الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية طب الأسنان
قسم النسج والتشريح المرضي

دور معقد التوافق النسيجي HLA- I في كل من الاستجابة المناعية ودرجة الخباثة في السرطان شائك الخلايا الفموي

The Role Of Major Histocompatipility Complex In Immune Response and Malignancy Degree in Oral Squamous Cell Carcinoma

بحث أعد لنيل درجة الماجستير في اختصاص النسج والتشريح المرضي الفموي

إعـــداد
طـــارق الذهبـي

إشراف الأستاذ المساعد الدكتور
شريف بركات
أستاذ في قسم النسج والتشريح المرضي
كلية طب الاسنان – جامعة دمشق

2012 م – 1434 هـ

تصريح

" لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم أخذه بالكامل من عملٍ آخر أو أنجز للحصول على شهادةٍ أخرى في هذه الجامعة أو أي جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي "

الإهداء

إلى التي رآني قلبها قبل عينيها وحضنتني أحشاءها قبل يديها ، إلى حبيبتي التي شاركتني همي وحزني

إلى أمي

إلى قدوتي ونبراسي الذي ينير دربي ، إلى من تحمل كل لحظة ألم في حياتي وحولها إلى لحظات فرح

إلى أبي

إلى من كبرنا معاً وتقاسمنا معاً معنى الحياة

إلى إخوتي

إلــى عائلتــي وأصدقائــي ..

كلمة شكر

بداية أحمد الله عزوجل على توفيقي في إتمام هذا البحث ، ومن ثم أتقدم بجزيل الشكر إلى أستاذي الأستاذ الدكتور شريف بركات الذي تفضل بقبول هذا البحث بداية وأضاف الكثير في سبيل إنجاح هذا العمل .

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى أعضاء لجنة الحكم الأستاذة الدكتورة رزان خطاب عميد كلية طب الأسنان والأستاذ الدكتور نبيل قوشجي رئيس قسم النسج والتشريح المرضي في كلية طب الأسنان لتفضلهما بإغناء البحث بملاحظاتهما القيمة ولتكرمهما بقبول تحكيم هذا البحث

والشكر لأساتذتي في قسم النسج والتشريح المرضي الذين أمدوني بالعون والمساعدة الأستاذ الدكتور قصي عزيز والأستاذ الدكتور أحمد المنديلي والأستاذ الدكتور ممدوح المحارب .

والشكر كل الشكر إلى كل من ساعدني في إنجاز هذا البحث وأخص زملائي الدكتور أنس رباطة و الدكتور عمر عرنوس والدكتورة علا الفقير والدكتورة محسنة الدعبل والدكتورة رنا إبراهيم .

كما أتقدم بعميق شكري إلى المهندس فهمي القربي والسيد ناصر كتابي والسيد طلال قاسم والسيد ضياء الدين شعبان لمساعدتهم في إنجاز هذا البحث .

ولا أنسى أصدقائي الدكتور جميل قصيباتي والدكتور ماهر دعدوش والدكتور أنس عطار والدكتور جورج خزوم على جهودهم المبذولة وملاحظاتهم المفيدة التي أمدوني بها.

قائمة المحتويات : **رقم الصفحة**

المقدمة ٨

أهداف البحث ٩

الباب الأول : المراجعة النظرية

١-١ السرطان شائك الخلايا الفموي ١١

١-١-١ أسباب الإصابة الفموية ١١

١-١-٢ الأشكال السريرية للسرطان شائك الخلايا الفموي ١٣

١-١-٣ النقائل ١٥

١-١-٤ الأنماط النسيجية ١٥

١-٢ الخصائص العامة للاستجابة المناعية ١٨

١-٢-١ المناعة الخلقية والمكتسبة ١٩

١-٢-٢ أنواع الاستجابات في المناعة المكتسبة ٢٠

١-٢-٣ المكونات الخلوية لجهاز المناعة المكتسبة ٢٠

١-٣ اللمفاويات التائية السامة CD8 ٢٢

١-٤ معقد التوافق النسيجي MHC ٢٧

١-٤-١ اكتشاف MHC البشري (HLA) ٢٧

١-٤-٢ التنظيم المورثي للـ HLA ٢٨

١-٤-٣ تعبيرية جزيئات الـ HLA والعلاقة مع السيتوكينات ٢٩

١-٤-٤ العرض المتصالب للـ HLA ٢٩

١-٤-٥ بنية معقد التوافق النسيجي HLA-I ٣٠

١-٤-٦ ارتباط الببتيدات بجزيئات HLA-I ٣٢

١-٤-٧ تهيئة المستضدات داخل الخلوية لعرضها مع جزيئات HLA-I ٣٣

١-٥ البروتيزوم LMP2 - 20S ٣٦

١-٦ الناقل المرافق لتهيئة المستضد TAP ٣٧
١-٧ الاستجابة المناعية اتجاه الأورام ٣٨
١-٧-١ المعالجة المناعية للسرطان ٤٠
١-٧-٢ تجنب الأورام للاستجابة المناعية ٤٢
الباب الثاني : المواد والطرائق
٢-١ عينة البحث ٤٥
٢-٢ المواد والأجهزة المستخدمة ٤٨
٢-٣ طرائق البحث ٥٣
٢-٣-١ تحضير العينات الشاهدة ٥٣
٢-٣-٢ طريقة التلوين التقليدي الهيماتوكسيلين – إيوزين ٥٣
٢-٣-٣ طريقة التلوين المناعي ٥٤
٢-٣-٤ طريقة عد الخلايا ٥٧
٢-٤ التحليل الإحصائي ٥٨
الباب الثالث : النتائج والدراسة الإحصائية
٣-١ وصف العينة ٦٠
٣-٢ الإحصاء الوصفي ٦١
٣-٣ الاختبار الإحصائي
٣-٣-١ دراسة تعبيرية HLA -I . ٦٢
٣-٣-٢ دراسة تعبيرية CD8 . ٦٧
٣-٣-٣ دراسة تعبيرية LMP2 . ٧٤
٣-٣-٤ دراسة تعبيرية TAP1 . ٧٨
٣-٣-٥ دراسة العلاقة بين HLA- I و CD8 . ٨٣

الباب الرابع : المناقشة ٨٦

الباب الخامس : الاستنتاجات ٩٣

الباب السادس : المقترحات والتوصيات ٩٥

الباب السابع : المراجع ٩٧

الملخص

قائمة الأشكال والمخططات البيانية في الدراسة

الشكل	اسم الشكل	رقم الصفحة
١	الشكل (١) يوضح البروتينات الغشائية في اللمفاويات التائية السامة CD8	٢٥
٢	الشكل (٢) يوضح مراحل استجابة اللمفاويات التائية	٢٦
٣	الشكل (٣) يوضح بنية معقد التوافق النسيجي I -HLA والثمالات متعددة الأشكال فيه	٣١
٤	الشكل (٤) يوضح عملية تهيئة المستضدات داخل الخلوية	٣٥
٥	الشكل (٥) يوضح الدرجة الأولي من السرطان شائك الخلايا الفموي	٤٦
٦	الشكل (٦) يوضح الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا	٤٦
٧	الشكل (٧) يوضح الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا	٤٧
٨	الشكل (٨) الملون المناعي I -HLA	٤٨
٩	الشكل (٩) الملون المناعي CD8	٤٨
١٠	الشكل (١٠) الملون المناعي LMP2	٤٩
١١	الشكل (١١) الملون المناعي TAP1	٤٩
١٢	الشكل (١٢) يوضح كيت التلوين المفرد	٥٠
١٣	الشكل (١٣) أقراص السائل الدارئ	٥٠
١٤	الشكل (١٤) محلول استرجاع المستضد	٥١
١٥	الشكل (١٥) يظهر المبشرة النسيجية والمحم المائي وفرن التجفيف	٥١
١٦	الشكل (١٦) يظهر الشرائح الزجاجية العادية والمناعية - الممص pipet - المجهر الضوئي (Kyowa) - قلم التحديد من شركة (Dako) – المايكروويف	٥٢
١٧	الشكل (١٧) يوضح شمع البارافين - الملونات النسيجية التقليدية (الهيماتوكسيلين – الايوزين) الكزيلول - الكحول	٥٢
١٨	الشكل (١٨) يوضح حمامات الكزيلول والكحول	٥٥
١٩	الشكل (١٩) يوضح عملية استرجاع المستضد بواسطة الميكروويف	٥٦
٢٠	الشكل (٢٠) يوضح السلات المستخدمة في مراحل التلوين المناعي	٥٦
٢١	الشكل (٢١) تطبيق Peroxide block	٥٦
٢٢	الشكل (٢٢) يوضح غسل الشرائح بواسطة المحلول الدارئ	٥٦
٢٣	الشكل (٢٣) تطبيق الضد الأولي على العينات النسيجية	٥٧
٢٤	الشكل (٢٤) تطبيق HRP على العينات النسيجية	٥٧
٢٥	الشكل (٢٥) تطبيق DAB على العينات	٥٧
٢٦	الشكل (٢٦) يوضح توزيع الحالات في عينة الدراسة	٦٠
٢٧	الشكل (٢٧) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير HLA1 Per	٦٢
٢٨	الشكل (٢٨) يوضح التلوين المناعي I -HLA في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي	٦٣
٢٩	الشكل (٢٩) يوضح التلوين المناعي I -HLA في العينة الشاهدة / تلون الطبقات القاعدية من البشرة المبطنة	٦٤
٣٠	الشكل (٣٠) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير HLA1 Per	٦٥
٣١	الشكل (٣١) يوضح التلوين المناعي I -HLA في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي	٦٥
٣٢	الشكل (٣٢) يوضح التلوين المناعي I -HLA في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي	٦٦
٣٣	الشكل (٣٣) يوضح التلوين المناعي I -HLA في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي	٦٦

٣٤	الشكل (٣٤) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير CD8_All	٦٧
٣٥	الشكل (٣٥) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير CD8_Peri	٦٨
٣٦	الشكل (٣٦) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير CD8_Intra	٦٨
٣٧	الشكل (٣٧) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي / الارتشاح اللمفي حول الجزر الورمية Peritumoral	٦٩
٣٨	الشكل (٣٨) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي /الارتشاح اللمفي داخل الجزر الورمية Intratumoral	٦٩
٣٩	الشكل (٣٩) يوضح التلوين المناعي CD8 في العينة الشاهدة	٧٠
٤٠	الشكل (٤٠) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير CD8_All	٧١
٤١	الشكل (٤١) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير CD8 Peri_	٧١
٤٢	الشكل (٤٢) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير CD8 Intra	٧٢
٤٣	الشكل (٤٣) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي	٧٣
٤٤	الشكل (٤٤) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي	٧٣
٤٥	الشكل (٤٥) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي	٧٤
٤٦	الشكل (٤٦) الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير LMP2_Per	٧٥
٤٧	الشكل (٤٧) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير LMP2_Per	٧٦
٤٨	الشكل (٤٨) التلوين المناعي LMP2 في العينة الشاهدة / نلاحظ تلون الطبقات القاعدية	٧٦
٤٩	الشكل (٤٩) يوضح التلوين المناعي LMP2 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي	٧٧
٥٠	الشكل (٥٠) يوضح التلوين المناعي LMP2 في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي	٧٧
٥١	الشكل (٥١) يوضح التلوين المناعي LMP2 في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي	٧٨
٥٢	الشكل (٥٢) الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير TAP1_Per	٧٩
٥٣	الشكل (٥٣) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير TAP1_Per	٨٠
٥٤	الشكل (٥٤) التلوين المناعي TAP1 للعينة الشاهدة	٨٠
٥٥	الشكل (٥٥) يوضح التلوين المناعي TAP1 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي	٨١
٥٦	الشكل (٥٦) يوضح التلوين المناعي TAP1 في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي	٨١
٥٧	الشكل (٥٧) يوضح التلوين المناعي TAP1 في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي	٨٢
٥٨	الشكل (٥٨) يوضح العلاقة بين HLA1 و CD8-All	٨٣
٥٩	الشكل (٥٩) يوضح العلاقة بين HLA1 و CD8-Intra	٨٤

قائمة جداول الدراسة

الجدول	اسم الجدول	رقم الصفحة
١	الجدول (١) يبين المعايير المتبعة في تقييم الدرجة النسيجية	٥٤
٢	الجدول (٢) يظهر المتوسط والانحراف المعياري لكامل العينة	٦١
٣	الجدول (٣) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية لـ | -HLA	٦٢
٤	الجدول (٤) يظهر قيمة اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار لـ | -HLA	٦٣
٥	الجدول (٥) يظهر قيمة اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار لـ | HLA-	٦٥
٦	الجدول (٦) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية لـ CD8	٦٧
٧	الجدول (٧) يظهر قيم اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار لـ CD8	٦٨
٨	الجدول (٨) يظهر قيم اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار لـ CD8	٧٢
٩	الجدول (٩) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية لـ LMP2	٧٤
١٠	الجدول (١٠) يظهر قيم اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار لـ LMP2	٧٥
١١	الجدول (١١) يظهر قيم اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار لـ LMP2	٧٦
١٢	الجدول(١٢) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية لـ TAP1	٧٨
١٣	الجدول (١٣) يظهر قيم اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار لـ TAP1	٧٩
١٤	الجدول (١٤) يظهر قيم اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار لـ TAP1	٨٠
١٥	الجدول (١٥) يظهر قيمة معامل الارتباط بيرسون بين | -HLA و CD8-All	٨٣
١٦	الجدول (١٦) يظهر قيمة معامل الارتباط بيرسون بين | -HLA و CD8- Intra	٨٤
١٧	الجدول (١٧) المعلومات المتعلقة بعينة الدراسة السرطانية	١٠٤

قائمة الاختصارات

الاختصار	الاسم الكامل باللغة الانكليزية	معنى الاسم باللغة العربية
MHC	Major histocompatibility complex	معقد التوافق النسيجي
HLA	Human leukocyte antigen	مستضد الكرية البيضاء البشري
CD4	Helper T lymphocyte	اللمفاويات التائية المساعدة
TH	T helper cell	اللمفاويات التائية المساعدة
CD8	Cytotoxic T lymphocyte	اللمفاويات التائية السامة
CTLs	Cytotoxic T lymphocyte	اللمفاويات التائية السامة
APCs	Antigen presenting cells	الخلايا العارضة للمستضد
NK	Natural killer cells	خلايا القتلة الطبيعيين
Ig	Immunoglobulin	الغلوبولين المناعي
TAP	Transporter associated with antigen processing	الناقل المرافق لتهيئة المستضد
IFN - γ	Interferon- γ	الانترفيرون غاما
TNF	Tumor necrosis factor	عامل التنخر الورمي
TCR	T cell Receptor	مستقبل اللمفاويات التائية
ER	Endoplasmic reticulum	الشبكة الإندوبلاسمية
LMP	Low molecular protein	البروتين ذو الوزن الجزيئي المنخفض
CD	Cluster of differentiation	عنقود التمايز
IL	Interleukin	الانترلوكين
ICAM	Intercellular adhesion molecule	جزيء الربط بين الخلوي

المقدمة :

طوال القرن الماضي ارتفع عدد حالات الإصابة بالسرطان في جميع أنحاء العالم وأصبح حالياً يمثل واحدة من أهم المشاكل الصحية في العالم (Franca et al., 2012)

تحتل سرطانات الرأس والعنق المرتبة السادسة بين خباثات الجسم عموماً حيث يشاهد سنوياً 650 000 إصابة و 350 000 حالة وفاة (Du et al., 2012)

ويعتبر السرطان شائك الخلايا الفموي من أكثر السرطانات شيوعاً في الرأس والعنق حيث يشكل ٣% من خباثات الجسم وحوالي 500 000 إصابة سنوية (Fan et al., 2011)

وقد قامت العديد من الدراسات نظراً لخطورة السرطان وشيوعه بمحاولات عديدة للتنبؤ بدرجة خطورة السرطان وإنذار الإصابة عبر طرق متعددة من ضمنها التلوين الكيميائي المناعي لبروتينات متعددة وربطها بالمعلومات السريرية والنسيجية للإصابة مثل p53 (Bukhari et al., 2009) و Cyclin D1 (Huang et al., 2012) و P16 (Chen et al., 2012) وغيرها من الدراسات .

وتتم معالجة السرطان شائك الخلايا في مراحله المبكرة بالإستئصال الجراحي أو المعالجة الشعاعية ومع تقدم الإصابة لا بد من المشاركة بين الجراحة والمعالجة الشعاعية والكيماوية التي لها العديد من الآثار الجانبية تتضمن : الألم / التهاب الأغشية المخاطية والجلد / الإنتانات المعممة والموضعة / صعوبة في النطق والتنفس / تليف الأنسجة الطبيعية / التجفاف وعسر البلع بالإضافة لكبح المناعة (Rapidis and Wolf, 2009)

لذلك كان لابد من تطوير آليات علاجية حديثة في مقدمتها المعالجة المناعية والتي هي نوعية للمستضدات الورمية دون أذية معظم الخلايا الطبيعية

وهذا يتطلب فهم دقيق لمناعة الجسم عموماً والمناعة اتجاه الأورام وكذلك الآليات التي يستخدمها السرطان لتجنب الاستجابة المناعية بهدف تطوير آليات حديثة بالإضافة لكفائتها تحافظ على نوعية الحياة الجيدة بالنسبة للمرضى .

الهدف من البحث :

١- تحري تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I وكذلك LMP2 و TAP1 في الدرجات المختلفة للسرطان شائك الخلايا الفموي وعلاقته بدرجة الخباثة النسيجية .

٢- تحري تعبيرية CD8 في الدرجات المختلفة للسرطان شائك الخلايا الفموي وعلاقته بدرجة الخباثة النسيجية .

٣- دراسة علاقة معقد التوافق النسيجي HLA- I مع ارتشاح اللمفاويات التائية السامة CD8 في السرطان شائك الخلايا الفموي .

الباب الأول : المراجعة النظرية

Literature Review

١-١ السرطان شائك الخلايا الفموي Oral Squamous Cell Carcinoma

تحتل سرطانات الرأس والعنق المرتبة السادسة بين خباثات الجسم عموماً . حيث يشاهد سنوياً حوالي 650 000 حالة إصابة و 350 000 حالة وفاة (Mascolo et al., 2012).

يعتبر السرطان الفموي هو الأكثر شيوعاً بين إصابات الرأس والعنق وبشكل أساسي السرطان شائك الخلايا الفموي الذي يشكل ٩٠% من خباثات الحفرة الفموية و٣% من خباثات الجسم (Fan et al., 2011)

إن معدل البقاء لخمس سنوات للسرطان شائك الخلايا الفموي لم يتغير خلال ٢٠ عام الفائت رغم التقدم الحاصل في مجال الوقاية والمعالجة (Mascolo et al., 2012)

١-١-١ أسباب الإصابة الفموية Etiology :

ليس هناك من سبب وحيد أو عامل معترف به بل هناك مجموعة من العوامل الداخلية والخارجية المسببة .

من العوامل الخارجية : تدخين التبغ / الكحول/ الإصابة بالزهري/ أشعة الشمس

أما العوامل الداخلية فتتضمن الحالة العامة والجهازية مثل فقر الدم بعوز الحديد / نقص التغذية العام (Neville, 2009)

- تدخين التبغ Tobacco Smoking :

أكدت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) أن تدخين التبغ بأشكاله المختلفة (البايب / السيجار والسجائر) هي عوامل مسرطنة عند البشر (Mehrotra and Yadav, 2006)

بالإضافة للتدخين المعكوس المشاهد في الهند وبعض دول أمريكا الجنوبية الذي يترافق مع خطورة عالية للإصابة بالسرطان الفموي نتيجة الاحتراق الشديد المجاور للسان وقبة الحنك (عداس ، ٢٠٠٦)

- التبغ غير المدخن Smokeless Tobacco :

يزيد الاستخدام المزمن للتبغ غير المدخن سواءاً (بشكل سعوط Snuff أو تبغ ممضوغ Chewing tobacco) من خطورة الإصابة السرطانية (Regezi et al., 2008)

ويلاحظ في ٥٠% من حالات الإصابة عند مستخدمي التبغ غير المدخن تركز منطقة الإصابة بمكان وضع التبغ (Neville, 2009)

- الكحول Alcohol :

أكدت الدراسات الحديثة دوره في زيادة خطورة الإصابة السرطانية وذلك من خلال تأثيره المهيج للمخاطية ودوره الحال للمواد المسرطنة (الموجودة خاصة في التبغ)

بالإضافة لوجود مواد لها إمكانية التسرطن في المشروبات الكحولية (Regezi et al., 2008)

وإن المشاركة بين التدخين والكحول تزيد بشكل كبير من خطر الإصابة بالسرطان الفموي (Zygogianni et al., 2011) (عداس ، ٢٠٠٦) .

- الإشعاع Radiation :

تعتبر الأشعة فوق البنفسجية UV عامل مسرطن معروف في إحداث الإصابة بالسرطان شائك الخلايا للجلد والشفاه (Regezi et al., 2008)

وكذلك دور الإشعة X في إضعاف الاستجابة المناعية وإحداثها شذوذات على مستوى الصبغيات وبالتالي فمن غير المفاجئ أن المعالجة الشعاعية للرأس والعنق تزيد من إمكانية الإصابة بخباثات فموية سواءاً كارسينوما أو ساركوما (Neville, 2009)

- نقص الحديد Iron Deficiency :

وبخاصة الشديد والمزمن المعروف بمتلازمة بلومر– فينسون Plummer Vinson Syndrome التي تترافق مع خطورة عالية للإصابة بالسرطان شائك الخلايا وخاصة في المري والبلعوم الفموي والمنطقة الخلفية من الفم والسبب في ذلك هو ضعف المناعة المتوسطة بالخلايا والتأثير على الوظيفة الطبيعية للخلايا البشروية (Neville, 2009)

- نقص الفيتامين آ Vitamin A Deficiency :

والذي يسبب فرط تقرن في الجلد والأغشية المخاطية

وقد اقترح الباحثون أن الفيتامين قد يلعب دوراً في الحماية والوقاية من السرطانات الفموية والآفات قبيل السرطانية (Mehrotra and Yadav, 2006)

- الإصابة بالزهري Syphilis :

يترافق الزهري بالمرحلة الثالثية بشكل شديد مع سرطان ظهر اللسان . وقد أصبحت الخباثات الفموية المترافقة مع الزهري نادرة حالياً لأن الإصابة تشخص وتعالج قبل الوصول للمرحلة الثالثية (Neville, 2009)

- الإصابة بالمبيضات البيض Candidal Infection :

والتي تم اقتراحها كعامل مسبب محتمل بسبب قدرتها على تصنيع مادة (N-nitrosobenzylmethylamine) المسرطنة (Regezi et al., 2008)

- الفيروسات الورمية Oncogenic Viruses :

قد تتحكم العوامل الفيروسية القادرة على الإندماج في المادة الوراثية للمضيف بقدرته على تنظيم النمو الطبيعي والتكاثر في الخلايا المصابة وهذا يسهل التحول الخبيث .

إن الفيروس الحليمي البشري Human Papillomaviruses HPV هو الفيروس المؤكد دوره ليس فقط في سرطان الفم وإنما في البلعوم والحنجرة والمري وعنق الرحم .

وتعتبر أنماط HPV (١٦-١٨-٣١-٣٣) هي الأكثر ترافقاً مع سوء التصنع البشروي والسرطان شائك الخلايا (Neville, 2009, Pannone et al., 2011)

- كبح المناعة Immunosuppression :

يعتبر مرضى الإيدز و المرضى الخاضعين لمعالجة كابحة للمناعة في خطورة عالية للإصابة بالسرطان شائك الخلايا الفموي وبخاصة عند قيام المريض بالتدخين أو شرب الكحول (Neville, 2009)

١-١-٢ الأشكال السريرية للسرطان شائك الخلايا الفموي :

- الأعراض والعلامات Signs and Symptoms :

عندما يكون السرطان صغير الحجم غالباً ما يكون غير عرضي أو مترافق مع أعراض مبهمة ومع تقدم الإصابة فإن أكثر الأعراض شيوعاً هي : النمو المخاطي / القرحة /الألم الذي قد ينتشر للأذن / بخر الفم / صعوبة التكلم والمضغ / النزف / فقد الوزن والإنتباج العقدي

يشاهد في الحالات المتقدمة النمو التكاثري التقرحي / مناطق متموتة بالإضافة الى امتداد الإصابة للبنى المجاورة كالعظام والعضلات والجلد .

وقد تترافق المراحل النهائية بحدوث شق أو ناسور جلدي فموي / نزف شديد ودنف بالإضافة الى فقر الدم الشديد (Barnes et al., 2005) .

- الأشكال السريرية Clinical Features :

قد يأخذ السرطان شائك الخلايا الفموي أشكالا سريرية متنوعة :

- ❖ كتلة خارجية النمو Exophytic (حليمية . ثؤلولية . كمئية)
- ❖ داخلية النمو Endophytic (قرحة غازية)
- ❖ لويحات بيضاء Leukoplakic
- ❖ لويحات حمراء Erythroplakic
- ❖ لويحات مبرقشة Erythroleukoplakic (بيضاء وحمراء) (Neville, 2009)

سرطان الشفة Lip Carcinoma :

يشكل سرطان الشفة حوالي ٢٥-٣٠% من كل السرطانات الفموية .

تتوضع ٩٠% من الإصابات في الشفة السفلية والتي غالباً ما يكون سببها الأشعة فوق البنفسجية وتدخين البايب ، غالباً ما يصيب الرجال مابين ٥٠-٧٠ سنة .

يتظاهر سرطان الحافة القرمزية كقرحة مزمنة أو ككتلة ثؤلولية ذو معدل نمو بطيء يحدث الإستعمار فيها بشكل متأخر (Regezi et al., 2008)

إن هذا السرطان يشخص ويعالج باكراً إلا أن إهمال المريض قد يسبب تخريباً واسعاً في النسج الطبيعية (Neville, 2009)

السرطان داخل الفموي Intraoral Carcinoma :

أكثر المناطق إصابة داخل الفم هي الحواف الخلفية الجانبية من اللسان / قاع الفم (بركات ، ٢٠٠٥) .

أما المناطق الأخرى فهي مرتبة حسب شيوع الإصابة : الحنك الرخو / اللثة / المخاطية الخدية والشفوية / الحنك الصلب (Neville, 2009)

سرطان اللسان Carcinoma of the Tongue :

يشكل ٢٥-٤٠ % من الإصابات داخل الفموية ، ذو سلوك عدائي

يتظاهر كقرحة قاسية أو آفة (بيضاء / حمراء)

الإستعمار شائع نسبياً عند المعالجة الأولية للسرطان (Regezi et al., 2008)

سرطان قاع الفم Carcinoma of the Floor of the Mouth :

يشكل ١٥-٢٠ % من الإصابات (بركات ، ٢٠٠٥) .

ويتظاهر غالباً كقرحة قاسية غير مؤلمة كما قد يأخذ شكل لويحات حمراء أو بيضاء .

والإستعمار للعقد اللمفية تحت الفكية يعتبر شائعاً (Regezi et al., 2008)

سرطان اللثة والمخاطية الخدية Carcinoma of the Buccal Mucosa and Gingiva:

يشكل كلاً منها ١٠% من حالات السرطان شائك الخلايا الفموي

يتنوع مظهرها السريري بين آفة ثؤلولية إلى لويحات بيضاء و قرحات نموها بطيء والإستعمار فيها نادر (Regezi et al., 2008) .

سرطان قبة الحنك Carcinoma of the Palate :

تشكل إصابات الحنك الرخو حوالي ١٠-٢٠ % من الحالات بينما تعتبر إصابة الحنك الصلب نادرة ، يتظاهر ككتلة متقرنة أو كلويحات بيضاء أو حمراء كما قد يظهر كآفة متقرحة (Regezi et al., 2008)

١-١-٣ النقائل Metastasis :

إن الانتشار النقيلي للسرطان شائك الخلايا الفموي يكون غالباً بالطريق اللمفي إلى العقد اللمفية العنقية حيث تظهر هذه العقد منتبجة صلبة ثابتة غير مؤلمة .

وإن المناطق المعرضة للإصابة بالنقائل البعيدة هي : الرئة / الكبد / العظام بالإضافة لأي منطقة من الجسم .

وقد أظهرت الدراسات أن ٥٠% من المصابين بالسرطان شائك الخلايا الفموي لديهم إيجابية عقد عنقية عند التشخيص وأن ١ من ١٠ منهم لديه نقائل بعيدة (Neville, 2009)

١-١-٤ الأشكال النسيجية Histopathologic Features :

قد ينشأ السرطان شائك الخلايا الفموي من البشرة السطحية المصابة بسوء التصنع Dysplasia وهو يتميز نسيجياً بجزر وحبال من خلايا بشروية شائكة خبيثة غازية للنسيج الضام ومفصولة عن البشرة السطحية (Barnes et al., 2005)

تظهر هذه الخلايا الورمية :

- ❖ سيتوبلاسما إيوزينية غزيرة
- ❖ نوى ضخمة مفرطة الكروماتين
- ❖ تعدداً في أشكال الخلايا والنوى
- ❖ إنتاجاً متنوعاً من كرات التقرن المعكوس

قد تمتد هذه الجزر عميقاً في النسيج الشحمي والعضلات والعظام مخربة هذه النسج الطبيعية بتقدمها وغالباً ما يوجد رد فعل مناعي أو التهابي شديد حول هذه الجزر الورمية كما قد تشاهد مناطق بؤرية متموتة (Neville, 2009) .

إن التقييم النسيجي لدرجة تمايز السرطان شائك الخلايا يدعى بـ **(الدرجة النسيجية) Grading** والتي تندرج اعتماداً على تصنيف منظمة الصحة العالمية **WHO** إلى ٣ درجات

- ❖ **الدرجة ١(جيد التمايز) Grade 1** : تشابه فيها الجزر الورمية البشرة الشائكة الطبيعية مع إنتاج واسع لكرات التقرن المعكوس
- ❖ **الدرجة ٢(متوسط التمايز) Grade 2** : يبدي تعدداً بسيطاً في أشكال الخلايا والنوى وإنتاجاً متوسطاً لكرات التقرن المعكوس
- ❖ **الدرجة ٣(منخفض التمايز) Grade 3** : يبدي تعدداً واسعاً في أشكال الخلايا والنوى وإنتاجاً منخفضاً أو معدوما لكرات التقرن المعكوس (Barnes et al., 2005)

وقد أكدت بعض الدراسات على أهمية تصنيف منظمة الصحة العالمية في الدرجة النسيجية للسرطان وعلاقتها مع الإنذار ومعدل البقاء (Arduino et al., 2008)

كما قام بعض العلماء بوضع معايير تقييم نسيجية أخرى كمحاولة للوصول إلى معايير أكثر توافقاً مع الإنذار ومنها : نمط الغزو و الاستجابة الالتهابية (Sarbia et al., 1995) (Fan et al., 2011) (بركات ، ٢٠١١)

- السرطان الثؤلولي Verrucous Carcinoma :

هو نمط جيد التمايز من السرطان شائك الخلايا غالباً ما يشاهد عند الرجال بين (٥٠-٦٠)عام وإن أكثر المناطق إصابة داخل الفم هي: اللثة و المخاطية الخدية (Cardesa and Nadal, 2011)

تبدأ الإصابة كلويحات متقرنة بيضاء رقيقة لا تلبث أن تثخن مشكلة نتوءات ثؤلولية أو حليمية وإن ضخامة العقد اللمفية المصاحبة تمثل رد فعل التهابي أكثر من كونه استعمار للعقد (Barnes et al., 2005)

نسيجياً : يملك السرطان الثؤلولي مظهر نسيجي سليم خادع يتميز بامتدادات إصبعية طويلة وعريضة تظهر مندفعة ضمن النسيج الضام مع سطح حليمي أو ثؤلولي .

كما تظهر الخلايا البشروية نمط ناضج طبيعي دون وجود درجة هامة من علائم الكشم الخلوي مع ارتشاح شديد للخلايا الإلتهابية المزمنة في النسيج الضام المجاور (Neville, 2009, Pereira et al., 2007)

- السرطان مغزلي الخلايا Spindle Cell Carcinoma :

هو سرطان وحيد النسيلة ثنائي الطور Biphasic monoclonal Tumor يتألف من سرطان شائك خلايا موضع أو غازي مع مكون مغزلي خبيث ذو مظهر ضام ومنشأ بشروي (Cardesa and Nadal, 2011)

غالباً ما يصيب الرجال في العقد السابع نتيجة تدخين السجائر والكحول (Barnes et al., 2005) ، يظهر ككتلة مسوقة سليلية الشكل Polypoid لكنه قد يظهر بشكل عقيدي Nodular أو كمئي Fungating أو كآفة متقرحة . الألم والخدر من العلامات البارزة وهو سريع النمو ذو ميل للاستعمار المبكر .

نسيجياً : يتألف من حزم من خلايا مغزلية مشابهة للسرطان الليفي . يتألف العنصر الشائك غالباً من سرطان موضع في البشرة السطحية المبطنة لكنه قد يظهر كجزر من خلايا بشروية شائكة بين الخلايا المغزلية (Neville, 2009, Viswanathan et al., 2010)

- السرطان المشبه بالقاعدي Basaloid Squamous Cell Carcinoma :

هو نمط عدائي ضعيف التمايز من السرطان شائك الخلايا ذو مكونين شائك ومشبه بالقاعدي .

غالباً ما يصيب الرجال بين (٦٠-٨٠) عام ، ذو ميل لإصابة اللسان لكنه قد يصيب أي منطقة داخل الفم (Rachel et al., 2011)

يشاهد الاستعمار للعقد اللمفية الناحية عند ثلثي المرضى (Cardesa and Nadal, 2011)

نسيجياً : لديه مكونين نسيجيين :

الأول سطحي عبارة عن جزر بشروية شائكة جيدة أو متوسطة التمايز .

الثاني الأعمق مكون من جزر وحبال من خلايا مشبهة بالقاعدية تظهر تسيج الخلايا المحيطية ومناطق تمايز شائك حيث تشابه السرطان قاعدي الخلايا (Neville, 2009) .

- السرطان الشائك الغدي Adenosquamous Carcinoma :

هو نمط نادر عدائي من السرطان شائك الخلايا يتظاهر ككتلة عقيدية مؤلمة قد تكون متقرحة السطح .

نسيجياً : يظهر كمزيج من سرطان شائك الخلايا سطحي وسرطان غدي قنيوي عميق مع وجود إنتاج للمخاط سواءاً داخل لمعي Intraluminal أو داخل خلوي Intracellular (Barnes et al., 2005, Masand et al., 2011)

- السرطان شائك الخلايا الحليمي Papillary Squamous Cell Carcinoma :

هو نمط غير شائع يميل لإصابة الذكور بالأعمار بين (٥٠-٦٠) عام .

ذو إنذار جيد ، يتظاهر ككتلة حليمية (Cardesa and Nadal, 2011)

نسيجياً : يتميز السرطان بنمط نمو حليمي سائد تتألف فيه هذه الحليمات من نسيج ليفي وعائي رقيق مغطى بخلايا ورمية مشبهة بالقاعدية أو خلايا متعددة الأشكال ويتألف الغزو الضام من جزر متعددة أو مفردة مع ارتشاح لمفي كثيف (Barnes et al., 2005)

- السرطان شائك الخلايا المتعلق بانحلال الأشواك Acantholytic Squamous Cell Carcinoma :

يدعى أيضاً بالسرطان شائك الخلايا المشبه بالغدي يتميز بانحلال واضح للأشواك في الخلايا الورمية معطياً مظهراً كاذباً للتمايز الغدي (Cardesa and Nadal, 2011)

نسيجياً : يتألف من جزر ورمية من السرطان شائك الخلايا ذات بؤر من انحلال الأشواك معطياً مظهراً لتمايز غدي . غالباً ما تحوي هذه اللمعات الكاذبة على حطام خلوي كما أنها قد تكون فارغة (ليس هناك من إنتاج للمخاط) وإن المكون الشائك هو السائد وعادة يكون متوسط التمايز (Barnes et al., 2005)

١-٢ الخصائص العامة للاستجابة المناعية General Properties of Immune Responses :

تدل كلمة المناعة على الحماية من المرض ، وتشكل الخلايا والجزيئات المسؤولة عن المناعة الجهاز المناعي وتدعى استجابتها المنسقة اتجاه المواد والأجسام الغريبة بالاستجابة المناعية

وكتعريف شامل للمناعة Immunity فهي استجابة الجسم اتجاه الأجسام الغريبة متضمنة (الميكروبات وكذلك الجزيئات الكبيرة من بروتينات وعديدات سكاكر) بغض النظرعن النتيجة الفيزيولوجية والمرضية لهذه الاستجابة (Abbas et al., 2005)

١-٢-١ المناعة الخلقية والمناعة المكتسبة :

يتوسط الدفاع اتجاه العوامل المؤذية ردود أفعال مبكرة تدعى المناعة الخلقية واستجابات متأخرة من المناعة المكتسبة

المناعة الخلقية Innate Immunity والتي تدعى أيضاً بالمناعة الفطرية أو الطبيعية تتضمن الآليات الدفاعية الخلوية والكيميائية الحيوية الموجودة دائماً حتى قبل الإصابة حيث تكون مستعدة للاستجابة السريعة للأذية (Kumar and Robbins, 2007)

فهي تمثل خط الدفاع الأول والاستجابة المباشرة وغير النوعية للعوامل المؤذية (Huang and Halliday, 2012)

وإن العناصر الرئيسية في المناعة الخلقية هي :

١- الحواجز الفيزيائية والكيميائية (البشرات المبطنة / العناصر المضادة للميكروبات المصنعة في البشرة) Physical and Chemical Barriers
٢- الخلايا البالعة والعدلات والخلايا القتلة الطبيعيون Phagocytic Cells and NK
٣- بروتينات الدم وتتضمن جملة المتممة والوسائط الالتهابية الأخرى Complement Mediators of inflammation / System
٤- بروتينات تدعى السيتوكينات التي تنظم وتنسق بين عدد من النشاطات الخلوية في المناعة الخلقية Cytokines (Medzhitov, 2007, Abbas et al., 2005)

وبالمقارنة مع المناعة الخلقية هناك استجابات مناعية أخرى تحرض عند التعرض للعوامل المؤذية وتزداد شدتها وقدرتها الدفاعية مع كل تعرض تالي لهذا العامل ،

ولما كان هذا النمط من المناعة يتطور كاستجابة للأذية ويتلائم معها فهو يسمى **المناعة المكتسبة (التلاؤمية) Adaptive Immunity** ومن أهم خصائص هذه المناعة :

- ❖ الخصوصية اتجاه جزيئات محددة
- ❖ التنوع
- ❖ القدرة على الذاكرة
- ❖ الاستجابة الأشد عند التعرض المتكرر لنفس العامل المؤذي
- ❖ تمييز الذات من اللاذات (Gartner and Hiatt, 2007)

لجهاز المناعة المكتسبة قدرة عالية على التعرف والاستجابة لعدد ضخم من الأجسام والتمييز بين مختلف الجزيئات والميكروبات حتى المتشابهة منها لهذا فهي تسمى المناعة المتخصصة .

وإن مكونات المناعة المكتسبة هي اللمفاويات ومنتجاتها (Vivier et al., 2011)
كما وتسمى المواد الأجنبية المسببة لهذه الاستجابات المناعية المتخصصة بالمستضدات Antigens (Roitt et al., 2001) .

وبالنتيجة تشكل كلاً من المناعة الخلقية والمكتسبة جهازاً متكاملاً من دفاع الجسم تتعاون فيه الخلايا والجزيئات المختلفة لأداء وظيفتها (Medzhitov, 2007)

١-٢-٢ أنواع الاستجابات في المناعة المكتسبة :

هناك نوعان من هذه الاستجابات هما المناعة الخلطية والمناعة الخلوية .

- المناعة الخلطية Humoral Immunity : يتوسطها جزيئات في الدم والمفرزات المخاطية والأنسجة تدعى الأضداد Antibodies التي تنتج من اللمفاويات البائية B بعد تمايزها إلى خلايا مصورية .

تتعرف الأضداد على المستضدات خارج الخلوية وتحيد تأثيرها ومن ثم تزيلها بآليات متعددة

- المناعة الخلوية Cellular Immunity : يتوسطها اللمفاويات التائية T (Akira, 2011)

تعيش الميكروبات داخل الخلوية كالفيروسات وبعض البكتيريا وتتكاثر داخل الخلايا البالعة وغيرها من خلايا المضيف حيث تكون صعبة الوصول من قبل الأضداد الدورانية

وإن الدفاع ضد مثل هذه الأذيات هو من وظيفة المناعة الخلوية التي تحفز على تدمير هذه الميكروبات الموجودة في الخلايا البالعة أو قتل الخلايا المصابة لإزالة مستودعات العدوى (Abbas et al., 2005)

١-٢-٣- المكونات الخلوية لجهاز المناعة المكتسبة :

إن الخلايا الأساسية في الاستجابة المناعية المكتسبة هي

- ❖ اللمفاويات Lymphocytes
- ❖ الخلايا العارضة للمستضد Antigen Presenting Cells (APC)
- ❖ الخلايا المستفعلة التي تزيل هذه المستضدات (Kumar and Robbins, 2007)

١. اللمفاويات Lymphocytes :

هي الخلايا التي تتعرف وتستجيب للمستضدات الغريبة وهي بذلك تمثل الوسائط في المناعة الخلوية والخلطية .

تتألف من مجموعات مميزة تختلف من حيث الوظيفة والمنتجات البروتينية وتتشابه شكلياً هي اللمفاويات البائية واللمفاويات التائية وخلايا القتلة الطبيعيين NK

اللمفاويات البائية B- Lymphocytes : هي الخلايا المنتجة للأضداد سميت البائية لأنها تنضج عند الطيور في عضو يدعى جراب فابريشيوس أما عند الإنسان فهي تنضج في نقي العظم .

تتمايز إلى خلايا مصورية Plasma Cells وتقوم بدور الوسائط في المناعة الخلطية عبر تعرفها على المستضدات خارج الخلوية (Gartner and Hiatt, 2007)

اللمفاويات التائية T- Lymphocytes : وهي وسائط المناعة الخلوية تنشأ من نقي العظم ثم تهاجر لتنضج في التيموس فالتسمية تشير إلى اللمفاويات المشتقة من التيموس

تتعرف على المستضدات داخل الخلوية المعروضة عبر بروتينات (معقد التوافق النسيجي/ MHC) وتعمل على إزالتها أو تدمير الخلايا المصابة (Kumar and Robbins, 2007)

تتألف اللمفاويات التائية من تجمعات مميزة وظيفيا أهمها :

اللمفاويات التائية المساعدة CD4 تشكل ٦٠% من اللمفاويات التائية الناضجة .

اللمفاويات التائية السامة CD8 (CTLS) والتي تشكل ٣٠% (Kumar and Robbins, 2007)

بعض اللمفاويات التائية تسمى **الخلايا المنظمة Regulatory T cells** وهي مسؤولة عن كبح الاستجابة المناعية .

أما الصنف الثالث من اللمفاويات فهي **خلايا القتلة الطبيعيين Natural Killer (NK)** وهي من عناصر المناعة الخلقية (Kumar and Robbins, 2007)

٢. الخلايا العارضة للمستضد Antigen Presenting Cells (APCs) :

إن بدء الاستجابة المناعية المكتسبة يتطلب التقاط هذه المستضدات وعرضها على اللمفاويات و إن الخلايا التي تقوم بذلك هي الخلايا العارضة للمستضد .

تعد الخلايا المتغصنة Dendritic cells هي الأكثر تخصصاً فيما بينها حيث تلتقط المستضدات الداخلة من البيئة الخارجية وتنقلها إلى الأعضاء اللمفية لتعرضها على اللمفاويات التائية وتبدأ الاستجابة المناعية (Banchereau and Steinman, 1998)

٣. الخلايا المستفعلة Effector Cells :

إن إزالة المستضد غالباً ما تحتاج خلايا مشاركة تدعى الخلايا المستفعلة وتضم اللمفاويات التائية الفعالة / الخلايا البالعة / الخلايا المصورية وغيرها من الكريات البيضاء .

٣-١ اللمفاويات التائية السامة Cytotoxic T lymphocytes CD8 :

هي خلايا دفاعية في الجسم وظيفتها الأساسية هي الحماية ضد المستضدات داخل الخلوية (Kumar and Robbins, 2007) حيث تقوم بالقتل المباشر للخلايا ذات المستضدات الغريبة مثل الخلايا المصابة بالفيروس أو الخلايا الورمية وهي أيضاً قادرة على إفراز العديد من السيتوكينات .

تستجيب اللمفاويات التائية السامة لهذه المستضدات عبر تعرفها على ببتيدات المستضدات داخل الخلوية المعروضة على سطح الخلايا والمرتبطة ببروتينات خاصة مرمزة بمورثات موجودة في موقع يدعى معقد التوافق النسيجي HLA- ا (Khanna, 1998) ويتم هذا التعرف عبر مستقبل غشائي خاص موجود على سطح اللمفاويات يدعى مستقبل الخلايا التائية T cell Recepter (TCR) والذي هو مستقبل موزع نسيلياً أي أن نسائل التائيات المختلفة تعرض مستقبلات مختلفة (Roitt et al., 2001)

تنشأ هذه الخلايا ككل الخلايا الدموية من الخلايا الجذعية في نقي العظم وتهاجر بعدها إلى التيموس حيث تدخل بمراحل معقدة من النضج تكتسب خلالها الخواص الوظيفية والمستقبلات المستضدية للخلايا الناضجة . (Kumar and Robbins, 2007)

وخلال نضج الخلايا تتم عمليات انتقاء لهذه اللمفاويات ينتج عنها ما يدعى (تقييد MHC الذاتي) حيث تبقى اللمفاويات التي تظهر المستقبلات المستضدية الخاصة بالببتيدات المرافقة للـ MHC الذاتي و تموت اللمفاويات التي لا تتعرف على MHC الذاتي .

وبعد نضج هذه الخلايا تغادر التيموس إلى الدوران والأعضاء اللمفية المحيطية وتدعى عندها اللمفاويات الـ Naive (اللمفاويات التي لم تقابل بعد المستضد) والتي يبقى تعدادها ثابتاً من خلال توليد خلايا جديدة من نقي العظم وموت الخلايا التي لم تقابل مستضد .

إن وظيفة اللمفاويات الـ Naive هي التعرف على المستضدات وبدء الاستجابة المناعية المكتسبة فإذا لم تقابل مستضد فإنها تموت بعملية الموت الخلوي المبرمج . (Abbas et al., 2005) .

يتطلب تكاثر وتمايز اللمفاويات التائية لقيامها بوظائفها المؤثرة ارتباطها مع المستضدات عبر مستقبلاتها المستضدية TCR بالمشاركة مع عدد من المحرضات الأخرى .

حيث تتعرف اللمفاويات التائية الـ Naïve T Lymphocytes على المستضدات في الأعضاء اللمفية المحيطية و تتكاثر وتتمايز إلى خلايا مستفعلة وخلايا ذاكرة (Kumar and Robbins, 2007)

ويحتاج تمايز اللمفاويات التائية وتحريضها إلى :

١- التعرف على المستضدات المعروضة عبر جزيئات HLA (Major Histocompatibility Complex) للخلايا العارضة للمستضد (APCs) والتي تمثل الإشارة الأولى للتحريض .

٢- التفاعل مع المحرضات المساعدة الموجودة على سطح APCs (B7-1/B7-2) والتي ترتبط مع جزيء (CD28) على سطح اللمفاويات التائية وهي تعطي الإشارة الثانية للتحريض (Beier et al., 2007)

٣- السيتوكينات المفرزة سواءاً من APCs أومن اللمفاويات التائية نفسها كـ (IL-2)

٤- قد يتطلب تمايز اللمفاويات التائية CD8 إلى إشارات إضافية من التائيات المساعدة CD4 حيث يرتبط CD40L الموجود على سطحها مع CD40 على سطح APCs لتزيد من قدرتها على تحريض CD8 .

يمر تفعيل اللمفاويات التائية بعد حصولها على إشارات التحريض بعدد من المراحل تتضمن :

١- تصنيع بروتينات جديدة Synthesis of new Proteins :

تبدأ اللمفاويات في مرحلة مبكرة بعد التحريض بنسخ مورثات تكون ساكنة وتصنع أعداداً من البروتينات الجديدة تتضمن : السيتوكينات المفرزة من بينها الإنترلوكين ٢ (IL-2) الذي يحرض على نمو وتمايز اللمفاويات نفسها والخلايا المؤثرة الأخرى ، ومستقبلات السيتوكينات التي تزيد من حساسية اللمفاويات للسيتوكينات وغيرها من البروتينات الداخلة في نسخ المورثات وانقسام الخلية (Abbas et al., 2005) .

٢- التكاثر الخلوي Cellular Proliferation :

تدخل بعدها اللمفاويات الخاصة بالمستضد بمرحلة انقسام ينتج عنها زيادة حجم النسيلة الخاصة بالمستضد والذي يدعى التوسع النسيلي Clonal Expansion حيث أنه في بعض الحالات قد يزيد عدد الخلايا التائية الخاصة بالمستضد (٥٠٠٠٠) مرة والخلايا البائية (٥٠٠٠) مرة .

وإن هذا التوسع النسيلي السريع هام جداً ليوافق قدرة الميكروبات على التضاعف السريع والزيادة العددية (Abbas et al., 2005)

٣- التمايز إلى خلايا مستفعلة Differentiation into Effector Cells:

تتمايز بعض نسائل اللمفاويات المحرضة بالمستضد إلى خلايا مستفعلة وظيفتها إزالة المستضد حيث تتمايز اللمفاويات التائية السامة Naïve CD8 عند مقابلة مستضد أجنبي إلى خلايا مستفعلة تدعى CTLs .

تحوي خلايا CTLs حبيبات سيتوبلاسمية مرتبطة بالغشاء تضم بروتينات من الـ (perforin و granzymes) قادرة على قتل الخلايا التي تظهر مستضدات ببتيدية غريبة عبر جزيئات I -HLA كالخلايا الورمية والخلايا المصابة بالفيروس بعملية الموت الخلوي المبرمج apoptosis . فبعد ارتباط CTLs بالخلايا الهدف يعاد تنظيم هيكل خلية CTLs حيث تنتقل الأنيبيبات microtubule الموجودة في المركز إلى السيتوبلاسما المجاورة للخلية الهدف و تتركز الحبيبات في تلك المنطقة ثم يندمج غشاء الحبيبات مع الغشاء السيتوبلاسمي مما يجعل هذه الحبيبات المحرضة على موت الخلية المبرمج على تماس معها . (Abbas et al., 2005) .

تستخدم هذه اللمفاويات أيضاً آلية أخرى لقتل الخلايا الهدف تعتمد على جزيئات غشائية موجودة على سطحها تدعى FasL والتي ترتبط ببروتينات موجودة على سطح الخلية الهدف Fas محرضة أيضاً على الموت الخلوي المبرمج .

كما أن هذه الخلايا لها القدرة على إفراز السيتوكينات مثل (IFN-γ/TNF / لمفوتوكسين)

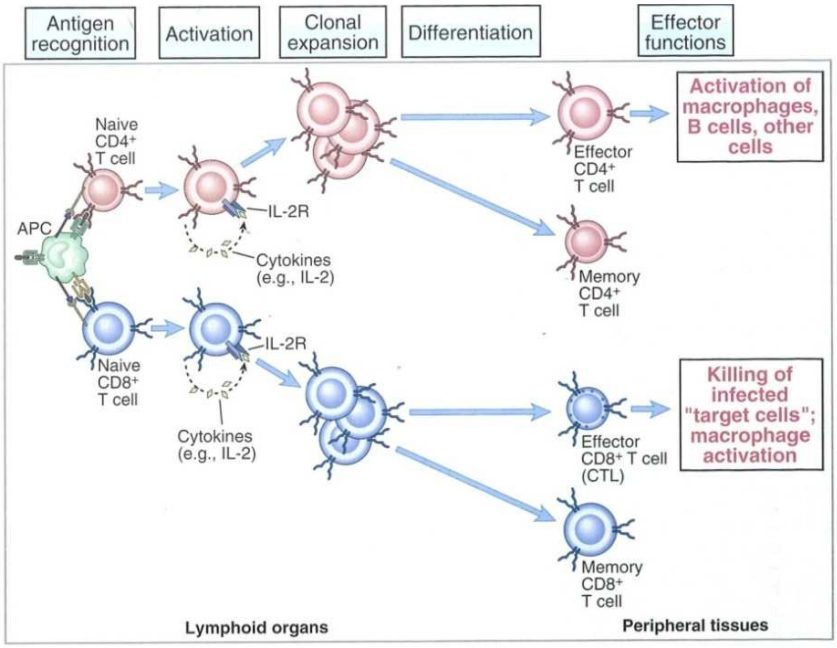
إن عمر معظم هذه الخلايا الفعالة المتمايزة قصير وهي غير قادرة على التجدد الذاتي

٤- التمايز إلى خلايا ذاكرة Differentiation into Memory Cells :

بعض نسائل اللمفاويات المحرضة بالمستضد تتمايز إلى خلايا ذاكرة وظيفتها التوسط السريع للاستجابات اللاحقة عند التعرض لنفس المستضدات .

يمكن تقسيمها إلى نوعين من الخلايا :
- خلايا الذاكرة المستفعلة Effector memory T cells (T_{EM}) : توجد في الدوران والطحال والأعضاء غير اللمفية وتستجيب سريعاً للمستضدات بإنتاجها الجزيئات المؤثرة
- خلايا الذاكرة المركزية Central memory T cells (T_{CM}) : توجد في الدوران والطحال والعقد اللمفية .

يلعب الإنترلوكين (7 و 15) IL-7/IL-15 دوراً هاماً في تنظيم بقاء اللمفاويات الذاكرة CD8 والإنترلوكين (7) IL-7 في بقاء اللمفاويات الذاكرة CD4 (Seder and Ahmed, 2003).



الشكل (١) يوضح مراحل استجابة اللمفاويات التائية

تحوي اللمفاويات التائية السامة بروتين غشائي مميز يلعب دوراً هاماً في الاستجابة المناعية ويعطي هذه الخلايا اسمها هو بروتين CD8 .

وهو جزيء غليكوبروتيني غشائي من عائلة Immunoglobulin (Ig) ذو بنية ثابتة (متشابه في جميع اللمفاويات التائية السامة) يرتبط بالمناطق وحيدة الشكل من جزيئات HLA- I ، يقوم بتنبيغ إشارات تساهم مع الإشارات المولدة من المعقد TCR في بدء تفعيل اللمفاويات التائية .

<u>بنية بروتين CD8 :</u> هو جزيء مثنوي مغاير Heterodimer مرتبط بثنائي السلفيد يتألف من سلسلتين β / α .

كل سلسلة منها تضم : - مجال واحد (Ig) خارج خلوي (Ig Domain)

- منطقة غشائية كارهة للماء

- جزء سيتويلاسمي من ٢٥ حمض أميني (Abbas et al., 2005)

وإن المجال (Ig) من CD8 يرتبط بالمجال α_3 من جزيئات HLA I (Roitt et al., 2001)

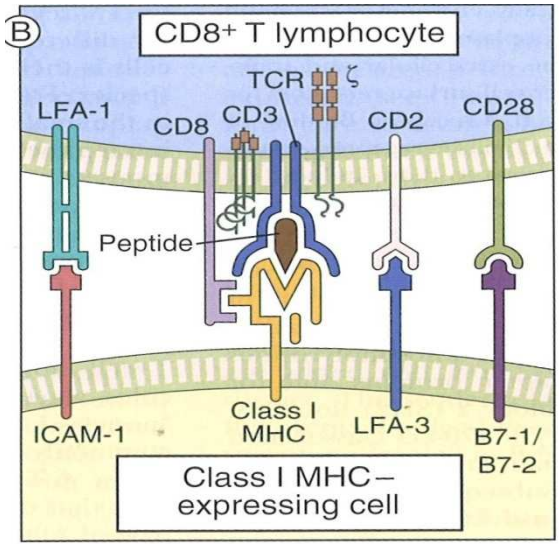
يلعب هذا البروتين دوراً أساسياً في الاستجابة المناعية للمفاويات التائية السامة حيث يضمن الارتباط الانتقائي لجزيء CD8 مع جزيئات HLA- I استجابة هذه الخلايا للببتيدات الشاذة المرافقة لجزيء HLA- I وهذا يساهم في تنظيم عمل هذه الخلايا .

كما يساهم جزيء CD8 في المرحلة الأولية من تنبيغ الإشارة وذلك بعد تعرف اللمفاويات التائية السامة على المعقد HLA- ا – ببتيد ويتم ذلك عبر كيناز من عائلة Src يدعى (Lck) المرتبط بشكل غير تساهمي مع الجزء السيتوبلاسمي لجزيء CD8 .

فبعد تعرف الخلية التائية السامة على المعقد تحرك التفاعلات المحرضة بين معقد التوافق النسيجي HLA- ا و اللمفاويات التائية السامة المستقبل المساعد CD8 و(Lck) المرتبط به إلى جوار معقد TCR عندها يقوم (Lck) بفسفرة ثمالات التيروزين في ITAM (Immunoreceptor tyrosine – based activation motif) الذي يمثل الجزء المسؤول عن الإشارة في الـ CD3 و ζ وهذا يبدء شلال تفعيل اللمفاويات التائية (Yin et al., 2012)

تحوي اللمفاويات التائية السامة أيضاً جزيئات غشائية أخرى منها ما يساهم في تنبيغ الإشارات إلى داخل الخلايا التائية والتي تعمل بالتناغم مع إشارات معقد TCR للتحريض التام للخلية وتعمل بعضها كجزيئات رابطة لإحكام الارتباط مع الخلايا وهذا يسمح للتائيات بالبقاء مدة كافية لتوليد الإشارات اللازمة (Kumar and Robbins, 2007)

من هذه الجزيئات جزيء CD28 وهو من أهم الجزيئات المشاركة في تحريض اللمفاويات التائية حيث يرتبط مع جزيئات B7-1 / B7-2 الموجودة على سطح الخلايا العارضة للمستضد وهذا ما يمنح إشارة التحريض الثانية للتائيات (Beier et al., 2007) وجزيئات LFA1 و CD2 والتي تمثل جزيئات ارتباط بين خلوي ترتبط بجزيئات موجودة على سطح الخلايا العارضة للمستضد مما يزيد من شدة الارتباط ويطيل مدة التماس بين الخلايا (Roitt et al., 2001) (Davis et al., 2003).



الشكل (٢) يوضح البروتينات الغشائية في اللمفاويات التائية السامة CD8

١-٤ معقد التوافق النسيجي The Major Histocompatibility Complex:

إن الوظيفة الرئيسية للمفاويات التائية هي الدفاع ضد المستضدات داخل الخلوية وتحريض الخلايا الأخرى (البالعات واللمفاويات البائية).

وتتطلب هذه الوظائف تفاعل اللمفاويات مع باقي الخلايا التي يمكن أن تكون خلايا المضيف نفسها / الخلايا المتغصنة / البالعات واللمفاويات البائية .

يتم هذا التفاعل عبر تعرف المستقبلات المستضدية للمفاويات التائية الـ TCR على المستضدات المعروضة على سطح الخلايا والمرتبطة ببروتينات خاصة مرمزة بمورثات موجودة في موقع يدعى معقد التوافق النسيجي (MHC) (Khanna, 1998)

هناك نوعان أساسيان من منتجات المورثة MHC هي :

جزيئات MHC I الموجودة على سطح جميع الخلايا المنواة والتي تعرض المستضدات داخل الخلوية Intracellular Antigens للمفاويات التائية السامة CD8 (Hoof et al., 2012)
جزيئات MHC II الموجودة بشكل أساسي على سطح الخلايا العارضة للمستضد والتي تعرض المستضدات خارج الخلوية Extracellular Antigens للمفاويات التائية المساعدة CD4 (Ackerman and Cresswell, 2004, Gartner and Hiatt, 2007).

١-٤-١ اكتشاف HLA البشري Discovery of the Human HLA :

يدعى جزيء MHC البشري بمعقد مستضد الكرية البيضاء البشري Human Leukocyte Antigen (HLA) (Kumar and Robbins, 2007)

وقد شكل تطور عمليات نقل الدم وزرع الأعضاء كوسائل للمعالجة في الطب السريري حافزاً قوياً لكشف المورثات التي تضبط تفاعلات الرفض عند البشر حيث كان (جين داوست و جان فان رود) وزملائهم أول من أظهر أن مرضى رفض الكلى ومرضى تفاعلات نقل الدم غالباً ما يكون لديهم أضداد جائلة متفاعلة مع مستضدات موجودة على سطح كريات الدم البيضاء أو خلايا عضو المانح ودعيت هذه المستضدات بالمستضدات الخيفية Alloantigens والتي هي منتجات المورثات متعددة الأشكال التي تميز الأنسجة الغريبة من الأنسجة الذاتية .

ولما كانت هذه المستضدات الخيفية تظهر على كريات الدم البيضاء البشرية فقد دعيت حينها بمستضدات الكريات البيضاء البشرية (HLA) .

قامت بعدها دراسات عديدة لمعرفة خارطة الموقع المورثي بالنسبة HLA حيث سميت أول ثلاث مورثات تم كشفها HLA-A / HLA-B / HLA-C ثم تم كشف مورثات أخرى دعيت HLA-DP / HLA-DQ / HLA-DR . (Abbas et al., 2005)

١-٤-٢ التنظيم المورثي لجزيء Genomic Organization of HLA

توجد مورثة السلسلة الثقيلة Heavy Chain من HLA على الذراع القصير من الصبغي السادس أما الميكروغلوبولين β٢ فهو مرمز بمورثة على الصبغي الخامس عشر (Mehta et al., 2008)

ترمز جزيئات HLA- I مورثات HLA-A / HLA-B / HLA-C
بينما ترمز جزيئات HLA- II مورثات HLA-DP / HLA-DQ / HLA-DR (Choi et al., 2011) (van den Elsen, 2011)

تتوضع مورثات HLA- I طرفياً في الموقع HLA بينما تقع مورثات HLA- II مركزياً في هذا الموقع .

ويشغل الـ HLA البشري قسماً واسعاً من DNA ممتد لحوالي ٣٥٠٠ Kb .

يحوي الموقع HLA- II أيضاً مورثات مرمزة للعديد من البروتينات التي تلعب دوراً هاماً في تهيئة المستضد من بينها جزيء TAP Transporter Associated with Antigen Processing الذي هو جزيء مثنوي مغاير Heterodimer ينقل الببتيدات من العصارة الخلوية إلى الشبكة الإندوبلاسمية ER حيث يرتبط الببتيد مع جزيء HLA المصنع حديثاً ويرمز جزئي TAP المثنوي مورثتين موجودتين داخل HLA- II .

كما يوجد داخل HLA- II مورثات أخرى ترمز عناصر من المعقد الحال للبروتين والتي تدعى البروتيزوم Proteasome التي تحول بروتينات العصارة إلى ببتيدات قادرة على الارتباط بجزيئات HLA (Wang et al., 2012)

يقع بين تجمع المورثة HLA- I و المورثة HLA- II مجموعة من المورثات ترمز :

عناصر متعددة من جملة المتممة / السيتوكينات الثلاث (عامل التنخر الورمي – اللمفوتوكسين و اللمفوتوكسين β) / وكذلك بعض بروتينات الصدمة الحرارية وقد دعيت هذه المورثات بمورثات MHC- III (Kumar and Robbins, 2007) .

يوجد بين المورثة HLA-A والمورثة HLA-C عدد من المورثات سميت بالمورثات المشابهة لـ HLA- I بعضها يرمز بروتينات تدعى جزيئات BI من ضمنها :
HLA-G الذي يلعب دوراً في تعرف NK على المستضدات
HLA-H الذي يدخل في استقلاب الحديد

وقد وجد أن معظم هذه المورثات المشابهة لـ HLA- I هي مورثات كاذبة تعمل كمخازن للسلاسل المرمزة التي تستخدم في تشكيل سلاسل متعددة الأشكال من جزيئات HLA- I و HLA- II بعملية تحول مورثي يستبدل فيها جزء من المورثة مع جزء من مورثة أخرى . (Abbas et al., 2005)

١-٤-٣ تعبيرية جزيئات HLA وعلاقتها مع السيتوكينات Expression of HLA Molecules and relation with cytokines:

تظهر جزيئات HLA- ا على سطح جميع الخلايا المنواة أما جزيئات HLA- ال فهي تظهر على سطح الخلايا المتغصنة / اللمفاويات البائية / البالعات الكبيرة وبعض الخلايا الأخرى وإن هذه التعبيرية متعلقة بوظيفة كل منها .

حيث أن وظيفة اللمفاويات التائية CD8 هي قتل الخلايا المصابة بالمستضدات داخل الخلوية وإن تعبيرية جزيئات HLA- ا تؤمن عرض هذه المستضدات أما اللمفاويات التائية CD4 فوظيفتها تتطلب عرض المستضدات من قبل أعداد أقل من الخلايا حيث تحتاج الخلايا CD4 التعرف على المستضدات المعروضة على الخلايا المتغصنة في الأعضاء اللمفية المحيطية أما الخلايا المتمايزة منها فهي تقوم بتحريض البالعات الكبيرة لإزالة المستضدات خارج الخلوية واللمفاويات البائية لإنتاج الأضداد (Roitt et al., 2001) .

تزداد تعبيرية جزيئات HLA عبر سيتوكينات منتجة خلال الاستجابة المناعية الخلقية والمكتسبة حيث تزيد الإنترفيرونات IFN-α / IFN-β / IFN-γ من تعبيرية جزيئات HLA1 في معظم الأنواع الخلوية وكذلك الأمر بالنسبة لعامل التنخر الورمي TNF و اللمفوتوكسين .

ولا يعزز IFNγ من تعبيرية جزيئات HLA- ا و HLA- ال فقط وإنما يزيد من تعبيرية الميكروغلوبولين β٢ والبروتيزوم وكذلك جزيء TAP (Respa et al., 2011, Han et al., 2011) .

كما تخفض بعض السيتوكينات من تعبيرية جزيئات HLA- ا مما يساهم في كبح الاستجابة المناعية كالإنترلوكين IL-10 .

١-٤-٤ العرض المتصالب لجزيء HLA- ا Cross Presentation:

تقوم الخلايا العارضة للمستضد وعلى رأسها الخلايا المتغصنة بعرض المستضدات الخارجية المبلعمة (كالخلايا الورمية / الخلايا المصابة بالفيروس) عبر جزيئات HLA- ا للمفاويات التائية السامة CD8 لتحريض الاستجابة المناعية الأولية وتكاثر اللمفاويات وتمايزها في العقد اللمفية وتدعى هذه العملية بالعرض المتصالب (Compeer et al., 2012) .

١-٤-٥ بنية جزيئات معقد التوافق النسيجي Structure of HLA Molecule:

تمتلك كل جزيئات HLA خواصاً بنيوية محددة هامة للقيام بدورها في عرض الببتيدات للتعرف على المستضدات من قبل اللمفاويات التائية .

إن كل جزيء HLA مؤلف من شق خارج خلوي رابط للببتيد يتبعه زوج من المجالات المشابهة للغلوبولين المناعي Immunoglobulin Like Domains (Ig) ثم منطقة غشائية وسيتوبلاسمية .

ويلاحظ تنوع الحموض الأمينية داخل وحول الشق الرابط للببتيد Peptide Binding Cleft في جزيئات HLA وهذا يؤمن ربط وإظهار ببتيدات متنوعة يتم التعرف عليها عبر المستقبلات المستضدية للمفاويات التائية (TCR) (Abbas et al., 2005) .

بنية جزيئات HLA- I :

تتألف جزيئات HLA- I من سلسلتين من عديدات الببتيد المرتبطة بشكل غير تساهمي

- سلسلة ثقيلة α تتألف من (٤٥ Kd)

- سلسلة خفيفة تدعى الميكروغلوبولين β_2 تضم (١٢ Kd) (Garcia-Lora et al., 2003)

تتألف السلسلة α من ثلاث مجالات خارج خلوية (α١/α٢/α٣) كلاً منها يضم ٩٠ حمض أميني وجزء قصير كاره للماء Hydrophobic موجود في غشاء الخلية ونهاية كربوكسيلية تتوضع في السيتوبلاسما (Roitt et al., 2001) .

تتفاعل النهاية الأمينية الخارجية للسلسلة α بجزئيها α١ و α٢ مع بعضها مشكلة سطح من (صفيحة مثناة β Pleated sheet تضم ثماني أطواق غير متوازية مدعومة بزوج متوازي من الحلزون α Helix) وهذا يشكل الشق الرابط للببتيد في جزيئات HLA- I (Abbas et al., 2005) . يكون حجم الشق كافي لربط ببتيدات بطول ٨-١١ حمض أميني بهيئة ممددة كما أن نهايتا هذا الشق تكون مغلقة بحيث يصعب عرض الببتيدات الأكبر .

وتكون الثمالات Residues متعددة الأشكال من جزيئات HLA- I محدودة بالمجالين α١ و α٢ حيث تساهم في التنوع لربط المستضدات المختلفة .

يشابه الجزء α٣ المجال الثابت من الغلوبولين المناعي Ig وهو يحافظ على تسلسل الحموض الأمينية نفسه في كل جزيئات HLA- I أي أنه ذو بنية ثابتة . يحوي هذا الجزء على عروة تمثل موقع ارتباط CD8 (Roitt et al., 2001) .

يمتد من النهاية الكربوكسيلية للجزء α٣ القسم الغشائي من الجزيء والمؤلف من ٢٥ حمض أميني كاره للماء يعبر الغشاء السيتوبلاسمي ومن ثم القسم السيتوبلاسمي المؤلف من ٣٠

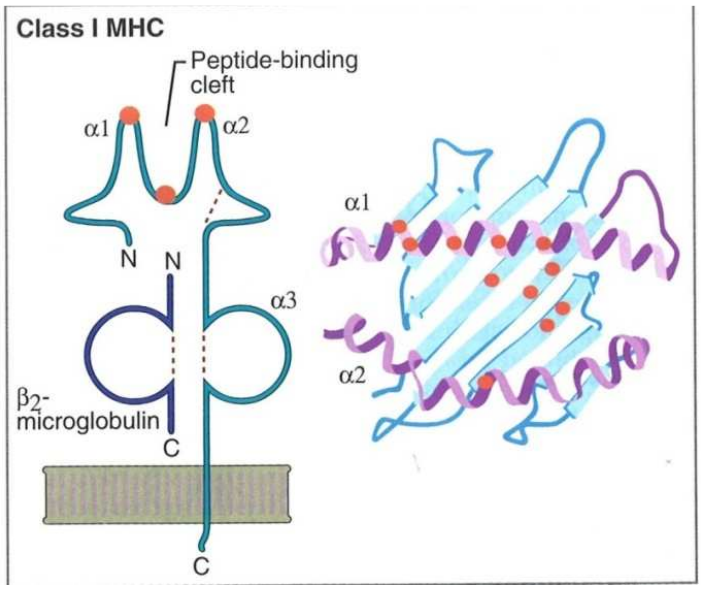
حمض أميني يضم حموض أمينية أساسية تتفاعل مع مجموعات فوسفوليبيدية من الوريقة الداخلية للغشاء السيتوبلاسمي وذلك لتثبيت جزيء HLA

أما السلسلة الخفيفة من جزيء ا -HLA والمرمزة بمورثة خارج HLA فهي تشابه بروتين كان معروف سابقاً في البول البشري ويدعى الميكروغلوبولين β٢ ودعي بذلك بسبب حركته الرحلانية Electrophoretic Mobility (β٢) وحجمه Micro وقابليته للذوبان Globulin (Abbas et al., 2005) . يرتبط الميكروغلوبولين β٢ مع الجزء α٣ بشكل غير تساهمي Noncovalently وهو كالجزء α٣ يشابه المجال الثابت من الغلوبولين المناعي Ig ويكون متماثل بنيوياً في كل جزيئات ا -HLA (Roitt et al., 2001) .

وبالتالي فإن جزيء ا -HLA هو جزيء ثلاثي مغاير Heterotrimer يتألف من :

- ❖ سلسلة ثقيلة α
- ❖ سلسلة خفيفة وهي الميكروغلوبولين β٢
- ❖ الببتيد المستضدي المرتبط (Garcia-Lora et al., 2003)

وتتطلب التعبيرية المستقرة لجزيئات ا -HLA على سطوح الخلايا وجود العناصر الثلاث معاً والسبب في ذلك أن الارتباط بين السلسلة α والميكروغلوبولين β٢ يستقر ويثبت بارتباط المستضدات الببتيدية داخل الشق المتشكل من α١ و α٢ وبالعكس فإن ارتباط الببتيد يقوى أيضا بارتباط السلسلة α مع الميكروغلوبولين β٢ .



الشكل (٣) يوضح بنية معقد التوافق النسيجي ا -HLA والثمالات متعددة الأشكال فيه

١-٤-٦ ارتباط الببتيدات بجزيئات Binding of Peptides to HLA Molecules:

كل جزيء HLA يحوي شق واحد رابط للببتيد له القدرة على عرض العديد من الببتيدات والتي تملك أشكالاً بنيوية تعزز هذا الارتباط منها : الحجم حيث أن جزيئات HLA-I تستطيع التكيف مع ببتيدات بطول ٨-١١ حمض أميني - كما تحوي الببتيدات المرتبطة بجزيئات HLA ثمالات الحمض الأميني التي تسمح بالتفاعل المتمم بين الببتيد وجزيء HLA وإن هذه الثمالات المرتبطة بالـ HLA مختلفة عن التي تتعرف عليها اللمفاويات التائية .

كما لا تميز جزيئات HLA بين الببتيدات الأجنبية (المشتقة من مستضدات ميكروبية) والببتيدات الذاتية (المشتقة من مستضدات الشخص نفسه) حيث تعرض كلا الببتيدات للمفاويات التائية التي تقوم بمسح هذه الببتيدات المعروضة لكشف المستضدات الغريبة (Yin et al., 2012)

إن الارتباط بين الببتيدات وجزيئات HLA هو ارتباط غير تساهمي Noncovalent يتوسطه الثمالات Residues الموجودة في الببتيدات من جهة وفي شقوق HLA من جهة أخرى

حيث يتم بداية تحويل المستضدات البروتينية في الخلايا إلى ببتيدات ترتبط بشقوق جزيئات HLA بهيئة ممددة . وعند الارتباط تملأ الببتيدات وجزيئاتها المائية المرافقة هذه الشقوق مشكلةً تماساً مفرطاً مع ثمالات الحمض الأميني المشكلة للأطواق β في قاعدة الشق والحلزنات α في جوانبه .

تملك الأطواق β في معظم جزيئات HLA جيوباً Pockets تلائم ثمالات من الببتيد وترتبط معها بروابط كارهة للماء وتدعى ثمالات الببتيد هذه بالثمالات المثبتة Anchor Residues التي يمكن أن توجد في مركز أو نهايات الببتيد وإن كل ببتيد مرتبط بالـ HLA يحوي (١-٢) فقط من هذه الثمالات المثبتة وهذا يسمح بتنوع أكبر في الأجزاء الأخرى التي تتعرف عليها اللمفاويات التائية المتخصصة .

لا تستخدم كل الببتيدات هذه الثمالات المثبتة للارتباط بجزيء HLA وخاصة جزيئات HLA-II حيث تساهم أيضا تفاعلات خاصة بين الببتيد والحلزنات α في جوانب الشق في إحداث الارتباط (Abbas et al., 2005)

ولأن العديد من الثمالات داخل وحول الشق الرابط للببتيد متعددة الأشكال فهي قادرة على ربط ببتيدات مختلفة .

يبقى الببتيد المرتبط مكشوفاً من القمة المفتوحة للشق حيث يتم التعرف على الحموض الأمينية للببتيد في هذا الجزء من قبل المستقبلات المستضدية للمفاويات التائية المتخصصة TCR والتي ترتبط أيضا بالثمالات متعددة الأشكال في الحلزنات α لجزيء HLA .

وبذلك تساهم الحموض الأمينية للببتيد ولجزيء HLA في تعرف اللمفاويات التائية على المستضدات بحيث يكون الببتيد مسؤولاً عن النوعية الدقيقة للتعرف المستضدي Specificity ويكون HLA مسؤولاً عن تقييد هذه اللمفاويات وارتباطها Restriction.

١-٤-٧ تهيئة المستضدات داخل الخلوية لعرضها مع جزيئات HLA-I :Processing of Intracellular Antigens

تبدأ هذه العملية بتدرك Degrade المستضدات البروتينية إلى ببتيدات عبر معقد البروتيزوم Proteasome تنقل بعدها عبر جزيء يدعى TAP (Transporter Associated with Antigen Processing) إلى لمعة الشبكة الإندوبلاسمية ER (Endoplasmic Reticulum) التي يتم فيها ربط الببتيد مع جزيء HLA-I المصنع حديثاً ثم إلى جهاز غولجي Golgi Complex ومنه إلى سطح الخلية (Liu et al., 2009)

١- تركيب البروتينات في العصارة الخلوية Production of Proteins in the Cytosol :

تشتق الببتيدات المرتبطة بجزيئات HLA-I من بروتينات العصارة الخلوية والتي يركب معظمها داخلياً في الخلايا المنواة .

قد تكون هذه البروتينات عبارة عن بروتينات ذاتية طبيعية موجودة في العصارة الخلوية وهي تمر بنفس المراحل التي تمر بها المستضدات الغريبة ليتم عرضها (Khanna, 1998)

أما المستضدات الغريبة داخل العصارة الخلوية فقد تكون عبارة عن منتجات للفيروسات أو الميكروبات داخل الخلوية التي تصيب الخلايا وتصنع بروتيناتها الخاصة خلال دورة حياتها كما تحوي الخلايا الورمية غالباً على مستضدات بروتينية للمورثات الذاتية الطافرة تتعرف عليها اللمفاويات التائية السامة (Zancope et al., 2010)

٢- تدرك بروتينات العصارة الخلوية Proteolytic Degradation of Cytosolic Proteins :

يتم في هذه المرحلة تحويل البروتينات إلى ببتيدات بحجم مناسب وذلك :

- للعبور عبر جزيء(TAP) إلى الشبكة الإندوبلاسمية ER
- التلائم مع ميزاب الارتباط الموجود في HLA-I

ويعتبر البروتيزوم 26S هو المعقد الأنزيمي الأساسي الحال للبروتين والمشكل للببتيدات (Sijts and Kloetzel, 2011)

٣- نقل الببتيدات من العصارة الخلوية إلى الشبكة الإندوبلاسمية Transport of Peptides from the Cytosol to the ER:

يتم نقل الببتيدات المصنعة داخل العصارة الخلوية عبر ناقل خاص إلى الشبكة الإندوبلاسمية حيث يتم ربطها بجزيئات ا -HLA المصنعة حديثاً

يدعى هذا الناقل بالناقل المرافق لتهيئة المستضد **TAP** (Transporter associated with Antigen Processing) وهو موجود في غشاء الشبكة الإندوبلاسمية و يتألف من جزيئي **TAP1**و **TAP2** (Bandoh et al., 2010)

ويرمز معقد (TAP) مورثتان TAP1/TAP2 تتوضعان بجوار LMP2/LMP7 داخل الموقع II -HLA .

في الجانب اللمعي من غشاء الشبكة الإندوبلاسمية يرتبط بروتين TAP مع معقد ا-HLA المصنع حديثاً عبر بروتبن رابط يدعى TAPASIN وبالتالي يبقى جزيء ا -HLA في الموقع اللازم لاستقبال الببتيدات (Ogino et al., 2006) .

٤- جمع معقدات ا -HLA - ببتيد داخل الشبكة الإندوبلاسمية Assembly of Peptide – HLA1 Complex in the ER :

يتم في الشبكة الإندوبلاسمية تصنيع السلاسل الثقيلة Heavy Chain α والميكروغلوبولين β٢ من جزيء HLA1 عبر مجموعة من المركبات المرافقة وهي (Calnexin/ Erp57 /Calreticulin) والتي تشكل المعقد ا -HLA المرتبط بـ TAP عن طريق Tapasin (Bandoh et al., 2010)

وعند دخول الببتيد إلى الشبكة الإندوبلاسمية ER يرتبط بالشق الموجود في جزيء ا -HLA وعندها يصبح المعقد (Peptide –-HLA1) قادراً على التحرر ومغادرة الشبكة الإندوبلاسمية وصولاً إلى سطح الخلية .

في حال غياب الببتيد فإن جزيء ا -HLA المتشكل حديثاً يكون غير مستقر / غير قادر على مغادرة الشبكة الإندوبلاسمية بصورة ملائمة وغالباً ما يتحلل داخل الـ ER .

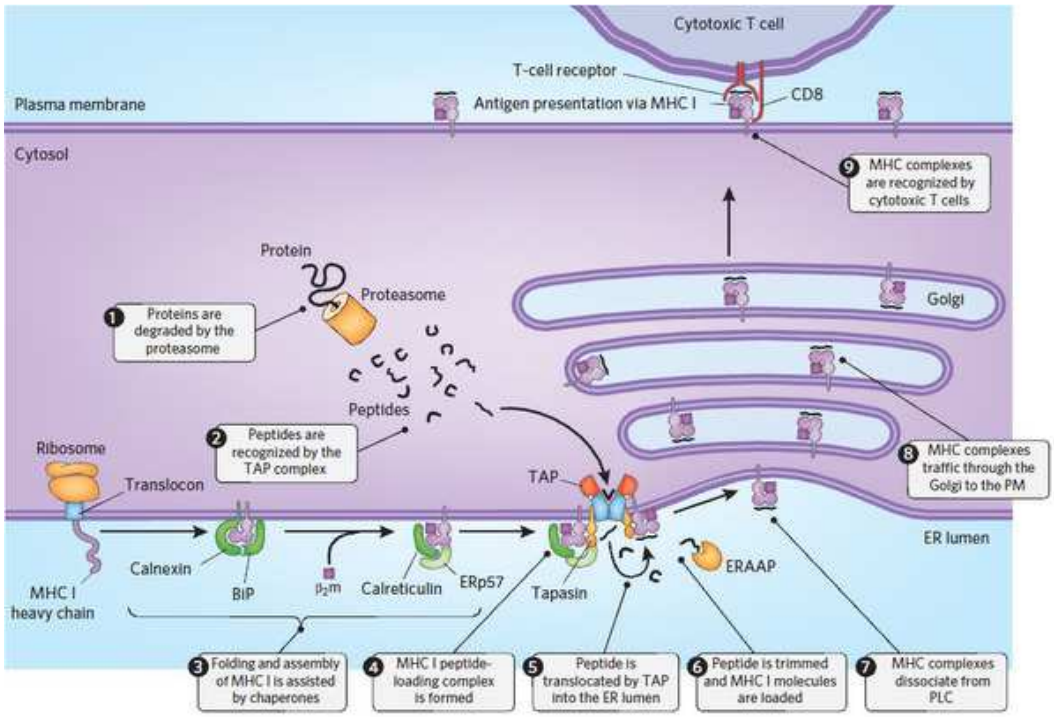
ترتبط الببتيدات الداخلة إلى الشبكة الإندوبلاسمية بجزيئات HLA- I ولا ترتبط بجزيئات HLA- II وذلك لسببين :

- ارتباط جزيئات HLA- I المصنعة حديثاً بالوجه اللمعي من معقد الـ TAP حيث تكون جاهزة لاستقبال الببتيدات .

- إن شقوق ارتباط الببتيدات لجزيئات HLA- II تكون مقفلة داخل الشبكة الإندوبلاسمية بجزيئات HLA- I (Abbas et al., 2005) .

٥- التعبيرية السطحية لمعقدات HLA- I - ببتيد Surface Expression of Peptide- MHC1 Complexes:

تنتقل المعقدات المصنعة في الشبكة الإندوبلاسمية إلى جهاز غولجي Golgi Complex ومنه إلى سطح الخلية عبر حويصلات ناقلة حيث يتم التعرف عليها من قبل اللمفاويات التائية السامة CD8 (Bandoh et al., 2010)



الشكل(٤) يوضح عملية تهيئة المستضدات داخل الخلوية

١-٥ البروتيزوم Proteasome 20S LMP2 - 20S:

يعتمد تعرف اللمفاويات التائية السامة على الببتيدات المستضدية على ارتباطها بالشق الموجود في جزيئات HLA- ا وإن هذه العملية تتطلب تدرك البروتينات إلى ببتيدات عبر جزيء يدعى البروتيزوم 26S .

إن البروتيزوم 26S هو بروتياز protease غير ليزيزومي فعال في الأجزاء السيتوبلاسمية والنووية المعتدلة PH في الخلايا حقيقية النوى .

وعلى اعتباره مكون هام في عملية التحلل البروتيني المعتمدة على ATP فإنه لا يشارك فقط في تحلل البروتينات السيتوبلاسمية والنووية وإنما يشارك أيضا في التحلل السريع أو تشكيل المستوى النهائي للأنزيمات وعوامل النسخ والبروتينات المنظمة لدورة الخلية (السيتوكينات و كابحات السايكلين) بالإضافة الى إزالة البروتينات الشاذة الناجمة عن طفرة أو عن تخرب بعد التصنيع . (Piccinini et al., 2005)

لذلك فإن البروتيزوم 26S يتدخل في تنظيم عمليات الاستقلاب وفي التمايز الخلوي والنسيجي وكذلك في الشيخوخة aging . كما يشارك البروتيزوم أيضاً في المراقبة المناعية بتحلل بروتينات العصارة الخلوية إلى ببتيدات وعرضها على سطح الخلايا مع جزيئات HLA- ا .

يعتبر البروتيزوم 26S هو المعقد الأنزيمي الأساسي الحال للبروتين في جهاز (ubiquitin –Proteasome) حيث يرتبط الـ Ubiquitin والذي هو عديد ببتيد برابطة تساهمية Covalent مع البروتينات عبر عدد من الأنزيمات (E1/E2/E3) التي تحرض وتجمع أجزاء ubiquitin المتعددة وتنقلها إلى ركائز substrates البروتينات ليتم تدركها عبر البروتيزوم (Sijts and Kloetzel, 2011)

يتركب البروتيزوم 26S من :

- المعقد 20S الذي يشكل المركز المحفز Catalytic Core
- معقدين منظمين من 19S مسؤولان عن تحريض المركز 20S

يتألف البروتيزوم 20S من ١٤ وحدة Subunits غير متماثلة تشكل ٤ حلقات : تتشكل الحلقتين الخارجيتين من ٧ وحدات α والداخليتين من ٧ وحدات β

يمثل البروتيزوم 20S بوجود ثمالات التريونين threonine كمواقع فعالة مفردة في الوحدات β وهي 5β , 2β ,1β أنزيم الهيدرولاز المسؤول عن توليد الببتيدات الفيروسية والورمية لعرضها مع جزيئات HLA- ا . تختلف هذه المواقع الفعالة بقدرتها على حلمهة ركائز الببتيدات وإن فعاليتها تماثل فعالية أنزيمات الكيموتربسين Chymotrypsin في 5β وفعالية التربسين trypsin في 2β و الكاسباز caspase في 1β . (Sijts and Kloetzel, 2011) .

يشكل **LMP2** (Low Molecular weigth Protein) مع كل من LMP7 و MECL1 وحدات β فعالة محفزة في البروتيزوم 20S تدعى بالوحدات المناعية immunosubunits حيث أنه وبتحريض IFN-γ وكذلك عامل التنخر الورمي TNFα ترتبط هذه الوحدات بالبروتيزوم مستبدلة وحدات أخرى موجودة هي 1β ، 5β ، 2β مشكلة المعقد 20S والذي يدعى البروتيزوم المناعي immunoproteasome ، يملك هذا البروتيزوم المناعي مواقع انقسام مختلفة في البروتين ومعدل انقسام مختلف عن النمط التقليدي

وبالتالي فإن هناك نمطان من البروتيزوم :

- النمط التقليدي الموجود في كل خلايا الجسم .
- والبروتيزوم المناعي الموجود في الخلايا المتعلقة بالمناعة والمتشكل بتحريض الإنترفيرون γ والسيتوكينات المولدة للالتهاب . (Sijts and Kloetzel, 2011)

وقد أظهرت الدراسات أن البروتيزوم المناعي هو القادر على تشكيل الببتيدات المناسبة للارتباط بجزيء ا -HLA وكذلك المرور عبر جزيء TAP إلى الشبكة الإندوبلاسمية وذلك بتحريض من IFNγ وأن النمط التقليدي من البروتيزوم غير قادر على تحريض استجابة اللمفاويات التائية السامة . (Sijts and Kloetzel, 2011)

٦-١ الناقل المرافق لتهيئة المستضد TAP Transporter associated with antigen processing

تعتبر بروتينات الكاسيت المرتبطة بـ ATP (ABC) (ATP binding cassette) واحدة من أكبر عائلات النواقل الفعالة والتي تستخدم تحلل ATP كمصدر للطاقة لنقل المواد المختلفة عبر الأغشية .

تتضمن المواد المنقولة عبر بروتينات ABC : السكاكر والدسم والببتيدات والحموض الأمينية ونتيجة لذلك فإن الطفرات التي تحدث على مستوى مورثات نواقل ABC المعروفة والتي عددها 48 تترافق مع العديد من الأمراض تشمل : التليف الكيسي cystic fibrosis ، التنكس البقعي macular degeneration وغيرها . وبالرغم من اختلاف هذه المواد المنقولة بالحجم والبنية إلا أن التنظيم البنيوي وآلية عمل نواقل ABC متشابهة جداً . (Corradi et al., 2012)

يتألف كل ناقل من نواقل ABC من أربع مجالات :

- مجالين رابطين للنكليوتيد NBDs (nucleotide binding domains) موجودين في جانب العصارة الخلوية من الغشاء .
- مجالين غشائيين TMDs (transmembrane domains) مرتبين في الحلزنات الممتدة في الغشاء لتشكل الممر الناقل translocation pathway .

بالإضافة إلى وجود موقعين رابطين لـ ATP بين مجالي NBDs يحويان العديد من المحفزات motifs . وبالنتيجة فإن الطاقة المولدة يتم تحويلها لتغيير هيئة المجالين الغشائيين TMDs للسماح بنقل المواد من جانب لآخر من الغشاء.

يلعب الناقل المرافق لتهيئة المستضد TAP (transporter associated with antigen processing) دوراً أساسياً في المناعة المكتسبة وذلك بنقل الببتيدات المستضدية المشتقة من تدرك البروتيزوم من العصارة الخلوية إلى لمعة الشبكة الإندوبلاسمية ER حيث يتم ربطها بجزيء HLA- ا وإن كبح جزيء TAP سواءا عبر الفيروسات التي تحاول الهرب من المناعة أو الطفرات التي تصيب المورثة تضعف بشكل كبير عملية عرض المستضدات . (Corradi et al., 2012)

ينتمي جزيء TAP إلى عائلة ABC-B وهو عبارة عن جزيء مثنوي مغاير يتركب من جزييئي TAP1 (ABC-B2) و TAP2 (ABC-B3). ويتألف كل جزيء منهما من مجال خارجي هو NBD مسؤول عن ربط وحلمهة ATP وستة حلزنات غشائية تشكل المجال الغشائي TMD .

كما يحوي جزييئي TAP1 و TAP2 مجال غشائي طرفي N للارتباط بجزيء Tapasin .

وتتضمن عملية نقل الببتيدات مرحلتين : مرحلة ارتباط الببتيد الغير معتمدة على ATP ومرحلة النقل المعتمدة على ATP . وإن نقل الببتيد وحلمهة ATP hydrolysis مرتبطة بشدة وهذا يدل على الارتباط بين المجالات NBD و TMD . (Oancea et al., 2009) .

١-٧ الاستجابة المناعية اتجاه الأورام Immune Response to Tumors:

اقترح العالمان (توماس / بورنت) في عام ١٩٥٠ مفهوم المراقبة المناعية للسرطان وهي تتضمن قدرة جهاز المناعة على كشف الخلايا الورمية كخلايا شاذة وقتلها قبل تطور الإصابة الورمية (Duray et al., 2010) .

وتعتبر المناعة المتوسطة بالخلايا هي الآلية الأساسية المضادة للورم (Kumar and Robbins, 2007) وتلعب فيها اللمفاويات التائية السامة CD8 دوراً أساسياً من خلال تعرفها على الخلايا الورمية التي تظهر الببتيدات المشتقة من البروتينات الخلوية الطافرة أو بروتينات الفيروسات الورمية والمعروضة عبر جزيئات HLA- ا (Topfer et al., 2011) .
وتدعى هذه المستضدات المعروضة بالمستضدات الورمية Tumor Antigens .

تم كشف العديد من المستضدات الورمية التي يمكن التعرف عليها من قبل اللمفاويات التائية والبائية في السرطانات البشرية .

وقد وجد في التجارب المحدثة على الحيوانات أن هذه المستضدات تحرض الاستجابة المناعية المكتسبة وهي تشكل أهدافاً لهذه الاستجابات .

إن المستضدات الورمية التي تتعرف عليها اللمفاويات التائية السامة CD8 هي ببتيدات مشتقة من بروتينات يتم تدركها في العصارة الخلوية عبر البروتيزوم المناعي ونقلها عبر جزيء TAP إلى الشبكة الإندوبلاسمية ليتم عرضها على سطح الخلايا الورمية عبر جزيئات HLA-I ومن هنا تكمن أهمية كل عنصر من هذه العناصر في المناعة اتجاه الأورام وإن أي خلل قد يصيب أي جزيء منها يؤدي إلى تجنب الخلايا الورمية للاستجابة المناعية .

والتعرف على هذه المستضدات الورمية مهم للغاية حيث من الممكن استخدامها كعناصر للقاحات الورمية كما يمكن استخدام الأضداد المتشكلة واللمفاويات التائية المؤثرة كوسائل علاجية مناعية (Nagorsen et al., 2003)

تم تصنيف المستضدات الورمية تبعاً للبنية الجزيئية ومنشأ هذه المستضدات ومن بينها :

- **منتجات المورثات الورمية والمورثات الكابحة للورم الطافرة Products of Mutated Oncogenes and Tumor Suppressor Genes:**

ينتج التحول الورمي من التبدلات المورثية لعدد من المورثات التي قد ينتج عن بعضها مستضدات تظهر على سطح الخلايا الورمية على أنها مستضدات غريبة .

تشتق هذه المستضدات من البروتينات الطافرة (oncoproteins) والبروتينات الكابحة للورم كمنتجات مورثات RAS/P53/CDK4 التي كثيراً ما تطفر في الإصابات الورمية (Kumar and Robbins, 2007) .

- **منتجات المورثات الطافرة الأخرى Products of other Mutated Genes:**

قد تنتج المستضدات الورمية من مورثات طافرة لا تتدخل في التحول الورمي وليس لها وظيفة معروفة .

- **البروتينات الخلوية الشاذة ومفرطة التعبيرية Overexpressed or Aberrantly Expressed Cellular Proteins:**

تكون هذه المستضدات الورمية عبارة عن بروتينات خلوية طبيعية تظهر بشكل شاذ في الخلايا الورمية (سواءاً بمستويات أعلى / أو ظهورها في أنسجة لا تظهر فيها عادةً) وتثير الاستجابة المناعية .

وكمثال عن هذه المستضدات أنزيم التيروزيناز Tyrosinase الذي يوجد في خلايا الميلانوسايت الطبيعية Melanocytes وذلك بمستويات منخفضة حيث يدخل في تركيب

الميلانين ويشاهد في الميلانوما بمستويات مرتفعة تحرض الاستجابة المناعية اتجاه هذا المستضد (Abbas et al., 2005) .

❖ المستضدات الورمية المنتجة من الفيروسات الورمية Tumor Antigens produced by Oncogenic Viruses:

تتورط بعض الفيروسات بتطور الإصابة السرطانية في عدد من الأورام البشرية ومن بينها فيروس الأبشتاين بار Epstein Barr Virus (EBV) والفيروس الحليمي البشري (HPV) Human Papillomavirus وهناك أدلة كثيرة على قدرة اللمفاويات التائية السامة على تمييز المستضدات الفيروسية وقد وجد أن اللقاحات ضد مستضدات HPV فعالة في الوقاية من سرطانات عنق الرحم (Kumar and Robbins, 2007) .

١-٧-١ المعالجة المناعية للسرطان Immunotherapy of Cancer:

تتم معالجة السرطان شائك الخلايا في مراحله المبكرة بالاستئصال الجراحي أو المعالجة الشعاعية ومع تقدم الإصابة لا بد من المشاركة بين الجراحة والمعالجة الشعاعية والكيماوية

وبالإضافة لتأثيرات السرطان على الوظائف الفيزيولوجية (المضغ / البلع والتنفس وغيرها) فإن الآثار الجانبية الشائعة للمعالجة الشعاعية والكيماوية Radio/Chemo Therapy تتضمن : الألم / التهاب الأغشية المخاطية والجلد / الإنتانات المعممة والموضعة / صعوبة في النطق والتنفس / تليف الأنسجة الطبيعية / التجفاف وعسر البلع بالإضافة لكبح المناعة (Rapidis and Wolf, 2009)

لذلك كان لابد من تطوير آليات علاجية حديثة في مقدمتها المعالجة المناعية والتي هي نوعية للمستضدات الورمية دون أذية معظم الخلايا الطبيعية وبالتالي فإن المعالجة المناعية لها الإمكانية لأن تصبح المعالجة النوعية للأورام .

تتضمن المعالجة المناعية عدد من الآليات والتي هي في مجال التطوير :

- **المعالجة الخلوية المقتبسة Adoptive Cellular Therapy** والتي تقوم على عزل اللمفاويات المرتشحة في الورم Tumor Infiltrating Lymphocytes وزرعها في أوساط مناسبة حيث يتم توسيعها Expansion بالسيتوكينات باستخدام تقنيات حديثة ومن ثم إعادتها إلى جسم المريض (Stroncek et al., 2012)

- المعالجة المناعية المعتمدة على السيتوكينات Cytokine based Immunotherapy
بإعطاء السيتوكينات موضعياً أو جهازياً لتحريض الاستجابة المناعية المضادة للورم ومن هذه السيتوكينات : الإنترفيرون IFN-γ و الانترلوكين IL-2/12 (Den Otter et al., 2008, Rapidis and Wolf, 2009).

- المعالجة المناعية بالأضداد وحيدة النسيلة Mono Clonal Antibody Immunotherapy

لقد مكن التقدم التكنولوجي الحاصل من التعرف على العديد من الأضداد وحيدة النسيلة وإنتاجها والتي هي نوعية جداً لأهدافها كما أنها تحرض على موت الخلايا الورمية المبرمج .

من بين هذه الأضداد : الأضداد الخاصة بمستقبل عامل النمو البشروي EGFR (الذي تزداد تعبيريته في أكثر من ٩٠ % من حالات السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق) من بينها : cetuximab / matuzumab / mab806 (Gold et al., 2009, Rapidis et al., 2008).

- اللقاحات السرطانية Cancer Vaccines :

هناك نمطان شائعان من المعالجة باللقاحات السرطانية :

نمط متعلق بالبروتين / ببتيد : يتم فيه ربط مادة مساعدة مع واحد أو أكثر من البروتينات التي تظهر في إصابات السرطان شائك الخلايا مثل P53 / HPV ومن المتوقع عندها أن الجهاز المناعي في استجابته للمادة المساعدة سيستجيب للخلايا الورمية التي تظهر هذا المستضد (Rapidis and Wolf, 2009)

نمط متعلق بالخلايا المتغصنة : يتم أخذ الخلايا المتغصنة من مرضى السرطان وتحريضها عبر مستضد ورمي ملائم ثم إعادتها إلى جسم المريض لتقوم بتحريض اللمفاويات التائية الخاصة بالورم (Bhardwaj, 2007) .

وعلى الرغم من وجود المراقبة المناعية للسرطان إلا أن العديد من الأورام لها القدرة على تجنب الاستجابة المناعية .

١-٧-٢ تجنب الأورام للاستجابة المناعية Evasion of Immune Responses by Tumors:

تملك العديد من الأورام الخبيثة آليات متعددة تمكنها من الهروب أو حتى مقاومة الاستجابة المناعية للمضيف وهي تشمل :

- الخلل في تعبيرية المستضدات على سطح الخلايا الورمية عبر فقد أو انخفاض تعبيرية HLA1 وعناصر الجهاز العارض للمستضد والتي تشمل الوحدات الفعالة في البروتيزوم LMP2 والناقل المسؤول عن نقل الببتيدات TAP ونتيجة هذا الخلل فإن الخلايا الورمية لا تعرض ببتيداتها الشاذة للمفاويات التائية السامة CD8 المسؤولة عن تمييز الخلايا الطبيعية من الخلايا الشاذة مما يسمح لها بتجنب الاستجابة المناعية للجسم وتقدم الإصابة السرطانية .

- كبح المناعة عبر آليات متعددة تشمل :

- ❖ إنتاج جزيئات متعددة كابحة للمناعة مثل عامل النمو المتحول TGF-β Transforming Growth Factor β والبروستاغلاندين Prostaglandin PGE2 وكذلك السيتوكينات IL-10 / IL-6 .
- ❖ اللمفاويات التائية المنظمة Regulatory T Lymphocytes حيث وجدت العديد من الدراسات أنها تعزز تقدم الإصابة السرطانية عبر كبحها لوظائف اللمفاويات التائية والقتلة الطبيعيون .
- ❖ بالإضافة لتجنب الخلايا الورمية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis وإظهارها FasL الذي يؤدي لموت اللمفاويات المرتشحة في الورم (Duray et al., 2010, Evans et al., 2006) .

وقد قامت العديد من الدراسات بتحري تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I وعناصر الجهاز العارض للمستضد في الإصابات السرطانية المختلفة كسرطان عنق الرحم (Mehta et al., 2008) وسرطان المثانة (Cathro et al., 2010) والسرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق والحنجرة والجيب الفكي والمري (Bandoh et al., 2010, Ogino et al., 2006, Liu et al., 2009, Ogino et al., 2003) وقد وجدت معظم هذه الدراسات انخفاضاً في تعبيرية HLA- I عن تعبيريته في الحالة الطبيعية وأن هذا الانخفاض يترافق مع انخفاض في تعبيرية عناصر الجهاز العارض للمستضد وخصوصاً LMP2 و TAP1 ، إلا أن الدراسات التي تناولت هذه البروتينات في السرطان شائك الخلايا الفموي كانت محدودة .

تتمتع الحفرة الفموية بخصائص متعددة حيث تحوي أكثر من ٥٠٠ نوع من البكتيريا الموجودة بصورة طبيعية (علاقة تعايش) Commensal Relationship بالإضافة لمقابلة أعداد كبيرة من المستضدات على سطح المخاطية متضمنة المواد الغذائية لذلك كان لابد من وجود آلية تكبح الاستجابة المفرطة لجهاز المناعة لهذه المستضدات تدعى هذه الآلية بالتحمل الفموي (Garant, 2003) .

تتم هذه الآلية عبر اللمفاويات التائية المنظمة بإنتاجها IL-10 وكذلك TGF-β (Uppaluri et al., 2008) .

حيث يملك IL-10 القدرة على إنهاء الاستجابة الالتهابية وكبح إنتاج السيتوكينات من اللمفاويات التائية المساعدة TH1 وكبح تطور اللمفاويات التائية السامة CTL (Evans et al., 2006) بالإضافة إلى قدرته على خفض تعبيرية HLA1 وكبح الاستجابة المناعية (Rodriguez et al., 2012) و TGF-β الذي يؤثر بصورة أساسية على اللمفاويات التائية بحيث يكبح تكاثرها وتمايزها كما يكبح تعبيرية المحرضات المساعدة في الخلايا المتغصنة بالإضافة لكبحه البالعات الكبيرة (Evans et al., 2006) .

تقوم هذه الدراسة بتحري تعبيرية معقد التوافق النسيجي ا -HLA وبعض العناصر المشاركة في تهيئة المستضد وعرضه وهي : الناقل المرافق لتهيئة المستضد TAP1 (Transporter associated with Antigen Processing) و البروتين ذو الوزن الجزيئي المنخفض LMP2 (Low Molecular weigth Protein) في الخلايا الورمية للسرطان شائك الخلايا الفموي بهدف تقييم قدرة الخلايا الورمية على إظهار مستضداتها الورمية لتحريض الاستجابة المناعية وكذلك ربط تعبيرية هذه الجزيئات مع الدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي ومدى إمكانية استخدامها في التنبؤ بخطورة الإصابة .

وقد تم اختيار كلاً من LMP2 و TAP1 في هذه الدراسة لأن العديد من الدراسات وجدت انحفاضاً في تعبيرية هذه العناصر مترافق مع انخفاض تعبيرية ا -HLA وبالتالي تأثيرها على عرض الببتيدات المرافقة لجزيء ا -HLA . وأن انخفاض تعبيريتها غالباً ما يترافق مع زيادة في خطورة الإصابة السرطانية .

ومن جهة أخرى أيضاً تضمنت الدراسة تحري تعبيرية CD8 في السرطان شائك الخلايا الفموي باعتبارها العناصر الأساسية في الدفاع ضد السرطان وربطها مع الدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي .

الباب الثاني : المواد والطرائق

Materials and Methods

٢-١ عينة البحث :

تألفت عينة البحث من ٥٤ حالة مقسمة إلى :

- ٤١ عينة سرطان شائك خلايا فموي مأخوذة من أرشيف خزعات مشفى البيروني ومن أرشيف خزعات قسم النسج والتشريح المرضي في كلية طب الأسنان في جامعة دمشق ما بين عامي ٢٠٠٤ – ٢٠١٠ .

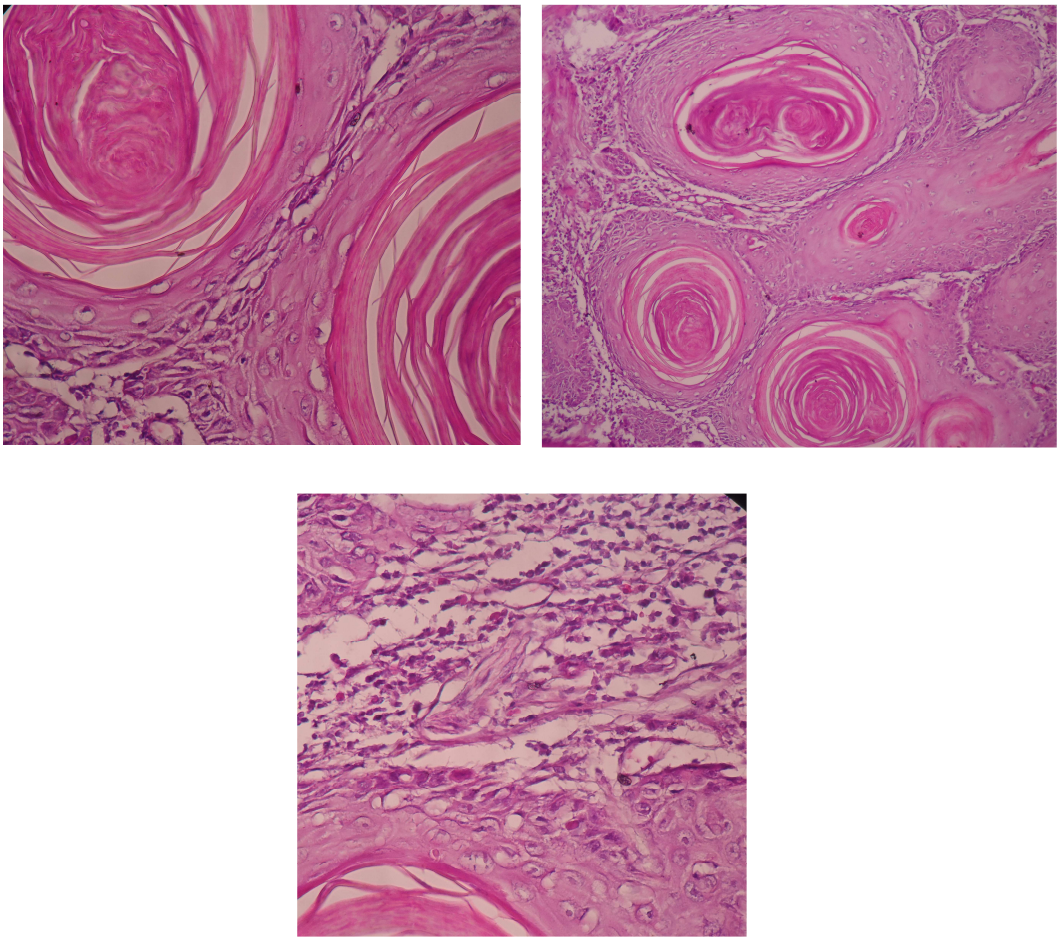
تم أخذ الموافقة للاطلاع على ملفات المرضى وأخذ المعلومات الازمة ،
حيث شملت العينة السرطانية : ٣٤ ذكر و ٧ إناث ، وبلغ متوسط عمر الإصابة حوالي ٥٠ سنة وقد خضعت جميع الحالات للمعالجة الجراحية فقط بحيث تم استبعاد الحالات الخاضعة للمعالجات الشعاعية والكيميائية . ويوضح الجدول رقم (١٧) المعلومات المتعلقة بالمرضى .

كانت هذه الحالات مقسمة نسيجياً إلى ثلاث درجات على النحو التالي :

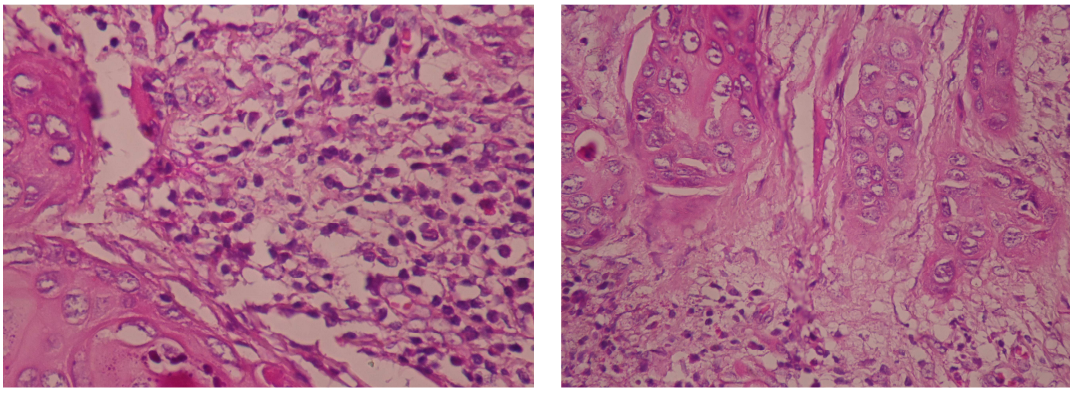
- ❖ ١٥ حالة درجة أولى Grade 1
- ❖ ١٥ حالة درجة ثانية Grade 2
- ❖ ١١ حالة درجة ثالثة Grade 3

وقد تم تقييم الدرجة النسيجية لهذه الخزعات عبر عدد من أساتذة قسم النسج والتشريح المرضي في كلية طب الأسنان في جامعة دمشق دون معرفتهم بأي معلومات مسبقة عن الخزعات وتشخيصها .

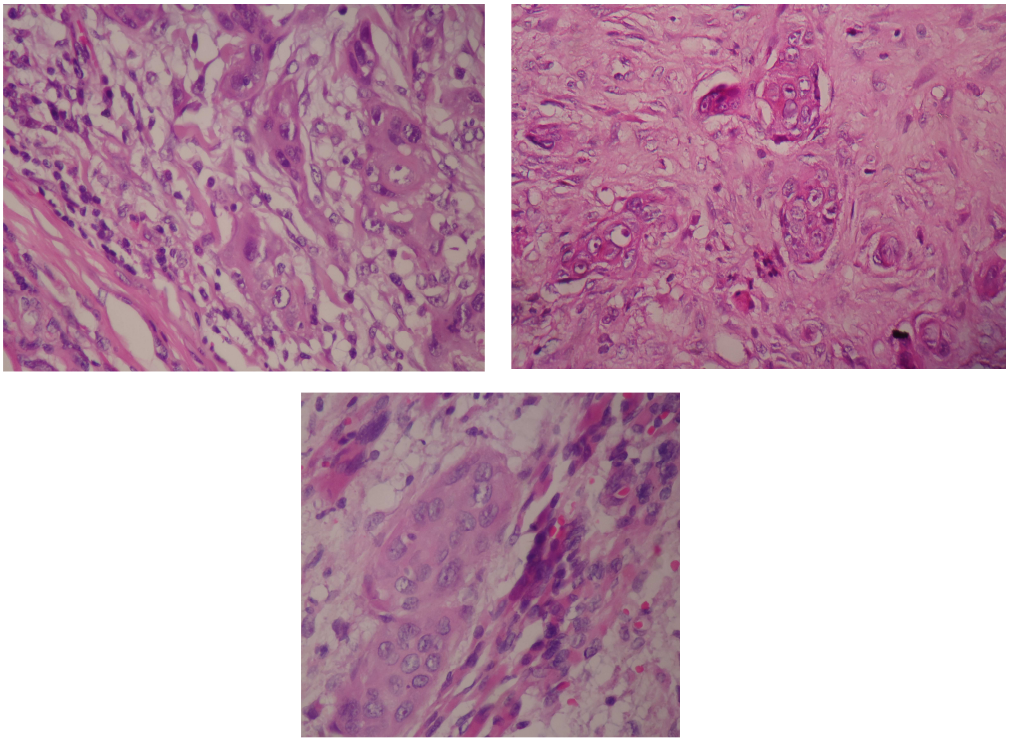
- ١٣ عينة سليمة شاهدة مأخوذة من المخاطية الفموية جمعت من عمليات القلع الجراحي للأرحاء المنطمرة في قسم جراحة الفم والفكين في كلية طب الأسنان وذلك بعد موافقة المرضى وتم التأكد بعد تحضيرها نسيجياً من خلوها من علامات الكشم الخلوي والارتشاح الالتهابي .



الشكل (٥) يوضح الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ جزر كبيرة وكرات تقرن كثيرة وارتشاح التهابي غزير



الشكل (٦) يوضح الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ جزر متوسطة الحجم وتعدد أشكال معتدل .



الشكل (٧) يوضح الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ جزر صغيرة وخلايا مفردة وتعدد أشكال واضح .

٢-٢ المواد والأجهزة المستخدمة :

٢-٢-١ الواسمات المناعية :

❖ الضد الأول :

Mouse monoclonal to HLA Class 1 ABC ,Clone (EMR8-5) , Code (ab70328), Abcam

واسم غشائي يستخدم بالتمديد بواسطة التريس بنسبة تتراوح بين ١/٥٠ – ١/١٠٠
وتم اختيار النسبة ١/١٠٠ بعد إجراء الدراسة التجريبية



الشكل (٨) الملون المناعي HLA- I

❖ الضد الثاني :

Monoclonal Mouse Anti- CD8, Clone (C8/144B), Code (IS623),(Ready-to-use), Dako

واسم غشائي جاهز للاستخدام دون تمديد .



الشكل (٩) الملون المناعي CD8

❖ الضد الثالث :

Proteasome 20S LMP2 antibody ,Code (ab3328) , Abcam

واسم سيتوبلاسمي ونووي يستخدم بالتمديد بواسطة التريس بنسبة ١/١٠٠٠



الشكل (١٠) الملون المناعي LMP2

❖ الضد الرابع :

TAP1 antibody , Code (ab60112) , Abcam

واسم سيتوبلاسمي يستخدم بالتمديد بواسطة التريس بنسبة تتراوح بين ١/٥٠ – ١/١٠٠ وتم اختيار النسبة ١/٥٠ بعد إجراء الدراسة التجريبية



الشكل (١١) الملون المناعي TAP1

٢-٢-٢ كيت التلوين المفرد :

Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse ,Code K5007 ,Dako





الشكل (١٢) يوضح كيت التلوين المفرد

٢-٢-٣ أقراص السائل الدارئ :

Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets, 100ml, Code E404-200TABS, Amresco (قرص واحد مقابل ١٠٠ مل ماء مقطر)



الشكل (١٣) أقراص السائل الدارئ

٢-٢-٤ محلول استرجاع المستضد

Antigen Retrieval Buffer (100×Citrate Buffer, pH 6), 125ml, Code (ab93678), Abcam
Antigen Retrieval Buffer (100×EDTA Buffer, pH 8), 125ml, Code (ab93680), Abcam



الشكل (١٤) محلول استرجاع المستضد

٢-٢-٥ المبشرة النسيجية Microtome (LEICA) - محم مائي لفرش المقاطع النسيجية (LEICA) - فرن التجفيف (Nicht drehen)

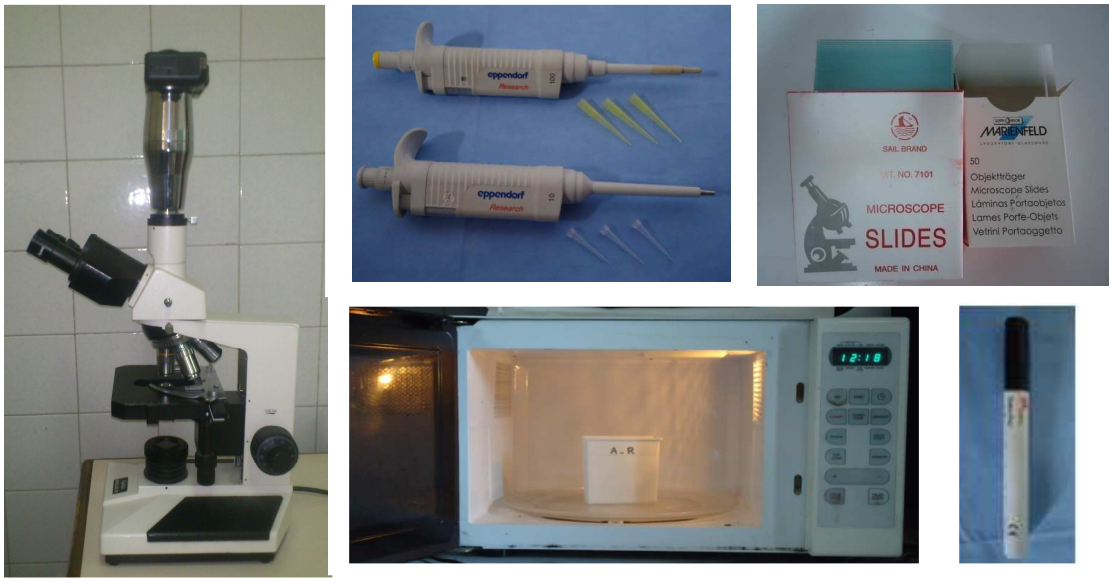






الشكل (١٥) يظهر المبشرة النسيجية والمحم المائي وفرن التجفيف

٢-٢-٦ الشرائح الزجاجية العادية والمناعية - المجهر الضوئي من شركة (Kyowa) - المايكروويف - قلم التحديد من شركة (Dako) - الممص pipet



الشكل (١٦) يظهر الشرائح الزجاجية العادية والمناعية - الممص pipet - المجهر الضوئي (Kyowa) - قلم التحديد من شركة (Dako) – المايكروويف

٢-٢-٧ شمع البارافين - الكزيلول - الكحول - الملونات النسيجية التقليدية (الهيماتوكسيلين – الايوزين)



الشكل (١٧) يوضح شمع البارافين - الملونات النسيجية التقليدية (الهيماتوكسيلين – الايوزين) - الكزيلول - الكحول

٢-٣ طرائق البحث :

٢-٣-١ تحضير العينات الشاهدة :

يمر تحضير العينات بعدد من المراحل كي تكون جاهزة لإجراء التلوين التقليدي والمناعي :

بعد استئصال العينة الشاهدة تم وضعها في الفورمول الممدد ١٠% لمدة ٢٤ ساعة وذلك لتثبيت العينة ومنع التحلل الذاتي للأنسجة ثم تبدأ مرحلة التجفيف وهدفها إزالة الماء من العينة واستخدم لذلك ثلاث حمامات من الكحول يزداد تركيزها تدريجياً : الحمام الأول ذو تركيز ٧٠% لمدة ساعة والثاني ذو تركيز ٨٥% كذلك لمدة ساعة والحمام الثالث ويحوي الكحول المطلق لمدة ساعة يليها مرحلة التشفيف وذلك لطرد الكحول من العينة وجعلها شافة وقد استخدم لذلك ثلاث حمامات من الكزيلول وضعت العينة في كل منها لمدة ساعة ثم مرحلة إدماج شمع البارافين حيث توضع العينة في حمام من البارافين المنصهر بدرجة حرارة ٥٥ درجة مئوية لمدة (١-٢) ساعة ، توضع العينة بعدها ضمن قالب ويصب شمع البارافين فوقها بحيث نتأكد من توجيه العينة بشكل مناسب ، يترك القالب ليبرد ويتصلب وعندها يصبح جاهزاً للقطع حيث تحفظ القوالب في البراد .

قمنا بعد ذلك بإجراء التلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين – إيوزين وذلك لتأكيد التشخيص وتحديد الدرجة النسيجية للعينات السرطانية والتأكد من خلو العينات الشاهدة من علامات الكشم الخلوي والارتشاح الالتهابي .

٢-٣-٢ طريقة التلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين – إيوزين :

يثبت المكعب الشمعي على المبشرة النسيجية Microtome (LEICA. ألمانيا) وتحدد سماكة المقطع بـ ٤ ميكرون ، تفرش هذه المقاطع البارافينية في محم مائي (LEICA . ألمانيا) يحتوي ماء مقطر بدرجة حرارة حوالي ٤٠ – ٤٥ درجة مئوية لإزالة التجاعيد وتحميلها على الشرائح الزجاجية ، توضع بعدها الشرائح الزجاجية في فرن التجفيف (Nicht drehen . المانيا) بدرجة حرارة ٤٥ – ٥٠ درجة مئوية لتجفيفها من الماء لمدة ١٠ دقائق ثم توضع في ٣ حمامات من الكزيلول لحوالي ٥ دقائق لكل حمام ، لإزالة شمع البارافين . توضع بعد ذلك في الكحول المطلق ثم كحول بنسبة ٩٥% يليها ٧٠% ثم ٥٠% لمدة ٥ دقائق لكل حمام فتتم إزالة الكزيلول ، تغسل الشرائح بالماء وتوضع في الهيماتوكسيلين لدقيقتين ثم تغسل بالماء عدة مرات لإزالة الهيماتوكسيلين الزائد وتوضع بعد ذلك في الإيوزين لمدة تتراوح بين دقيقة ودقيقة ونصف وتغسل بالماء لإزالة الإيوزين الزائد ، توضع في حمام كحول ٧٠% لمدة دقيقة ثم ٩٥% لمدة دقيقة ثم في حمامين من الكحول المطلق كل حمام دقيقة واحدة ليتم طرد الماء من النسيج ، تجفف العينة وتوضع في الكزيلول لمرتين متتاليتين لمدة ٣ دقائق في كل مرة لطرد الكحول وأخيراً تستر السلايدات الزجاجية بالسواتر باستخدام بلسم كندا لتصبح جاهزة للفحص النسيجي .

قمنا بتقييم الدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي اعتماداً على تصنيف منظمة الصحة العالمية WHO مع إضافة كلاً من نمط الغزو وشدة الاستجابة الالتهابية لما لها من أهمية في التنبؤ بالإنذار(Barnes et al., 2005) (Akhter et al., 2011) وذلك وفق الجدول التالي :

الدرجة النسيجية	الدرجة ١	الدرجة ٢	الدرجة ٣
كرات التقرن	كثيرة	متوسطة	قليلة أو معدومة
نمط الغزو	جزر كبيرة	حبال / شرائط وجزر متوسطة	حبال رقيقة / جزر صغيرة وخلايا مفردة
الاستجابة الالتهابية	غزيرة	متوسطة	قليلة أو معدومة
تعدد أشكال الخلايا والنوى	أقل من ٢٥% من الخلايا الورمية	حوالي ٥٠% من الخلايا	أكثر من ٧٥% من الخلايا الورمية

الجدول (١) يبين المعايير المتبعة في تقييم الدرجة النسيجية

٢-٣-٣ طريقة التلوين المناعي :

بعد التقطيع بالمبشرة النسيجية تسخن السلايدات في فرن بدرجة حرارة ٦٥ لمدة ١٥ دقيقة وتوضع بعدها في سلسلة من الحمامات تتضمن حمامين من الكزيلول (٣-٥ دقائق لكل واحد) تتبع بثلاث حمامات من الكحول تبدأ بالكحول المطلق ثم الكحول ٩٥% ومن ثم ٧٠% (٣ دقائق لكل حمام) بعدها تغسل السلايدات بالماء الجاري بلطف .

تبدأ بعدها عملية استرجاع المستضد حيث تم تحضير محلول استرجاع المستضد حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بتمديده بالماء المقطر بنسبة (١/١٠٠) وقد تم هذا التحضير لكل من Citrate Buffer/EDTA Buffer ، تم استخدام Citrate Buffer PH 6 لكل من HLA-1 و LMP2 و CD8 واستخدم EDTA Buffer PH 8 للواسم TAP1 .

توضع في هذه المرحلة السلايدات ضمن وعاء يحوي كمية كافية من محلول استرجاع المستضد بحيث تغمر السلايدات بشكل كامل ويوضع الوعاء في الميكروويف لمدة ١٥ دقيقة (حوالي ١٠ دقائق بعد الغليان) ثم تترك بعدها لحوالي (١٥ – ٢٠ دقيقة) لتبرد في درجة حرارة الغرفة ، توضع السلايدات بعدها في حوض يحوي السائل الدارئ PBS لمدة ٥ دقائق ثم تنقل إلى حوض آخر يحوي PBS لمدة ٣ دقائق مع الانتباه لعدم جف المقاطع النسيجية خلال مراحل التلوين .

يطبق بعدها PEROXIDE BLOCK بحيث يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف وتحدد المقاطع النسيجية بقلم التحديد (Dako Pen) وتطبق المادة بواسطة الممص (Eppendorf) بحيث تغطي كامل العينة وتترك ٥ دقائق ، تغسل السلايدات بعدها بالمحلول

الدارئ PBS ونتجنب الغسيل المباشر للعينة النسيجية ثم توضع في حمام جديد من السائل الدارئ لمدة ٥ دقائق .

يطبق بعد ذلك الضد الأولي Primary Antibody وقد تم تحضير الملونات وتمديدها بالسائل الدارئ PBS حسب التراكيز المذكورة سابقا ، حيث يزال أولاً المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف ويطبق Primary Antibody بواسطة الممص بحيث يغطي كامل العينة
أما زمن الحضن فهو : HLA Class 1 ABC antibody (٢٠ دقيقة)
Proteasome 20S LMP2 antibody (٢٠ دقيقة)
TAP1 antibody (ساعة واحدة)
Anti CD8 (٣٠ دقيقة)

تغسل السلايدات بعدها بالمحلول الدارئ وتوضع في حوض من السائل الدارئ لمدة ٥ دقائق .

يتم بعدها تطبيق HRP- RABBIT/MOUSE بحيث يزال المحلول الدارئ الزائد حول العينة بلطف وتطبق المادة فوق العينة بحيث تغطي كاملها وتترك لمدة ٢٠ دقيقة ثم تغسل السلايدات بالمحلول الدارئ وتوضع لمدة ٥ دقائق في حمام من السائل الدارئ .

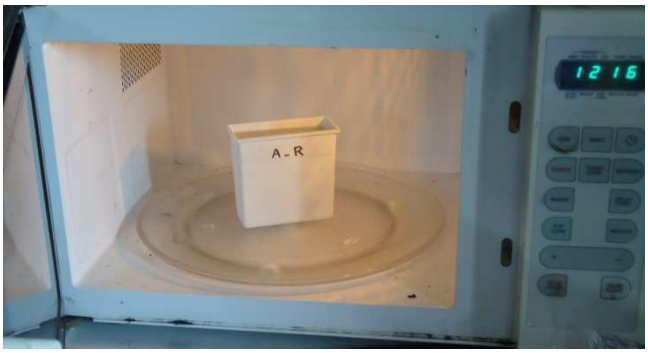
يلي ذلك تطبيق DAB والذي تم تحضيره حسب توصيات الشركة المنتجة (١مل من SUBSTRATE BUFFER مقابل ٢٠ ميكرون من DAB+ CHROMOGEN) مع المزج الجيد ضمن عبوة مناسبة ، تطبق المادة بواسطة الممص بحيث تغطي العينة وتترك لمدة ٥ دقائق ثم تغسل السلايدات بعدها بالماء بلطف

يطبق الهيماتوكسيلين على العينات لمدة حوالي ٣٠ ثانية ثم تغسل بالماء وتمرر السلايدات في النهاية بحمامات متتالية من الكحول ٧٠% و٩٥% ثم كحول مطلق (كل حمام لمدة ٣ دقائق) ثم حمامين من الكزيلول (٣-٥ دقائق لكل واحد) وتستر ببلسم كندا لتصبح جاهزة للدراسة المناعية .





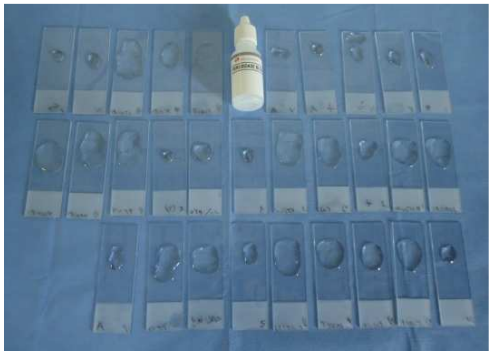
الشكل (١٨) يوضح حمامات الكزيلول والكحول



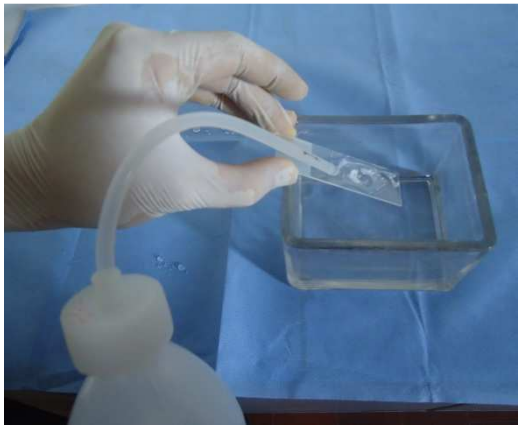
الشكل (١٩) يوضح عملية استرجاع المستضد بواسطة الميكروويف



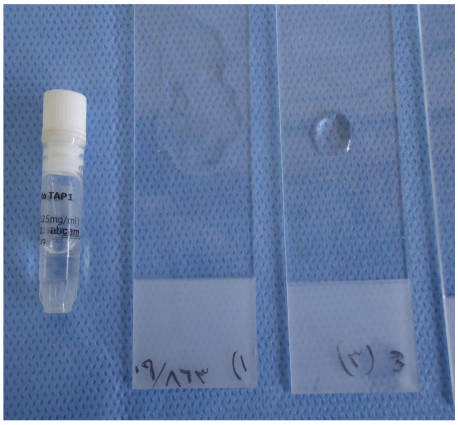
الشكل (٢٠) يوضح السلات المستخدمة في مراحل التلوين المناعي



الشكل (٢١) تطبيق Peroxide block

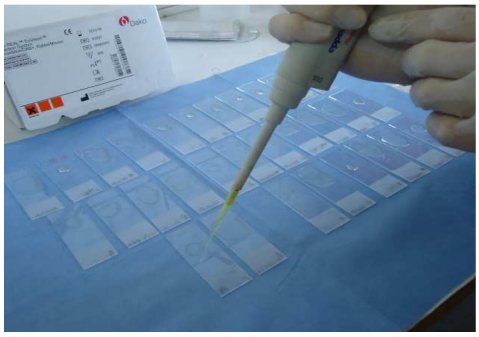


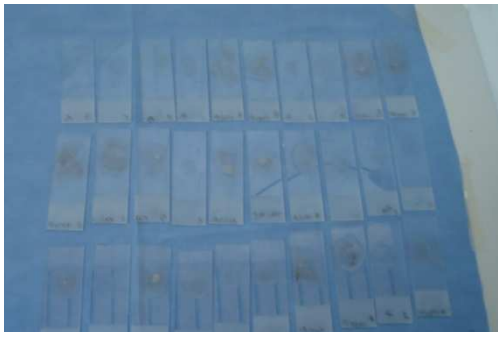
الشكل (٢٢) يوضح غسل الشرائح بواسطة المحلول الدارئ





الشكل (٢٣) تطبيق الضد الأولي على العينات النسيجية





الشكل (٢٤) تطبيق HRP على العينات النسيجية

الشكل (٢٥) تطبيق DAB على العينات

٢-٣-٤ طريقة عد الخلايا :

بالنسبة للملونات HLA- I / LMP2 / TAP1 فقد تم عد الخلايا الورمية في أربع ساحات عشوائية تحت التكبير القوي 10× 40 (عبرعد الخلايا الورمية بالكامل ومن ثم عد الخلايا ذات التعبيرية)

بحيث تم عد الخلايا ذات التعبيرية الغشائية فقط بالنسبة لضد HLA- I والسيتوبلاسمية بالنسبة لضد TAP1 وذات التعبيرية السيتوبلاسمية والنووية بالنسبة لضد LMP2 .

أما فيما يتعلق بـضد CD8 فقد تم عد الخلايا (اللمفاويات التائية السامة) ذات التعبيرية الغشائية في ١٠ ساحات عشوائية تحت التكبير القوي 10×40 بحيث تضمن العد في كل ساحة :

- الخلايا ذات التعبيرية CD8 حول الجزر الورمية (Peritumoral) / في النسيج الضام
- الخلايا ذات التعبيرية CD8 داخل الجزر الورمية (intratumoral) / في النسيج البشروي .

٤-٢ التحليل الإحصائي :

تم استخدام اختبار ستيودنت للمقارنة بين تعبيرية الملونات المناعية HLA- I و CD8 و LMP2 و TAP1 في العينة الشاهدة وعينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي .

واستخدم اختبار One- Way ANOVA للمقارنة بين تعبيرية الملونات المناعية HLA- I و CD8 و LMP2 و TAP1 بين الدرجات الثلاث من السرطان شائك الخلايا الفموي .

ولدراسة العلاقة بين HLA- I و CD8 تم استخدام ارتباط بيرسون .

وقد عولجت هذه البيانات باستخدام برنامج SPSS.V 19 .

الباب الثالث : النتائج والدراسة الإحصائية

Results and Statistical Study

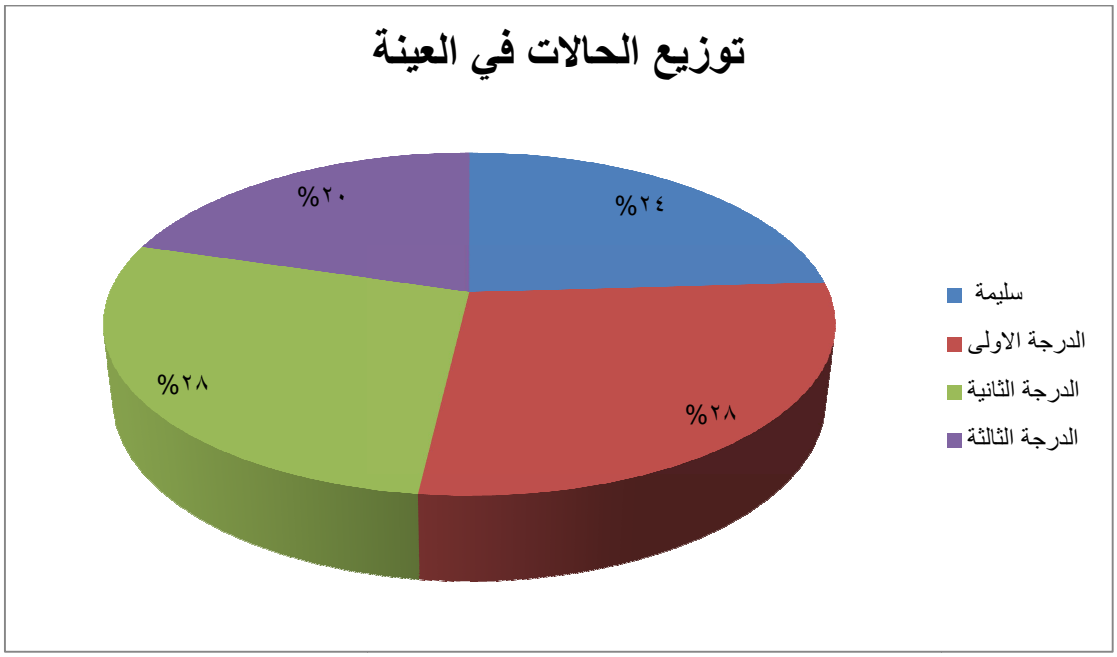
٣-١ وصف العينة :

تألفت عينة البحث من ٥٤ حالة مقسمة على النحو التالي :

٤١ عينة سرطان شائك الخلايا الفموي

- ١٥ عينة سرطان شائك خلايا فموي من الدرجة الأولى
- ١٥ عينة من الدرجة الثانية
- ١١ عينة من الدرجة الثالثة

١٣ عينة سليمة شاهدة .



الشكل (٢٦) يوضح توزيع الحالات في عينة الدراسة

٣-٢ الإحصاء الوصفي :

وضعنا المتغيرات التالية بهدف الحصول على بيانات للدراسة :

- HLA1- Per : يمثل النسبة المئوية لعدد الخلايا الورمية التي تلونت باستخدام الملون HLA-1 إلى عدد الخلايا الورمية الكلي في الحالة الواحدة .
- LMP2 - Per : يمثل النسبة المئوية لعدد الخلايا الورمية التي تلونت باستخدام الملون LMP2 إلى عدد الخلايا الورمية الكلي في الحالة الواحدة .
- CD8 - All : يمثل عدد الخلايا الكلي التي تلونت بالملون CD8 في الحالة الواحدة .
- CD8 Peri : يمثل عدد الخلايا التي تلونت بالملون CD8 في النسيج الضام / حول الجزر الورمية .
- CD8 Intra : يمثل عدد الخلايا التي تلونت بالملون CD8 في النسيج البشروي / داخل الجزر الورمية .
- TAP1 - Per : يمثل النسبة المئوية لعدد الخلايا الورمية التي تلونت باستخدام الملون TAP1 إلى عدد الخلايا الورمية الكلي في الحالة الواحدة .

ويمكن تلخيص وصف هذه المتغيرات إحصائياً في كامل العينة بالجدول التالي :

المتغير	المتوسط	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
HLA1-Per	0.421	0.264	0.03	0.92
LMP2_Per	0.452	0.266	0.03	0.95
CD8_All	470.20	403.559	3	1249
CD8- Peri	400.83	346.81	2	1045
CD8- Intra	69.37	86.43	1	441
TAP1_Per	0.546	0.214	0.05	0.84

الجدول (٢) يظهر المتوسط والانحراف المعياري لكامل العينة

٣-٣ الاختبار الإحصائي :

قمنا بدراسة البيانات باستخدام برنامج SPSS v.19 ، ووجدنا حسب العينة المدروسة ما يلي :

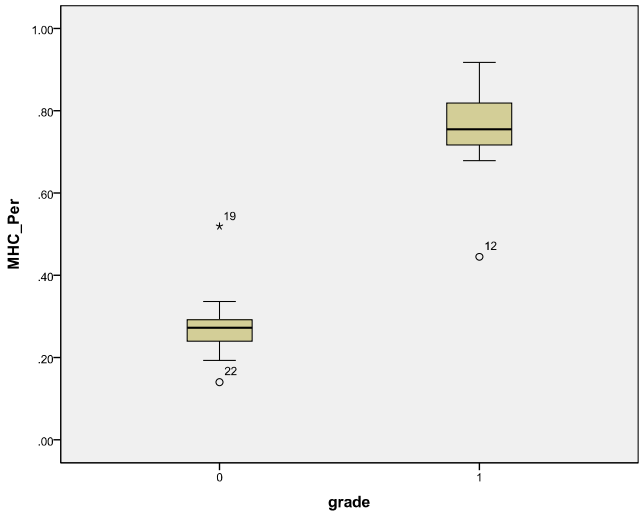
٣-٣-١: دراسة تعبيرية ا -HLA :

يوضح الجدول التالي الخصائص الإحصائية الوصفية لمعقد التوافق النسيجي ا -HLA

HLA1-per	متوسط النسب	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
العينة الشاهدة	27%	0.0887	0.14	0.52
Grade1	75%	0.1129	0.45	0.92
Grade2	44%	0.123	0.16	0.65
Grade3	9%	0.0796	0.03	0.30

الجدول (٣) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية في ا -HLA

- **دراسة الفروق في تعبيرية ا -HLA بين العينة الشاهدة و الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي :**



الشكل (٢٧) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير HLA1 Per

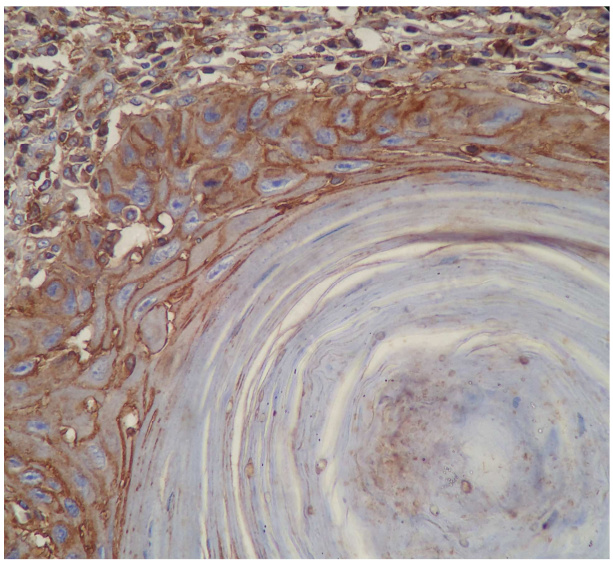
يظهر المخطط الصندوقي وجود فروق في تعبيرية ا -HLA بين العينة الشاهدة و عينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا .

ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار ستيودنت (student) لعينتين مستقلتين و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

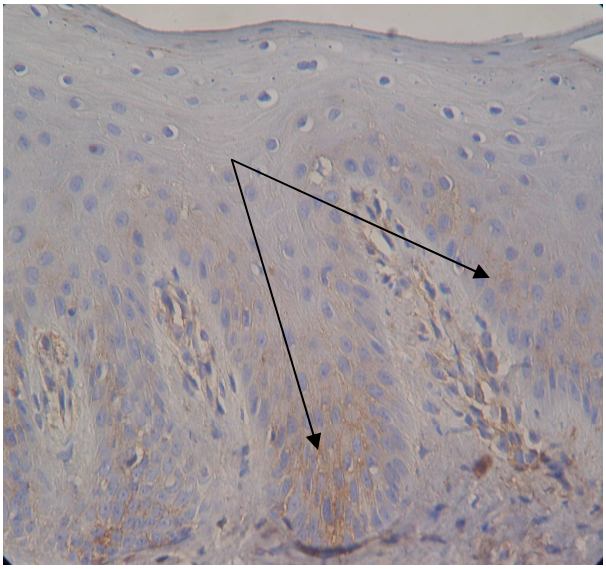
المتغير	قيمة احصاءة الاختبار T	معنوية الاختبار P	دلالة المعنوية
HLA1 - Per	12.367	0.00	توجد فروق

الجدول (٤) يظهر قيمة اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار

يبين الجدول أعلاه أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية بروتين ا -HLA بين العينة الشاهدة وعينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي . ونلاحظ أن عينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي سجلت تعبيرية أعلى من العينة الشاهدة التي اقتصرت فيها التعبيرية الغشائية لمعقد التوافق النسيجي على الطبقات القاعدية فقط من البشرة المبطنة .

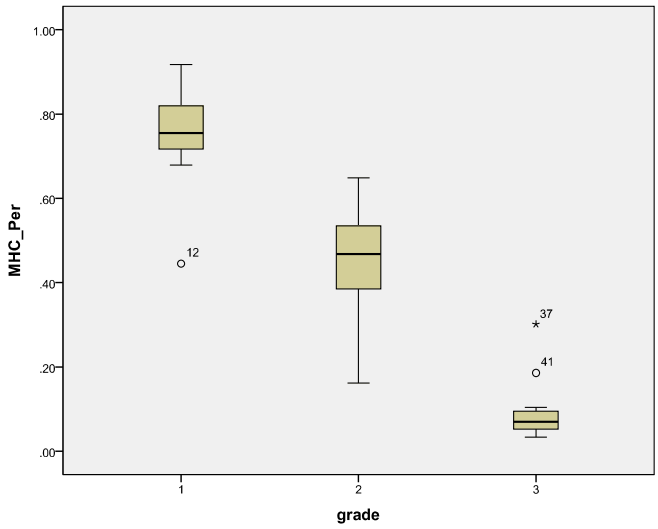


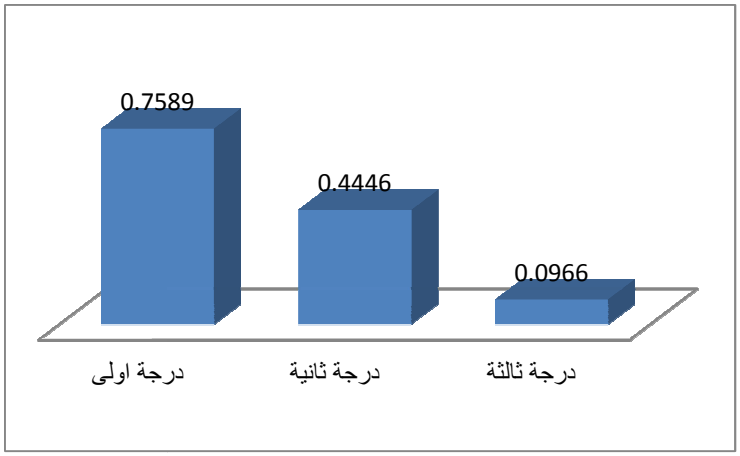
الشكل (٢٨) يوضح التلوين المناعي ا -HLA في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ التعبيرية الغشائية المرتفعة



الشكل (٢٩) يوضح التلوين المناعي لـ HLA- I في العينة الشاهدة / تلون الطبقات القاعدية فقط من البشرة المبطنة

- **دراسة الفروق في تعبيرية HLA- I بين الدرجات الثلاث من السرطان شائك الخلايا الفموي :**





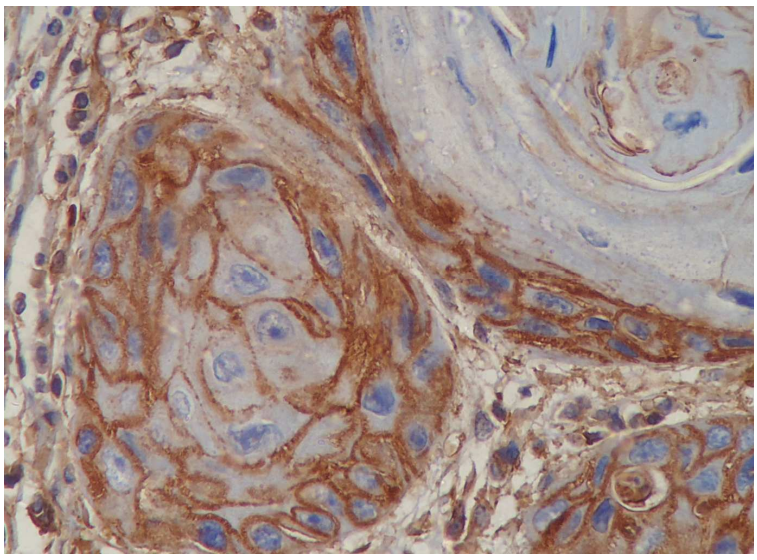
الشكل (٣٠) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير HLA1 Per

يظهرالمخطط الصندوقي وجود فروق في HLA- ا بين درجات الإصابة الثلاث للسرطان شائك الخلايا الفموي ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه (One-Way ANOVA)، و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

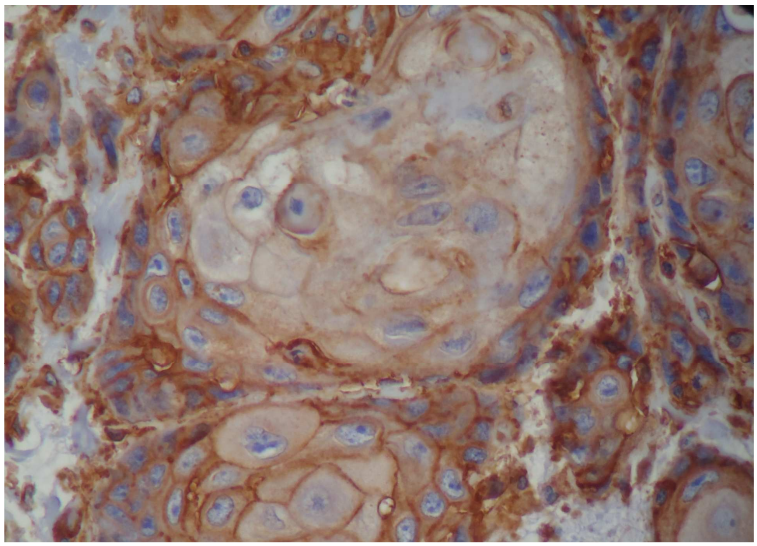
المتغير	قيمة احصاءة الاختبارF	معنوية الاختبار P	دلالة المعنوية
HLA1 - Per	116.910	0.00	توجد فروق

الجدول (٥) يظهر قيمة اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار

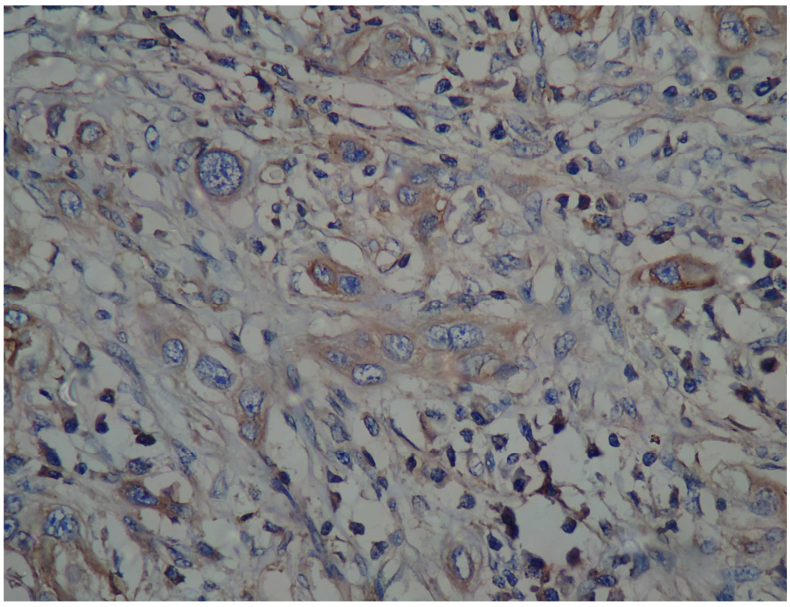
يبين الجدول أعلاه أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية HLA- ا بين درجات الإصابة الثلاث ، ونلاحظ أنه كلما زادت الدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي تتناقص تعبيرية HLA- ا .



الشكل (٣١) يوضح التلوين المناعي HLA- ا في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي



الشكل (٣٢) يوضح التلوين المناعي لـ HLA- I في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ التعبيرية الغشائية المتوسطة



الشكل (٣٣) يوضح التلوين المناعي لـ HLA- I في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ التعبيرية الغشائية المنخفضة

٣-٣-٢ دراسة تعبيرية CD8 :

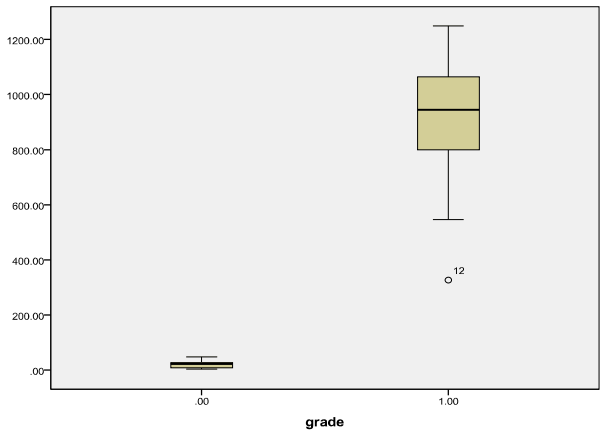
شملت دراستنا لتعبيرية CD8 كلاً من : CD8-all والتي تمثل تعبيرية اللمفاويات التائية السامة بالكامل و CD8- peri وتمثل تعبيرية اللمفاويات حول الجزر الورمية (في النسيج الضام) و CD8- intra وتمثل تعبيرية اللمفاويات داخل الجزر الورمية(في النسيج البشروي)

يوضح الجدول التالي الخصائص الإحصائية الوصفية في CD8- All

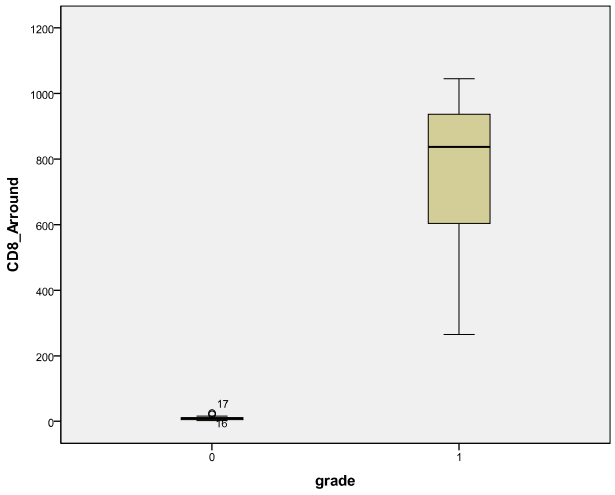
CD8–all	المتوسط	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
العينة الشاهدة	21.38	12.96	3	48
Grade1	907.13	251.44	327	1249
Grade2	626.8	263.73	221	1136
Grade3	191.27	80.474	68	337

الجدول (٦) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية في CD8

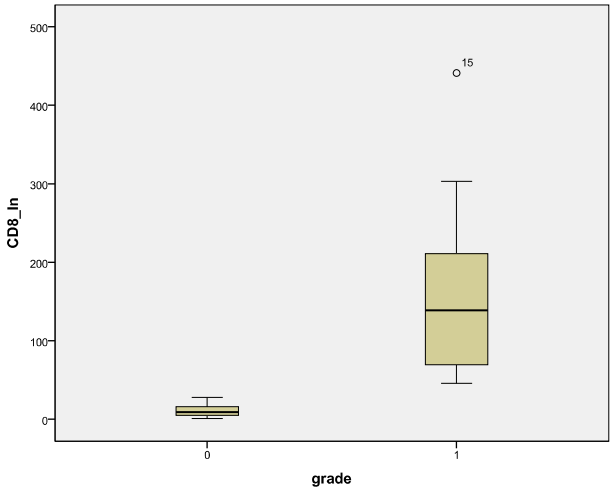
- **دراسة الفروق في تعبيرية CD8 بين العينة الشاهدة و الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي :**



الشكل (٣٤) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير CD8_All



الشكل (٣٥) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير CD8_Peri



الشكل (٣٦) يوضح الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير CD8_Intra

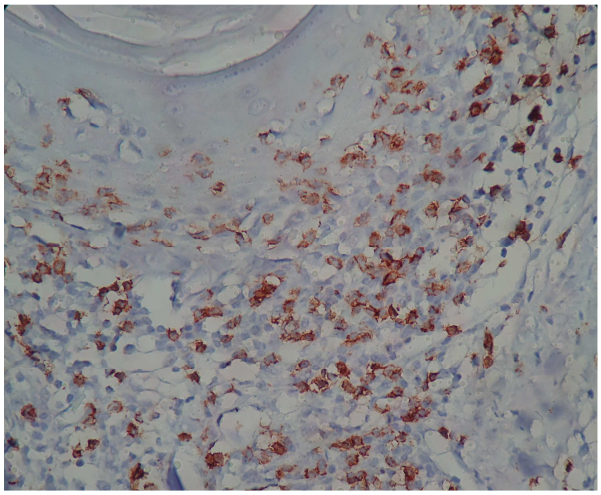
يبدو من المخططات الصندوقية أعلاه وجود فروق في تعبيرية CD8 بين العينة الشاهدة و عينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار ستيودنت (student) لعينتين مستقلتين ، و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

المتغير	قيمة احصاءة الاختبار T	معنوية الاختبار p	دلالة المعنوية
CD8_All	13.623	0.00	توجد فروق
CD8 - Peri	11.969	0.00	توجد فروق
CD8 - Intra	5.165	0.00	توجد فروق

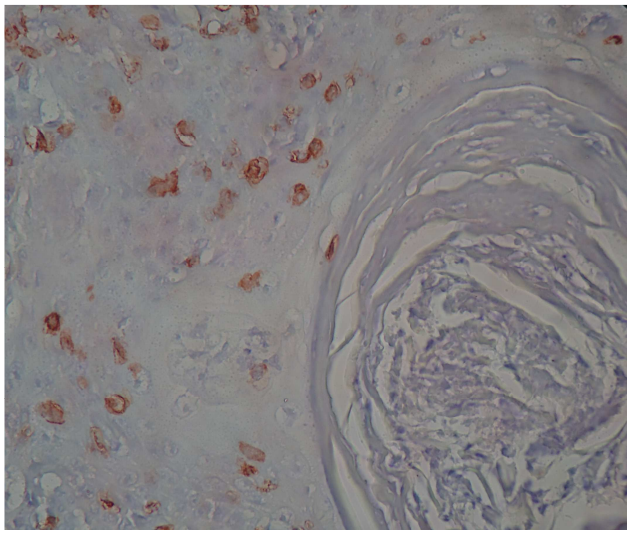
الجدول (٧) يظهر قيم اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار

يبين الجدول أعلاه أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية CD8 بين العينة الشاهدة وعينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا .

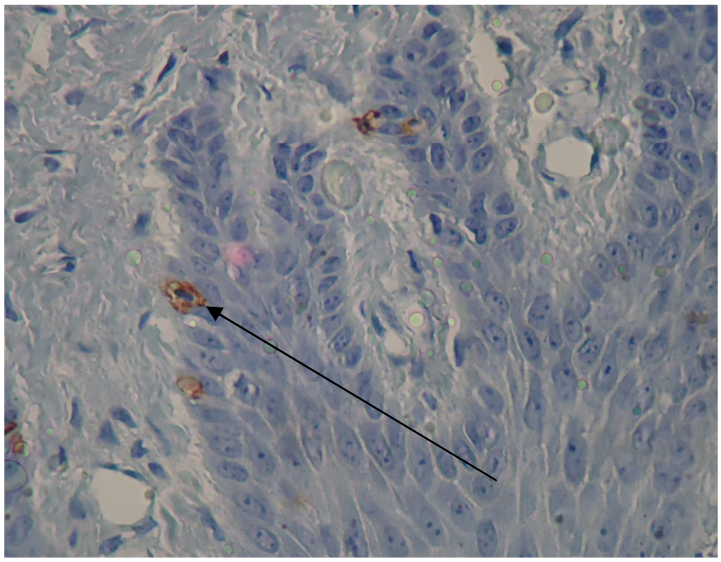
ونلاحظ أن عينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي سجلت تعبيرية أعلى من العينة الشاهدة في كل من المتغيرات (CD8 (all- peri- intra . أي أنه في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي زادت كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 عن كثافتها في الحالة الطبيعية .



الشكل (٣٧) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي / الارتشاح اللمفي حول الجزر الورمية Peritumoral

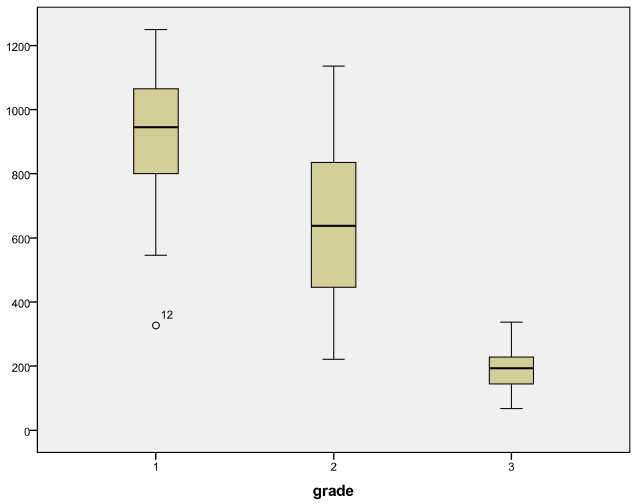


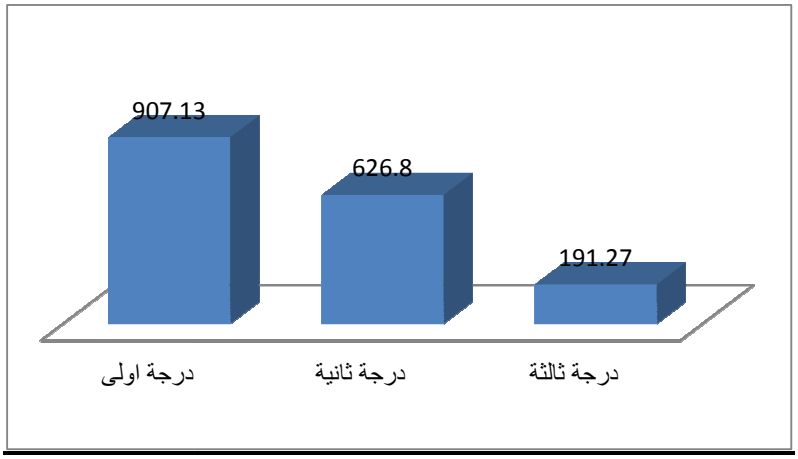
الشكل (٣٨) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي /الارتشاح اللمفي داخل الجزر الورمية Intratumoral



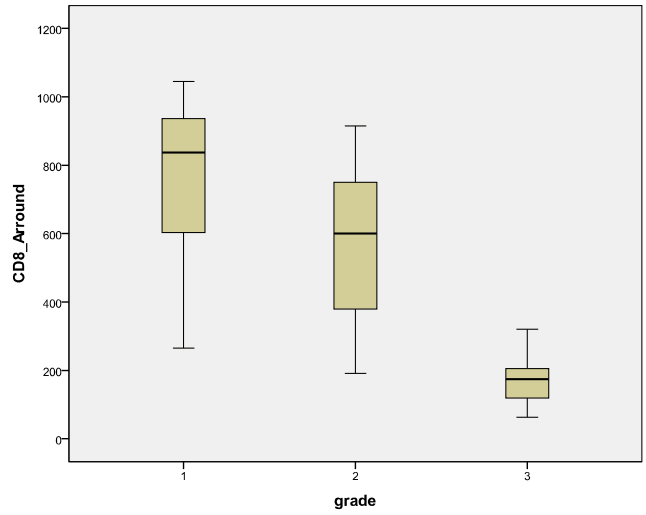
الشكل (٣٩) يوضح التلوين المناعي CD8 في العينة الشاهدة / نلاحظ بعض اللمفاويات التائية السامة في البشرة المبطنة

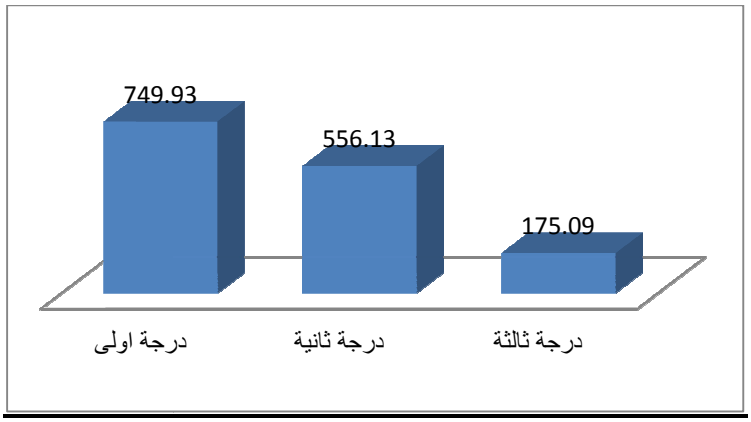
- **دراسة الفروق في تعبيرية CD8 بين الدرجات الثلاث من السرطان شائك الخلايا الفموي :**



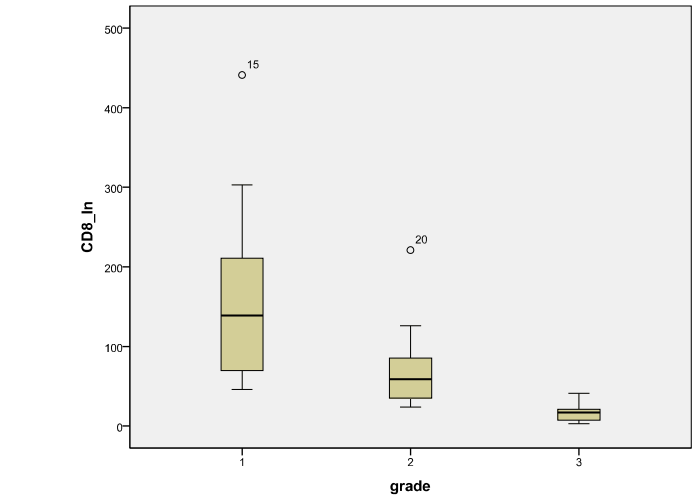


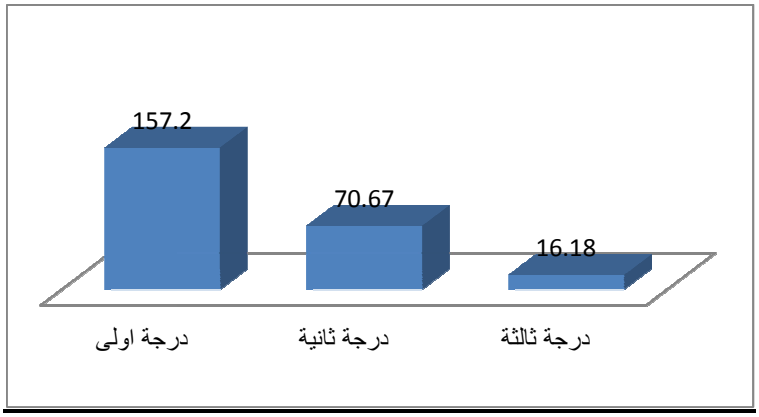
الشكل (٤٠) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير CD8_All





الشكل (٤١) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير CD8 Peri





الشكل (٤٢) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير CD8 Intra

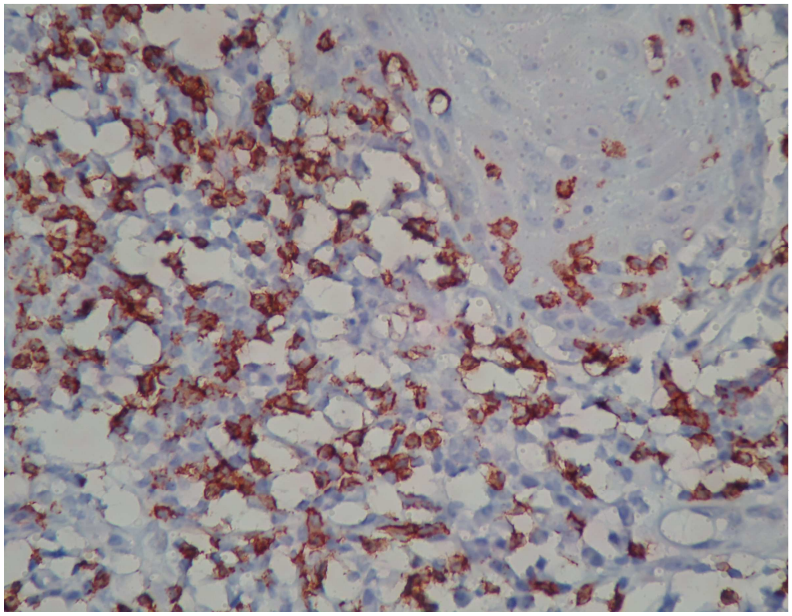
تظهر المخططات الصندوقية وجود فروق بين متوسطات المتغيرات المدروسة في درجات الإصابة الثلاث للسرطان شائك الخلايا الفموي ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه (One-Way ANOVA) لكل من المتغيرات ، و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

المتغير	قيمة احصاءة الاختبارF	معنوية الاختبار p	دلالة المعنوية
CD8_All	32.170	0.00	توجد فروق
CD8 - Peri	24.622	0.00	توجد فروق
CD8 - Intra	12.358	0.00	توجد فروق

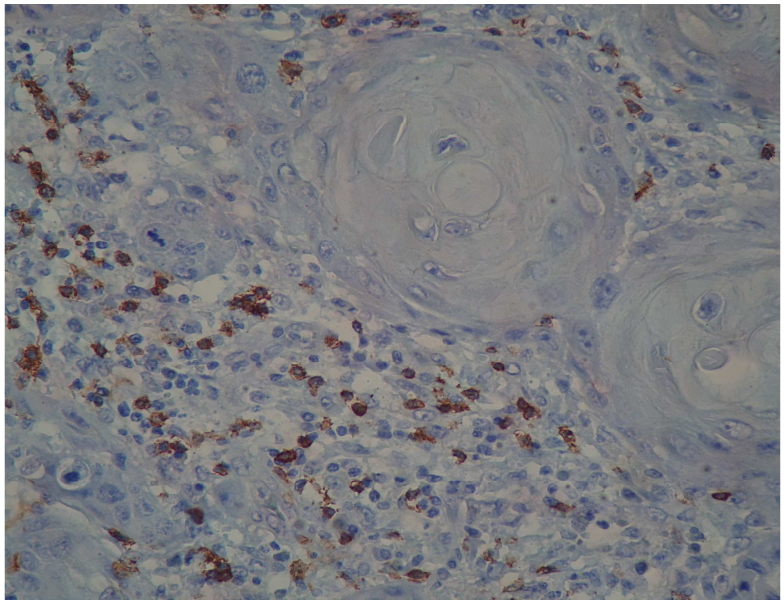
الجدول (٨) يظهر قيم اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار

يبين الجدول أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية بروتين CD8 بين درجات الإصابة الثلاث ، ونلاحظ أن قيم جميع المتغيرات تتناقص بزيادة درجة الخباثة .

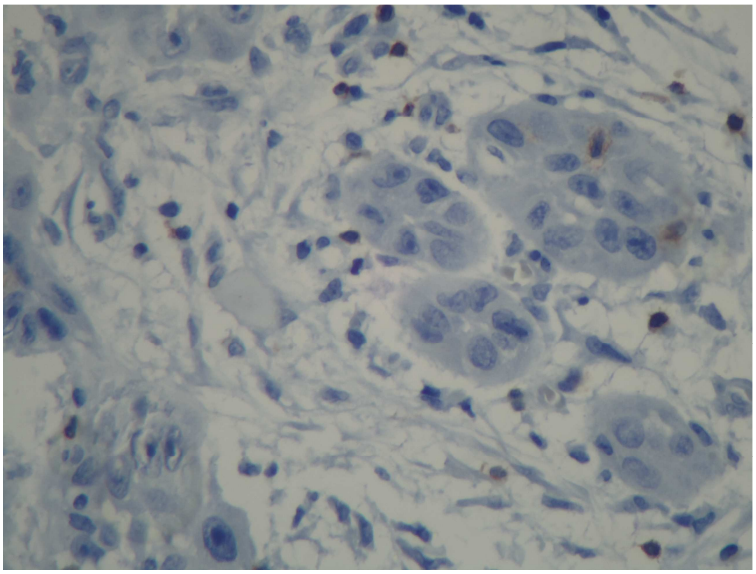
وبالتالي تكون كثافة اللمفاويات التائية السامة مرتفعة في الدرجة الأولى ولكنها تنخفض في الدرجة النسيجية الثانية والثالثة .



الشكل (٤٣) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي



الشكل (٤٤) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي



الشكل (٤٥) يوضح التلوين المناعي CD8 في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي

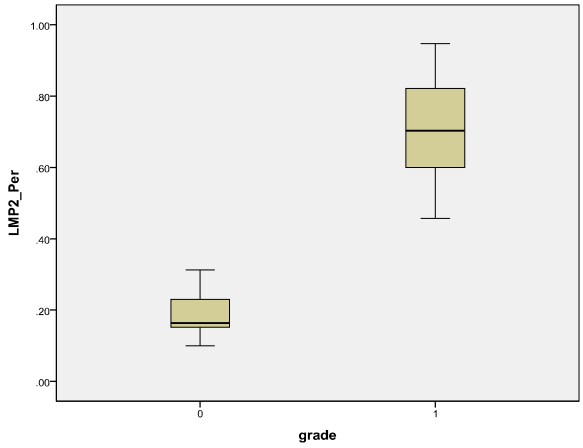
٣-٣-٣ دراسة تعبيرية LMP2 :

يظهر الجدول الخصائص الإحصائية الوصفية في LMP2

LMP2-per	متوسط النسب	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
العينة الشاهدة	19%	0.065	0.10	0.31
Grade1	72%	0.145	0.46	0.95
Grade2	52%	0.157	0.21	0.81
Grade3	29%	0.257	0.03	0.75

الجدول (٩) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية في LMP2

- **دراسة الفروق في تعبيرية LMP2 بين العينة الشاهدة و الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي :**



الشكل (٤٦) الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير LMP2_Per

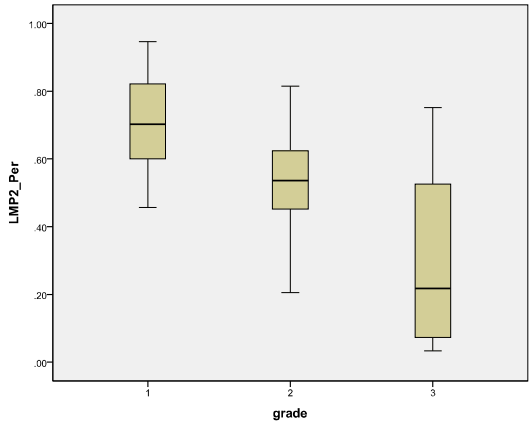
يظهر من المخطط الصندوقي وجود فروق في تعبيرية LMP2 بين العينة الشاهدة و عينة الدرجة الأولى من السرطان ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائيا نستخدم اختبار ستيودنت (student) لعينتين مستقلتين و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

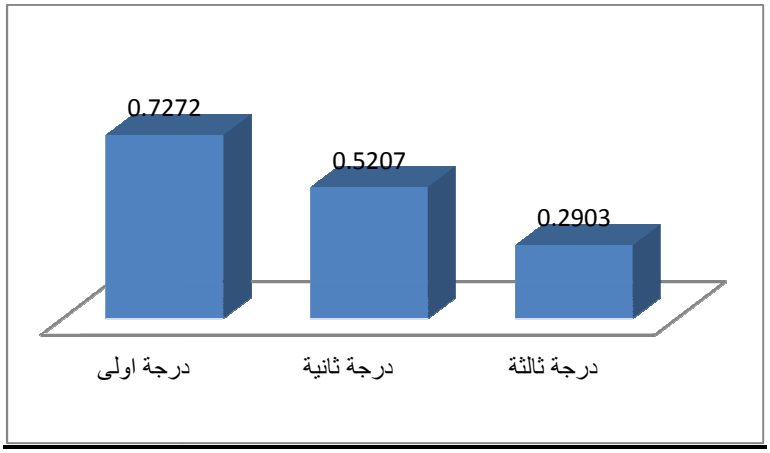
المتغير	قيمة احصاءة الاختبار T	معنوية الاختبار P	دلالة المعنوية
LMP2 – Per	12.917	0.00	توجد فروق

الجدول (١٠) يظهر قيم اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار

يبين الجدول أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية بروتين LMP2 بين العينة الشاهدة و عينة الدرجة الأولى من السرطان والتي سجلت تعبيرية أعلى من العينة الشاهدة .

- **دراسة الفروق في تعبيرية LMP2 بين الدرجات الثلاث من السرطان شائك الخلايا الفموي :**





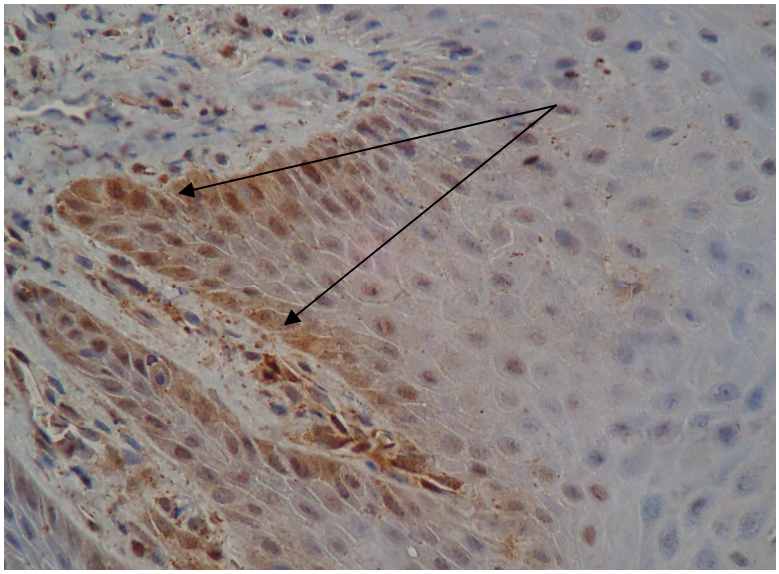
الشكل (٤٧) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير LMP2_Per

يظهر المخطط الصندوقي وجود فروق في تعبيرية LMP2 بين درجات الإصابة الثلاث للسرطان شائك الخلايا الفموي ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه (One-Way ANOVA) ، و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

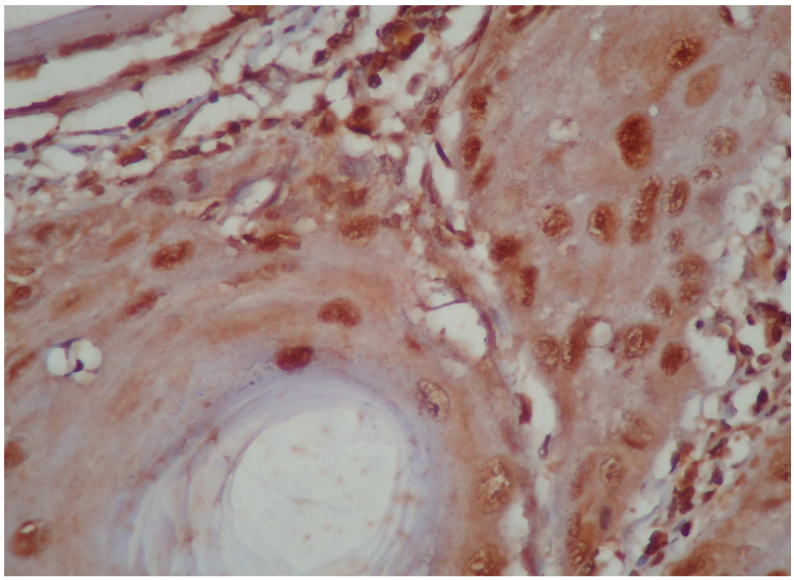
المتغير	قيمة احصاءة الاختبارF	معنوية الاختبار	دلالة المعنوية
LMP2_Per	17.735	0.00	توجد فروق

الجدول (١١) يظهر قيم اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار

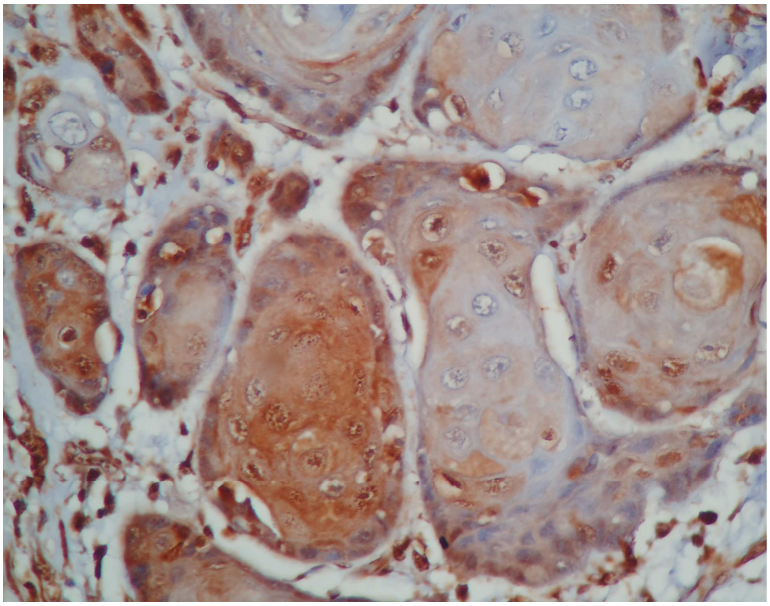
يبين الجدول أعلاه أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية بروتين LMP2 بين درجات الإصابة الثلاث، حيث نلاحظ أن تعبيرية LMP2 السيتوبلاسمية والنووية تكون مرتفعة في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي ومع زيادة الخباثة النسيجية تنخفض هذه التعبيرية .



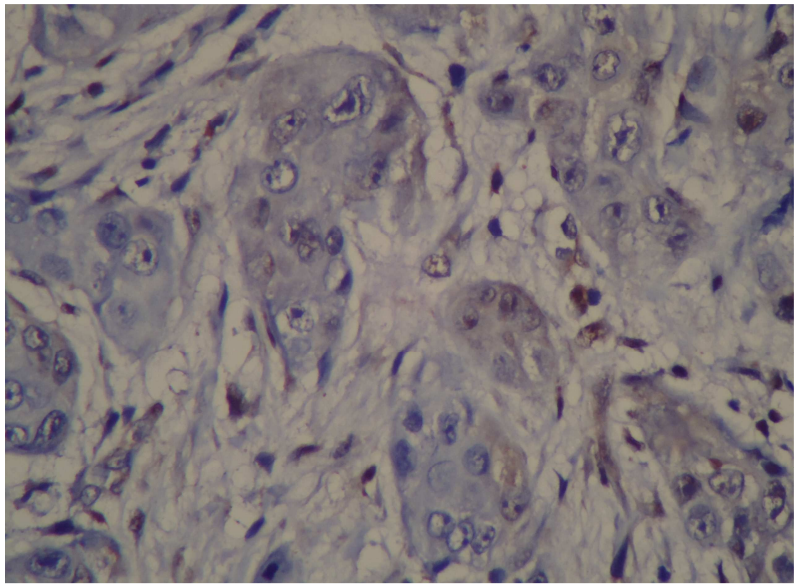
الشكل (٤٨) التلوين المناعي LMP2 في العينة الشاهدة / نلاحظ التلون السيتوبلاسمي والنووي في الطبقات القاعدية فقط من البشرة المبطنة .



الشكل (٤٩) يوضح التلوين المناعي LMP2 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ التعبيرية المرتفعة .



الشكل (٥٠) يوضح التلوين المناعي LMP2 في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي / انخفاض التعبيرية السيتوبلاسمية والنووية



الشكل (٥١) يوضح التلوين المناعي LMP2 في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي / نلاحظ أن التعبيرية في الدرجة الثالثة تنخفض بشكل كبير

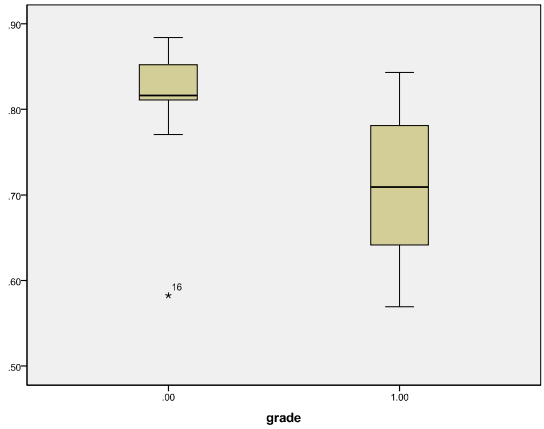
٤-٣-٣ دراسة تعبيرية TAP1 :

يظهر الجدول التالي الخصائص الإحصائية الوصفية في TAP1

TAP1-per	متوسط النسب	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
العينة الشاهدة	81%	0.041	0.52	0.68
Grade1	71%	0.092	0.57	0.84
Grade2	56%	0.139	0.29	0.82
Grade3	22%	0.20	0.05	0.77

الجدول(١٢) يبين الخصائص الإحصائية الوصفية في TAP1

- **دراسة الفروق في تعبيرية TAP1 بين العينة الشاهدة و الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي :**



الشكل (٥٢) الفروق في التعبيرية بين العينة الشاهدة والإصابة من الدرجة الأولى للمتغير TAP1_Per

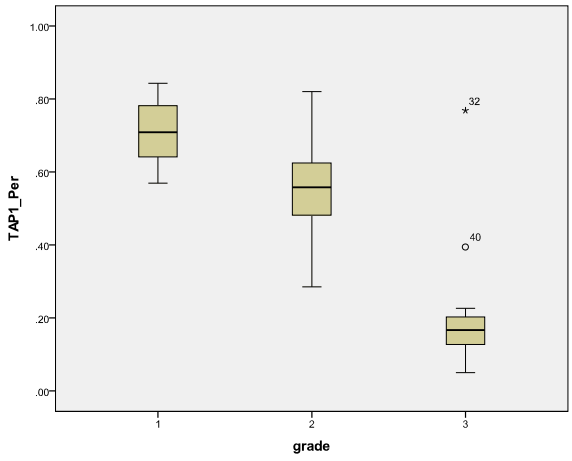
يظهر من المخطط الصندوقي وجود فروق بين العينة الشاهدة و عينة الدرجة الأولى من السرطان في TAP1 ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار ستيودنت (student) لعينتين مستقلتين ، و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

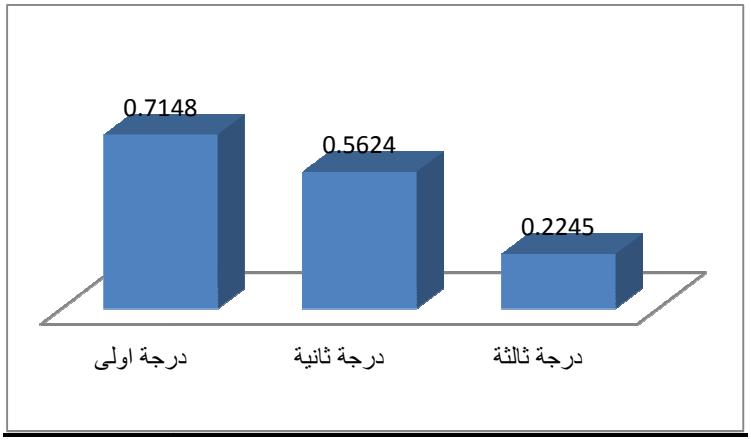
المتغير	قيمة احصاءة الاختبار T	معنوية الاختبار P	دلالة المعنوية
TAP1 – Per	2.989	0.006	توجد فروق

الجدول (١٣) يظهر قيم اختبار ستيودنت ومعنوية هذا الاختبار

يبين الجدول أعلاه أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية TAP1 بين العينة الشاهدة و عينة الدرجة الأولى من السرطان ، ونلاحظ أن العينة الشاهدة سجلت تعبيرية أعلى من عينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي .

- **دراسة الفروق في تعبيرية TAP1 بين الدرجات الثلاث من السرطان شائك الخلايا الفموي :**





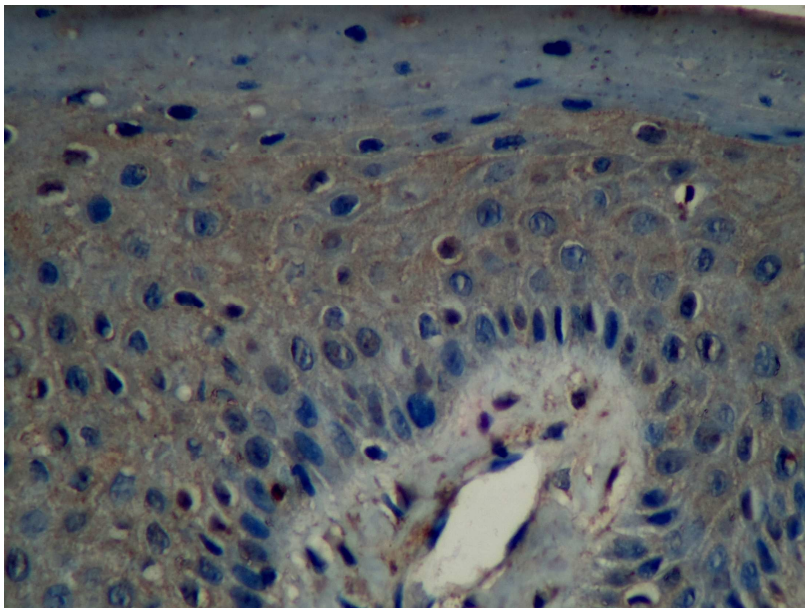
الشكل (٥٣) يوضح الفروق في التعبيرية بين درجات الإصابة الثلاث للمتغير TAP1_Per

يظهر المخطط الصندوقي وجود فروق بين متوسطات TAP1 في درجات الإصابة الثلاث للسرطان شائك الخلايا الفموي ، ولدراسة هذه العلاقة إحصائياً نستخدم اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه (One-Way ANOVA) و يلخص الجدول التالي نتائج هذا الاختبار :

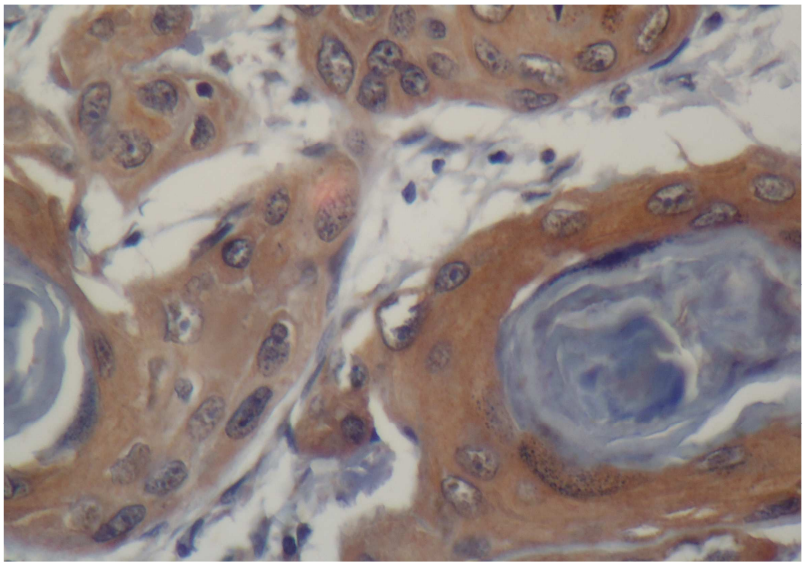
المتغير	قيمة احصاءة الاختبارF	معنوية الاختبار	دلالة المعنوية
TAP1_Per	37.174	0.00	توجد فروق

الجدول (١٤) يظهر قيم اختبار تحليل التباين ومعنوية هذا الاختبار

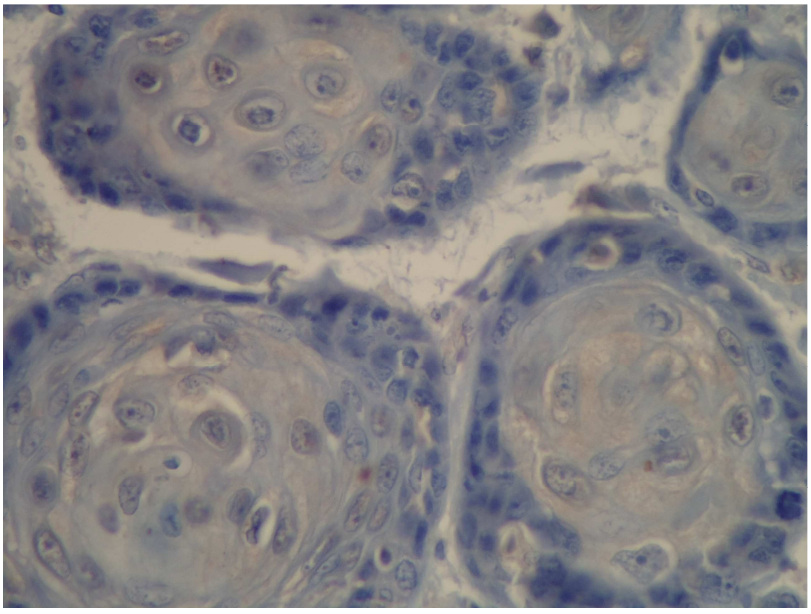
يبين الجدول أعلاه أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من القيمة 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95 % توجد فروق دالة إحصائياً في تعبيرية TAP1 بين درجات الإصابة الثلاث ، ونلاحظ أن القيمة تتناقص بزيادة درجة الخباثة أي أنه كلما زادت الدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي تتناقص التعبيرية السيتوبلاسمية لبروتين TAP1 .



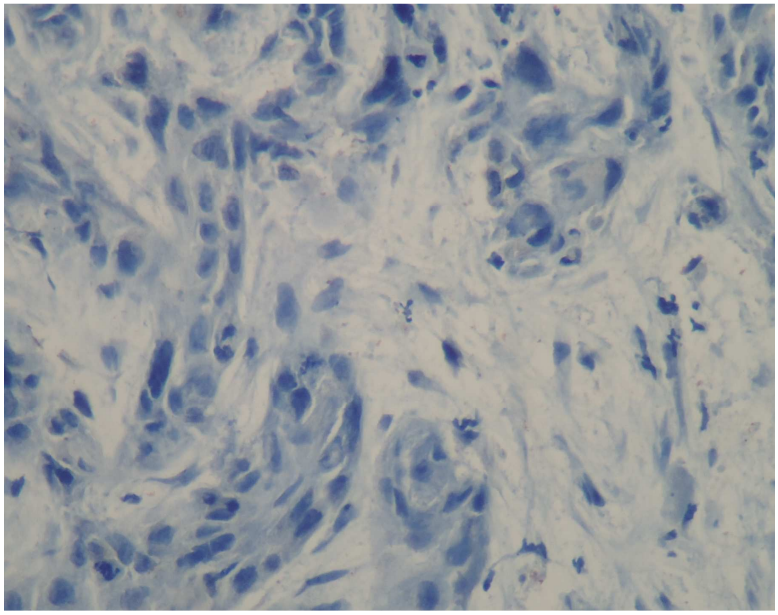
الشكل (٥٤) التلوين المناعي TAP1 للعينة الشاهدة/ نلاحظ التعبيرية السيتوبلاسمية المرتفعة والتي تشمل الطبقة القاعدية والطبقات الشائكة



الشكل (٥٥) يوضح التلوين المناعي TAP1 في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي/ ونلاحظ التعبيرية السيتوبلاسمية المرتفعة في الخلايا الورمية



الشكل (٥٦) يوضح التلوين المناعي TAP1 في الدرجة الثانية من السرطان شائك الخلايا الفموي / انخفاض التعبيرية السيتوبلاسمية



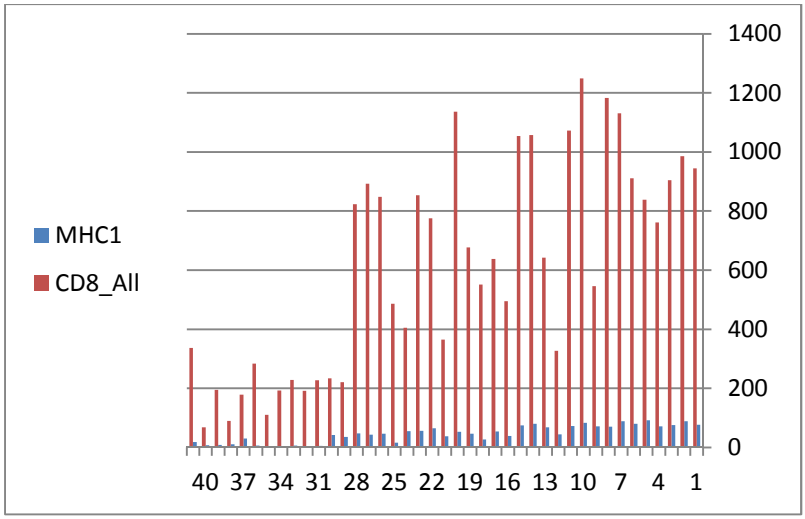
الشكل (٥٧) يوضح التلوين المناعي TAP1 في الدرجة الثالثة من السرطان شائك الخلايا الفموي /
نلاحظ انخفاض شديد في التعبيرية السيتوبلاسمية .

٣-٣-٥ : دراسة العلاقة بين HLA- ا و CD8 :

قمنا بدراسة العلاقة بين HLA1- Per و CD8 all والعلاقة بين HLA1- Per و CD8 (Intratumoral) .

❖ العلاقة بين HLA1- Per و CD8- All :

لدراسة وجود علاقة ما بين المتغيرين نبحث عن وجود ارتباط باستخدام ارتباط بيرسون Pearson ، يبين الجدول ملخصا للنتائج التي حصلنا عليها والذي يعطي قيمة معامل ارتباط بيرسون ، ومعنوية هذا المعامل باختبار ستيودنت بذيلين ، كما يلي :



الشكل (٥٨) يوضح العلاقة بين HLA1 و CD8-All

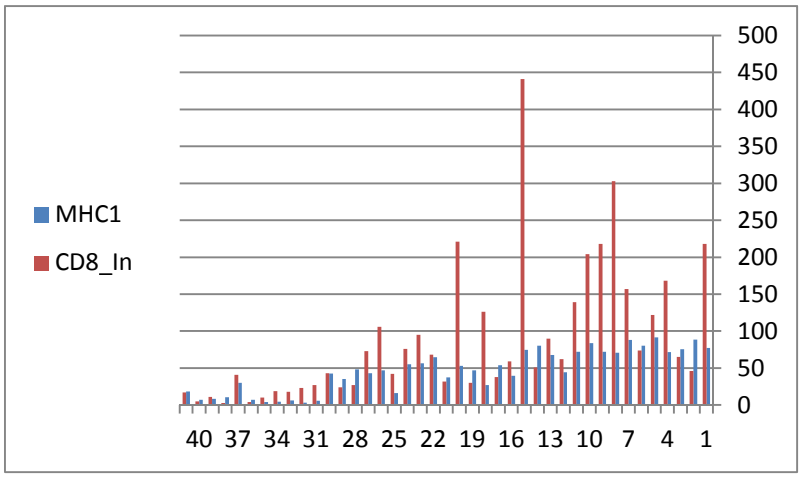
المتغير	قيمة معامل ارتباط بيرسون	معنوية اختبار ستيودنت	دلالة المعنوية	وصف الارتباط
كامل العينة	0.850	0.00	يوجد ارتباط	موجب ، قوي

الجدول (١٥) يظهر قيمة معامل الارتباط بيرسون بين HLA- ا و CD8-All

يبين الجدول أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95% يوجد ارتباط بين HLA- ا و CD8- all ونلاحظ أن الارتباط بين المتغيرين قوي و موجب ، هذا يعني أن زيادة تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- ا تترافق مع زيادة في كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 الموجودة في منطقة الإصابة الورمية .

❖ العلاقة بين HLA1- Per و CD8- Intra :

لدراسة وجود علاقة ما بين المتغيرين نبحث عن وجود ارتباط باستخدام ارتباط بيرسون Pearson ، حيث يبين الجدول ملخصا للنتائج التي حصلنا عليها والذي يعطي قيمة معامل ارتباط بيرسون ، ومعنوية هذا المعامل باختبار ستيودنت بذيلين ، كما يلي :



الشكل (٥٩) يوضح العلاقة بين HLA1 و CD8-Intra

المتغير	قيمة معامل ارتباط بيرسون	معنوية اختبار ستيودنت	دلالة المعنوية	وصف الارتباط
كامل العينة	0.595	0.00	يوجد ارتباط	موجب ، متوسط القوة

الجدول (١٦) يظهر قيمة معامل الارتباط بيرسون بين HLA- I و CD8-Intra

يبين الجدول أن قيمة معنوية الاختبار أصغر من 0,05 أي أنه عند مستوى الثقة 95% يوجد ارتباط بين HLA- I و CD8- intra ونلاحظ أن الارتباط بين المتغيرين متوسط القوة و موجب ، وهذا يدل على أن زيادة تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I في الخلايا الورمية يترافق مع زيادة كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 الموجودة داخل الجزر الورمية (في النسيج البشروي) .

الباب الرابع : المناقشة

Discussion

تملك الخلايا الورمية آليات متعددة تمكنها من تجنب الاستجابة المناعية للمضيف من أهمها فقد أو انخفاض تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I وبالتالي تعطيل إشارة التحريض الأولى للمفاويات التائية السامة CD8 والتي تنشأ من تعرف هذه الخلايا على المستضدات المعروضة عبر جزيئات HLA- I ، لذلك قامت العديد من الدراسات بتحري تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I في الإصابات السرطانية المختلفة ومن ضمنها السرطان شائك الخلايا إلا أن معظم هذه الدراسات تناولت دراسة التعبيرية في العينة السرطانية ككل ومقارنتها مع العينة الشاهدة في حين قمنا في دراستنا بتحري تعبيرية HLA- I وكذلك كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 و تعبيرية الوحدة المحفزة في البروتيزوم LMP2 والناقل المرافق لتهيئة المستضد TAP1 في عينات الدرجات النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي ومقارنتها مع بعضها ومع العينة الشاهدة مما يسمح لنا بمعرفة التغير الحاصل على مستوى هذه التعبيرية .

٤-١ دراسة تعبيرية HLA- I:

قمنا في دراستنا بتحري تعبيرية HLA- I (معقد التوافق النسيجي) ودراسة الفرق في التعبيرية بين العينة الشاهدة وعينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي وكذلك الفرق في التعبيرية بين الدرجات النسيجية الثلاث للسرطان شائك الخلايا الفموي وهذا يؤمن لنا القدرة على معرفة التغير الحاصل على مستوى تعبيرية HLA- I خلال الإصابة السرطانية .

وجدنا من خلال التلوين المناعي لمعقد التوافق النسيجي في العينة الشاهدة أن تعبيرية HLA-I شملت الطبقة القاعدية والطبقات المجاورة لها فقط من البشرة المبطنة وبلغت نسبة التعبيرية فيها ٢٧% وقد يكون انخفاض التعبيرية هذا نتيجة كبح الاستجابة المناعية المفرطة المشاهد في الحفرة الفموية (التحمل الفموي) بتأثير الخلايا المنظمة والسيتوكينات TGF-β / IL-10 المفرزة حيث وجدت بعض الدراسات كدراسة Rodriguez وزملائه 2012 تأثيراً للـ IL-10 في خفض تعبيرية معقد التوافق النسيجي . (Rodriguez et al., 2012)

أما في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي فقد وجدنا زيادة في التعبيرية على مستوى HLA-I في الخلايا السرطانية حيث بلغت نسبة التعبيرية ٧٥% الأمر الذي يدل على أنه في الدرجة الأولى من الإصابة السرطانية يتوقف كبح المناعة في الحفرة الفموية و تزداد تعبيرية معقد التوافق النسيجي عن تعبيريته في البشرة الطبيعية والذي يمثل استجابة أولية للإصابة ، وقد اختلفت دراستنا مع العديد من الدراسات التي تناولت دراسة تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I في الإصابات السرطانية المختلفة كدراسة Liu وزملائه 2009 في السرطان شائك الخلايا في المري ودراسة Cathro وزملائه 2010 لسرطان المثانة التي وجدوا فيها انخفاض تعبيرية HLA- I عن تعبيريته في الحالة الطبيعية وقد يكون هذا الاختلاف بسبب ظاهرة التحمل الفموي oral tolerance في الحفرة الفموية الموجودة في الحالة الطبيعية والتي تسبب كبح المناعة و انخفاضاً في تعبيرية HLA- I حيث تقتصر التعبيرية على الطبقات القاعدية فقط من البشرة المبطنة بالإضافة إلى أن هذه الدراسات تناولت مقارنة التعبيرية بين العينة الشاهدة والعينة السرطانية بالكامل في حين قمنا في دراستنا بإجراء

المقارنة بين العينة الشاهدة والدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي لمعرفة التغير الدقيق الحاصل على مستوى تعبيرية HLA- I .

كما وجد Cruz وزملاؤه 1999 في دراستهم التي تمت فيها مقارنة البشرة الطبيعية في العينة الشاهدة مع البشرة المجاورة للجزر الورمية في حالات السرطان شائك الخلايا الفموي أن تعبيرية HLA-I في البشرة الطبيعية كانت منخفضة وشملت الطبقة القاعدية والطبقات المجاورة لها فقط في حين كانت التعبيرية في البشرة المجاورة للجزر الورمية مرتفعة وشملت الطبقة القاعدية والشائكة. (Cruz et al., 1999) كما لاحظ Ogino وزملاؤه 2003 أن تعبيرية HLA- I في السرطان شائك الخلايا للجيب الفكي تكون مرتفعة في السرطان جيد التمايز (الدرجة الأولى) ولكنها تنخفض مع زيادة درجة الخباثة النسيجية . (Ogino et al., 2003)

وفيما يتعلق بمقارنة تعبيرية HLA- I بين درجات الخباثة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي فقد وجدنا من خلال التلوين المناعي أن عينات الدرجة الأولى من السرطان كانت ذات تعبيرية مرتفعة HLA- I وبلغت نسبة التعبيرية فيها ٧٥% في حين انخفضت التعبيرية في عينات الدرجة الثانية وأصبحت التعبيرية فيها ٤٤ % أما عينات الدرجة الثالثة فكانت منخفضة التعبيرية وبنسبة ٩% ، أي أنه في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي تزداد تعبيرية HLA- I عن تعبيريته في الحالة الطبيعية ثم لا تلبث أن تنخفض مع زيادة الخباثة في الدرجة الثانية والثالثة وقد اتفقنا في دراستنا مع Liu وزملائه 2009 الذين وجدوا أن تعبيرية HLA- I في السرطان شائك الخلايا في المري مرتبطة بدرجة الخباثة النسيجية للسرطان فهي تنخفض مع زيادة الخباثة كما لاحظوا أن انخفاض تعبيرية HLA- I يترافق مع الاستعمار للعقد اللمفية وسوء الإنذار . (Liu et al., 2009)

كما اتفقنا مع Zhang وزملائه 2012 الذين وجدوا أن انخفاض تعبيرية HLA- I في السرطان شائك الخلايا في المري يزداد في الحالات منخفضة التمايز (الدرجة الثالثة) من السرطان شائك الخلايا وأنه يترافق مع سوء الإنذار . (Zhang et al., 2012) لكننا اختلفنا مع Ogino وزملائه 2006 الذين وجدوا أن تعبيرية HLA- I في السرطان شائك الخلايا في الحنجرة ذات علاقة بمعدل بقاء المرضى وكذلك بنكس الإصابة ولكنهم لم يجدوا علاقة بين التعبيرية والدرجة النسيجية للسرطان وقد يكون الاختلاف بسبب اعتمادهم على تصنيف منظمة الصحة العالمية WHO (التمايز النسيجي) في تقييمهم للدرجة النسيجية أما في دراستنا فقد أضفنا على تصنيف WHO كلاً من نمط الغزو والارتشاح الالتهابي . (Ogino et al., 2006) .

٤-٢ دراسة تعبيرية CD8 :

تعتبراللمفاويات التائية السامة CD8 هي الخلايا الرئيسية المسؤولة عن الدفاع ضد المستضدات داخل الخلوية حيث تقوم بقتل الخلايا التي تظهر مستضدات ببتيدية غريبة عبر جزيء ا - HLA كالخلايا الورمية والخلايا المصابة بالفيروس وقد قمنا في دراستنا بتحري تعبيرية CD8 وبالتالي كثافة اللمفاويات التائية السامة في كل من العينة الشاهدة والسرطانية وتضمنت هذه الدراسة تحري تعبيرية اللمفاويات التائية السامة بالكامل وكذلك اللمفاويات حول الجزر الورمية أو في النسيج الضام (CD8- peri) و اللمفاويات داخل الجزر الورمية أو في النسيج البشروي (CD8- intra) باعتبارها الخلايا ذات التأثير المباشر على الخلايا الورمية .

قمنا في البداية بمقارنة التعبيرية بين العينة الشاهدة وعينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي وقد أظهر التلوين المناعي لـ CD8 كثافة منخفضة للمفاويات التائية السامة في العينة الشاهدة سواءاً داخل البشرة المبطنة أو في النسيج الضام تحت البشرة وهذا الأمر طبيعي حيث أن العينة الشاهدة هي عينة طبيعية سليمة لا تحوي ارتشاح التهابي و إن اللمفاويات التائية السامة CD8 توجد طبيعياً بشكل أساسي داخل البشرة في المخاطيات المبطنة وتمثل خط الدفاع الأول في حين توجد اللمفاويات التائية المساعدة CD4 بشكل أساسي في الصفيحة الخاصة لمعظم المخاطيات المبطنة . (Garant, 2003) في حين وجدنا في عينات الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي زيادة في تعبيرية CD8 (زيادة في كثافة اللمفاويات التائية السامة) سواءاً حول الورمية أو داخل الورمية عن كثافتها في العينة الشاهدة وبالتالي فإنه في الدرجة الأولى من السرطان يستجيب الجسم لهذه الإصابة وتزداد كثافة اللمفاويات التائية السامة والتي تمثل الخلايا المناعية الأساسية في الدفاع ضد السرطان وتترافق هذه الزيادة مع زيادة في تعبيرية ا -HLA في الخلايا الورمية . وقد اتفقنا في دراستنا مع Zancope وزملائه 2010 الذين وجدوا أن كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 في السرطان شائك الخلايا الفموي تكون أعلى في الإصابة السرطانية عن كثافتها في الحالة الطبيعية في العينة الشاهدة سواءاً على مستوى CD8 حول الورمية (في النسيج الضام) أو داخل الورمية (البشروية). (Zancope et al., 2010)

كما قام Gannot وزملاؤه 2002 بدراسة ارتشاح الخلايا اللمفية في المخاطية الفموية وقد وجدوا أن كثافة اللمفاويات التائية السامة في حالات سوء التصنع المتوسط والشديد تكون عالية وتزيد عن كثافتها في حالات فرط التقرن وحالات سوء التصنع البسيط . (Gannot et al., 2002)

وفي العلاقة بين كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 مع الدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي فقد وجدنا في التلوين المناعي CD8 أن كثافة اللمفاويات سواءاً حول الورمية أو داخل الورمية تكون عالية في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي وتنخفض هذه الكثافة في الدرجة الثانية والثالثة . حيث كان متوسط عدد اللمفاويات التائية السامة في الدرجة الأولى من السرطان (٩٠٧،١٣ خلية) وفي الدرجة الثانية (٦٢٦،٨) وانخفض الى

(١٩١،٢٧ خلية) في الدرجة الثالثة من السرطان أي أنه مع زيادة درجة الخباثة النسيجية تتراجع الاستجابة المناعية للمفاويات التائية السامة اتجاه السرطان وتضعف.

وقد اتفقنا في دراستنا مع Liu وزملائه 2009 الذين قاموا بدراسة تعبيرية CD8 في السرطان شائك الخلايا في المري ولاحظوا وجود علاقة بين كثافة اللمفاويات داخل الورمية والدرجة النسيجية للسرطان بالإضافة لعلاقتها مع الاستعمار للعقد اللمفية حيث يترافق انخفاض كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 مع الإصابات المتقدمة وكذلك مع الاستعمار للعقد اللمفية . (Liu et al., 2009)

واتفقنا أيضاً مع Ogino وزملائه 2006 الذين أكدوا على وجود علاقة بين شدة ارتشاح اللمفاويات التائية السامة CD8 والدرجة النسيجية للسرطان شائك الخلايا في الحنجرة و أن انخفاض كثافة اللمفاويات يترافق مع زيادة الخباثة النسيجية. (Ogino et al., 2006) وفي دراسة أجراها Tsuchikawa وزملاؤه 2011 على ارتشاح اللمفاويات التائية السامة CD8 في سرطانات المري وجدوا فيها أن حالات الإصابة ذات الارتشاح الغزير للمفاويات التائية السامة CD8 لها معدل بقاء أعلى للمرضى من الحالات ذات الارتشاح المنخفض . (Tsuchikawa et al., 2011)

٤-٣ دراسة تعبيرية LMP2 :

يلعب LMP2 دوراً أساسياً في تدرك بروتينات العصارة الخلوية و تشكيل الببتيدات المعروضة على HLA- I لذلك قامت العديد من الدراسات بتحري تعبيريته في الإصابات السرطانية المختلفة ، وقد قمنا في دراستنا بتحري تعبيرية LMP2 في العينة السليمة الشاهدة وفي العينات السرطانية ووجدنا أن تعبيرية LMP2 في العينة الشاهدة شملت الطبقة القاعدية والطبقات المجاورة لها فقط من البشرة المبطنة وبلغت نسبة التعبيرية فيها ١٩% وقد يكون انخفاض التعبيرية هذا نتيجة تأثير اللمفاويات التائية المنظمة في آلية كبح المناعة المشاهد في التحمل الفموي مما يؤثر على فعالية LMP2 ، في حين بلغت نسبة التعبيرية في عينة الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي ٧٢% الأمر الذي يدل على أنه في الدرجة الأولى من الإصابة السرطانية يتوقف كبح المناعة في الحفرة الفموية و تزداد تعبيرية LMP2 عن تعبيريته في البشرة الطبيعية . وقد اختلفت دراستنا مع بعض الدراسات التي تناولت دراسة تعبيرية LMP2 في الإصابات السرطانية كدراسة Liu وزملائه 2009 في السرطان شائك الخلايا في المري التي وجدوا فيها انخفاض تعبيرية LMP2 عن تعبيريته في الحالة الطبيعية وقد يكون هذا الاختلاف بسبب ظاهرة التحمل الفموي oral tolerance في الحفرة الفموية الموجودة في الحالة الطبيعية والتي تسبب كبح المناعة بالإضافة إلى أن هذه الدراسة تناولت مقارنة التعبيرية بين العينة الشاهدة والعينة السرطانية بالكامل في حين قمنا في دراستنا بإجراء المقارنة بين العينة الشاهدة والدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي لمعرفة التغير الدقيق الحاصل على مستوى تعبيرية LMP2.

وفي مقارنة تعبيرية LMP2 بين درجات الخباثة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي فقد وجدنا من خلال التلوين المناعي أن عينات الدرجة الأولى من السرطان كانت ذات تعبيرية مرتفعة وبلغت نسبة التعبيرية فيها ٧٢% في حين انخفضت التعبيرية في عينات الدرجة الثانية وأصبحت التعبيرية فيها ٥٢ % أما عينات الدرجة الثالثة فكانت منخفضة التعبيرية وبنسبة ٢٩% ، أي أنه في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي تزداد تعبيرية LMP2 عن تعبيريته في الحالة الطبيعية ثم لا تلبث أن تنخفض مع زيادة الخباثة في الدرجة الثانية والثالثة ، وقد اتفقت دراستنا مع Cathro وزملائه 2010 الذين قاموا بدراسة تعبيرية HLA1 وعناصر الجهاز العارض للمستضد في سرطانات المثانة ووجدوا أن تعبيرية LMP2 تكون منخفضة في الإصابات السرطانية المتقدمة مقارنة مع الإصابات البسيطة الأولية (Cathro et al., 2010) . كما وجد Liu وزملاؤه 2009 في دراستهم في السرطان شائك الخلايا بالمري أن الإصابات ذات التعبيرية المنخفضة LMP2 تكون سيئة الإنذار وغالباً ما تترافق مع استعمارات إلى العقد اللمفية (Liu et al., 2009) . وفي دراسة أجراها Ogino وزملاؤه 2006 في السرطان شائك الخلايا في الحنجرة وجدوا فيها أن انخفاض تعبيرية LMP2 يترافق مع انخفاض معدل البقاء Disease Free Survival (DFS) لكنهم لم يجدوا علاقة بين التعبيرية والدرجة النسيجية للسرطان وقد يكون الاختلاف بسبب اعتمادهم على تصنيف منظمة الصحة العالمية WHO في التقييم النسيجي أما في دراستنا فقد أضفنا على تصنيف WHO كلاً من نمط الغزو والارتشاح الالتهابي (Ogino et al., 2006) .

٤-٤ دراسة تعبيرية TAP1 :

يمثل TAP البروتين المسؤول عن نقل الببتيدات المصنعة داخل العصارة الخلوية إلى الشبكة الإندوبلاسمية وبالتالي فهو يلعب دوراً هاماً في عملية عرض المستضدات ، وقد قمنا في دراستنا بتحري تعبيرية TAP1 في المخاطية الفموية الطبيعية (العينة الشاهدة) وكذلك في الدرجات النسيجية المختلفة للسرطان شائك الخلايا الفموي .

وعلى العكس من بقية بروتينات الدراسة فقد وجدنا أن تعبيرية TAP1 في العينة الشاهدة كانت مرتفعة وشملت الطبقة القاعدية والشائكة وبلغت نسبة التعبيرية فيها ٨١% وانخفضت هذه التعبيرية في الدرجات النسيجية الثلاث من السرطان شائك الخلايا الفموي حيث بلغت نسبة التعبيرية في الدرجة الأولى ٧١% وانخفضت في الدرجة الثانية إلى ٥٦% وفي الدرجة الثالثة بلغت تعبيريتها ٢٢% ، أي أنه مع تقدم الإصابة السرطانية تنخفض تعبيرية TAP1 عن تعبيريته في الحالة الطبيعية .

وقد اتفقت دراستنا مع Liu وزملائه 2009 في دراستهم التي تناولت معقد التوافق النسيجي ا HLA- وعناصر الجهاز العارض للمستضد في السرطان شائك الخلايا في المري وجدوا فيها انخفاض في تعبيرية TAP1 عن تعبيريته في الحالة الطبيعية وأن هذا الانخفاض يترافق مع

زيادة الخباثة النسيجية وسوء إنذار الإصابة ووجود استعمارات للعقد اللمفية (Liu et al., 2009). وقد اتفقت دراستنا مع Cathro وزملائه 2010 الذين وجدوا أن تعبيرية TAP1 تنخفض في سرطانات المثانة عن تعبيريتها في الحالة الطبيعية . كما وجد Mehta وزملاؤه 2008 في دراستهم لمعقد التوافق النسيجي HLA1 وعناصر الجهاز العارض للمستضد في سرطان عنق الرحم أن انخفاض تعبيرية TAP1 يترافق بشكل هام مع انخفاض في معدل بقاء المرضى لخمس سنوات (Mehta et al., 2008).

٤-٥ دراسة العلاقة بين معقد التوافق النسيجي HLA-1 والارتشاح اللمفي CD8 :

قمنا في دراستنا بالإضافة لدراسة الارتباط بين تعبيرية HLA- I في الخلايا الورمية وكثافة اللمفاويات التائية السامة الكلية CD8 بدراسة ارتباط HLA- I مع اللمفاويات التائية السامة داخل الورمية Intratumoral لكونها العناصر الدفاعية ذات التأثير المباشر على الخلايا الورمية وتكمن أهمية دراسة هذا الارتباط بالتأكيد على أهمية معقد التوافق النسيجي في توليد الاستجابة المناعية المضادة للسرطان مما يساهم في تطوير تقنيات المعالجة المناعية .

أظهرت دراستنا وجود ارتباط قوي إيجابي بين تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA-1 وكثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 وكذلك بين HLA- I و CD8 داخل الورمية وذلك في الدرجات المختلفة للسرطان شائك الخلايا الفموي حيث ترافقت التعبيرية المرتفعة لمعقد التوافق النسيجي HLA-1 مع كثافة عالية للمفاويات التائية السامة CD8 في حين ترافقت التعبيرية المنخفضة HLA-1 مع كثافة منخفضة للمفاويات CD8 .

اتفقت دراستنا مع Tsuchikawa وزملائه 2011 في دراستهم على معقد التوافق النسيجي والارتشاح اللمفي للمفاويات التائية CD8 في سرطانات المري وجدوا فيها ارتباط شديد بين تعبيرية HLA-1 وكثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 سواءاً داخل الورمية أوحول الورمية (Tsuchikawa et al., 2011) . كما اتفقنا مع Ogino وزملائه 2006 الذين وجدوا ارتباط إيجابي بين تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I واللمفاويات التائية السامة داخل الورمية CD8 في السرطان شائك الخلايا في الحنجرة (Ogino et al., 2006) .

واتفقت دراستنا مع Liu وزملائه 2009 في دراستهم التي أكدوا فيها على ارتباط كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 مع تعبيرية HLA- I في الخلايا الورمية حيث ترافق في دراستهم انخفاض تعبيرية HLA- I مع انخفاض في كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 (Liu et al., 2009) .

الباب الخامس : الاستنتاجات

Conclusions

- تكون تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA- I وكذلك تعبيرية كلاً من البروتين ذو الوزن الجزيئي المنخفض LMP2 و الناقل المرافق لتهيئة المستضد TAP1 وكثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 مرتفعة في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا الفموي .

- مع زيادة الخباثة النسيجية تنخفض تعبيرية HLA- I وكذلك تعبيرية كلاً من LMP2 / TAP1 والذي يترافق مع انخفاض في كثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 حيث تتمكن الخلايا الورمية من تجنب الاستجابة المناعية للجسم وتتقدم الإصابة السرطانية .

- يوجد ارتباط شديد بين تعبيرية معقد التوافق النسيجي HLA-1 وكثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 حيث تترافق الحالات ذات التعبيرية المرتفعة لمعقد التوافق النسيجي I -HLA مع كثافة عالية للمفاويات التائية السامة CD8 وهذا يؤكد على أهمية HLA- I في الاستجابة المناعية المضادة للورم .

الباب السادس : المقترحات والتوصيات

Suggestions and Recommendation

- نوصي بالتوثيق الدقيق والصحيح لكل حالات السرطان في المؤسسات الحكومية ذات الصلة مع الأرشفة الحاسوبية متضمنة المعلومات السريرية والنسيجية الكاملة والمعلومات المتعلقة بالمعالجة والمتابعة لهذه الحالات .

- نقترح إجراء دراسة حول HLA- I في السرطان شائك الخلايا الفموي متضمنة الاستعمارات للعقد اللمفية وكذلك الاستعمارات البعيدة لتأكيد ارتباطه بخطورة الإصابة.

- نقترح إجراء دراسة حول خلايا القتلة الطبيعيين Natural Killer في السرطان شائك الخلايا الفموي لأهميتها في الاستجابة المناعية اتجاه الأورام .

- نقترح إجراء دراسة حول تعبيرية CD28 وكذلك الجزيئات المحرضة(B7-1 / B7-2) الموجودة في الخلايا العارضة للمستضد لتحري إمكانية وجود خلل في تحريض اللمفاويات التائية السامة .

- إجراء الدراسات المتعلقة بالمعالجة المناعية للسرطانات الفموية سواءاً عن طريق السيتوكينات المحفزة للمناعة أو الأضداد النوعية للمستضدات الورمية .

الباب السابع : المراجع

References

1- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2005. *Cellular and molecular immunology,* Philadelphia, Elsevier Saunders.
2- ACKERMAN, A. L. & CRESSWELL, P. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol,* 5**,** 678-84.
3- AKHTER, M., HOSSAIN, S., RAHMAN, Q. B. & MOLLA, M. R. 2011. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol,* 15**,** 168-76.
4- AKIRA, S. 2011. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* 366**,** 2748-55.
5- ARDUINO, P. G., CARROZZO, M., CHIECCHIO, A., BROCCOLETTI, R., TIRONE, F., BORRA, E., BERTOLUSSO, G. & GANDOLFO, S. 2008. Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J Oral Maxillofac Surg,* 66**,** 1570-9.
6- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature,* 392**,** 245-52.
7- BANDOH, N., OGINO, T., KATAYAMA, A., TAKAHARA, M., KATADA, A., HAYASHI, T. & HARABUCHI, Y. 2010. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing downregulation in metastatic lesions of head and neck squamous cell carcinoma as a marker of poor prognosis. *Oncol Rep,* 23**,** 933-9.
8- BARNES, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D. 2005. World Health Organization Classification of Tumours & International Agency For Research on Cancer. *Pathology and genetics of head and neck tumours,* Lyon, IARC Press.
9- BEIER, K. C., KALLINICH, T. & HAMELMANN, E. 2007. Master switches of T-cell activation and differentiation. *Eur Respir J,* 29**,** 804-12.
10- BHARDWAJ, N. 2007. Harnessing the immune system to treat cancer. *J Clin Invest,* 117**,** 1130-6.
11- BUKHARI, M. H., NIAZI, S. & CHAUDHRY, N. A. 2009. Relationship of immunohistochemistry scores of altered p53 protein expression in relation to patient's habits and histological grades and stages of squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol,* 36**,** 342-9.
12- CARDESA, A. & NADAL, A. 2011. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat,* 20**,** 161-73.
13- CATHRO, H. P., SMOLKIN, M. E., THEODORESCU, D., JO, V. Y., FERRONE, S. & FRIERSON, H. F., JR. 2010. Relationship between HLA class I antigen processing machinery component expression and the clinicopathologic characteristics of bladder carcinomas. *Cancer Immunol Immunother,* 59**,** 465-72.
14- CHEN, Y. W., KAO, S. Y. & YANG, M. H. 2012. Analysis of p16(INK4A) expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: Prognostic correlation without relevance to betel quid consumption. *J Surg Oncol*.
15- CHOI, N. M., MAJUMDER, P. & BOSS, J. M. 2011. Regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Curr Opin Immunol,* 23**,** 81-7.
16- COMPEER, E. B., FLINSENBERG, T. W., VAN DER GREIN, S. G. & BOES, M. 2012. Antigen processing and remodeling of the endosomal pathway: requirements for antigen cross-presentation. *Front Immunol,* 3**,** 37.
17- CORRADI, V., SINGH, G. & TIELEMAN, D. P. 2012. The human transporter associated with antigen processing: molecular models to describe peptide binding competent states. *J Biol Chem,* 287**,** 28099-111.
18- CRUZ, I., MEIJER, C. J., WALBOOMERS, J. M., SNIJDERS, P. J. & VAN DER WAAL, I. 1999. Lack of MHC class I surface expression on neoplastic cells and poor activation of the

secretory pathway of cytotoxic cells in oral squamous cell carcinomas. *Br J Cancer,* 81**,** 881-9.
19- DAVIS, S. J., IKEMIZU, S., EVANS, E. J., FUGGER, L., BAKKER, T. R. & VAN DER MERWE, P. A. 2003. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol,* 4**,** 217-24.
20- DEN OTTER, W., JACOBS, J. J., BATTERMANN, J. J., HORDIJK, G. J., KRASTEV, Z., MOISEEVA, E. V., STEWART, R. J., ZIEKMAN, P. G. & KOTEN, J. W. 2008. Local therapy of cancer with free IL-2. *Cancer Immunol Immunother,* 57**,** 931-50.
21- DU, L., SHEN, J., WEEMS, A. & LU, S. L. 2012. Role of phosphatidylinositol-3-kinase pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol,* 2012**,** 450179.
22- DURAY, A., DEMOULIN, S., HUBERT, P., DELVENNE, P. & SAUSSEZ, S. 2010. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol,* 2010**,** 701657.
23- EVANS, C., DALGLEISH, A. G. & KUMAR, D. 2006. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther,* 24**,** 1163-77.
24- FAN, S., TANG, Q. L., LIN, Y. J., CHEN, W. L., LI, J. S., HUANG, Z. Q., YANG, Z. H., WANG, Y. Y., ZHANG, D. M., WANG, H. J., DIAS-RIBEIRO, E., CAI, Q. & WANG, L. 2011. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci,* 3**,** 180-91.
25- FRANCA, D. C., MONTI, L. M., DE CASTRO, A. L., SOUBHIA, A. M., VOLPATO, L. E., DE AGUIAR, S. M. & GOIATO, M. C. 2012. Unusual presentation of oral squamous cell carcinoma in a young woman. *Sultan Qaboos Univ Med J,* 12**,** 228-31.
26- GANNOT, G., GANNOT, I., VERED, H., BUCHNER, A. & KEISARI, Y. 2002. Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma. *Br J Cancer,* 86**,** 1444-8.
27- GARANT, P. R. 2003. *Oral cells and tissues,* Chicago ; London, Quintessence.
28- GARCIA-LORA, A., ALGARRA, I. & GARRIDO, F. 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol,* 195**,** 346-55.
29- GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. 2007. *Color textbook of histology,* Philadelphia, PA, Saunders Elsevier.
30- GOLD, K. A., LEE, H. Y. & KIM, E. S. 2009. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer,* 115**,** 922-35.
31- HAN, W., PAN, H., JIANG, L., WEI, K., ZOU, D. & ZHANG, Z. 2011. A novel approach to rescue immune escape in oral squamous cell carcinoma: Combined use of interferon-gamma and LY294002. *Oncol Rep,* 25**,** 181-7.
32- HOOF, I., VAN BAARLE, D., HILDEBRAND, W. H. & KESMIR, C. 2012. Proteome Sampling by the HLA Class I Antigen Processing Pathway. *PLoS Comput Biol,* 8**,** e1002517.
33- HUANG, S. F., CHENG, S. D., CHUANG, W. Y., CHEN, I. H., LIAO, C. T., WANG, H. M. & HSIEH, L. L. 2012. Cyclin D1 overexpression and poor clinical outcomes in Taiwanese oral cavity squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol,* 10**,** 40.
34- HUANG, Y. & HALLIDAY, G. M. 2012. Aspects of innate immunity and Parkinson's disease. *Front Pharmacol,* 3**,** 33.
35- KHANNA, R. 1998. Tumour surveillance: missing peptides and MHC molecules. *Immunol Cell Biol,* 76**,** 20-6.
36- KUMAR, V. & ROBBINS, S. L. 2007. *Robbins basic pathology,* Philadelphia, Pa., Saunders Elsevier.
37- LIU, Q., HAO, C., SU, P. & SHI, J. 2009. Down-regulation of HLA class I antigen-processing machinery components in esophageal squamous cell carcinomas: association with disease progression. *Scand J Gastroenterol,* 44**,** 960-9.
38- MASAND, R. P., EL-MOFTY, S. K., MA, X. J., LUO, Y., FLANAGAN, J. J. & LEWIS, J. S., JR. 2011. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: relationship to human papillomavirus and review of the literature. *Head Neck Pathol,* 5**,** 108-16.

39- MASCOLO, M., SIANO, M., ILARDI, G., RUSSO, D., MEROLLA, F., DE ROSA, G. & STAIBANO, S. 2012. Epigenetic disregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci,* 13**,** 2331-53.
40- MEDZHITOV, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature,* 449**,** 819-26.
41- MEHROTRA, R. & YADAV, S. 2006. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer,* 43**,** 60-6.
42- MEHTA, A. M., JORDANOVA, E. S., KENTER, G. G., FERRONE, S. & FLEUREN, G. J. 2008. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother,* 57**,** 197-206.
43- NAGORSEN, D., SCHEIBENBOGEN, C., MARINCOLA, F. M., LETSCH, A. & KEILHOLZ, U. 2003. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res,* 9**,** 4296-303.
44- NEVILLE, B. W. 2009. *Oral and maxillofacial pathology,* St. Louis, Mo., Saunders Elsevier.
45- OANCEA, G., O'MARA, M. L., BENNETT, W. F., TIELEMAN, D. P., ABELE, R. & TAMPE, R. 2009. Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 5551-6.
46- OGINO, T., BANDOH, N., HAYASHI, T., MIYOKAWA, N., HARABUCHI, Y. & FERRONE, S. 2003. Association of tapasin and HLA class I antigen down-regulation in primary maxillary sinus squamous cell carcinoma lesions with reduced survival of patients. *Clin Cancer Res,* 9**,** 4043-51.
47- OGINO, T., SHIGYO, H., ISHII, H., KATAYAMA, A., MIYOKAWA, N., HARABUCHI, Y. & FERRONE, S. 2006. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res,* 66**,** 9281-9.
48- PANNONE, G., SANTORO, A., PAPAGERAKIS, S., LO MUZIO, L., DE ROSA, G. & BUFO, P. 2011. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer,* 6**,** 4.
49- PEREIRA, M. C., OLIVEIRA, D. T., LANDMAN, G. & KOWALSKI, L. P. 2007. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc,* 73**,** 339-44.
50- PICCININI, M., RINAUDO, M. T., ANSELMINO, A., RAMONDETTI, C., BUCCINNA, B., FIANO, V., GHIMENTI, C. & SCHIFFER, D. 2005. Characterization of the 20S proteasome in human glioblastomas. *Anticancer Res,* 25**,** 3203-10.
51- RACHEL, J., KUMAR, N. & JAIN, N. 2011. Basaloid squamous cell carcinoma of retromolar trigone: A case report with review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol,* 15**,** 192-196.
52- RAPIDIS, A. D., VERMORKEN, J. B. & BOURHIS, J. 2008. Targeted therapies in head and neck cancer: past, present and future. *Rev Recent Clin Trials,* 3**,** 156-66.
53- RAPIDIS, A. D. & WOLF, G. T. 2009. Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. *J Oncol,* 2009**,** 346345.
54- REGEZI, J. A., SCIUBBA, J. J. & JORDAN, R. C. K. 2008. *Oral pathology : clinical pathologic correlations,* St. Louis, Mo., Saunders Elsevier.
55- RESPA, A., BUKUR, J., FERRONE, S., PAWELEC, G., ZHAO, Y., WANG, E., MARINCOLA, F. M. & SELIGER, B. 2011. Association of IFN-gamma signal transduction defects with impaired HLA class I antigen processing in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res,* 17**,** 2668-78.
56- RODRIGUEZ, J. A., GALEANO, L., PALACIOS, D. M., GOMEZ, C., SERRANO, M. L., BRAVO, M. M. & COMBITA, A. L. 2012. Altered HLA class I and HLA-G expression is

associated with IL-10 expression in patients with cervical cancer. *Pathobiology,* 79**,** 72-83.
57- ROITT, I. M., BROSTOFF, J. & MALE, D. K. 2001. *Immunology,* Edinburgh ; New York, Mosby.
58- SARBIA, M., BITTINGER, F., PORSCHEN, R., DUTKOWSKI, P., WILLERS, R. & GABBERT, H. E. 1995. Prognostic value of histopathologic parameters of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer,* 76**,** 922-7.
59- SEDER, R. A. & AHMED, R. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol,* 4**,** 835-42.
60- SIJTS, E. J. & KLOETZEL, P. M. 2011. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci,* 68**,** 1491-502.
61- STRONCEK, D. F., BERGER, C., CHEEVER, M. A., CHILDS, R. W., DUDLEY, M. E., FLYNN, P., GATTINONI, L., HEATH, J. R., KALOS, M., MARINCOLA, F. M., MILLER, J. S., MOSTOSLAVSKY, G., POWELL, D. J., JR., RAO, M., RESTIFO, N. P., ROSENBERG, S. A., O'SHEA, J. & MELIEF, C. J. 2012. New directions in cellular therapy of cancer: a summary of the summit on cellular therapy for cancer. *J Transl Med,* 10**,** 48.
62- TOPFER, K., KEMPE, S., MULLER, N., SCHMITZ, M., BACHMANN, M., CARTELLIERI, M., SCHACKERT, G. & TEMME, A. 2011. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol,* 2011**,** 918471.
63- TSUCHIKAWA, T., IKEDA, H., CHO, Y., MIYAMOTO, M., SHICHINOHE, T., HIRANO, S. & KONDO, S. 2011. Association of CD8+ T cell infiltration in oesophageal carcinoma lesions with human leucocyte antigen (HLA) class I antigen expression and survival. *Clin Exp Immunol,* 164**,** 50-6.
64- UPPALURI, R., DUNN, G. P. & LEWIS, J. S., JR. 2008. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun,* 8**,** 16.
65- VAN DEN ELSEN, P. J. 2011. Expression Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I and Class II Encoding Genes. *Front Immunol,* 2**,** 48.
66- VISWANATHAN, S., RAHMAN, K., PALLAVI, S., SACHIN, J., PATIL, A., CHATURVEDI, P., D'CRUZ, A., AGARWAL, J. & KANE, S. V. 2010. Sarcomatoid (spindle cell) carcinoma of the head and neck mucosal region: a clinicopathologic review of 103 cases from a tertiary referral cancer centre. *Head Neck Pathol,* 4**,** 265-75.
67- VIVIER, E., RAULET, D. H., MORETTA, A., CALIGIURI, M. A., ZITVOGEL, L., LANIER, L. L., YOKOYAMA, W. M. & UGOLINI, S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science,* 331**,** 44-9.
68- WANG, D., ZHOU, Y., JI, L., HE, T., LIN, F., LIN, R., LIN, T. & MO, Y. 2012. Association of LMP/TAP gene polymorphisms with tuberculosis susceptibility in Li population in China. *PLoS One,* 7**,** e33051.
69- YIN, Y., WANG, X. X. & MARIUZZA, R. A. 2012. Crystal structure of a complete ternary complex of T-cell receptor, peptide-MHC, and CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 109**,** 5405-10.
70- ZANCOPE, E., COSTA, N. L., JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P., VALADARES, M. C., SILVA, T. A., LELES, C. R., MENDONCA, E. F. & BATISTA, A. C. 2010. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med,* 39**,** 162-7.
71- ZHANG, X., LIN, A., ZHANG, J. G., BAO, W. G., XU, D. P., RUAN, Y. Y. & YAN, W. H. 2012. Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*.

72- ZYGOGIANNI, A. G., KYRGIAS, G., KARAKITSOS, P., PSYRRI, A., KOUVARIS, J., KELEKIS, N. & KOULOULIAS, V. 2011. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head Neck Oncol,* 3**,** 2.

المراجع العربية :

١- بركات ، شريف سليم . ٢٠١١. تحري العلاقة بين حجم الجزر الورمية مع درجة الخباثة خلال مراحل استحداث السرطان تجريبيا في الجيب الخدي للهامستر السوري . مجلة بحوث جامعة تعز .

٢- بركات ، شريف سليم . ٢٠٠٥. دراسة مقارنة نسيجية وكيميانسيجية وكيميانسيجية مناعية مابين البشرة المخاطية الفموية الطبيعية وبشرات الآفات قبيل السرطانية والسرطانية . دكتوراه ، دمشق ، جامعة دمشق .

٣- عداس ، عبد الله . ٢٠٠٦. تحري صيغة المورثة السرطانية في السرطان شائك الخلايا الفموي والبلعومي الفموي . ماجستير ، دمشق ، جامعة دمشق .

مراجع الأشكال :

الشكل رقم (١) - ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2005. *Cellular and molecular immunology,* Philadelphia, Elsevier Saunders.

الشكل رقم (٢) - ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2005. *Cellular and molecular immunology,* Philadelphia, Elsevier Saunders.

الشكل رقم (٣) - ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2005. *Cellular and molecular immunology,* Philadelphia, Elsevier Saunders.

الشكل رقم (٤) - Tamp, R. 2010. The ABC of self-defence: TAP (transporter associated with antigen processing) and adaptive immunity . Proc Physiol Soc 19.

الملخص Abstract :

خلفية وهدف البحث : يشكل السرطان شائك الخلايا نسبة مرتفعة من خباثات الحفرة الفموية لذلك قامت عدد من الدراسات بمحاولة إيجاد طرق للتنبؤ بخطورة الإصابة السرطانية وإنذارها لتحسين المعالجة . تهدف هذه الدراسة الكيميائية المناعية النسيجية إلى تحري تعبيرية معقد التوافق النسيجي ا –HLA وكذلك كلاً من LMP2 و TAP1 و CD8 ودراسة علاقة هذه التعبيرية مع درجة الخباثة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي .

مواد وطرائق البحث : تألفت عينة البحث من ٥٤ عينة مقسمة إلى ٤١ عينة سرطان شائك خلايا فموي مأخوذة من أرشيف خزعات مشفى البيروني وقسم النسج والتشريح المرضي في كلية طب الاسنان مابين عامي ٢٠٠٤ – ٢٠١٠ وأخذ ١٣ عينة سليمة (شاهدة) من المخاطية الفموية ، خضعت جميعها للتلوين التقليدي (الهيماتوكسيلين– إيوزين) و المناعي (HLA1/CD8/LMP2/TAP1) واستخدم اختبار student واختبار One–way anova وارتباط Pearson للدراسة الإحصائية $p<0,05$.

النتائج : بلغت نسبة تعبيرية ا–HLA في عينة السرطان شائك الخلايا (الدرجات الأولى والثانية والثالثة) ٧٥% و ٤٤% و ٩% على التوالي وبلغ متوسط تعبيرية CD8 في الدرجة الأولى والثانية والثالثة ٩٠٧،١٣ و ٦٢٦،٨ و ١٩١،٢٧ على التوالي كما بلغت تعبيرية LMP2 و TAP1 في درجات السرطان الأولى والثانية والثالثة ٧٢%– ٥٢%– ٢٩% و ٧١%– ٥٦%– ٢٢% على التوالي وقد أظهرت الدراسة وجود فروق دالة إحصائياً $p<0,05$ عند مقارنة هذه التعبيرية بين الدرجات النسيجية الثلاث وكذلك عند دراسة ارتباط تعبيرية HLA–1 مع CD8 وقد وجدنا أن التعبيرية تتناقص بزيادة درجة الخباثة النسيجية .

الاستنتاجات : تكون تعبيرية معقد التوافق النسيجي ا–HLA وكذلك LMP2 و TAP1 وكثافة اللمفاويات التائية السامة CD8 مرتفعة في الدرجة الأولى من السرطان لكنها تنخفض مع زيادة الخباثة النسيجية للسرطان شائك الخلايا الفموي (في الدرجة النسيجية الثانية والثالثة) .

الكلمات المفتاحية : السرطان شائك الخلايا الفموي . معقد التوافق النسيجي ا –HLA . CD8. التلوين الكيميائي المناعي .

Abstract:

Background and Aim of study: Squamous cell carcinoma represents very high rate of oral malignancies and because of that a great number of studies were made in order to find ways to predict the seriousness of the injury and the cancer prognosis to improve the treatment . The aim of our research is to study the expression of the Histocompatibility complex HLA Class1- LMP2- TAP1 and CD8 and the relationship of this expression with the grade of malignancy of oral squamous cell carcinoma .

Materials and Methods : The researched samples consisted of 54 samples divided into 41 samples of oral squamous cell carcinoma taken from the archive of the "Biruni Hospital" and the histology and pathology department at the faculty of dentistry at Damascus university between 2004 to 2010 and 13 normal (witness) samples taken from the oral mucosa . which have been traditionally stained by (hematoxylin - eosin) and the immunohistochemical stain (HLA1/CD8/LMP2/TAP1). and the use of student test and one-way anova test and pearson test for the statistical study 0,05 >P.

Results : The expression of HLA-1 in the squamous cell carcinoma (grade1,2 and 3) are 75% , 44% and 9% respectively and the expressions of CD8 in grade 1.2 and 3 are 907,13 . 626,8 and 191,27 . The expressions of LMP2 and TAP1 are 72% - 52%- 29% and 71%- 56%- 22% respectively.the study showed a statistically significant difference 0,05>P when compared the expressions between the three histological grades and when study the relation between HLA1 and CD8 . The results indicated that the expressions decrease with increased grade of malignancy.

Conclusions : The expression of major histocompatibility complex HLA-1 –LMP2-TAP1 and density of cytotoxic T lymphocytes CD8 decrease with increasing histological malignancy of oral squamous cell carcinoma(in the histological grade 2 and 3).

Keywords : oral squamous cell carcinoma . major Histocompatibility complex HLA Class1 . CD8 . immunohistochemical staining .

ملحق : الجدول (١٧) المعلومات المتعلقة بعينة الدراسة السرطانية

السنة	رقم العينة	الجنس	العمر	الدرجة النسيجية
٢٠٠٤	١	أنثى	٦٦ سنة	١
٢٠٠٥	٢	ذكر	٧٥ سنة	١
	٣	أنثى	٥٠ سنة	٢
	٤	ذكر	٩٠ سنة	٢
	٥	أنثى	٦٠ سنة	٢
	٦	ذكر	٥٠ سنة	٢
	٧	ذكر	٦٠ سنة	١
	٨	ذكر	٥٣ سنة	٢
	٩	ذكر	٧٠ سنة	٢
	١٠	ذكر	٦٥ سنة	٢
	١١	أنثى	٦٠ سنة	١
	١٢	ذكر	٥٥ سنة	١
	١٣	ذكر	٨٣ سنة	٣
	١٤	أنثى	١٨ سنة	٣
٢٠٠٦	١٥	ذكر	٥٣ سنة	٢
	١٦	ذكر	٥٠ سنة	٣
	١٧	ذكر	٤٢ سنة	٢
	١٨	ذكر	٦٥ سنة	٣
	١٩	ذكر	٧٠ سنة	٣
٢٠٠٧	٢٠	ذكر	٥٠ سنة	١
٢٠٠٨	٢١	ذكر	-	٣
	٢٢	ذكر	٧٢ سنة	٣
	٢٣	ذكر	-	٣
	٢٤	ذكر	٥٦ سنة	٣
	٢٥	ذكر	-	١
	٢٦	ذكر	٤٢ سنة	١
	٢٧	ذكر	٤٤سنة	٢
٢٠٠٩	٢٨	أنثى	٧٩ سنة	٣
	٢٩	ذكر	٥٧ سنة	٢
	٣٠	ذكر	٩٠ سنة	١
	٣١	ذكر	٦٤ سنة	٢
	٣٢	ذكر	٧٠ سنة	٢
	٣٣	ذكر	٣٦ سنة	١
٢٠١٠	٣٤	ذكر	-	١
	٣٥	ذكر	٥٣ سنة	١
	٣٦	ذكر	٨٢ سنة	١
	٣٧	ذكر	٥٨ سنة	٢
	٣٨	ذكر	٤٢ سنة	٢
	٣٩	ذكر	-	١
	٤٠	ذكر	٥١ سنة	٣
	٤١	أنثى	-	١