو البروتين الذي يلعب دوراً مهماً في الحفاظ على التكاثر الخلوي، يستخدم هذا البروتين كواسم تنبؤي في العديد من الأورام ويحدد درجة سوء التصنع (19). والتعبيرية العالية للـ Ki-67 عند المرضى الحزاز المنبسط الفموي قد ذكرت في دراسات سابقة وقد افترضت ان يكون هناك اضطراب ثانوي في التكاثر ربما بسبب الانهيار المتكرر في دورة الخلايا التي تؤدي إلى زيادة حالة التكاثر (20).

وفي دراسة سابقة أجريت عام 2004 للتعبير عن مستضدات التكاثر الخلوي PCNA و Ki-67 في الحزاز المنبسط الفموي عند 30 مريضاً أظهرت النتائج رد فعل للـ Ki-67 يتراوح بين منخفض للمتوسط لعالي الكثافة، والكثافة العالية لوحظت في حالات الحزاز المنبسط التآكلي الذي يترافق مع علامات سوء تصنع (21).

وفي دراسة Aung وزملائه وجدوا نتائج مشابهة لدراستنا، قاموا بتلوين Ki-67 في الحزاز المنبسط الفموي مقارنة مع المخاطية الفموية (كعينة شاهدة) وكان أعلى بشكل ملحوظ حيث $P<0.05$ في النوع الشبكي أكثر من النوع الضموري. بالإضافة مستوى Ki-67 له علاقة بالتحول لسوء التصنع ونتائج Aung تقترح بإن الحزاز المنبسط الفموي مع سوء التصنع الشديد له قدرة على التحول لسرطان شائك الخلايا (7). وجدت دراسة Zargarán وزملاؤه أن تعبيرية Ki-67 في الحزاز المنبسط الفموي وسوء التصنع البشري كانت متشابهة مع مستوى أعلى من التعبيرية في السرطان البشري الفموي، وأظهرت هذه الدراسة ان خطر تحول الحزاز المنبسط الفموي إلى خباثة يشبه خطر سوء التصنع البشري لذلك ينصح بإجراء فحوصات منتظمة (22). وجود Ki-67 في أنسجة سوء التصنع دون التحول للخباثة يشير إلى أهمية Ki-67 في تشخيص إمكانية التحول للخباثة في الآفات قبيل سرطانية (3).

6-الإستنتاجات:

Ki-67 مفيد في تحديد آفات الحزاز المنبسط الفموي مع الأنماط الأكثر عدوانية وقد تحمل ميل أكبر للتطور إلى سرطان شائك الخلايا الفموي.

7-التوصيات:

إجراء دراسة مقارنة بين تعبيرية مشعر الانقسام Ki-67 بين الآفات الحزاز المنبسط والسرطان شائك الخلايا.

8-المراجع:

1. Poomsawat S, Buajeeb W, Khovidhunkit SoP, Punyasingh J. Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2011;40(4):294-9.
2. Montebugnoli L, Venturi M, Gissi D, Leonardi E, Farnedi A, Foschini MP. Immunohistochemical expression of p16INK4A protein in oral lichen planus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2011;112(2):222-7.
3. Roopashree M, Gondhalekar RV, Shashikanth M, George J, Thippeswamy S, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus—a review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2010;39(10):729-34.
4. Regezi J, Sciubba J, Jordan R. CK: Oral pathology, clinical pathologic correlations. Missouri, ST. Louis: Saunders. Elsevier; 2012.
5. Bashardoust N, Modabbernia S, Bagheri S, Shiva A, Jalali R. Immunohistochemical analysis of Ki-67 expression in oral lichen planus lesions. *Journal of Dentomaxillofacial*. 2015;4(1):25-30.
6. de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *Journal of oral science*. 2009;51(1):117-21.
7. Aung WPP. Evaluation of epithelial cell proliferation in oral lichen planus by using Ki-67 cell proliferative marker. *Myanmar Dental Journal*. 2011;18(1).
8. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer*. 1983;31(1):13-20.
9. Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*. 2017:1-6.

10. Vieira FL, Vieira BJ, Guimaraes MA, Aarestrup FM. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC oral health*. 2008;8(1):25.
11. Tumuluri V, Thomas G, Fraser I. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*. 2002;31(10):598–604.
12. Rosa EA, Hurtado-Puerto AM, Falcão DP, Brietzke AP, de Almeida Prado Franceschi LE, Neto C, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: The role of p16, Ki-67, Bub-3 and SOX4 in assessing precancerous potential. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(5):4157–66.
13. Birajdar SS, Radhika M, Paremala K, Sudhakara M, Soumya M, Gadivan M. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. 2014;18(2):169.
14. Kumar KV, Chaithanya K, Punde P, Thorat A, Jangam AG, Deepthi S. Comparative Evaluation of Immunohistochemical Expression of Ki-67 in Oral Lichen Planus, Oral Leukoplakia and Normal Mucosa Cases. *Journal of International Oral Health*. 2015;7(10):82.
15. García-Pola MV, Anitua MR, Fernández BA, Garcia JM, Lopez-Muniz A. Study comparative of Ki-67 expression in oral lichen planus and oral leukoplakia. Quantitative analysis. *Medicina oral: organo oficial de la Sociedad Espanola de Medicina Oral y de la Academia Iberoamericana de Patologia y Medicina Bucal*. 2001;6(5):364–70.
16. Agha-Hosseini F, Khalili M, Rohani B. Immunohistochemistry analysis of P53 and Ki-67 proteins in oral lichen planus and normal oral mucosa. *Iranian Journal of Public Health*. 2009;38(2):37–43.
17. Epstein JB, Wan LS, Gorsky M, Zhang L. Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2003;96(1):32–7.
18. Kamal C, Simionescu CE, Margaritescu C, Stepan A. P53 and Ki67 immunoexpression in mucinous malignant ovarian tumors. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(3 Suppl):799–803.

19. BASCONES–ILUNDAIN C, GONZALEZ–MOLES MA, ESPARZA–GÓMEZ G, GIL–MONTTOYA JA, BASCONES–MARTÍNEZ A. Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer research*. 2006;26(1A):357–62.
20. Gonzalez–Moles M, Gil–Montoya J, Ruiz–Avila I, Esteban F, Bascones–Martinez A. Differences in the expression of p53 protein in oral lichen planus based on the use of monoclonal antibodies DO7 and pAb 240. *Oral oncology*. 2008;44(5):496–503.
21. Pirkić A, Biočina–Lukenda D, Cekić–Arambašin A, Buković D, Habek M, Hojsak I. Tissue expression of proliferative antigens (PCNA and Ki–67) in oral lichen ruber related to clinical status. *Collegium antropologicum*. 2004;28(1):447–53.
22. Zargarán M, Jamshidi S, Eshghyar N, Moghimbeigi A. Suitability/unsuitability of cell proliferation as an indicator of malignant potential in oral lichen planus: an immunohistochemical study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(11):6979–83.