

تحرّي تعبيرية بروتين الـ β -Catenin في سوء التصنع البشري الفموي

الدكتور شريف بركات*

علاء نصر**

(تاريخ الإيداع 22 / 7 / 2015. قُبِلَ للنشر في 26 / 11 / 2015)

□ ملخص □

تعتبر آفات سوء التصنع الفمويّة في كثير من حالاتها آفات ما قبل سرطانيّة، وتقوم الخلايا الظهاريّة السرطانية بالغزو والاستعمار من خلال آليّة التحوّل الظهاري الميزانشيمي. وقد أجريت هذه الدراسة لتحريّ التحوّل الظهاري الميزانشيمي عبر دراسة تغيرات الـ β -catenin في الدرجات المختلفة لسوء التصنع البشري الفموي. تمّ دراسة 45 خزعة مثبّة بالفورمالين ومدمجة بشمع البارافين مؤرشفة ومشخّصة على أنّها آفات ذات سوء تصنع بشروي فموي، وتمّ تقطيعها وتلوينها بالـ H&E ثمّ تقييم درجة سوء تصنعها وتقسيمها لثلاث مجموعات حسب درجة سوء التصنع، ثمّ لوّنت بالملون المناعي الكيميانسيجي β -catenin لدراسة التحوّل الظهاري الميزانشيمي فيها. وتمّ مقارنتها مع عينة شاهدة من نسيج فمويّة سليمة.

واستنتج أنهيزداد معدّل التحوّل الظهاري الميزانشيمي مع زيادة درجات سوء التصنع. ويزداد معدّل التطفّر في البروتينات التي تضبط مستويات الـ β -catenin مع زيادة درجات سوء التصنع. فبالتالي يمكن استخدام الملون المناعي الكيميانسيجي الـ β -catenin للنتبؤ باحتماليّة التحوّل الخبيث للآفات الفمويّة البشريّة.

الكلمات المفتاحية: سوء التصنع البشري الفموي، التحوّل الظهاري الميزانشيمي، بروتين الـ β -catenin، سبيل إشارات Wnt.

* أستاذ مساعد - كلية طب الأسنان-جامعة دمشق- دمشق - سورية.

** طالب دراسات عليا (ماجستير) - قسم النسيج والتشريح المرضي - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق - سورية.

Investigation the expression of β -catenin in oral epithelial dysplasia

Dr. Sharif Barakat*
Alaa Nasser**

(Received 22 / 7 / 2015. Accepted 26 / 11 / 2015)

□ ABSTRACT □

Oral epithelial dysplasia is a precancerous change develops in the oral mucosa, and leukoplakia is the most common precancerous lesions in oral mucosa.

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is considered the mechanism through which the oral leukoplakia becomes malignant, and it's also responsible for the invasion and metastasis of cancers. This study investigates the expression of β -catenin in epithelial-mesenchymal transition detected by immunohistochemical staining in the different grades of oral epithelial dysplasia.

The sample consisted of 45 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of oral leukoplakia with different grades of oral epithelial dysplasia; specimens were immunohistochemically stained with β -catenin antibody.

The control group was consisted of biopsies from the normal oral epithelia.

The EMT rates are associated with the severity of the oral epithelial dysplasia. That means, the epithelial-mesenchymal transition marker β -catenin could be used to evaluate the potentiality of malignant transformation in the precancerous lesions.

Key Words: Oral epithelial dysplasia, β -catenin, epithelial-mesenchymal transition, leukoplakia, Wnt signaling pathway.

* Assistant Professor, Department of Oral Histology and Pathology- Dentistry Faculty- Damascus University- Damascus- Syria.

**Postgraduate student. Department of Oral Histology and Pathology- Dentistry Faculty- Damascus University- Damascus- Syria.

مقدمة:

إنّ سرطان الفم شائكة الخلايا هي السرطانات الأكثر شيوعاً من سرطانات الرأس والعنق ويسجّل ما يفوق 300000 حالة سنوياً حول العالم، ويعتبر من أهمّ مسببات الموت حيث معدّل بقاء المصاب لمدة خمس سنوات أقل من 50% (Greenlee et al., 2000). وإنّ التشخيص المبكر للسرطانات بشكل عام هو أهمّ العوامل التي تحسّن من إنذارها. و معظم سرطانات الفم شائكة الخلايا تنشأ عن آفات ما قبل سرطانية (Thompson, 2006)، والتي يأتي في مقدمتها الطلاوات الفموية (Mithani et al., 2007)(Neville, 2009) حيث أنّ أكثر من 50% من السرطانات شائكة الخلايا الفموية تحوّلت عن آفات سوء تصنّع بشروية قبيل سرطانية (Speight, 2007) (Rastogi et al., 2013).

ويعرّف سوء التصنّع البشري الفموي على أنّه مصطلح تشخيصي يصف التغيّرات النسيجية التي تحدث في الاضطرابات ما قبل السرطانية المزمنة والمترفية للمخاطية الفموية (Lumerman et al., 1995) لا يرتبط مصطلح سوء التصنّع البشري الفموي بمظهر سريري محدّد، لكن غالباً ما يعتبره الباحثون أنّه الانعكاس النسيجي للآفات الطلاوية الفموية (Barakat, 2005)، كما أنّه يُشاهد دائماً في المخاطية الفموية المجاورة للسرطان شائكة الخلايا الفموي. (Jaber et al., 2003) وقد تمّ تصنيفه من قبل منظمة الصحة العالمية WHO عام 2005 وفق معايير بنيوية وخلوية موضحة في الجدول (1)

جدول (1) تصنيف سوء التصنّع البشري الفموي (Barnes et al., 2005)

الدرجة	مستوى التغيّر	التغيّرات الخلوية	التغيّرات البنيوية
فرط تقرّن	الطبقة السطحية	لا يوجد	زيادة القرنين والخلايا الناضجة الطبيعية
فرط التصنّع	الطبقة القاعدية	لا يوجد	ظاهرة متمسكة فرط تقرّن والنضج طبيعي
سوء التصنّع البسيط	الثالث القاعدي	تعدد الأشكال الخلوية والنووة زيادة اصطبغ النوى	فرط تصنّع الطبقة القاعدية
سوء التصنّع المتوسط	حتى الثالث المتوسط	تعدد الأشكال الخلوية والنووية تفاوت حجوم النوى والخلايا زيادة اصطبغ النوى زياد الأشكال الفتيلية غير الطبيعية	فقدان القطبية اضطراب في نضج الخلايا من الطبقة القاعدية حتى الشائكة امتدادات إصبعية مغزلية الشكل فرط تصنّع الطبقة القاعدية زيادة كثافة الخلايا

اضطرابات النضج من الطبقة القاعدية إلى الشائكة فرط تصنع الطبقة القاعدية زيادة كثافة الخلايا سوء تقرن (تقرن غير ناضج) لآلى كيرانتينية في عمق الظهارة انحلال الأشواك	تعدد الأشكال الخلوية والنوية تفاوت حجوم النوى والخلايا زيادة اصطبغ النوى زياد الأشكال الفتيلية غير الطبيعية زيادة حجوم النوى والخلايا زيادة أعداد وحجوم النويات	حتى الثلث السطحي	سوء التصنع الشديد
تغيرات من الطبقة القاعدية إلى السطحية فقدان التطبق	كل التغيرات ممكنة	كامل سماكة الظهارة	السرطان الموضّع

ويقترح Neville معالجة الطلاوات التي تبدي سوء تصنع متوسط إلى شديد بإزالتها بشكل كامل سواء بالاستئصال الجراحي أو التجريف الكهربائي أو بتطبيق الليزر خوفاً من تحولها الخبيث مع مراقبة طويلة الأمد للمريض للتأكد من عدم ظهور آفات أخرى. أما الطلاوات التي لا تبدي علائم سوء التصنع أو تبدي سوء تصنع بسيط فتستطب فيها المعالجة المحافظة والإقلاع عن التدخين والكحول بالإضافة للمراقبة كل 6 أشهر للتأكد من عدم تقدم الآفة وزيادة سوء التصنع فيها عندها لابد من استئصالها كلياً. وفي الوقت نفسه يطرح Neville تساؤلاً حول ما تشير إليه الدراسات التي يتم فيها متابعة المرضى (Follow up-Studies) حيث بينت تلك الدراسات بقاء العديد من الآفات الفموية الطلاوية لمدة تزيد عن عشر سنوات وقد تصل إلى 20 سنة دون أن يطرأ عليها أي تقدم يذكر رغم احتواء بعضها على علائم مختلفة من سوء التصنع، وإحدى هذه الدراسات بقيت فيها بعض الآفات ما يفوق نصف قرن (Neville, 2009).

كذلك تحدث Martorell عن معالجة الطلاوة الفموية حيث قسمها إلى طلاوات عالية الخطورة تشمل الطلاوات غير المتجانسة سريريا إضافة إلى الطلاوات الحاوية على سوء التصنع البشري بمختلف درجاته، وطلاوات منخفضة الخطورة وتشمل الطلاوات دون سوء التصنع أو مع سوء تصنع بسيط شرط أن تكون متجانسة سريريا وصغيرة الحجم أصغر من 2 ملم ولا تشغل مناطق تشريحية خطيرة (قاع الفم وباطن ووحشي اللسان). وقد أكد على ضرورة الاستئصال الجراحي الكامل للطلاوات عالية الخطورة.

في حين اكتفى بالمعالجة المحافظة للطلاوات منخفضة الخطورة فكانت بإيقاف التدخين وشرب الكحول، وتطبيق الوقاية الكيميائية (chemoprevention) كـ Retinoids والفيتامينات A, C, E سواء موضعياً أو جهازياً أو بالمضادات الفطرية في الطلاوات المرتبطة بالكانديدا و مراقبة المريض، فإذا لم يحدث تراجع للآفة خلال ثلاثة أشهر نلجأ إلى الجراحة بالتبريد (Cryosurgery) أو بتطبيق الليزر (Carbon dioxide laser)، ثم نتوجه إلى الاستئصال

الجراحي الكامل ما لم تحدث استجابة للعلاج المحافظ حتى ولو صُنِّفت الآفة على أنها منخفضة الخطورة في البداية.
(Martorell–Calatayud et al., 2009)

وقد بنى Martorell تلك المقاربة بالعلاج انطلاقاً من اعتقاده أنّ عدم وجود علائم سوء التصنّع البشري في الآفة لا ينفي احتمالية تحولها إلى سرطان شائك الخلايا.

وهذا ما أشار إليه أيضاً Mehta في دراسة سريرية شملت 50915 حالة حيث ذكر أن هناك ميلاً بنسبة 15% للتحوّل الخبيث في الآفات الخالية من علائم سوء التصنّع. (Mehta et al., 1969)

كما استنتج Cowan من دراسته أنّ وجود سوء التصنّع البشري الفموي – بغض النظر عن درجته – في الطلاوة يعتبر مؤشراً هاماً للتنبؤ بالتحوّل الخبيث للآفة ولكنه ليس شرطاً ضرورياً لظهور مثل هذا التحوّل.
(Cowan et al., 2001)

وهذا الجدل يطرح تساؤلاً هاماً حول الآفات الطلاوية قبيل السرطانية وهو "ما الذي يمنع التحوّل الخبيث في بعض هذه الآفات وبقائها لفترات طويلة دون تقدم يذكر رغم احتواء بعضها على علائم سوء التصنّع، ومن ناحية أخرى ما الذي يجعل بعض الآفات تتحوّل إلى سرطان شائك الخلايا دون إنذار مسبق بظهور علائم سوء التصنّع أو بتقدمه تدريجياً".

لذلك يمكن أن يكون مفهوم التحوّل الظهاري الميزانشمي EMT وتحرري واسماته المختلفة أحد الحلول الممكنة لهذا التساؤل. والذي تم وصفه لأول مرة من قبل Elizabeth Hay في ستينيات القرن الماضي (Hay et al., 1967) (Acloque et al., 2009). فهو عملية بيولوجية تطورية تسمح للخلية الظهارية المستقطبة والمتوضعة على الغشاء القاعدي بالمضي قدماً في تغييرات كيميائية حيوية تمكنها من اتخاذ نمط الخلية الميزانشمية والذي يشمل تعزيز القدرة على الهجرة والغزو ومقاومة التموّت الذاتي، وزيادة منتجاتها من مكونات المادة خارج الخلية ECM (Kalluri and Neilson, 2003).

و يلاحظ عند إتمام عملية EMT انحلال الغشاء القاعدي المجاور للخلية وتشكل خلية ميزانشمية يمكنها الهجرة بعيداً عن الطبقة الظهارية التي نتجت عنها. وتشارك مجموعة من التفاعلات الجزيئية بشكل منتظم وبترتيب معين لبدء عملية EMT حتى اكتمالها. وتتضمن هذه التفاعلات عوامل الانتساح وظهور بروتينات معينة على سطح الخلية وإعادة تنظيم بروتينات هيكل الخلية وإنتاج أنزيمات حائلة للمادة خارج الخلية وحدثت تغييرات في تعبيرية جزيئات محدّدة من الـ RNA.

وفي عام 2008 تم تصنيف عمليات الـ EMTs ضمن ثلاثة أنماط حيوية واضحة، يؤدي كل صنف منها إلى نتائج وظيفية مختلفة. (Kalluri and Weinberg, 2009) وهي:

Type 1 EMT- المرافق لانغراس البويضة الملقحة والتخلّق الجنيني وتطوّر الأعضاء.

Type 2 EMT- المرافق لعمليات التجدد النسيجي وتليّف الأعضاء.

Type 3 EMT- المرافق للغزو والاستعمار السرطاني.

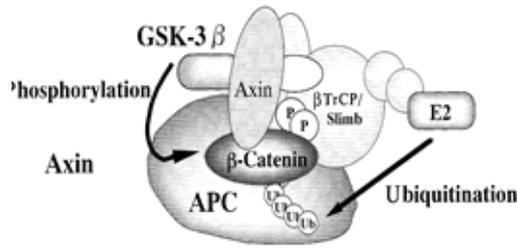
دلّت الأبحاث على أهمية هذه الآلية في الغزو والاستعمار للخلايا السرطانية، لكن دور التحوّل الظهاري الميزانثيمي في تحوّل الخلايا البشرية سيئة التصنع إلى خلايا سرطانية غير معروف (Rosado et al., 2013). تختلف المحرّضات المؤدّة لسلسلة التفاعلات المعقدة في التحوّل الظهاري الميزانثيمي من نمط إلى آخر، وهذه المحرّضات هي عبارة عن عوامل نمو أو بروتينات من القالب خارج الخلوي أو عوامل أخرى كالتهاب ونقص الأكسجة. وتثير هذه المحرّضات مسالك إشارة (signaling pathways) متنوعة تؤثر في مختلف النسخ سواء أثناء التطور الجنيني أو في الآليات الإمبراضية التي تصيب الإنسان أو في الغزو والاستعمار السرطاني (كالإشارات الشاذة التي تنتج عن لحمة الورم). (Thiery et al., 2009) والتي تعمل على تفعيل أحد أهم مسالك الإشارة المسؤولة عن EMT، وهو مسلك إشارات Wnt (Wnt signaling pathway) الذي يتوسط فيه الـ β -catenin بالتآزر مع بروتينات أخرى لإطلاق عملية التحول.

بروتين الـ β -catenin هو بروتين سيتوبلازمي يلعب دوراً مضاعفاً (Bienz, 2005) فهو:

- ✓ جزء (Subunit) من الـ E-Cadherin ويعمل على ربطها بالهيكل الخلوي
- ✓ يعمل كزناد لتفعيل الانتساخ (transcriptional activator) بالمشاركة مع عامل نمو الخلايا

التائية TCF ضمن نواة الخلية، وذلك كجزء من مسلك إشارات Wnt

في الحالة الطبيعية يتواجد بروتين β -



الشكل (1) آلية تفكيك الـ β -catenin (Hart et al., 1998)

Catenin ضمن غشاء الخلية الظهارية والذي هو جزء من المعقد E-cadherin/catenin والذي يمثل أحد بروتينات اللصق الخلوي (Wijnhoven et al., 2000). ويتم فسفرة وتفكيك الفائض منه وضبط مستوياته ضمن السيتوبلازم عبر تشارك عدة وسائط كالـ APC (كابح الورم الكولوني) وبروتين Axin والأنزيم β -GSK-3 (أنزيم الغليكوجين كيناز) وغيرها (الشكل 1). وعند تفعيل مسلك إشارات Wnt يُكبح

الأنزيم β -GSK-3 فيزداد توافر الـ β -Catenin وينتقل إلى النواة ليتراكم فيها ويقوم بدوره الانتساخي وتفعيل الجينات الهدف، وبالتالي إنتاج بروتينات تؤثر على دورة حياة الخلية وعلى صفاتها الظهارية وتبدأ عملية التحول. وإن الطفرات التي تؤثر على بنية الـ β -Catenin أو على إحدى البروتينات التي تشارك في ضبط مستوياته ضمن الخلية تؤدي إلى زيادة توافره ضمن السيتوبلازم وتراكمه في النواة. وكأن مسلك الإشارات Wnt مفعّل. (Behrens et al., 1996)

ولما كان تقرير المعالجة للآفات الطلاوية الفموية يعتمد بشكل أساسي على تقدير درجة سوء تصنعها كان لابد من إيجاد وسيلة لتقييم تلك الدرجة. وهذا ما حاولت أنظمة التصنيف المختلفة فعله منذ عام 1971م حتى اعتماد تصنيف منظمة الصحة العالمية (WHO System) عام 2005م (Barnes et al., 2005) وهو ما اعتمد في بحثنا هذا، ثم ظهر في نفس العام نظام التصنيف الثنائي (Binary System) والذي يراعي تقرير المعالجة بين

المعالجة الجراحية والمعالجة المحافظة (Rastogi et al., 2013). ولكن رغم هذه التصنيفات والمعايير الدقيقة المتبعة في تقييم درجة سوء تصنع الآفات الفموية البشرية فيها، تبقى تلك العملية صعبة وخاضعة لرأي المشرح المرضي الشخصي في قراءة تلك المعايير، كما يلاحظ وجود الاختلاف الكبير والتفاوت في تقييم درجة سوء التصنع بين مشرح مرضي وآخر (Kujan et al., 2007) وحتى عند المشرح المرضي نفسه قد يلاحظ اختلاف في تقييمه للدرجة بين مرة وأخرى (Abbey et al., 1995).

وبالتالي قد يكون استخدام واسمات التحوّل الظهاري الميزانشيمي المختلفة أحد الحلول المقترحة لتلافي تلك المشكلة ولاعتماد القرار الصائب في معالجة الآفات الفموية البشرية. فاستخدام الملون المناعي الـ β -Catenin قد يوجّه المشرح المرضي لتقييم درجة سوء التصنع وتقدير احتمالية التحوّل الخبيث لآفة وبالتالي اتخاذ التدابير العلاجية اللازمة بثقة أكبر.

وقد تم إجراء هذا البحث بهدف التحقق من التحوّل الذي قد يطرأ على الخلايا الظهارية في الآفات الطلاوية الفموية سيئة التصنع ويجعلها قادرة على الهجرة وانتقالها من مكانها الأصلي إلى النسيج الميزانشيمي المجاور، وكان ذلك عبر تحري التغيرات التي تطرأ على البروتين الغشائي β -Catenin.

أهمية البحث وأهدافه:

- تحري تعبيرية الـ β -catenin في الدرجات المختلفة من سوء التصنع البشري في المخاطية الفموية.
- تحري وجود علاقة بين التحوّل الظهاري الميزانشيمي ودرجات سوء التصنع البشري في المخاطية الفموية.
- تحري وجود علاقة بين التحوّل الظهاري الميزانشيمي والتحوّل الخبيث لآفات سوء التصنع البشري في المخاطية الفموية.

طرائق البحث ومواده:

1 - العينة:

تضمّن البحث دراسة نسيجية كيميا مناعية استعادية أجريت في قسم النسيج والتشريح المرضي الفموي في كلية طب الأسنان بجامعة دمشق من 2013\7 حتى 2015\3. حيث كانت عينة البحث 45 خزعة نسيجية مثبتة بالفورمالين ومدمجة بشمع البارافين ومحفوظة في أرشيف قسم النسيج والتشريح المرضي بكلية طب الأسنان. وتم أخذ العينة اعتماداً على التشخيص المسبق لها على أنها خزعات من آفات حاوية على سوء التصنع البشري الفموي بدرجات مختلفة. وقد تمّ الحصول على مقاطع نسيجية بثخانة 4 ميكرونات من كلّ خزعة من خزعات العينة بقطعها بواسطة المبشرة النسيجية وتمّ تحضير محضرين نسيجين لكل خزعة أحدهما للتلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين أيوزين والآخر للتلوين بالملون الكيميامناعي النسيجي β -catenin.

أما العينة الشاهدة فتتكون من 15 خزعة نسيجية من نسيج فموية سليمة أُخِذت حديثاً من المُخاطية المغطّية للأرجاء الثالثة خلال قلع الأرجاء المنظّمة، تمّ الحصول عليها عن طريق مشفى جراحة الفم والفكين، وقسم النسيج حول السنية في كلية طب الأسنان - جامعة دمشق. ثمّ تُبنت خزعات العينة الشاهدة بالفورمالين 10% ودمجت بالبرافين لتحضير شرائح قابلة للدراسة المجهرية. وتمّ أيضاً تحضير محضّرّين نسيجيين لكل خزعة من العينة الشاهدة أحدهما للتلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين أيزون والآخر للتلوين بالملون الكيميامناعي النسيجي β -catenin.

2 - مواد البحث:

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------------------|
| 1 - الفورمالين 10% | 2 - الكحول والكزيلول |
| 3 - شمع البرافين | 4 - ملونات الهيماتوكسيلين والأيزون التقليدية |
| 5 - بلسم كندا | 6 - الشرائح الزجاجية |
| 7 - السواتر | |
| 8 - مواد الملونات المناعية: | |

• Primary Antibody ضد فأري وحيد النسيلة لـ β -catenin من شركة Bio SB الأمريكية.

• مجموعة التلوين المناعي المفرد من شركة Bio SB الأمريكية وتحتوي:

Poly Detector Peroxidase Blocker-

Poly Detector DAB Buffer-

Poly Detector HRP Label-

Poly Detector DAB Chromogen-

• محلول استرجاع المستضد Solution Antigen Retrieval من DAKO

• المحلول الدارئ IHC Wash Buffer

• الشرائح الزجاجية الخاصة بالتلوين المناعي الكيميانسيجي

3 - الأجهزة المستخدمة:

1 - المِبشّرة النسيجية (microtome) نوع leica - 2 - المِحَمّ المائي

-ألمانيا

3 - سخّان نوع Leica - ألمانيا - 4 - المايكرويف

5 - قلم التحديد من شركة Dako - 6 - الممص pipette

7 - المجهر الضوئي نوع Nikon-CX21-OLYMPUS - اليابان

طرائق البحث

1 - طريقة التلوين بالهيماتوكسيلين - أيزون:

حضرت مقاطع نسيجية بسماكة 4 ميكرونات بواسطة المبشرة النسيجية Microtome. تم وضع المقاطع على الشرائح الزجاجية العادية. ثم وضعت الشرائح الزجاجية على السخان الجاف لتجفيفها من الماء بدرجة 50 C. بعد ذلك وضعت الشرائح في حمامين من الاكزيلول مدة دقيقتين لكل حمام، لحلّ شمع البارافين والابقاء على النسيج المراد دراسته. ثم وضعت الشرائح في الكحول المطلق، ثم الكحول 90%، و 80% و 70% و 50% بالتتالي لمدة دقيقتين لكل حمام، لطرد الاكزيلول من النسيج. بعد ذلك غسلت الشرائح بالماء ووضعت في الهيماتوكسيلين لبضع دقائق، ثم غسلت بالماء لإزالة الهيماتوكسيلين الزائد. ثم غمرت الشرائح في الايزون مدة دقيقة ونصف تقريباً، ثم غسلت بالماء لإزالة الفائض من الايزون. وضعت الشرائح في حمامات من الكحول 70-95% بالتتالي، ثم في حمامين من الكحول المطلق، كل حمام دقيقة، ليتم طرد الماء من النسيج. ثم وضعت الشرائح الزجاجية في حمامين من الاكزيلول لنزع الكحول من النسيج، كل حمام 3 دقائق. وأخيراً سترت الشرائح الزجاجية بالسواتر ويلسم كندا.

وتم إجراء التقييم النسيجي للشرائح الملونة H&E بهدف تحديد درجة سوء التصنع البشري في كل خزعة نسيجية من العينة. ووصفت التغيرات النسيجية الحاصلة في كل محضّر وصنّفت إلى تغيرات بنوية وتغيرات خلوية، واعتماداً على تلك التغيرات تم تصنيف الخزعات النسيجية في العينة إلى مجموعات تبعاً لدرجة سوء التصنع البشري الفموي الموجود فيها وذلك حسب نظام تصنيف منظمة الصحة العالمية 2005 (Barnes et al., 2005)

وبالتالي صنفت جميع الخزعات النسيجية في العينة إلى ثلاث مجموعات:

- ❖ المجموعة الأولى خزعات سوء التصنع البسيط
- ❖ المجموعة الثانية خزعات سوء التصنع المتوسط
- ❖ المجموعة الثالثة خزعات سوء التصنع الشديد

2- التلوين الكيمائي النسيجي المناعي (IHC) بالملون β -Catenin

تم إجراء التلوين IHC حسب البروتوكول الموصى باتباعه من قبل شركة Bio SB تم الحصول على المقاطع النسيجية من الخزعات المثبتة بالفورمالين ومدمجة بالبارافين وتحمل على الشرائح الزجاجية الخاصة بالتلوين IHC التي تكون ذات شحنة موجبة ومجهزة لالتصاق المقطع النسيجي بالشريحة.

- تُسخّن الشرائح في فرن بدرجة حرارة 58 درجة مئوية لمدة ساعتين.

- لإزالة شمع البارافين تُمرر الشرائح في حمامين من الكزيلول (3-5 دقائق لكل منهما)، ثم تجفف بتمررها بثلاثة حمامات من الكحول.

يتم استرجاع المُستضدات وذلك بواسطة محلول استرجاع المستضد مناسب (Solution Antigen Retrieval) والذي تم تحضيره مسبقاً حسب تعليمات الشركة المصنّعة Dako.

-يتم تطبيق Peroxidase Blocker حيث حُدد حول المقاطع النسيجية بقلم التحديد (Dako Pen) لمنع تسرب المواد المطبقة على النسيج ثم يطبق الـ Poly Detector Peroxidase Blocker بواسطة الممص بحيث غُطيت كامل العينة وتُركت 5 دقائق، غُسلت الشرائح بعدها بالمحلول الدائري PBS. ثم يتم تطبيق الضدّ الأولي الـ β-Catenin بواسطة الممص بحيث غُطى كامل النسيج. و كان زمن التطبيق 45 دقيقة، ثم وُضعت الشرائح في حوض من السائل الدائري لمدة 5 دقائق.

-يتم تطبيق الـ Poly Detector HRP Label بحيث يغطي كامل النسيج ويحضر لمدة 45 دقيقة. يتم تطبيق محلول DAB Substrate-Chromogen بواسطة قطارة خاصة بحيث تغطي كامل النسيج وتُركت لمدة 10 دقائق. ثم طبّق الهيماتوكسولين على المقاطع النسيجية بشكل كامل لمدة 30 ثانية فقط ثم غُسلت بالماء، عندها سُترت العينات ببلم كندا وأصبحت جاهزة للدراسة.

3- التقييم النسيجي:

معظم خلايا المجموعة الشاهدة تبدي تعبيرية غشائية للملون، لذا اعتبرت كل خلية أبدت تلك التعبيرية طبيعية، وكل خلية تبدي عكس ذلك اعتبرت خلية شاذة. وبما أن بروتين ال-Catenin-β أحد مظاهر التحول الظاهري الميزانثيمي إذا ما ظهرت تعبيرية في غير مكانه الطبيعي أي غشاء الخلية، اعتبرت كل خلية شاذة هي خلية في طور التحول الظاهري الميزانثيمي. (Kaur et al., 2013) تمّ دراسة الشرائح الملونة الـ β-Catenin-β ووفق المجموعات الثلاثة المقسمة مسبقاً اعتماداً على التلوين بالهيماتوكسولين أيوزين. وقد دُرست خمس ساحات نسيجية مكبرة 400 مرة من كل محضّر، وتمّ التقاط صور رقمية للساحات المجهرية المدروسة، ثمّ تمّ معالجة الصور حاسوبياً من حيث زيادة حدة الألوان وتباينها ثمّ المباشرة بعدّ الخلايا الشاذة والطبيعية يدوياً في كل صورة. يتمّ وضع الأعداد الناتجة ضمن الحقل المناسب لها في جدول النتائج المصمّم على برنامج Microsoft Excel 2010 بهدف إجراء الدراسات الإحصائية وإنشاء المخططات البيانية.

وقد تمّ حساب المتوسطات الحسابية لأعداد الخلايا في الساحات الخمس من كلّ محضّر ثمّ حساب :

- نسبة الخلايا المتلونة بالـ β-Catenin ذات التعبيرية الغشائية.
- نسبة الخلايا المتلونة بالـ β-Catenin ذات التعبيرية النووية.
- نسبة الخلايا في طور التحول EMT والتي تشمل الخلايا ذات التعبيرية الهيولية والنوية للـ β-Catenin.

النتائج والمناقشة:

تألّفت عينة الدراسة من 60 خزعة، مقسمة حسب درجة سوء التصنع كما يوضح الجدول (2).

لاحظ في المجموعة الشاهدة تعبيرية غشائية لا B-Catenin فقط ولم تشكّل التعبيرية الهيولية أو النووية أي نسبة حيث تناهت إلى 0% (الشكل 2)

جدول (2) توزع العينة حسب درجة سوء التصنع		
المجموعة	العدد	النسبة المئوية
المجموعة الشاهدة	15	25.0 %
سوء تصنع بسيط	13	21.7 %
سوء تصنع متوسط	17	28.3 %
سوء تصنع شديد	15	25.0 %

لوحظ في المجموعة الأولى تعبيرية واضحة للواسم β -Catenin معظمها تعبيرية غشائية طبيعية وكانت نسبة التعبيرية النووية معدومة تقريباً ونسبة الخلايا في طور التحول قليلة تراوحت بين 1%-3% من الخلايا. (الشكل 3)

لوحظ في المجموعة الثانية تعبيرية واضحة للواسم β -Catenin معظمها تعبيرية غشائية طبيعية ولكن بنسب أقل من نسب المجموعة الأولى وكانت نسبة التعبيرية النووية قليلة تراوحت بين 1% - 3% ، في حين تراوحت نسبة الخلايا في طور التحول بين 5% - 9% من الخلايا. (الشكل 4)

لوحظ في المجموعة الثالثة تعبيرية واضحة للواسم β -Catenin معظمها تعبيرية غشائية طبيعية ولكن بنسب أقل من نسب المجموعة الثانية وتراوحت نسبة التعبيرية النووية بين 3% - 7%، في حين تراوحت نسبة الخلايا في طور التحول بين 12% - 15% من الخلايا. (الشكل 5) وكانت النتائج كما في الجدول (3):

المجموعة الثالثة				المجموعة الثانية				المجموعة الأولى			
نسبة التعبيرية النووية	نسبة التعبيرية EMT	نسبة التعبيرية الغشائية	رقم الحالة	نسبة التعبيرية النووية	نسبة التعبيرية EMT	نسبة التعبيرية الغشائية	رقم الحالة	نسبة التعبيرية النووية	نسبة التعبيرية EMT	نسبة التعبيرية الغشائية	رقم الحالة
7%	19%	80%	1	3%	6%	93%	1	0%	2%	97%	1
5%	15%	84%	2	5%	11%	88%	2	0%	1%	98%	2
0%	6%	93%	3	2%	9%	91%	3	0%	1%	99%	3
4%	14%	85%	4	2%	6%	94%	4	1%	3%	97%	4
5%	12%	87%	5	2%	10%	90%	5	0%	1%	99%	5
7%	18%	81%	6	1%	5%	94%	6	1%	2%	97%	6
2%	10%	88%	7	2%	13%	87%	7	0%	1%	99%	7
4%	12%	87%	8	1%	5%	95%	8	0%	1%	99%	8
3%	12%	88%	9	1%	8%	91%	9	1%	9%	90%	9
1%	12%	87%	10	2%	10%	90%	10	0%	1%	99%	10
3%	13%	87%	11	3%	9%	90%	11	1%	1%	98%	11
3%	12%	88%	12	1%	8%	91%	12	1%	4%	95%	12
4%	13%	86%	13	2%	7%	91%	13	0%	1%	99%	13
2%	5%	94%	14	2%	8%	92%	14				
6%	13%	86%	15	3%	9%	90%	15				
				3%	9%	90%	16				
				1%	9%	91%	17				

وللتحقق من وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة الخلايا EMT ما بين مجموعات درجات الإصابة،

نجري اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA وكانت النتائج كما في الجدول (4):

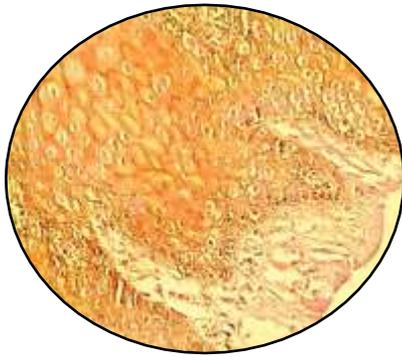
جدول (4) نتيجة اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA لمتوسط نسب الخلايا EMT		
الإستنتاج	مستوى الدلالة P.value	إحصاء الاختبار F
توجد فروق دالة	0.000 *	88.786



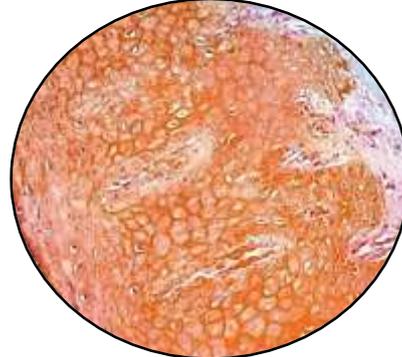
الشكل (3) تعبيرية الـ β -Catenin في سوء التصنع البشري الفموي البسيط تكبير 400



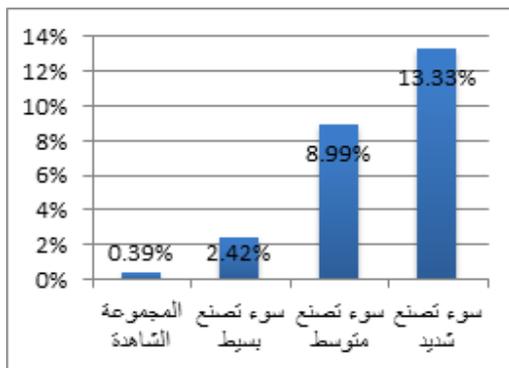
الشكل (2) تعبيرية الـ β -Catenin في إحدى خزعات العينة الشاهدة تكبير 400



الشكل (5) تعبيرية الـ β -Catenin في سوء التصنع البشري الفموي الشديد تكبير 400



الشكل (4) تعبيرية الـ β -Catenin في سوء التصنع البشري الفموي المتوسط تكبير 400



تبيّن من خلال بحثنا وجود علاقة بين التحوّل الظاهري الميزانشيمي ودرجة سوء التصنع البشري الفموي، حيث وضّح اختبار ANOVA وجود فروق دالة إحصائية في نسبة الخلايا الأخذة بالتحوّل بين المجموعات الثلاث أي بين درجات سوء التصنع المختلفة. فقد كانت نسبة هذه الخلايا تزداد مع زيادة درجة سوء التصنع فكانت متوسطاتها % 0.394 للمجموعة

الشاهدة و % 2.418 في درجة سوء التصنع البسيط و % 8.985 في درجة سوء التصنع المتوسط و % 13.333 في درجة سوء التصنع الشديد. (الشكل 6) وقمنا بدراسة هذه الفروق بمزيد من التفصيل، بالمقارنة بين كل مجموعتين باستخدام اختبار Tukey ووجد فروق دالة إحصائية بين كل مجموعتين ما عدا المجموعة الشاهدة والمجموعة الأولى مما قد يدل على انخفاض احتمالية التحول الخبيث في آفات سوء التصنع البسيط. لكن وجود فروق دالة إحصائية بين العينة الشاهدة والمجموعتين الثانية والثالثة قد يدل على الاحتمالية العالية للتحول الخبيث لآفات سوء التصنع من الدرجة المتوسطة والشديدة.

وللتحقق من وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبير النوية ما بين مجموعات درجات الإصابة،

نجري اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA ونحصل على النتائج التالية في الجدول (5):

جدول (5) نتيجة اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA لمتوسط نسب التعبير النوية		
الإستنتاج	مستوى الدلالة P.value	إحصاء الاختبار F
توجد فروق دالة	0.000 *	38.88

وقد تبين عدم ظهور أي تعبيرية نووية في المجموعة

الشاهدة، في حين كانت التعبيرية النووية شبه معدومة في

المجموعة الأولى حيث كان متوسط النسبة % 0.358 من

مجموع الخلايا وفي المجموعة الثانية % 2.108 وفي

المجموعة الثالثة % 3.705. ويتبين وجود زيادة في نسبة

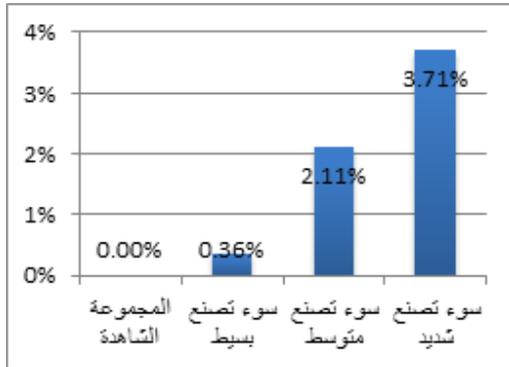
التعبيرية النووية لـ β -Catenin مع زيادة درجة سوء

التصنع. (الشكل 7) وهذا ما أوجده تحليل ANOVA حيث

وجد فروقاً ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيرية النووية ما

بين مجموعات درجات الإصابة، وعند إجراء اختبار

Tukey لاحظنا وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة



الشكل (7) نسبة التعبيرية النووية في

كل من درجات الإصابة

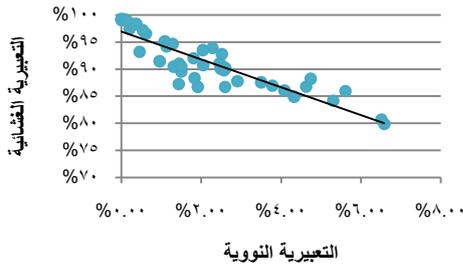
التعبيرية النووية ما بين كل من درجات الإصابة عدا الفرق بين المجموعة الأولى والمجموعة الشاهدة لم يكن ذا دلالة

إحصائية. وتكمن أهمية التعبيرية النووية في دلالتها إما على تفعيل مسلك إشارات Wnt في الخلايا الظهارية سيئية

التصنع أو على زيادة حدوث طفرات في بروتين β -Catenin نفسه أو في أحد البروتينات أو الأنزيمات التي تشارك

في ضبط مستوياته ضمن الخلية وذلك في كل من سوء التصنع المتوسط والشديد مما يزيد قدرة الخلية على التحول

الظهاري الميزانشيمي.



الشكل (8) العلاقة ما بين التعبيرية النووية و التعبيرية الغشائية

وقد تبين في بحثنا أنّ التعبيرية الغشائية لـ β -catenin تنخفض مع زيادة درجات سوء التصنع البشري الفموي حيث كانت متوسطات النسب 99.6% للمجموعة الشاهدة و 97.5% للمجموعة الأولى و 91% للمجموعة الثانية و 86.7% للمجموعة الثالثة. ولدى إجراء اختبار معامل ارتباط بيرسون بين التعبيرية الغشائية والنوية تبين لنا وجود علاقة عكسية قوية بين التعبيرية الغشائية للملون وتعبيرته النووية حيث نلاحظ أنّ انخفاض نسبة التعبيرية الغشائية لـ β -catenin مع زيادة درجات سوء التصنع ترافقه زيادة في تعبيرته النووية (الشكل 8). مما يدل على فقدان الخلايا قدرتها على الالتصاق مع زيادة سوء تصنيعها مما يكسبها بعض صفات الخلايا الميزانشيمية. وذلك يشبه التحول الذي يطرأ على الخلايا السرطانية في السرطانات البشرية عموماً للغزو والاستعمار اللاحقين. (Thiery, 2002).

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1. يزداد معدّل التحول الظهاري الميزانشيمي في الخلايا الظهارية سيئة التصنع مع زيادة درجات سوء التصنع.
2. يزداد تفعيل مسلك إشارات Wnt أو معدّل التطفر في الـ β -Catenin أو في أحد البروتينات التي تضبط مستوياته في الخلية مع زيادة درجات سوء التصنع.
3. وجود علاقة عكسية بين التعبيرية الغشائية لـ β -Catenin وتعبيرته النووية في الدرجات المختلفة من سوء التصنع الفموي، حيث تنخفض تعبيرته الغشائية وتزداد تعبيرته النووية والسيئوبلازمية مع زيادة درجات سوء التصنع البشري الفموي.
4. يمكن استخدام الملون المناعي الكيميانسيجي الـ β -Catenin للتنبؤ باحتمالية التحول الخبيث للآفات الفموية البشرية.

التوصيات:

1. نوصي بإجراء دراسات سريرية أوسع على التحول الظهاري الميزانشيمي مع المتابعة للمرضى، ودراسات على حيوانات التجربة.
2. نوصي بإجراء دراسات على التحول الظهاري الميزانشيمي في آفات سوء التصنع البشري الفموي بواسطة أخرى.

المراجع:

1. ABBEY, L. M., KAUGARS, G. E., GUNSOLLEY, J. C., BURNS, J. C., PAGE, D. G., SVIRSKY, J. A., EISENBERG, E., KRUTCHKOFF, D. J. & CUSHING, M. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,1995. 80, 188-91.
2. ACLOQUE, H., ADAMS, M. S., FISHWICK, K., BRONNER-FRASER, M. & NIETO, M. A.. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*,2009119, 1438-49.
3. BARAKAT, S.. Histologic, Histochemic and Immunohistochemic comparative study between Normal, Precancerous and Cancerous oral mucosa. *PHD Research in Dentistry Faculty, Damascus University*.2005
4. BARNES, L., EVESON, J., REICHART, P. & SIDRANSKY, D.. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & genetics. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*.2005
5. BEHRENS, J., VON KRIES, J. P., KUHL, M., BRUHN, L., WEDLICH, D., GROSSCHEDL, R. & BIRCHMEIER, W.. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.1996*Nature*, 382, 638-42.
6. BIENZ, M.. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol*,2005. 15, R64-7.
7. COWAN, C. G., GREGG, T. A., NAPIER, S. S., MCKENNA, S. M. & KEE, F.. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis*,2001.7, 18-24.
8. GREENLEE, R. T., MURRAY, T., BOLDEN, S. & WINGO, P. A.. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*2000., 50, 7-33.
9. HART, M. J., DE LOS SANTOS, R., ALBERT, I. N., RUBINFELD, B. & POLAKIS, P.. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol*,1998. 8, 573-81.
10. HAY, E. D., TRELSTAD, R. L. & REVEL, J. D. 1967. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev Biol*, 16, 78-106.
11. JABER, M. A., PORTER, S. R., SPEIGHT, P., EVESON, J. W. & SCULLY, C.. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. *Oral Oncol*,2003. 39, 589-96.
12. KALLURI, R. & NEILSON, E. G.. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*,2003. 112, 1776-84.
13. KALLURI, R. & WEINBERG, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.
14. KAUR, J., SAWHNEY, M., DATTA GUPTA, S., SHUKLA, N. K., SRIVASTAVA, A., WALFISH, P. G. & RALHAN, R.. Clinical significance of altered expression of beta-catenin and E-cadherin in oral dysplasia and cancer: potential link with ALCAM expression. *PLoS One*,20138, e67361.
15. KUJAN, O., KHATTAB, A., OLIVER, R. J., ROBERTS, S. A., THAKKER, N. & SLOAN, P.. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol*,2007. 43, 224-31.
16. LUMERMAN, H., FREEDMAN, P. & KERPEL, S.. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,1995. 79, 321-9.

17. MARTORELL-CALATAYUD, A., BOTELLA-ESTRADA, R., BAGAN-SEBASTIAN, J. V., SANMARTIN-JIMENEZ, O. & GUILLEN-BARONA, C.. [Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach]. *Actas Dermosifiliogr*,2009 100, 669-84.
18. MEHTA, F. S., PINDBORG, J. J., GUPTA, P. C. & DAFTARY, D. K.. Epidemiologic and histologic study of oral cancer and leukoplakia among 50,915 villagers in India. *Cancer*,1969.24, 832-49.
19. MITHANI, S. K., MYDLARZ, W. K., GRUMBINE, F. L., SMITH, I. M. & CALIFANO, J. A.. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis*,2007. 13, 126-33.
20. NEVILLE, B. W. 2009. *Oral and maxillofacial pathology*, St. Louis, Mo., Saunders Elsevier.
21. RASTOGI, V., PURI, N., MISHRA, S. & ARORA, S.. An Insight to Oral Epithelial Dysplasia.2013
22. ROSADO, P., LEQUERICA-FERNANDEZ, P., FERNANDEZ, S., ALLONCA, E., VILLALLAIN, L. & DE VICENTE, J. C.. E-cadherin and beta-catenin expression in well-differentiated and moderately-differentiated oral squamous cell carcinoma: relations with clinical variables. *Br J Oral Maxillofac Surg*,2013.51, 149-56.
23. SPEIGHT, P. M.. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol*,2007. 1, 61-6.
24. THIERY, J. P.. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*,2002. 2, 442-54.
25. THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
26. THOMPSON, L. D. R.. *Head and neck pathology*, Edinburgh, Elsevier/Churchill Livingstone.2006.
27. WIJNHOFEN, B. P., DINJENS, W. N. & PIGNATELLI, M.. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*,2000.87, 992-1005.