الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية طب الأسنان

قسم النسج والتشريح المرضي

تحري تعبيرية الكولاجين III و IV في السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق

(دراسة نسيجية و كيميا نسيجية مناعية)

Investigating The Expression Of Collagen III&IV In Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

(Histological and Immunohistochemical Study)

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في علوم طب الأسنان في اختصاص علم النسج والتشريح المرضي للفم والأسنان

إعداد الباحثة: شريهان منصور باشا

إشراف الأستاذ الدكتور: أحمد المنديلي

أستاذ في قسم النسج والتشريح المرضي و نقيب المعلمين في جامعة دمشق

1437 هـ - 2016 م

الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية طب الأسنان

قسم النسج والتشريح المرضي

تحري تعبيرية الكولاجين III و IV في السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق

(دراسة نسيجية و كيميا نسيجية مناعية)

Investigating The Expression Of Collagen III&IV In Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

(Histological and Immunohistochemical Study)

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في علوم طب الأسنان في اختصاص علم النسج والتشريح المرضي للفم والأسنان

إعداد الباحثة: شريهان منصور باشا

إشراف الأستاذ الدكتور: أحمد المنديلي

لجنة الحكم

الأستاذ الدكتور	الأستاذ الدكتور	الأستاذة الدكتورة
شريف بركات	أحمد المنديلي	رائدة الخاني

بسم الله الرحمن الرحيم

قرار لجنة الحكم

تصريح

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

كلمة شكر

أتقدم بجزيل الشكر إلى أساتذتي الكرام في قسم النسج والتشريح المرضي الذين كانوا منارة للطريق الطويل، وأخص بالشكر أستاذي الأستاذ الدكتور أحمد المنديلي الذي تفضل بقبول هذا البحث بداية وأضاف الكثير من العلم والوقت في سبيل إنجاح هذا العمل. كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى أعضاء لجنة الحكم .

والشكر كل الشكر إلى كل من ساعدني في إتمام الجوانب العملية من هذا البحث ، وأخص بالشكر السيد ناصر كتابي والسيد طلال قاسم والسيد ضياء شعبان وزميلاتي مايا الجوخدار ورانيا عثمان .

كما أشكر عمادة كلية طب الأسنان في جامعة دمشق على الجهود المبذولة في مجال البحث العلمي .

قائمة المحتويات

قائمة الجداول.....4

قائمة الأشكال التوضيحية.....5

قائمة الإختصارات.....9

المُقدّمة Introduction 10

الهدف من البحث.....12

الباب الأول : المراجعة النظرية Literature Review.....13

1-1 : الورم والسَّرطان.....14

2-1 : تعريف أورام الرأس والعنق.....14

3-1 : تَصنيف أورام الرَّأس والعُنق حسب مُنَظّمة الصّحَة العَالميَّة.....14

4-1 : السرطانة شائكة الخلايا.....15

1-4-1 : الوبائيات 15

2-4-1 : أسباب السرطانة شائكة الخلايا.....16

A- التبغ والكحول.....16

B - المتعضيات الدقيقة.....17

C - سوء التغذية.....17

D- الأشعة.....17

E- الاضطرابات المناعية.....18

3-4-1 : منشأ السرطانة شائكة الخلايا 18

4-4-1 : المظاهر السريرية للسرطانة شائكة الخلايا.....24

5-4-1 : المظاهر النسيجية للسرطانة شائكة الخلايا.....24

أ – السرطان البشروي الثؤلولي Verrucous Carcinoma 25

ب – السرطانة شائكة الخلايا المشبهة بالقاعدي Basaloid Squamous Cell Carcinoma….26

ج – السرطانة شائكة الخلايا الحليمية Papillary Squamous Cell Carcinoma ……. 26

هـ – السرطانة شائكة الخلايا ذو الخلايا المغزلية 26

1-5 : الغشاء القاعدي..... 27

1-6:الكولاجين 29

1-6-1 : لمحة عامة عن الكولاجين..... 29

1-6-2 : البنية الأساسية للكولاجين..... 30

1-6-3 : تصنيف الكولاجين..... 33

A – الكولاجينات المشكّلة للألياف..... 33

B – كولاجينات الغشاء القاعدي 33

D– الكولاجين ذو الألياف المجهرية..... 33

E– الكولاجينات التي تشكل شبكة 34

F– ألياف التثبيت..... 34

G– الكولاجينات عبر الغشائية 34

1-6-4 : توزع الأنماط المختلفة للكولاجين وبنيتها ووظائفها 34

1-6-5 : الكولاجين من النمط III 35

1-6-6 : الكولاجين من النمط IV 36

1-6-7 : العلاقة بين القالب خارج الخلوي والخلايا الورمية..... 37

الباب الثاني : مواد البحث و طرائقه Materials and Methods 38

2-1 : العينة 39

2-2 : مواد البحث 39

2-3 : الأجهزة المستخدمة 41

2-4 : طريقة العمل 43

2-4-1 : تحضير العينات النسيجية 43

2-4-2 : طريقة التلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين و الإيوزين.....43

2-4-3 : تشريب ألياف الكولاجين III بالفضة باستخدام طريقة Gomori 44

2-4-4 : طريقة التلوين المناعي 46

2-4-5 : تقييم العينة الشاهدة 47

2-4-6 : تقييم الدرجة النسيجية 47

2-4-7 : تقييم التلوين بملون الكولاجين III وطريقة الدراسة 48

2-4-8 : تقييم التلوين المناعي بمضاد الكولاجين IV وطريقة الدراسة 49

2-5 : الاختبارات الإحصائية المستخدمة 49

الباب الثالث : النتائج والدراسة الإحصائية 51

3-1 :عينة البحث 52

3-2 : الاختبار الإحصائي 53

3-2-1 : دراسة صباغ نترات الفضة 53

3-2-2 : دراسة ملون مضاد الكولاجين IV 58

الباب الرابع :المناقشة 64

الباب الخامس :الإستنتاجات 69

الباب السادس : المقترحات والتوصيات 71

المراجع.....73

الملخص.....80

Abstract 81

الملاحق 82

قائمة الجداول والمخططات

جدول (1–1) يبين أنماط الكولاجين المختلفة وبنيتها الجزيئية وتوزعها في الأنسجة 32

جدول (2–1) المعايير المتبعة في تقييم الدرجة النسيجية 48

مخطط (3–1) تقسيم العينة حسب الدرجة النسيجية . 52

جدول (2–3) توزيع الحالات حسب كثافة الكولاجين III في الدرجات النسيجية الثلاث 57

مخطط (3–3) يوضح توزيع الحالات حسب كثافة الكولاجين III في الدرجات النسيجية الثلاث 57

جدول (4–3) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة تأثير الدرجة النسيجية في كثافة الكولاجين III 57

جدول (5–3) توزيع الحالات حسب تعبيرية الكولاجين IV في الدرجات النسيجية الثلاث 62

مخطط (6–3) يوضح توزيع الحالات حسب تعبيرية الكولاجين IV في الدرجات النسيجية الثلاث 62

جدول (7–3) يبين نتائج اِختبار كاي مربع لدراسة تأثير الدرجة النسيجية على تعبيرية الكولاجين IV 62

قائمة الأشكال التوضيحية

الشكل (1-1) تنظيم دورة حياة الخلية عند الطور G1-S 18

الشكل (1-2) كيفية غزو الخلية السرطانية عن طريق تنشيط حركة الخلية و التنشؤ الوعائي 19

الشكل (1-3) سرطانة شائكة الخلايا تظهر فيها جزر الخلايا السرطانية الغازية للعضلات . 25

الشكل (1-4) تركيب الغشاء القاعدي 28

شكل (2-1) الكيت المناعي المفرد من شركة **Bio SB** الأمريكية 41

شكل (2-2) ضد وحيد النسيلة للكولاجين **IV** 41

شكل (2-3) المحلول الدارئ 41

شكل (2-4) الشرائح الزجاجية 41

شكل (2-5) المايكرويف 42

شكل (2-6)السخان 42

شكل (2-7)المحم المائي 42

شكل (2-8)المجهر الضوئي 42

شكل (2-9) المبشرة النسيجية 42

شكل (2-10) قلم التحديد 42

شكل(2-11) تعبيرية صباغ نترات الفضة في وعاء دموي 48

شكل (2-12) تعبيرية مضاد الكولاجين IV في وعاء دموي 49

شكل(3-1) تعبيرية صباغ نترات الفضة في العينة الشاهدة. تكبير 100 مرة. 53

شكل(3-2)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 100 54

شكل (3-3)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير100 54

شكل (3-4)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 54

شكل (3-5)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 54

شكل (3-6)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير100. 55

شكل (3-7)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 55

شكل (3-8)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز .تكبير400 55
شكل (3-9)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير100 55
شكل (3-10)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 56
شكل (3-11)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 56
شكل (3-12)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 56
شكل (3-13)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 56
شكل (3-14) تعبيرية واسم الكولاجين IV في العينة الشاهدة. تكبير100 58
شكل (3-15) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400 59
شكل (3-16) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400 59
شكل (3-17) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400 59
شكل (3-18) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400 59
شكل (3-19) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 60
شكل (3-20) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز .تكبير100 60
شكل (3-21) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 60
شكل (3-22) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 61
شكل (3-23) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 61
شكل (3-24) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير400 61
شكل (3-25)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز .تكبير100 83
شكل (3-26)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 83
شكل (3-27)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 83
شكل (3-28)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 84
شكل (3-29)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 84
شكل (3-30)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير400 84
شكل (3-31)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير100 85
شكل (3-32)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 86

شكل (3-33)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 86
شكل (3-34)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 86
شكل (3-35)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 87
شكل (3-36)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 87
شكل (3-37)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير100 87
شكل (3-38)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 88
شكل (3-39)تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير400 88
شكل (3-40) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيء التمايز تكبير100 89
شكل (3-41) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 89
شكل(3-42) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 89
شكل (3-43) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 90
شكل (3-44) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 90
شكل (3-45) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 90
شكل (3-46) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 91
شكل (3-47) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 91
شكل (3-48) تعبيرية نترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير100 91
شكل(3-49)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 100 92
شكل (3-50)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400 92
شكل (3-51)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 100 92
شكل (3-52)تعبيرية واسم الكولاجينIV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400 93
شكل(3-53) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 100 93
شكل (3-54)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 100 93
شكل (3-55)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400 94
شكل (3-56)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400 94
شكل (3-57)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 100 94

شكل (3–58) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400 95
شكل (3–59)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 100 95
شكل (3–60) تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400 95
شكل (3–61)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير 400 96
شكل (3–62)تعبيرية واسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير 100 96
شكل (3–63)تعبيرية واسم الكولاجينIV في السرطانة شائكة الخلايا سيّئ التمايز تكبير 100 96

قائمة الاختصارات

رقم الصفحة	الإختصار	المصطلح باللغة الإنكليزية	المصطلح باللغة العربية
10	SCC	Squamous Cell Carcinoma	السرطانة شائكة الخلايا
17	HPV	human papillomavirus	فيروس الورم الحليمي البشري
22	EGFRs	epidermal growth factor receptors	مستقبلات عامل النمو البشروي
22	ICAM	intercellular adhesion molecule	جزيء اللصق بين الخلوي
23	VEGF	vascular endothelial growth factor	عامل النمو البشروي الوعائي
23	FGF	Basic fibroblastic growth factor	عامل النمو الأساسي لمصورات الليف
29	ECM	Extra Cellular Matrix	القالب خارج الخلوي
33	FACIT	Interrupted triplehelices Fibril-associated collagens	الكولاجينات المرتبطة بالألياف ذات الحلزون الثلاثي المتقطع

المُقدّمة Introduction:

تُعدّ السرطانات المسبب الثّاني للوفاة بعد الأمراض القلبية الوعائية ، إذ تُشكّل السرطانات حوالي 13% من مجمل أسباب الوفيات . وغالباً ما يسأل المرضى المصابون بالسرطان عن الوقت الذي سيتمكن فيه العلم من إيجاد العلاج الشافي لهذا الدَّاء، وغالباً ما يعجز العلماء عن الإجابة عن هذا السؤال البسيط، لأن السرطان ليس مرضاً وحيداً، وإنّما هو مجموعة من الاضطرابات التي تشكل جزءاً من خلل عميق في نظام النمو (Robbins,2007)

قُدِّرت نسبة الإصابة بسرطانات الرأس والعنق (السرطان الفموي، وسرطانات الحنجرة، وسرطانات البلعوم) حول العالم بنصف مليون إصابة سنوياً وهذا جعله يحتل المرتبة السابعة بين السرطانات من حيث الشيوع ، وتتنبأ الإحصائيات بازدياد الإصابات حتى المليون إصابة، وازدياد الوفيات حتى نصف مليون حالة وفاة مع قدوم عام 2020.

تُشكّل السرطانة شائكة الخلايا (Squamous Cell Carcinoma (SCC حوالي 80–90% من مجمل سرطانات الرأس والعنق، و 95% من السرطانات الفموية . تختلف نسبة الإصابة والوفيات حسب الجنس والعمر والعرق ، كما يختلف إنذار الإصابة حسب درجة السرطان السريرية والنسيجية ومكان الإصابة ، ولكن بشكل عام قُدّر عالمياً معدل البقاء على قيد الحياة لمدة 5 سنوات من بين الحالات المُشَخصة على أنها سرطانة شائكة الخلايا في منطقة الرأس والعنق بـ 80% للحالات السريرية المبكرة و 15% للحالات المتقدمة (Coulthard, 2003) .

تتصف السرطانات البشروية بقدرة الخلايا الخبيثة على اختراق الغشاء القاعدي الذي يمثل الحاجز الأول أمامها، ومن ثم غزو النسيج الضام الواقع أسفل البشرة ، إذ تجتاحه الجزر الورمية التي تعمل على إحداث مجموعة من التغيرات الفعّالة في اللحمة الضامة المحيطة بها وأحد هذه المركبات الضامة التي تتأثر هي الكولاجين من النمط III (George et al,2012)

يُعدّ الكولاجين من النمط IV من المكونات الأساسية للغشاء القاعدي حيث يتم خسارة هذا الغشاء في العديد من السرطانات الغازية.

و من المفيد معرفة التغيرات التي تطرأ على تركيب الغشاء القاعدي والتبدلات التي تصيب اللحمة الضامة المحيطة بالجزر الورمية الغازية، إذ سنهتم في هذا البحث بدراسة تعبيرية الكولاجين من النمط

IIIو IV في الدرجات النسيجية المختلفة للسرطانة شائكة الخلايا للرأس والعنق، لعلّها تمكننا مستقبلاً من التشخيص المبكر لهذا المرض الخطير والتنبؤ بالتطور الحيوي له .

الهدف من البحث:

يهدف هذا البحث إلى :

1- تحرّي تعبيرية الكولاجين من النمط III في الدرجات النسيجية المختلفة للسرطانة شائكة الخلايا للرأس والعنق.

2- تحرّي تعبيرية الكولاجين من النمط IV في الدرجات النسيجية المختلفة للسرطانة شائكة الخلايا للرأس والعنق.

الباب الأول :المراجعة النظرية

Literature Review

1-1 : الورم والسَّرطان

يُعَرَّف الورم على أنَّه كتلة نسيجية شاذة ذات نمو مُفرِط، تستمر في النمو حتى بعد زوال العامل المُسَبِّب، و يعرف الورم على المستوى الجُزيئي على أنه كتلة خلوية تَحررت من الآليات الطبيعية المُنَظّمة والمُحدِّدَة لنمو الخلايا في العضوية الحية (Barsevick et al ,2002). في حين يُعرَّف السرطان على أنّه نمو خلوي ناتج عن انقسام خلوي غير طبيعي يمكن أن ينتشر إلى أي مكان آخر في الجسم عبر الدَّوران الدَّموي أو اللمفي ، أما جُزيئياً فالسرطان هو إنتاج شاذ لخلايا طَافِرة بسبب تراكم التغيرات المُوَرِّثية المتعاقبة. وقد سُمِّي السرطان بهذا الإسم لأنَّ كتل الخلايا الوَرميَّة ذات امتدادات مُتَغلغِلَة في النُّسج بشكل يشبه أذرع حيوان سرطان البحر (Blanchard et al.,2001).

يُعزَى تَشَكّل السرطانات إلى التفاعل بين الجُملة المُوَرِّثية للفرد وبين العَوَامِل المُسَرطِنَة الفِيزيَائِيَّة وَالكِيميائِيّة والحَيَويَّة .

تختلف الأورام الخَبيثة عن السَّليمة بِقُدرَتِهَا على الغَزْو والإستِعمَار ومُعَدَّل نُموِّها السريع ونَقص تَمَايزِهَا .

1-2 : تعريف أورام الرأس والعنق

هيَ الأورام الَّتي تُصِيب مَنطِقة الرَّأس وَالعُنُق وتَنشَأ غالباً مِن خلايا البَشَرَة الرَّصفِيَّة المُطَبَّقَة التي تُبَطِن أجواف هذه المَنطِقة، وقد تَنشَأ على حِسَاب النَّسيج الغدِّي فِي الغدد اللعابية في حالات نادرة أو من بقايا البَشَرَة السنيَّة، يُستَثنى مِن هذا التّصنيف عادةً أورام الدِّماغ والعَين والمَريء والغدة الدَّرَقية وفروة الرَّأس والعِظَام والعَضَلات (Barnes et al .,2005).

1-3 : تَصنيف أورام الرَّأس والعُنق حسب مُنَظّمة الصّحَة العَالميَّة

تَضُم أورام الرَّأس والعنق حسب منظمة الصحة العالمية (Barnes et al .,2005) المجموعات الآتية:

1 – أورام الأنف والجيوب حول الأنفية .

2 – أورام البلعوم الأنفي .

3 – أورام البلعوم والحنجرة والرُّغامى.

4 – أورام الحفرة الفموية والبلعوم الفموي.

5 – أورام الغدد اللعابية.

6 – الأورام سنيّة المنشأ.

7 – أورام الأذن.

8–الأورام نظيرة العقدية.

4–1 : السرطانة شائكة الخلايا Squamous Cell Carinoma

هو ورم بَشروي خبيث يَنشَأ على حِساب الخَلايا الشّائِكة squamous cell ، يُرمَز له حسب مُنظمة الصَّحة العالمية لِلأورام بـ ICD-O 8070/3 (Barnes et al.,2005).

وللسرطانة شائكة الخلايا عِدَّة درجات نسيجية، ولديه ميل لإعطاء نقائِل للعقد اللمفية في المراحل المُبَكّرَة مِن الإصابة ، ويُصيب الأشخاص في الأعمار المُتقدِّمة وخَاصَّة في العقدين الخَامس والسَّادِس.

كانت مُعدّلات البقاء على قيد الحياة عند المرضى المُصَابين بهذا السرطان مُخَيِّبَة للآمال خلال العُقود القليلة الماضية، وهي تقارب 50% عند مرضى السرطان الفموي (Regezi et al.,2008).

1–4–1 : الوبائيات

تُمثِل السرطانة شائكة الخلايا الفَموي والبلعومي الفَموي نسبة 3% عند الذكور و2% عند الإناث من مُجمَل أنواع السرطانات . وتُشكّل نسبة إِصابة الذكور للإناث حالياً 2 إلى 1 ، وقد كانت هذه النسبة في السابق هي 3 إلى 1، ويعود سبب التغيير في هذه النّسبة إلى اِنتشار عادة التّدخِين عند النِساء ، وتَبلغ نسبة الوفاة بسرطان الفم و البلعوم الفموي ما يُقارِب 2% عند الذكور، و1% عند النِّساء (Regezi et al.,2008).

تُعَد كل من فرنسا والجزء الغربي لسويسرا وشمال إيطاليا وشرق أوروبا وجزء من أمريكا اللاتينية أكثر المناطق إصابة بهذا النوع من السرطانات (Barnes et al.,2005)

كما أنَّ السرطان الفموي هو النّمط الأكثر شيوعاً مِنَ الخَبَاثات في الهند وبعض الدُول الآسيوية ، وتَتَجاوز نسبة الإصابة فيه 50% من مُجمَل الحالات السرطانية ويعود ذلك لِانتِشار عادة تدخين التّبغ بشكل مرتفع . ويُصَاب في أمريكا ذَوو البَشرة السَّوداء أَكثَر بِمرتين من البيض .

1-4-2 : أسباب السرطانة شائكة الخلايا (Regezi et al.,2008).

A- التبغ والكحول

يُعتَقد أنَّ التّبغ هو العامِل الأكثر أهميَّة مِن بين العوامل الّتي تُسهم في الآلية الإمراضيِّة ، فَهناك اِرتباط وَثيق بين جميع أشكال التبغ المُدَخَّن tobacco smoking ومُسبِّبَات السَّرطان الفموي، إلَّا أنَّ تدخين السيجار وَالغليون cigar and pipe يُشكِّل خُطورة أكبَر لِتَطَوُّر السرطان الفموي مِن تدخين السَّجائِر cigarette.

يُمزَج التَّبغ Tobaccoعادةً مع مكونات أُخرى مثل جَوزة التنبول areca nut ، وَهيدروكسيد الكالسيوم أو الكلس المُطَفَّأ slaked lime ، وَمجموعة مِن البهارات spices ويدعى هذا المزيج بالمُضَاغَة pan or quid وتبقى عادةً لِفترة طويلة في دِهليز الفَم بِجانب الخَدّ، وقد يختلف هذا المَزيج مِن العناصر من مكانٍ إلى آخر ، ويعدُّ أكثر خُطورَة في إحداث السَّرطان مِن التبغ بمُفردِه (Regezi et al.,2008).

أمَّا بالنسبة إلى التدخين المَعكُوس reverse smoking وهي إحدى العادات المنتَشِرَة في الهند وجنوب أمريكا، فهنا يَتم الاِحتفاظ بالنِّهاية المُشتَعلة للسجَائِر داخِل الفم وهذا يؤدي لِحدوث اِحتراق شديد للتبغ بالقُرب مِن نسج قبة الحَنَك واللِّسان، و يزيد مِن خَطَر تَطَور السرطان الفموي . وعلى أيَّة حال تُعدُّ العلاقة بينَ الجُرعَة والوَقت هي الأمر الأساسيّ الأكثر أَهميَّة في إحداث السرطان الفموي ، ويُبدِي مُدخِنو الغَليون مَيلاً خَاصَّاً لإصابة الشفة السُّفلية بالسرطانة شائكة الخلايا.

يُعتَقد أنَّ الاِستخدام المُزمِن للتّبغ غير المُدخَّن smokeless tobacco يزيد من خطر حدوث السرطان الفموي سواء كان بشكل مُستَنشَق snuff (أيّ التبغ المَطحون أو المَهروس) أو بشكل مَمضوغ chewing (رقاقات التبغ اللّينة) مع أنَّ مُستوى الخُطورة مُنخفِض إلى حدٍّ ما .

يَستهلك العديد مِنَ المرضى الذين يَستخدمون مُنتجات التبغ غيرِ المُدخَّن السَّجائِر والكحول أيضاً، و بالتالي فهم يُسهِمونَ في اِرتفاع خَطَر حُدوث السرطان الفموي لديهم.

يَحمِل اِستخدام التبغ غير المدخن مخاطر إضَافِيَّة على الصَّحة مثل :اِرتفاع ضغط الدَّم elevated blood pressure ، والاِعتماد الفِيزيُولُوجِي physiologic dependence ، وأَمراض النُّسج حول السنيَّة periodontal disease.

تَبيَّنَ بأنّه من الصعوبةِ بعض الشَّيء أن يكون الكُحول بِمُفرَدِهِ عامِلاً مُسرطِناً ، إذ إنَّه غالباً ما تشترك عادات الشرب مع التدخين عند معظم مرضى السرطان الفموي، واِقترحَت الدِّراسات الوَبائِيَّة الحاليَّة بأنَّ استخدام الكُحول بِمفرَدِه قد يزيد من خَطر حدوث السرطان الفموي حيث يمتلك الكحول أثراً مُخَرِّشاً irritate وَمُذيباً solvent للمُخاطِية ولاسيَّما عند المدخنين.

تَحتوي المشروبات الكُحوليَّة على ملوِّثَات contaminants ومواد أُخرى مُسرطِنة تؤدي دوراً إضافياً في تَطَوُّر السرطان . أَشارت الدِّراسات الجُزيئيَّة molecular studies إلى أنَّ خطورة الكحول في إحداثِه السرطان تَرتبِط بِتأثير مُستقلَبات الكُحول و acetaldehyde في تغيير تعبيرية مُوَرِّثة الخلايا المُتَقَرِّنة keratinocyte gene .

B – المتعضيات الدقيقة microorganisms

تُسهِم بعض المُتَعضِّيَات الدَّقيقة microorganisms في السرطان ، فقد تَمَّ اِقتِراح المبيضَّات البيض Candida albicans باعتباره مُسبِّباً للسرطان الفموي، لِأَنَّها مِن المُحتَمل أن تُنتِج مُركَّب N-nitrosobenzylmethylamine المُسرطِن.

تَبيَّن وجود اِرتباط بين الحمة الرَّاشِحَة Epstein-Barr وَكل مِن لمفوما بوركيت Burkitt's lymphoma والسرطان البشروي في البلعوم الأنفي nasopharyngeal carcinoma .

كَما أثبتَت الدِّراسات وجود الحمَّات الرَّاشِحَة للوَرم الحُليمي البشروي human papillomavirus (HPV) نَمط 16 و18 في السرطانة شائكة الخلايا الفموي ، مُقتَرِحَةً بذلك الدَّور المُحتَمل لِهذه الحمَّات الرَّاشحة في السرطانات الفموية ، وهذا الإرتباط هو الأقوى في السرطانة شائكة الخلايا في اللَّوزات، إذ تشير الدَّلائِل إلى وجود الحمَّات الرَّاشحة HPV في أكثر من 60% من السرطانات الشائكة في اللَّوزات . فضلاً عن ذلك فقد تترافق السرطانات الثُّؤلُولِيَّة verrucous carcinoma مع إنتانات HPV، و يعتقد بأنَّ آلية تأثير HPV المُسرطِنة تكون مِن خِلال تَثبيط p53 عن طريق بروتين E6 وهذا يقود لِتسريع دورة الخلية وتَعطيل إصلاح DNA .

C – سُوء التَّغذِيَة

تزدَاد حَالات الإصابة بالسَّرطان الفموي في حالات سُوء التغذية ، فنقص الحَديد مثلاً يُؤَهِّب لِتطوّر السرطانة شائكة الخلايا الفموي كما يَحدُث في سياق مُتلازِمة Plummer-Vinson (مُتَلازِمة عسر البلع بنقص الحَديد)، إذ تُصِيب هذه المُتلازِمة النِّساء في مُنتصَف العمر وتَتَظَاهَر بالأعراض التَّالية : لِسان أحمر مُؤلِم، وضُمور المخاطية، وعسر بلع ناتج عن تَشكُّل حَلَقات في المَريء (esophageal webs) مِمَّا يُشكِّل قابلية لِتطوُّر السرطان الفموي .

D– الأَشعَّة :

تَمتَلِك الأَشِعَّة فوق البنفسجِيَّة ultraviolet دوراً في إحدَاث السرطان قاعديّ الخَلايا Basal cell carcinoma في الجلد والسرطانة شائكة الخلايا في الجلد والشفة ، فالأشعة فوق البَنفسجيَّة ذات طول المَوجة الَّتي تتراوح من 2900 نانومتر إلى 3200 نانومتر أكثر خُطورَة في إحداث السرطان من الأشعَّة ذات طول

المَوجة من 2300 نانومتر إلى 3400 نانومتر، كما أنَّ الجرعات المُتراكِمة acumulative dose من أشعة الشَّمس ومَدى الحِمَايَة الَّتي تُقدِّمها الصَّبائِغ الطبيعية تؤدي دوراً مهماً في تَطوُّر هذه السرطانات .

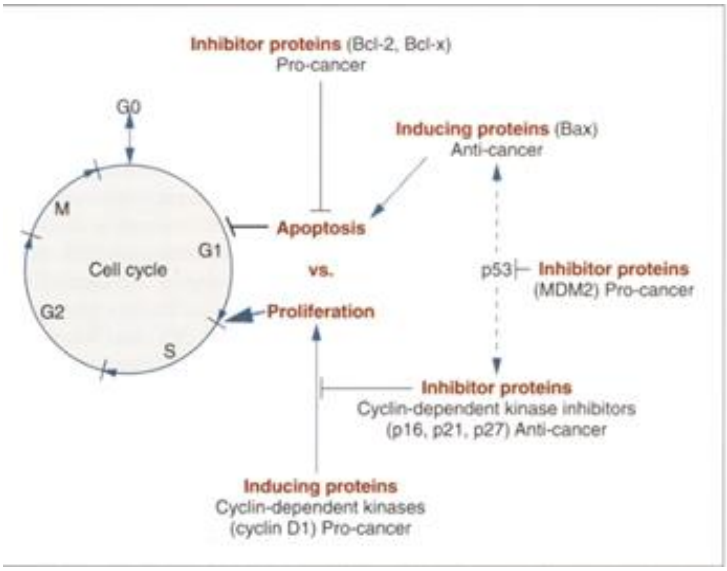
E- الإضطرَابات المَناعِيَّة:

تُساعِد اِضِّطِرابات الجِهاز المَناعِي في تَطَور السرطانات ، فالمَرضى المُثبطِون مَنَاعِيَّاً الَّذين أُجرِيَ لَديهم زرع نقي عظم أو زرع كِلَى هم في خطر مُرتفع لِتطور السرطان الفموي ، يَعتقدُ البعض بأنَّ المرضى المُصابِين بِالـ AIDs مُعرَّضون لِلإصابة، ولكن لا يوجد دَليل على ذلك.

غالباً فإنَّ الرَّض الميكانيكي النَّاشِئ عن الأجهزة السنيَّة السيِّئة والِاحتكاكات الأُخرى لا يكون بمُفرَدِهِ سبباً في تَطوُّر السرطان الفموي ، وإذا بَدَأ السرطان مِن أيّ سبب آخَر فإنَّ هذه العوامل من المُحتمل أن تسرِّع العَمَليَّة . تُعدُّ الصَّحة الفمويَّة السَّيئَة ذات تأثير ثانوي مُشابِه . وعلى أيَّة حال فإنَّ العديد مِنَ المرضى ذَوي الصَّحة الفموية السيئة لَدَيهم عوامل خُطورة هامَّة للسرطان الفموي مثل تَدخين التَّبغ وَشرب الكُحول (Regezi et al.,2008).

1-4-3 : منشأ السرطانة شائكة الخلايا **Pathogenesis** (Regezi et al.,2008)

للسرطانة شائكة الخلايا الفموي شأن جميع الخباثات الأخرى فهو ينشأ من تراكم مجموعة من الحوادث المورثية المستقلة عن بعضها discrete genetic event تؤدي لحدوث السرطان الغازي invasive cancer



الشكل(1-1): تنظيم دورة حياة الخلية عند الطور G1-S (Regezi et al.,2008).

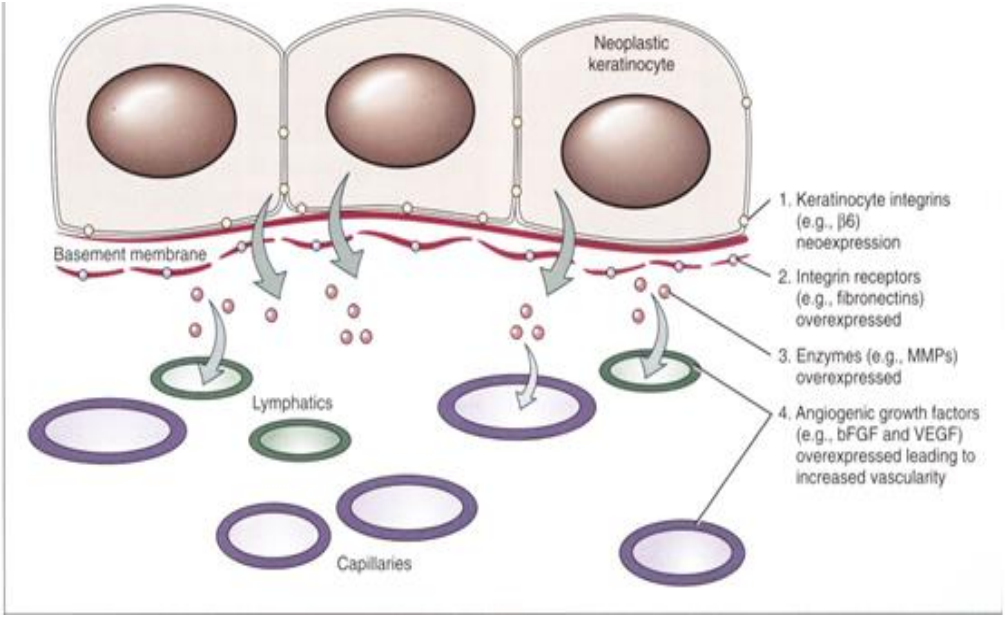
وتصيب هذه التغيرات المورثات التي تشفر encode البروتينات المسؤولة عن :

1–ضبط دورة الخلية cell cycle

2–بقاء الخلية على قيد الحياة cell survival

3–حركة الخلية cell motility

4–التنشؤ الوعائي angiogenesis



الشكل(1–2) يبين كيفية غزو الخلية السرطانية عن طريق تنشيط حركة الخلية و التنشؤ الوعائي . (Regezi et al.,2008).

إنَّ حدوث أعداد صغيرة من التغيرات المورثية ضروري لإكتساب النمط الظاهري للخباثة malignant phenotype فمثلاً: الطفرة في مورثات APC و K-ras تحدث في وقت مبكر من تطور الورم، بينما التحولات في p53 و DCC غالباً ما تحدث في المراحل المتقدمة من الورم.

تمر السرطانات الفموية عبر مرحلتين حيويتين مهمَّتين :

– المرحلة الأولى وهي فقدان القدرة على ضبط الدورة الخلوية عن طريق ارتفاع معدل التكاثر ونقصان الموت الخلوي المبرمج apoptosis ، وتكون هذه المرحلة أكثر وضوحاً من الناحية السريرية عند مرضى السرطانات

البشروية الموضَّعة carcinoma in situ حيث إنَّ الأعداد المُتزايدة من الخلايا المُنقسمة يمكن مُشاهدته في جميع طبقات البشرة .

– المرحلة الثانية وهنا تزداد حركة الخلايا الورميَّة وهذا يؤدي لحدوث الغزو invasion والإستعمار metastasis، حيث تخترق الخلايا الورمية الغشاء القاعدي وتغزو النسيج المجاور لِتصل للعقد اللمفية الناحيَّة regional lymph node، وتَنتُج كِلتا المرحلتين عن تفعيل المُوَرِّثات المُوَلِّدَة للورم oncogenes وتثبيط المورثات الكابِحَة للورم antioncogenes.

تُشَفِّر طليعة المورثة الورمية protooncogene والمورثة الورمية onogene في الحالات الطبيعية بروتينات مسؤولة عن تنظيم الوظائف المهمة لنمو الخلية مثل :التكاثر، والموت الخلوي المُبَرمَج، وحركة الخلايا، والإشارات الخلوية الداخلية، والتَنَشُّؤ الوِعَائِي.

إذا طَرَأَ أي تبدل في هذه المورثات عن طريق واحدة من الآليات المتعددة مثل الطَفرَة mutation فسيحدث فرط تعبيرية في البروتينات المُرَمِّزَة يقود لازدياد نسيلة الخلايا clone of cell مع زيادة قدرتها على النمو والحركة .

تُرَمِّز المورثات المُثَبِّطَة للورم tumor suppressor genes البروتينات التي تُثَبِّط التكاثر، فحدوث تَغيُّر في كل من الأَلِّيلَين الأُم والأَب لهذه المورثات both maternal and paternal alleles يؤدي إلى تكاثر الخلايا النسيلية .

يعتقد أنَّ المورثات المثبطة للورم تؤدي دوراً أكثر أهمية في تَطوُّر السرطان الفموي من المورثات الورمية، وأن التَبدُّل الذي يطرأ على المورثات المسؤولة عن تنظيم الدورة الخلوية له دور أساسي في تطور السرطان الفموي .

يمر انقسام الخلية عادة ضمن أربعة أطوار :

G1(gap1) –1 ، S – 2(تركيب DNA)، G2(gap2) – 3 ، M – 4 (Mitosis) الانقسام الخيطي

الحدث المهم هو تَتَابُع عملية الإنقسام من الطور G1 إلى الطَّور S، فإذا لم يتم إصلاح الخلل في التغيرات التي تطرأ على المورثات في الطور G1 فسوف ينتقل هذا الخلل إلى الطور S ويستمر حتَّى نهاية مَراحِل اِنقسام الخلية .

يتم عادةً تنظيم نقطة التحقق "G1-S checkpoint " مِن قبل جملة مُتناسِقة ومُعَقَّدَة من البروتينات التي يكون ضمان توازنها ووظائفها ضرورياً للحفاظ على اِنقسام طبيعي للخلية .

من الممكن أن تُؤَدِّي فرط تعبيرية البروتينات الورمية overexpression of oncogenic proteins أو اِنخِفَاض تعبيرية البروتينات المُضَادَّة للورم underexpression of antioncogenic proteins

إلى خلل في التوازن يجعل الخلية تنحرف باتجاه التكاثر والتحولات الورمية .

فمثلاً مورثة p53 هي مورثة كابتة للورم tumor suppressor gene ، وهي مفتاح تنظيم سلبي عند نقطة التحقق G1-S لدورة حياة الخلية (أي تنظم عن طريق الاستموات الخلوي أو إيقاف تكاثر الخلية إذا لم يتم تصحيح الخلل) فما يقارب 50% من السرطانات الفموية يكون الp53 فيها طافراً، وتكون البروتينات المُشَفَّرة عنه غير وظيفية ، وبذلك يسمح بروتين p53 المعيب بدخول الخلايا للطور S من دورة حياة الخلية قبل إصلاح الخلل في DNA ،والنتيجة هي تراكم المورثات المعيبة المؤذية، التي تسهم في التحولات للخباثة .

يتواسط بروتين MDM2 تَدَرُّك الـ p53 degradation وغالباً ما يحدث فرط تعبيرية MDM2 في السرطانات الفموية .

قد تقود فرط تعبيرية cyclin D1 لِإنقسام مُتزايد وَتَقَدُّم سابق لِأوانه ضمن نقطة التفتيش G1-S.

هناك مجموعتان مهمتان من البروتينات الأساسية للدورة الخلوية، التي تُنَظِّم الإنقسام وهي :

1 – السايكلينات cyclins

2 –الأنزيمات المُحَفِّزَة للسايكلين catalytic binding enzymes والأنزيمات المُعتَمِدَة عليها cyclin –dependent kinases .

تُنظَّم هذه البروتينات بالمُقابِل من قبل أحد أنواع البروتينات المُثبِّطَة تُعرَف بِإسم مُثبِّطَات الأنزيم المُعتمد على السايكلين cyclin –dependent kinase inhibitors. حيث إن انخفاض تعبيرية هذه المثبطات مثل ($p16^{ink4a}$ و $p27^{kip1}$) يُعدُّ من المظاهر المهمة للسرطان الفموي، ويعود ذلك لِإنخفاض القُدرَة على ضبط الدورة الخُلوية وإزدياد الإنقسام .

يُقَابِل الإنقسام proliferation حيوياً الـ apoptosis أي المَوت الخُلوي المُبَرمَج programmed cell death.

إذا بقيت الخلية على قيد الحياة لِمُدَّة طويلة فستصبح أكثر قابلية لِتَطور الأورام.

ترتبط بعض المورثات التي تَضبط الموت الخلوي المبرمج بالسرطانات، فعلى سبيل المِثَال يُلاحظ حُدوث فَرط تعبيرية مورثة الـ BCL2 في لمفوما الخلايا المِعطَفيَّة mantle cell lymphoma نتيجة لِتبدُّل مواقع الصبغيات.

كما أنه يلاحظ عادة في السرطانات الفموية فرط تعبيرية بروتينات Bcl-X و Bcl-2 المضادة للموت الخلوي المبرمج. كما أن طليعة بروتينات الموت الخلوي المبرمج Bax ترتبط بشكل إيجابي مع زيادة الحساسية لعوامل المعالجة الكيميائية لسرطانات الرأس والعنق.

تؤدي العديد من المورثات الورمية oncogenes دوراً مهماً في تنظيم نمو الخلية ونقل الإشارات من غشاء الخلية إلى النواة، وقد لوحظ أنها تتبدل في العديد من السرطانات . يتضمن هذا المورثات التي تشفر عامل النمو growth factor مثل:

1 – int-2 و hst–1 (عامل نمو مصورات الليف fibroblast growth factor).

2– مستقبلات عامل النمو growth factor receptors مثل: erbB1 وerbB2 (مستقبلات عامل النمو البشروي epidermal growth factor receptors [EGFRs])

3– البروتينات المعنيّة بنقل الإشارة مثل ras (البروتينات الرابطة للغوانوزين ثلاثي الفوسفات GTP)

4– البروتينات التنظيمية النووية مثل myc والبروتينات المحفّزة الناسخة.

يجدر الإشارة هنا إلى أن العلاقة بين تعبيرية مستقبلات عوامل النمو ومصير المريض أيضاً أصبحت شيئاً واحداً.

تمر العديد من السرطانات الفموية بمرحلة ما قبل التسرطن (سوء تصنع dysplasia أو سرطان موضع carcinoma in situ) إلا أن هناك حالات أخرى تنشأ دون وجود أي مؤشر سريري أو مجهري على وجود آفة تسبقها.

تمتلك السرطانات البشروية الغازية القدرة على اِختراق penetrate الغشاء القاعدي والنسيج الضام، فضلاً عن إمكانية النفوذ عبر الجملة الوعائية، ويعتقد أن هذه الأورام تكتسب هذه الخصائص الحيوية من خلال الاِضطرابات الجزيئية التي تطرأ على المورثات والبروتينات المعنيّة بحركة الخلية وانحلال القالب خارج الخلوي. كما أن التغيرات في النمط الظاهري لجزيئات اللصق الخلوي مثل cadherins و integrins تتيح للخلايا أن تتحرر من مكانها الطبيعي وتصبح قادرة على الهجرة، فضلاً عن وجود أنزيمات الاِنحلال للغشاء القاعدي والنسيج الضام حيث أنَّ هذه المكونات مجتمعة تسمح للأورام المتكاثرة بالغزو.

تتعرض بروتينات اللصق الخلوي الأساسية للتبدل في السرطانات الغازية و تتضمن هذه البروتينات:

1 – جزيء اللصق بين الخلوي intercellular adhesion molecule (ICAM) .

2– e-cadherin .

3–التعبيرية الحديثة لـ beta-6 integrin (beta-6 integrin neoexpression)، وهو البروتين الذي يساعد في حركة الخلايا المتقرنة keratinocyte .

تسهم بروتينات القالب الخلوي المُنتَجة من قبل الخلايا الورمية، التي من الممكن أن تنتجها عناصر النسيج الضام مثل مصورات الليف fibroblasts والبالعات الكبيرة macrophages على انحلال الغشاء القاعدي وبروتينات القالب خارج الخلوي.

لقد تم إثبات وجود Tenascin (وهو جزيء حال للروابط بين الخلايا البشروية لا يظهر عادة في المخاطية السليمة) في العديد من حالات السرطانة شائكة الخلايا الفموي. وكذلك الأمر بالنسبة إلى MMPs 1, 2, 9, 13 فقد تم تأكيد وجودها في السرطانات البشروية الغازية invasive carcinomas ، ويعتقد أن لها دوراً مهماً في تدرك عناصر النسيج الضام.

وترتبط MMPs 3, 13 بالتحديد بالمراحل المتقدمة للسرطانات البشروية للرأس والعنق.

يتطلب نمو الورم لأكثر من 1mm إمداده بأوعية دموية جديدة، وهو ما يعرف بالتنشؤ الوعائي angiogenesis وهذا يحدث من خلال فرط تعبيرية بروتينات وعائية المنشأ angiogenic مثل :

1 – عامل النمو البشروي الوعائي (VEGF) vascular endothelial growth factor.

2 – عامل النمو الأساسي لمصورات الليف (FGF) basic fibroblastic growth factor.

3 – مثبطات البروتينات الكابتة للتنشؤ الوعائي.

كما تمّ التحقق من وجود كل من VEGF وFGF والإنترلوكين 8 (IL8)(وهو عبارة عن سيتوكين قبل التهابي proinflammatory cytokine) في سرطانات الرأس والعنق، ويعتقد أنها مسؤولة جزئياً على الأقل عن التنشؤ الوعائي المرتبط بتطور هذه الأورام.

تؤدي التبدُّلات الوراثية إلى فرط تعبيرية هذه البروتينات، التي قد لا تكون واضحة بمفردها ولكن من المحتمل أن تصبح كذلك في حال التداخل (التآثر) مع المورثات الورمية والمورثات الكابتة للمناعة الأخرى.

من المظاهر المهمة الأخرى للخلايا السرطانية التناسخ المستمر مدى الحياة ، حيث إن telomeres هو عبارة عن مُعقَّد بروتيني DNA-protine complex موجود في نهاية الصبغيات، وهو ضروري من أجل ثبات الصبغي واِستقراره. تمتلك الخلايا السليمة مدة حياة محددة ترتبط بتقاصر telomere ، الذي يحدث مع الاِنقسامات المتتالية للخلية .

يخضع الصبغي وبالتالي الخلية إلى التَدَرُّك degradation عند الوصول لدرجة حساسة من تقاصر telomere ، وغالباً ما تُطَوِّر الخلايا السرطانية آلية تسمح فيها ببقاء التيلومير طويلاً لضمان عدم تجزئة الصبغي chromosome integrity وبالتالي البقاء لمدة طويلة، ويعود ذلك لإنتاج telomerase وهو عبارة عن أنزيم داخل نووي لايوجد عادة في الخلايا الطبيعية البالغة إلا أنه يوجد في الخلايا السرطانية . تمتلك معظم السرطانات البشروية للرأس والعنق فعالية telomerase من خلال تعبيرية لهذا الأنزيم فتعطي بذلك الخلية الورمية حياة طويلة (Regezi et al.,2008).

1-4-4 : المظاهر السريرية للسرطانة شائكة الخلايا

يتظاهر السرطانة شائكة الخلايا بعدة أشكال سريرية :

1- كتلة خارجية ناتئة exophytic ذات شكل حليمي أو ثؤلولي.

2- على شكل اِنغمادات endophytic غازية أو مندخلة أو تقرحية .

3- على شكل لويحات بيضاء كالطلاوة leukoplakia .

4- على شكل لويحات حمراء كالتنسج الأحمر Erythroplakia .

5-على شكل لويحات حمراء وبيضاء كالطلاوة المبرقشة erythroleukoplakia .
(Neville et al.,2002)

1-4-5 : المظاهر النسيجية للسرطانة شائكة الخلايا

عادةً ينشأ السرطانة شائكة الخلايا من سطح بشرة مصابة بسوء تصنع ، ويتظاهر نسيجياً بشكل جزر وحبال من خلايا شائكة سرطانية غازية، و يظهر الغزو بشكل امتداد غير نظامي لبشرة الآفة عبر الغشاء القاعدي وعبر النسيج الضام تحت البشروي، و غالباً ما تشاهد استجابة خلوية مناعية مقابل البشرة الغازية كما، قد تظهر مناطق تنخر ورمية (Regezi et al.,2008) .

تبدي الخلايا الورمية علامات عدم التصنع الخلوي anaplasia ، وتشمل زيادة ونقص حجم الخلايا والنوى والنويات واقتراب نسبة حجم النواة للهيولى، و فرط أو نقص تصبغ النواة وخلل التقرن وزيادة الفعالية الانقسامية الشاذة . فضلاً عن علامات خباثة أخرى تشمل تعدد الأشكال الانقسامية وفقدان قطبية الخلايا القاعدية وفقدان الاتصالات بين الخلوية مع وجود التقرن المفرد للخلايا.

يدعى التقدير النسيجي لمدى تشابه الورم مع النسيج الأصلي بالدرجة النسيجية وتقسم إلى :

الدرجة I أو الأورام منخفضة الخباثة low grade tumours :

تطلق على الأورام جيدة التمايز، ويكون النسيج الورمي مشابهاً للنسيج الأصلي، ويتميز هذا النوع من الأورام بنموه البطيء واستعماره في المراحل المتأخرة .

الدرجة III /IV للأورام عالية الخباثة High grade tumours :

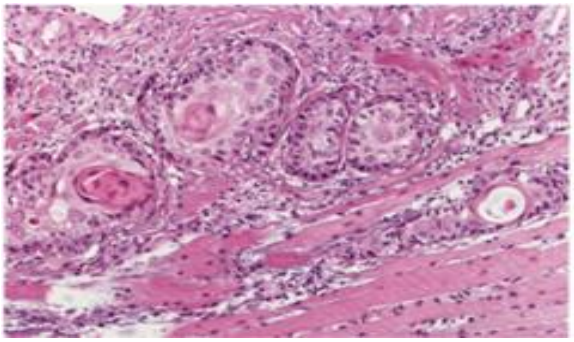
تمثل الأورام قليلة التمايز حيث تكون الخلايا السرطانية متعددة الأشكال والحجوم، لا تماثل الخلايا الشائكة السليمة، وتكون كمية القرنين قليلة أو غائبة وبالتالي يصعب تحديد أصل النسيج وغالباً ما تنمو هذه السرطانات بشكل سريع وتستعمر بشكل مبكر .

الدرجة II وهي للأورام معتدلة التمايز وتتوسط الدرجتين السابقتين .(Neville et al,2002)

عادةً يدل التقرن على الدرجتين الجيدة والمتوسطة ولكن لا يمكن الاعتماد عليه بمفرده ، ويعدُّ ذا أهمية قليلة بتحديد الإنذار إذا ما قورن بنمط الغزو الذي يصنف إلى تمددي أو توسعي expansive وارتشاحي infiltrative وقد يظهران معاً.

يتميز النمط التمددي بجزر ورمية كبيرة ذات حواف محددة، وتترافق بإنذار أفضل، أما النمط الإرتشاحي فيتميز بحبال صغيرة مبعثرة غير نظامية ، أو خلايا ورمية مفردة، وتكون حواف الارتشاح غير محددة، ويترافق مع نهج أكثر عدوانية. (Barnes et al., 2005, Woolgar and Triantafyllou., 2009)

معظم السرطانات شائكة الخلايا البشروية الفموية هي آفات جيدة أو متوسطة التمايز



الشكل (1-3) سرطانة شائكة الخلايا تظهر فيه جزر الخلايا السرطانية الغازية للعضلات .

من الممكن تمييز عدة أشكال نسيجية إضافة إلى الشكل التقليدي للسرطانة شائكة الخلايا :

أ – السرطان البشروي الثؤلولي verrucous carcinoma :

ينمو الشكل الثؤلولي ببطء، ويظهر غالباً لدى الذكور المتقدمين في العمر والمدخنين، وقد لوحظ وجود الحمة الراشحة الحليمية البشرية في أكثر من 40 % من الحالات.

يتظاهر سريرياً بشكل آفة لاعرضية ذات حدود واضحة، ويرتبط لونها بشكل أساسي بسماكة الطبقة المتقرنة و كثافة الرشاحة المناعية أسفل الورم، و لايشاهد تقرح السطح والنزف إلا إذا وجدت بؤر السرطانة شائكة الخلايا التقليدي ، تشمل المظاهر النسيجية وجود خلايا بشروية جيدة التمايز تبدي علائم فرط تصنع hyperplastic أكثر من علائم التنشؤ الورمي neoplastic . تكون هذه الآفة ذات حواف عريضة مندفعة broad-pushing margine حيث يتجه السرطان باتجاه النسيج الضام مفضلاً دفع الغشاء القاعدي على الإرتشاح ، ويُحاط الجزء الأمامي المندفع the advancing front بالبالعات الكبيرة و اللمفاويات والخلايا البلاسمية. (Neville.,2009) .(Regezi et al.,2008)

ب- السرطانة شائكة الخلايا المشبهة بالقاعدي Basaloid Squamous cell carcinoma

أكثر ما يُصَادف في البلعوم، وتغلب مشاهدته عند الذكور بعمر 60-80 سنة، ويُعد التدخين والكحول من العوامل المؤهبة للإصابة . يتظاهر سريرياً بشكل كتلة معنقة مؤلمة ومتقرحة في المركز، تشمل المظاهر النسيجية وجود مكونين خلويين هما الخلايا البشروية الشائكة و الخلايا المشبهة بالقاعدية basaloid cells ،التي تتميز بصغر حجمها ونواتها مفرطة الاصطباغ وهيولاها القليلة .

يتصف هذا الورم بسلوكه العدواني وسرعة نموه، ويرتبط وجود هذا الشكل دائماً بوجود السرطانة شائكة الخلايا، وبشكل أقل بوجود السرطانة شائكة الخلايا المغزلي .(Fritsch and Lentsch,2014)

ج - السرطانة شائكة الخلايا الحليمية Papillary Squamous Cell Carcinoma

يتظاهر نسيجياً كامتدادات حليمية مدعومة بنسيج ليفي وعائي، ويلاحظ تعدد في الأشكال الخلوية، وقد يشاهد بؤر من التموت والنزف، وهو ذو إنذار أفضل من السرطانة شائكة الخلايا التقليدي، ويعدُّ إنذاره أفضل كلما قل الإرتشاح بإتجاه النسيج الضام . يُعدُّ الكحول والتبغ عوامل أساسية للإصابة بالإضافة إلى الحمة الراشحة للورم الحليمي البشري، ويأخذ الورم شكل حليمة طرية هشة خارجية النمو.(Cowson and Odell,2008)

ي - السرطانة شائكة الخلايا ذو الخلايا المغزلية:

نادراً ما يتظاهر السرطانة شائكة الخلايا الفموي (OSCC) بشكل تكاثر لخلايا مغزلية الشكل حيث يعتقد خطأً أنها أحد السرطانات الضامة sarcoma . يُعرَف هذا النمط من الأورام باسم spindle cell carcinoma السرطان البشروي مغزلي الخلايا، أو السرطان البشروي المشبه بالسرطان الضام sarcomatoid carcinoma . ينشأ السرطان البشروي مغزلي الخلايا عادة من البشرة السطحية في الشفاه وأحياناً في اللسان. (Regezi et al.,2008).

يصيب الرجال بالعقد السابع بشكل رئيسي، وقد يتطور بسرعة بعد التعرض للأشعة. تعد الحنجرة أكثر الأماكن إصابة في الرأس والعنق، ويتباين حجم الورم وهو ذو سطح متقرح .أعطت أكثر من 25% من الحالات نقائل للعقد اللمفية الناحية، وقد بلغ معدل البقاء على قيد الحياة لمدة 5 سنوات 65-95 %.(Thompson,2006 and Barnes et al,2005)

5-1 : الغشاء القاعدي Basement Membrane

يشغل الغشاء القاعدي السطح الفاصل بين البشرة والنسيج الضام ،وهو عبارة عن منطقة ضيقة غير خلوية تظهر بوضوح عند تلوينها بكاشف شيف الدوري PAS أو الملونات النسيجية الأخرى التي تظهر الغليكوزأمينوغليكانات GAGs (Thomas et al.,2004).

تشبه الصفيحة الخارجية external lamina التي تحيط بالخلايا العضلية الملساء و الهيكلية والخلايا الشحمية وخلايا شوان، في تركيبها الغشاء القاعدي .

يظهر من خلال المجهر الإلكتروني بأن الغشاء القاعدي يتألف من تركيبين هما : الصفيحة القاعدية basal lamina، التي تشكلها الخلايا البشروية بعناية فائقة و الصفيحة الشباكية lamina reticularies التي تصنع من قبل النسيج الضام.

أولاً – الصفيحة القاعدية :

تصنع الصفيحة القاعدية من قبل الخلايا البشروية، وتتألف من الصفيحة الشافة lamina lucida والصفيحة الكثيفة lamina densa .

أ – الصفيحة الشافة :

تبلغ ثخانتها 50nm ، وهي منطقة نَيِّرة إلكترونياً تقع تحت البشرة ، وتتكون بشكل أساسي من البروتينات السكرية للقالب خارج الخلوي (اللامنين laminin ، والإنتاكتين entactin ، والإنتغرين integrins، و dystroglycans ، ومستقبلات اللامنين الحالة الغشائية)، التي تنتجها أغشية الخلايا البشروية وتفرزها ضمن الصفيحة القاعدية (Leslie and James,2007).

ب– الصفيحة الكثيفة :

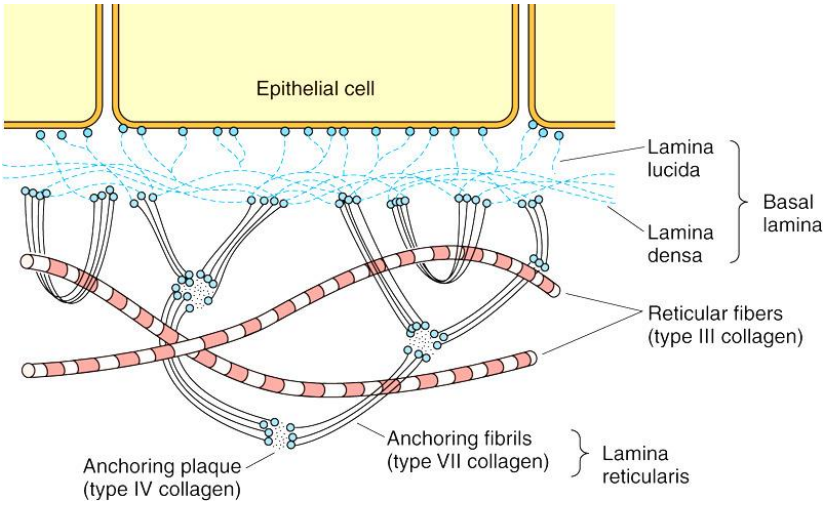
تبلغ ثخانتها 50nm، وهي منطقة عاتمة إلكترونياً وتحتوي على الكولاجين من النمط IV بشكل شبكة ، وهي تربط بين الصفيحة الشافة من جهة البشرة والصفيحة الشباكية من جهة النسيج الضام من خلال البروتينات

السكرية proteoglycan perlacan والهيبارين سلفات وبعض الشوارد سلبية الشحنة polyanion كالكلور والكبريتات، وتؤدي هذه الشحنات الكهربائية السالبة المرتبطة مع البروتيوغليكان في الغشاء القاعدي دوراً في المحافظة على تركيب السائل الخلالي في النسيج الضام ومنع ارتشاحه خارجاً (Barakat ,2011 and LIDDINGTON,2001).

يشغل الفيبرونكتين fibronectin جانب الصفيحة الشباكية الذي يحاذي الصفيحة الكثيفة .

يمتلك اللامنين مجالات تربط كل من الكولاجين IV وكبريتات الهيباران heparin sulfate والإنتغرين و الـ dystroglycans التابعة لأغشية الخلايا البشروية القاعدية، مُثَبِّتَةً بذلك الخلايا البشروية إلى الصفيحة القاعدية

تتثبت الصفيحة القاعدية بشكل جيد إلى الصفيحة الشباكية عن طريق عدة مركبات تتضمن : الفيبرونكتين ، والألياف الرابطة (كولاجين النمط VII السابع) والليفات المجهرية fibrillin التي تفرزها خلايا مصورات الليف fibroblasts الموجودة في النسيج الضام.



الشكل (1—4) يبين تركيب الغشاء القاعدي . (Leslie and James,2007)

وظائف الصفيحة القاعدية:

1 – تعمل الصفيحة القاعدية على تأمين دعم قوي ومرن للبشرة فوقها .

2 – تشكل حاجزاً اِنتقائياً جزيئياً وذلك يعود لوجود الكولاجين IV ، الذي تشكل أليافه شبكة مصفاة فيزيائية من خلال مساماتها ذات الأحجام النوعية ، فضلاً عن اِحتوائها على كبريتات الهيباران ذات الشحنة السالبة، والتي توجه مرور الجزيئات سالبة الشحنة .

3 – تسهيل النشاط الإنقسامي وتمايز الخلايا وتنظيم الإستقلاب الخلوي، والمساعدة في تحديد قطبية الخلايا .

4 – تؤدي دوراً في تعديل ترتيب بروتينات المتممة المتوضعة في أغشية الخلايا القاعدية .

5– تمثل الطريق الذي تعبره الخلايا أثناء هجرتها .(Leslie and James,2007)

ثانياً– الصفيحة الشباكية:

تشكل هذه الصفيحة السطح الفاصل بين الصفيحة القاعدية والنسيج الضام أسفله، وهي مسؤولة عن تثبيت الصفيحة الكثيفة إلى النسيج الضام المجاور، وتنشأ من مكونات النسيج الضام حيث تقوم الخلايا مصورات الليف بصنعها وتتألف من كولاجين النمط I و III ، وتتنوع الصفيحة الشباكية في ثخانتها، ويعود ذلك لِإختلاف قوى الإحتكاك التي تتعرض لها البشرة الواقعة أعلاها ، ولذلك فهي سميكة في الجلد ورقيقة أسفل البشرة المبطنة للأسناخ الرئوية .

تشكل ألياف الكولاجين نمط I و III الموجودة في النسيج الضام عقداً (عرىً) ضمن الصفيحة الشباكية وترتبط مع الألياف المجهرية وتثبت الألياف إلى الصفيحة الشباكية (Leslie and James,2007).

1-6 : الكولاجين

1-6-1 : لمحة عامة عن الكولاجين

يُمثِّل القالب خارج الخلوي Extra Cellular Matrix ECM للنسيج الضام خليطاً مُعقَداً من أجزاء متنوعة من العائلات البروتينية التي تحدد البنية والمهام الوظيفية المتكاملة .

أما الخصائص الفيزيائية الحيوية فتحدد من خلال الترتيب فوق الإلكتروني لكل من :

1– العناصر الليفية Fibrillar elements.

2– الشبكات الليفية المجهرية والبروتينات الحلولة Microfibrillar networks and Soluble proteins

3– الغليكوبروتينات(البروتينات السكرية) فضلاً عن مجموعة كبيرة من جزيئات أخرى.

من الملاحظ وجود تنوع كبير في تركيب وبنية الأنماط المختلفة للنسيج الضام.

تكمن الوظيفة الأساسية للقالب خارج الخلوي بتقديم الخصائص الحيوية والميكانيكية النوعية التي ينفرد بها كل نسيج. كما يؤثر القالب خارج الخلوي في وظائف الخلايا المقيمة فيه، وبالمقابل تكون الخلايا مسؤولة عن تركيب القالب وحمايته.

يتواسط التفاعل المتبادل بين الخلايا و القالب خارج الخلوي مستقبلات خلوية خاصة ومواقع ربط خلوية لجزيئات عديدة في القالب خارج الخلوي وهي تؤدي دوراً آخر في ضبط التمايز الخلوي ودعمه .

.(Yamaguchi et al,1990 and Schuppan et al, 1998)

من المفيد معرفة البنية الجزيئية والتركيب الحيوي للكولاجين إذ إنها تساعد في فهم عملية التطور الجنينية، وبالتالي فهم الآلية الإمراضية المرتبطة بالعديد من الأمراض التي تصيب الإنسان.

فدراسة تعبيرية ووظائف الأنماط المختلفة للكولاجين يسهم في استيعاب أفضل للأمراض التي تعتمد على الخلل الجزيئي في مورثات الكولاجين مثل:

1- سوء التصنع الغضروفي Chondrodysplasias

2- تكون العظم المعيب Osteogenesis imperfecta

3- متلازمة آلبرت Alport syndrome

4- متلازمة Ehler's Danlos Syndrome

5- إنحلال البشرة الفقاعي Epidermolysis bullosa .(Bateman et al,1996 and Mark,1999)

يُعَدُّ إنحلال الكولاجين واِضطِّراب اِستقلابه أمراً ضرورياً لتقدم سير بعض الأمراض مثل :

الإلتهاب العظمي المفصلي Osteoarthritis وتخلخل العظام Osteoporosis .

تُفيد المعرفة العميقة لخصائص الأنماط المختلفة من الكولاجين أيضاً من الناحية العلاجية ، وذلك ضمن مجال المستحضرات الدوائية وعوامل النمو، و إمكانية تسريع شفاء وترميم الأنسجة . .(Schuppan et al, 1998 and Frenkel et al,1997 and Wakitani et al ,1989)

1-6-2 : البنية الأساسية للكولاجين

يطلق مصطلح الكولاجين على جميع البروتينات التي تتركب من حلزون ثلاثي triple helix من ثلاث سلاسل من عديدات الببتيد .ولجميع عناصر عائلة الكولاجين هذه البنية فوق الجزيئية على الرغم من التنوع الكبير في حجمها ووظائفها وتوزعها في الأنسجة.

. (Mark et al ,1999 and. Ku¨hn ,1986 and Sato et al ,2002)

تبدو ألياف الكولاجين الملونة بالمعادن الثقيلة عند فحصها بالمجهر الإلكتروني بأنها ذات تخطيطات عرضية يفصل بينها مسافة قدرها 67 نانومتراً، تتكون هذه الألياف من مجموعات متوازية من الليفات الأرق التي يتراوح قطرها بين 10–300 نانومتر ، تتألف هذه الليفات بدورها من وحدات أصغر من جزيئات أصغر من التروبوكولاجين طول كل منها حوالي 280 نانومتراً وقطرها 5.1 نانومتراً، وهذه الجزيئات من التروبوكولاجين تتألف من 3 سلاسل من عديدات الببتيد التي تسمى سلاسل α، وتكون ملتفة حول بعضها بشكل حلزوني .وقد تكون السلاسل الثلاثة متشابهة homotrimers كما في الأنماط التالية : II ، III ، VII ، VIII ،X وغيرها من الكولاجينات، أو تكون اثنتان أو أكثر من السلاسل مختلفة heterotrimers كما في الأنماط التالية: I ،IV ،V ،VI ،IX ، XI .

تمتلك كل سلسلة α حوالي 100 حمض أميني و تعدُّ ثمالة الغليسين glycine residue البنية الأساسية في تركيب الحلزون الثلاثي في كل موقع ثالث من سلاسل عديدات الببتيد حيث تنتج البنية التكرارية (GLY-X-Y)، التي تُميِّز البنية الكولاجينية لجميع أنماط الكولاجين، كما تلتف سلاسل α بطريقة تتوضع فيها جميع ثمالات الغليسين في مركز الحلزون الثلاثي ، بينما تشغل باقي الحموض الأمينية المواقع الخارجية لسلاسل عديدات الببتيد ويسمح الغليسين بتجمع متقارب لسلاسل α الثلاث وذلك بسبب صغر حجمه، علماً أنَّ الغليسين هو أصغر حمض أميني.

يشغل غالباً البرولين proline والهيدروكسي برولين hydroxy proline و والهيدروكسي ليزين الموقع X والموقع Y . يعدُّ وجود 4–hydroxyproline أساسياً لتشكيل روابط الهيدروجين التي تسهم في ثبات هيكل الحلزون الثلاثي من خلال ربط السلاسل الثلاث مع بعضها.

أما الهيدروكسي ليزين فيسمح بتشكيل الليفات من خلال ربط جزيئات الكولاجين مع بعضها .

تستخدم الأرقام الرومانية للدلالة على نمط الكولاجين فنقول مثلاً النمط (I ، II ، III .....) .

يختلف طول الحلزون الثلاثي بتنوع أنماط الكولاجين فمثلاً الكولاجينات المشكلة للألياف من النمط I ، II ، III تحوي مجالاتها ما يقارب 1000 حمض أميني، بينما الكولاجينات من النمط VI و X ذات حلزون ثلاثي يحوي 200 أو 460 حمضاً أمينياً. (Mark,1999)

وبالرغم من أن الحلزون الثلاثي هو المظهر الأساسي لجميع الكولاجينات ويشكل الجزء الأكبر من الكولاجينات المشكلة للألياف فإن المجالات غير الكولاجينية المحيطة بالجزء المركزي للحلزون تُعدُّ أيضاً من المكونات البنيوية المهمة، حيث يعتقد أن C-propeptide يؤدي دوراً أساسياً في تشكيل الحلزون الثلاثي ، بينما N– propeptide يعتقد أنه معنيّ بتنظيم الأبعاد الأساسية للألياف. (Bateman et al,1988)

Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
Fibril-forming collagens			
I	$[\alpha1(I)]_2\alpha2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	α1(V),α2(V),α3(V)	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	α1(XI)α2(XI)α3(XI)	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	cartilage, vitreous body
Basement membrane collagens			
IV	$[\alpha1(IV)]_2\alpha2(IV)$; α1–α6	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
Microfibrillar collagen			
VI	α1(VI),α2(VI),α3(VI)	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
Anchoring fibrils			
VII	$[\alpha1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal–epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
Hexagonal network-forming collagens			
VIII	$[\alpha1(VIII)]_2\alpha2(VIII)$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha3(X)]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hypertrophic cartilage
FACIT collagens			
IX	α1(IX)α2(IX)α3(IX)	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	blood vessel wall
Transmembrane collagens			
XIII	$[\alpha1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal–epidermal junctions
Multiplexins			
XV	$[\alpha1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver

جدول (1–1) يبين أنماط الكولاجين المختلفة وبنيتها الجزيئية وتوزعها في الأنسجة.(Gelse et al,2003)

3-6-1 : تصنيف الكولاجين

تُصَنَّف الكولاجينات بالِاعتماد على البنية والترتيب فوق الجزيئي إلى المجموعات التالية :

A- الكولاجينات المُشَكِّلَة للألياف Fibril-forming collagens:

يمثّل الكولاجين المشكّل للألياف 90% من الكولاجين الإجمالي حيث إنه العائلة الأكثر غزارة والأوسع انتشاراً من بين الكولاجينات الأخرى . يشمل الأنماط التالية: I الأول ، II الثاني ، III الثالث ،V الخامس ، XIالحادي عشر.

يسهم كل من النمط I الأول و V الخامس من الكولاجين الليفي في تشكيل البنية الهيكلية للعظام . أما النمطان II الثاني و XI الحادي عشر فيسهمان بالدرجة الأولى بتشكيل القالب الليفي للغضروف المفصلي articular cartilage .

يمتلك هذا النوع من الكولاجينات القدرة على مقاومة الشد tensile strength والمحافظة على الاستقرار والتوازن رغم التعرض للِالتواء torsional stability وهذا يؤدي لسلامة الأنسجة.

(Birk et al,1988 and Mayne ,1989 and Mark,1999) .

B- كولاجينات الغشاء القاعدي Basement membrane collagens :

يشمل النمط الرابع IV من الكولاجين.

C- الكولاجين ذو الألياف المجهرية Microfibrillar collagen:

يشمل الكولاجين من النمط VI السادس وهو ذو ألياف مجهرية microfibrillar ولديه الكثير من الروابط المتصالبة ثنائية الكبريت، ويشكل شبكة من خيوط رفيعة تتشابك مع الكولاجينات الليفية الأخرى (Mark ,et al 1984).

D- الكولاجينات المرتبطة بالألياف Fibril-associated collagens :

تشمل الأنماط التالية: IX التاسع ،XII الثاني عشر،XIV الرابع عشر،XIX التاسع عشر،XX العشرون، XXI الحادي والعشرون.

وهي ذات حلزون ثلاثي متقطع interrupted triplehelices ويرمز لها (FACIT) .

و ترتبط مع الكثير من ألياف الكولاجين ومن المحتمل أنها تؤدي دوراً في تنظيم قطر ألياف الكولاجين . (Rest and Garrone, 1991)

E- الكولاجينات التي تشكل شبكة Network forming collages

مثل الكولاجينات من النمط VIII الثامن وX العاشر وهي تشكل شبكات سداسية hexagonal networks (Rest and Mayne , 1987).

F- ألياف التثبيت Anchoring fibrils:

تشمل النمط VII السابع.

G- الكولاجينات عبر الغشائية Transmembrane collagens :

تشمل النمط XIII الثالث عشر، و XVII السابع عشر.

بالإضافة إلى أنواع أخرى ذات وظائف منفردة .

1-6-4 : توزع الأنماط المختلفة للكولاجين وبنيتها ووظائفها

يتم التعرُّف على الكولاجينات المشكلة للألياف في المجهر الإلكتروني من خلال نموذج ربط مميز ودوري يحدث بمسافات منتظمة قدرها 70 nm وتسمى D period (Hulmes and Miller ,1981).

يشكل الكولاجين من النمط I أكثر من 90% من الكتلة العضوية في العظام ، وهو الكولاجين الرئيسي في الأوتار tendons والجلد والأربطة والقرنية cornea والعديد من الأنسجة الضامة الخلالية باستثناء القليل جداً من الأنسجة مثل الغضروف الزجاجي hyaline cartilage والدماغ والجسم الزجاجي vitreous body .

يتشكل الحلزون الثلاثي في كولاجين النمط I من سلاسل α غير متشابهة heterotrimer، حيث تكون هناك سلسلتان متطابقتان من α1(I) وسلسلة واحدة من α2(I) .في البيئة الحيوية in vivo غالباً ما تكون ألياف الحلزون الثلاثي مندمجة مع مركبات أخرى تتضمن إما كولاجين النمط III كما في الجلد (Fleischmajer et al,1990)، أو مع كولاجين النمط V كما في العظام والأوتار والقرنية .(Niyibizi and Eyre,1989)

يُؤَمِّن كولاجين النمط I في أغلب الأعضاء ولاسيما في الأوتار والصفاق fascia الصلابة اللازمة تجاه قوى الشد ، وفي العظم يكون مسؤولاً عن تقديم مجموعة من الخصائص الحيوية والميكانيكية التي تتعلق بتحمل الأوزان والثقل ومقاومة الشد، والمحافظة على الشكل والبنية عند التعرض للِالتواء وخاصة بعد التكلس.

يتصف كولاجين النمط II بأنه المكون الخاص والسائد في الغضروف الزجاجي، إلا أنه لا ينحصر في الغضاريف فقط، فهو يشكل حوالي 80% من الكولاجين الكلي ، ويوجد أيضاً في الجسم الزجاجي وبشرة القرنية والحبل الظهري Notochord والنواة اللبية للأقراص بين الفقرات والتحولات البشروية الضامة الجنينية . (Mark,1999)

يتكون الحلزون الثلاثي لكولاجين النمط II من ثلاث سلاسل متشابهة α1(II) homotrimer ويمتلك هذا الكولاجين الحجم والخصائص الحيوية الميكانيكية المماثلة لكولاجين النمط I.(Bruckner and Rest ,1994).

لا تقتصر ألياف الكولاجين في الغضاريف على النمط II فهناك أيضاً الكولاجين من النمط IX و XI وهي مسؤولة عن تحديد قطر الألياف بما يقارب 15–50 نانومتر بالإضافة إلى مجموعة من البروتينات غير الكولاجينية (Mendler et al ,1989).

يتشكل الكولاجين من النمط V و XI من ثلاث سلاسل α مختلفة (α1, α2, α3) ومن الملاحظ أن السلسلة α3 لكولاجين النمط XI يشفر من قبل المورثة ذاتها التي تشفر السلسلة α1 لكولاجين النمط II ، ويكمن الإختلاف فقط في مجال الإرتباط بالغليكوزيل والهيدروكسيل عن السلسلة α1(II) ، وينتشر كولاجين النمط XI بشكل واسع في الغضروف المفصلي مع كولاجين النمط II (Mark,1999).

1–6–5 : الكولاجين من النمط III

ينتمي إلى مجموعة الكولاجينات المشكلة للألياف ، وينتشر بشكل واسع في الأنسجة التي تحتوي على الكولاجين من النمط I بإستثناء العظام (Rossert and Crombrugghe ,2002)، كما يوجد في الأنسجة الخلالية لكل من الرئة و الكبد والطحال والأدمة وفي جدران الأوعية الدموية ويكون غزيراً في الأنسجة المرنة . (Mark,1981)

يتكون من ثلاث سلاسل متجانسة α1(III) homotrimer ويبلغ طول الحلزون الثلاثي 300 نانومتر، ويحتوي على ما يقارب 1000 حمض أميني (Bateman,1996 and Mark,1999).

يحتوي النسيج الضام الشباكي Reticular connective tissue على مجموعة من الألياف الشباكية تتألف من الكولاجين من النمط III ، وتشكل الألياف الشباكية شبكة تتوزع على سطحها خلايا مصورات الليف من نوع خاص تسمى هنا الخلايا الشباكية reticular cells ، وهذه الخلايا هيَ المسؤولة عن تصنيع الألياف بشكل شبكة رقيقة ومتفرعة (Strum et al ,2007) .

إلا أن الألياف الشباكية ليست محصورة فقط بالنسيج الضام الشباكي، ولكنها الأكثر غزارة وانتشاراً فيه.

يوجد النسيج الضام الشباكي حول الكلية والكبد والطحال ونقي العظام والعقد اللمفية (Martini, Frederic ,2006).

تقوم هذه الألياف بوظائف مهمة منها تشكيل هيكل رخو داعم للأعضاء اللمفية و النسيج الشحمي ، ومن الممكن إظهار هذه الألياف لرؤيتها ضمن المقاطع النسيجية عن طريق استخدام المعادن الثقيلة كالفضة أو كاشف شيف PAS حيث تتلون السكريات carbohydrates التي تدخل في تركيبها .

1-6-6 : الكولاجين من النمط IV

وهو المكون البنيوي الأكثر أهمية في الغشاء القاعدي وذلك بالتكامل مع اللامنين و nidogens بالإضافة إلى مكونات أخرى، وتتصف بنية الكولاجين IV بوجود ثلاثة مجالات هي:

1- النهاية الأمينية للسلسلة متعددة الببتيد N-terminal .

2- النهاية الكربوكسيلية للسلسلة متعددة الببتيد C-terminal .

3- الجزء المركزي من الحلزون الثلاثي مع اِنقطاعات قصيرة للثلاثية المتكررة (GLY-X-Y) ينتج عنها حلزون ثلاثي قابل للاِنثناء . هذا وقد تم التعرف على 6 سلاسل ثانوية إلى الآن ابتداءً من السلسلة α1(IV) حتى السلسلة α6(IV) (BABA et al,2008).

والشكل الأكثر انتشاراً لهذا النمط من الكولاجينات ناتج عن اتحاد سلسلتين من α1(IV)2 مع سلسلة واحدة من α2(IV)، وبالتالي تتشكل الشبكة التي تشاهد في معظم الأغشية القاعدية عند البالغين والأجنة (Hudson et al 1993).

لا يَظهَر في هذا النمط من الكولاجين التخطيطات العرضية التي يفصل بينها مسافة 67 نانومتر، وتذكر العديد من المقالات الطبية ضياع السلسلتين α5(IV) و α6(IV) في الغشاء القاعدي المحيط بالأعشاش الخلوية بعد غزو النسيج الضام المجاور، وذلك في المراحل الأولى من الاجتياح (BABA et al,2008 and Tamamura et al ,2006).

تفرز الخلايا السرطانية أنزيمات حالة ،أو تحرض خلايا المضيف على إنتاج خمائر حالة للبروتينات بما فيها الجيلاتيناز و الكولاجيناز (Supriatno et al,2003) حيث يعمل الكولاجيناز IV على حل الكولاجين IV ويعمل Metalloproteinases 2 و9 على حل الكولاجين IV الموجود في الغشاء القاعدي . مما يسمح للخلايا السرطانية بغزو النسيج الضام واِستعمار الأنسجة والأعضاء البعيدة، فهناك العديد من الخمائر البروتينية proteases والخمائر الحالة للبروتين proteolytic enzymes و cathepsin بنوعيه D و B تسهل

مرور الخلايا السرطانية واِستعمارها الأنسجة المجاورة (Kawasaki et al 2002 and Myoung et al,2003) .

1-6-7 : العلاقة بين القالب خارج الخلوي والخلايا الورمية

إن القالب خارج الخلوي هو مركب من جزيئات غير حية تصنعها وتفرزها الخلايا في المسافات خارج الخلوية، ويعتقد أن القالب خارج الخلوي يشكل العناصر الهيكلية للنسج التي يسكنها (Leslie et al ,2007).

يتكون القالب خارج الخلوي ECM من شبكة كثيفة من ألياف الكولاجين والألياف المرنة مغمورة في قالب من مواد أساسية viscoelastic ground substances ذات قوام جيلاتيني تتألف من البروتيوغليكانات proteoglycans والبروتينات السكرية glycoproteins .(Liotta,1986)

كما يتألف القالب الناضج للقالب خارج الخلوي من تجمع فوق جزيئي لبروتينات النسيج الضام تتضمن الكولاجين الليفي وغير الليفي وبروتين الألياف المرنة elastin والبروتينات السكرية glycoproteins والغليكوز أمينو غليكانات glycosaminoglycans، التي تتفاعل مع بعضها بروابط تشاركية وغير تشاركية covalent and non- covalent bonds لتشكيل مواد غير قابلة للِانحلال.(Zucker et al,2012).

تقاوم المادة الأساسية قوى الضغط بينما تقاوم الألياف قوى الشد ، كما تؤدي جزيئات القالب خارج الخلوي دوراً مهماً في التمايز والتكاثر وهجرة الخلايا البشروية الورمية (Kosmehl et al,1996) .

تحدد البيئة الصغيرة خارج الخلوية للأورام من قبل مركبات القالب المفرزة من الخلايا السليمة و الورمية تماماً كما تقوم خلايا مصورات الليف بإفراز مركبات اللحمة الضامة عند الثوي .

تتنوع اللحمة الضامة stroma من منطقة إلى أخرى حتى في الورم المفرد single tumour كما أن مكونات اللحمة الضامة قد تتطور مع مرور الوقت (Nagy et al ,1988) .

على أية حال فإن دور المكونات الليفية (الكولاجين ، والإلاستين ، والألياف الشباكية) والمواد الأساسية ground substances (الغليكوبروتينات، mucinsm ، والليفين) في المراحل المختلفة من تنشؤ الورم لا يزال قيد التحديد. قد تبدل التغيرات الفعالة في اللحمة الضامة الورمية من عدوانية السلوك الحيوي للسرطانات، كما قد يساعد إدراج هذه المفاهيم ضمن جملة الدلائل الإنذارية في إظهار التنوع الحيوي للسرطان الفموي والتنبؤ بالنتائج السريرية(George et al, 2012) .

الباب الثاني : مواد البحث وطرائقه

Materials and Methods

2-1 : العينة

أُجريت دراسة راجعة Retrosoepctive cohort study لعينة البحث المؤلفة من :

30 عينة من سرطانة شائكة الخلايا للرأس والعنق تم أخذها من أماكن مختلفة (من الشفة والبلعوم والحفرة الفموية)، وهذه العينات محفوظة في قوالب من شمع البارافين، وقد تم الحصول عليها من أرشيف قسم النسج والتشريح المرضي من مشفى البيروني بين عام 2005-2010 وذلك بعد أن تمت الموافقة الأخلاقية والقانونية على بروتوكول الدراسة . وكان الشرط الوحيد لقبول الخزعات هو عدم تعرض المرضى لمعالجات شعاعية أو كيميائية سابقة . و توزعت عينة البحث بحيث يؤخذ من كل عينة ثلاث شرائح وفق الترتيب الآتي :

1 – الشريحة الأولى تم تلوينها بالتلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين و الإيوزين للتأكد من صحة التشخيص.

2- الشريحة الثانية تم تلوينها بصباغ نترات الفضة.

3- الشريحة الثالثة تم تلوينها بمضاد الكولاجين IV.

أما العينة الشاهدة فقد تألفت من **30** خزعة أخذت من لثة حرة سليمة من مرضى خضعوا لعمليات تطويل تيجان في قسم اللثة في جامعة دمشق، وذلك بعد أخذ الموافقة الأخلاقية المستنيرة لكل مريض.

2-2 : مواد البحث

1 – الفورمول **10**%.

2 – الكحول والاكزيلول

3 – شمع البارافين

4 – ملونات الهيماتوكسيلين و الإيوزين التقليدية.

5 – بلسم كندا

6- مواد التلوين الخاصة بتشريب ألياف الكولاجين **III** بالفضة وفق طريقة **GOMORI** :

- محلول نترات الفضة 10 %.

- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 10 %.

- محلول برمنغنات البوتاسيوم potassium permanganate 1%.

- محلول Potassium metabisulphite 3 %.

- محلول كبريتات الأمونيوم الحديدية Ferric Ammonium Sulphate 2% وتعرف أيضاً باسم Iron Alum ويدل مصطلح Alum على الأملاح التي تحتوي على زمرة ثنائية مضاعفة من الكبريتات $(SO_4)_2$.

- محلول الفورمالين 10 %.

- محلول كلور الذهب Gold chloride .

- محلول Sodium Thiosulphate 3 %.

- ماء مقطر.

7- مواد التلوين المناعي :

- كيت التلوين المناعي المفرد من شركة Bio SB الأمريكية ويضم :

PEROXIDASE , HRP LABEL , DAB BUFFER , chromogen

- ضد وحيد النسيلة فأري للكولاجين Mouse Monoclonal IV من شركة Bio SB الأمريكية و يتوضع هذا الواسم في السيتوبلاسما (الهيولى).

- محلول استرجاع المستضد Antigen Retrieval.

- المحلول الدارئ.

- قلم تحديد من شركة Dako .

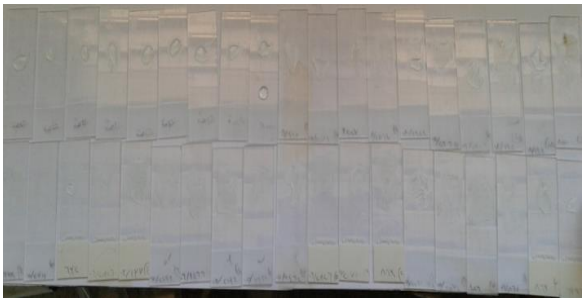
8 – الشرائح الزجاجية التقليدية والخاصة بالتلوين المناعي.

9- السواتر.

شكل (2–1)الكيت المناعي المفرد

شكل (2–2)ضد وحيد النسيلة للكولاجين IV

شكل (2–3) المحلول الدارئ



شكل (2–4) الشرائح الزجاجية

2–3 الأجهزة المستخدمة

1 – المبشرة النسيجية (microtome) نوع LEICA RM 2155 مُصنّع في ألمانيا .

2– المحم المائي.

3– سخان من نوع LEICA – ألمانيا.

4– المايكرويف.

5– قلم التحديد من شركة Dako.

6– الممص pipette .

7– المجهر الضوئي نوع Nikon Olympus-cx21-اليابان.

شكل (2-5)المايكروويف

شكل(2-6)السخان

شكل (2-7)المحم المائي

شكل(2-8)المجهر الضوئي

شكل (2-9)المبشرة النسيجية

شكل (2-10) قلم التحديد

2-4 طريقة العمل:

2-4-1 تحضير العينات النسيجية :

يمر تحضير العينات بالمراحل التالية :

1 –مرحلة التثبيت:

حيث توضع العينات في الفورمول تركيز 10 **%** لمدة 24 ساعة بهدف تثبيت العينة ومنع التحلل الذاتي للأنسجة .

2 – مرحلة التجفيف:

الهدف من هذه المرحلة هو إزالة الماء من العينة، وقد استخدم لذلك ثلاثة حمامات من الكحول مختلفة التركيز وفق ما يلي :

– الحمام الأول بتركيز 70 % وتترك العينة فيه لمدة ساعة.

– الحمام الثاني بتركيز 85 % وتترك العينة فيه لمدة ساعة أيضاً.

– الحمام الثالث يحوي الكحول المطلق وتترك العينة فيه لمدة ساعة أيضاً.

3 – مرحلة التشفيف:

هي مرحلة مهمة لطرد الكحول من العينة وجعلها شافّة، وقد اِستُخدِمت ثلاث حمامات من الكزيلول ووضعت العينة فيها في كل منها لمدة ساعة.

4 – مرحلة إدماج شمع البارافين :

تم وضع العينات في حمام من شمع البارافين المنصهر بدرجة حرارة 55 درجة مئوية لمدة (1–2) ساعة ثم وضعت ضمن قوالب حيث أضيف إليها شمع البارافين ،ثم تُترَك القوالب الشمعية لتبرد و تتصلب، وبذلك تكون قد أصبحت جاهزة للقطع، ويتم حفظ القوالب في البراد. وبذلك تكون جميع العينات محفوظة ضمن قوالب شمعية وجاهزة لإجراء التلوين (الهيماتوكسيلين و الإيوزين) والمناعي.

2-4-2 طريقة التلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين والإيوزين :

1 – يثبت المكعب الشمعي على المبشرة النسيجية Microtome وتحدد سماكة القطع ب 4 ميكرون .

2 – تفرش هذه المقاطع البارافينية في محم مائي يحتوي على ماء مقطر بدرجة حرارة 40–45 درجة مئوية لإزالة التجاعيد وتحميلها على الشرائح الزجاجية.

3 – توضع الشرائح الزجاجية في فرن التجفيف بدرجة حرارة 45–50 درجة مئوية لتجفيفها من الماء لمدة 10 دقائق.

4 – ثم تمرر الشرائح في 3 حمامات من الكزيلول لمدة 15 دقيقة لكل حمام بهدف إزالة شمع البارافين.

5 – تمرر بعد ذلك الشرائح في الكحول المطلق، ثم كحول بنسبة 95 % يليها 70 % ثم 50% لمدة 15 دقيقة لكل حمام لتتم إزالة الكزيلول .

6 – تغسل الشرائح بالماء وتوضع في الهيماتوكسيلين لمدة دقيقتين، ثم تغسل بالماء عدة مرات لإزالة الهيماتوكسيلين الزائد.

7 – توضع بعد ذلك في الإيوزين لمدة تتراوح بين دقيقة ودقيقة ونصف وتغسل بالماء لإزالة الإيوزين الزائد.

8 – توضع في حمام كحول 70 % لمدة دقيقة ثم 95 % لمدة دقيقة، ثم في حمامين من الكحول المطلق لمدة دقيقة واحدة لكل حمام ليتم طرد الماء من النسيج.

9 – تجفف العينة وتوضع في الكزيلول لمرتين متتاليتين لمدة 3 دقائق في كل مرة لطرد الكحول

10 – تستر السلايدات الزجاجية بالسواتر باستخدام بلسم كندا لتصبح جاهزة للفحص النسيجي .

2-4-3 تشريب ألياف الكولاجين III بالفضة باستخدام طريقة Gomori :

في البداية يجب تحضير محلول الفضة المعدل كما يلي :

أُضيف 4 مقادير من نترات الفضة المائية 10 % في أنبوب اختبار أو حوجلة زجاجية، وأضيف إليها مقدار من هيدروكسيد البوتاسيوم 10 % بهدف ترسيب الفضة، و استخدم قلم الزيت لوضع علامة للدلالة على حجم السائل، ثم أُزيل الفائض من السائل وغسل الراسب بالماء المقطر عدة مرات، ثم أضيفت الأمونيا المركزة (880) نقطة فنقطة حتى تمام انحلال الراسب بشكل كامل ، ثم أضيفت بعد ذلك نترات الفضة 10 % نقطة فنقطة حتى أصبح الراسب بلمعان وبريق خفيفين، وأضيف إلى هذا المحلول ماء مقطر بما يعادل ضعفي حجمه .

ملاحظة: يمتلك هذا المحلول صلاحية لمدة 24–36 ساعة .

ولإجراء عملية التلوين اتُبعت الخطوات التالية :

1- استُخدمت برمنغنات البوتاسيوم 1% لمدة 1-2 دقيقة وغُسِلت الشرائح بماء الصنبور ، وتعد برمنغنات البوتاسيوم من المؤكسدات oxidizer و يتم من خلال عملية الأكسدة استبدال مجموعات الغليكول glycol في السكاكر السداسية للألياف الشباكية بالألدهيدات . وهناك مؤكسدات أخرى يمكن استخدامها مثل :

حمض فوسفوموليبيديك phosphomolybdic acid أو حمض البيريوديك periodic acid.

2- بعد ذلك اِستُخدِم potassium metabisulphate 3 % لمدة دقيقة، ثم غسلها بماء الصنبور والهدف من هذه العملية هو إزالة اللون .

3 – بعد ذلك استخدمت كبريتات الأمونيوم الحديدية Iron alum 2% لمدة دقيقة، والغرض من ذلك هو التحسيس sensitization، فخلال هذه المرحلة يحدث التشريب بالمعدن حيث تترسب الأملاح المعدنية على وحول العناصر النسيجية، ولكن ليس بداخلها لكي تظهر بوضوح، وستستبدل هذه المعادن بالفضة لاحقاً. ويمكن استخدام محسسات أخرى مثل: نترات اليورانيوم ، ومحاليل مخففة من نترات الفضة .

4 – يتبع ذلك غسيل الشرائح بماء الصنبور من 2-3 دقيقة، ثم يعاد غسلها بالماء المقطر مرتين أو ثلاث مرات.

5 – التشريب بمحلول الفضة لمدة 3 دقائق .

6 – الغسل بالماء المقطر بسرعة .

7 – ثم اِستخدام الفورمالين 10% لمدة 3 دقائق وذلك بهدف إرجاع الفضة المتبقية إلى فضة معدنية .

8 – الغسل بالماء الجاري لمدة 2-3 دقيقة ثم الغسل بالماء المقطر .

9 – ثم اِستخدام كلور الذهب ولونه أصفر لمدة 5-15 دقيقة، وتدعى هذه العملية بتغيير اللون Toning، وهنا سوف تُستَبدَل الفضة المعدنية بالذهب المعدني بهدف تحسين الوضوح clarity والتباين contrast حيث يتغير لون المكونات التي تم شُرِّبَت من البني إلى الأسود، ويزول اللون الأصفر من خلفية الساحة، ولكن من المحتمل أن تحدث هذه المرحلة بشكل مبالغ فيه لدرجة أنها تؤدي لجعل خلفية الساحة بلون بنفسجي إلى أحمر بعيد إلى حد ما عن اللون الرمادي المرغوب فيه .

10 –الغسل بالماء المقطر .

11 – تخفيف اللون بإستخدام potassium metabisulphate 3 % لمدة دقيقة ثم الغسل بالماء المقطر .

12 –ثم أضيف تيوسلفات الصوديوم 3 % لمدة دقيقة للتثبيت حيث إن هذا المركب سوف يزيل الفضة غير المخففة وسوف يمنع الفضة اللانوعية المرتبطة والمتبقية في الشرائح من أن تخفف في حال تعرضها لأشعة الشمس لاحقاً .ثم تُغسل الشرائح بالماء ويُنتَظَر حتى تجف وبذلك تصبح المحضرات جاهزة للفحص النسيجي .

ملاحظات مهمة لنجاح عملية التلوين :

يجب اِستخدام الملاقط المطلية أو البلاستيكية عوضاً عن الملاقط المعدنية ، كما أن أملاح الفضة يجب حفظها في عبوات عاتمة لأنها تتأكسد بالضوء في حال وُضعت في عبوات شفافة .

2-4-4:طريقة التلوين المناعي

1 – إزالة شمع البارافين :

بعد التقطيع بالمبشرة النسيجية تسخن الشرائح في فرن بدرجة حرارة 58 درجة مئوية لمدة ساعتين ، ثم تمرر

الشرائح في سلسلة من الحمامات تتضمن حمامين من الكزيلول لمدة (3-5) دقائق لكل منهما، ليتبع بثلاثة حمامات من الكحول تبدأ بالكحول المطلق ثم الكحول 95 %، ومن ثم 70 % لمدة 3 دقائق لكل حمام بعدها تغسل الشرائح بالماء الجاري بلطف.

2 – عملية اِسترجاع المستضد:

تم تحضير محلول اِسترجاع المستضد حسب تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بتمديده بالماء المقطر بنسبة (100/1)، وقد تم هذا التحضير لكل من Citrate/EDTA حيث وضعت الشرائح ضمن وعاء يحوي كمية كافية من محلول استرجاع المستضد وغمرت الشرائح فيه بشكل كامل.

وضع الوعاء في الميكرويف لمدة 15 دقيقة (حوالي 10 دقائق بعد الغليان)، ثم ترك بعدها لحوالي (15-20 دقيقة) ليبرد في درجة حرارة الغرفة . ثم وضعت الشرائح في حوض يحوي السائل الدارئ PBS لمدة 5 دقائق، ثم نقلت إلى حوض آخر يحوي السائل الدارئ أيضاً PBS لمدة 3 دقائق مع الانتباه لعدم جفاف المقاطع النسيجية خلال مراحل التلوين كافة.

3 – تطبيق Peroxidase Blocker :

أُزيل المحلول الدارئ PBS الزائد وُمسح حول العينة بلطف، واِستُخدم قلم التحديد من DAKO لتحديد حول المقاطع النسيجية بهدف منع تسرب المواد المطبقة خارج النسيج. وطُبِّقت المادة بواسطة الممص

(Eppendorf) بحيث غطيت كامل العينة وتركت 5 دقائق . غسلت الشرائح بعدها بالمحلول الدارئ PBS مع تجنب الغسيل المباشر للعينة النسيجية، ثم وضعت في حمام جديد من السائل الدارئ لمدة 5 دقائق .

4 – تطبيق الضد الأولي primary antibody:

حُضِّرت الملونات ومُدِّدَت بالسائل الدارئ PBS حسب التراكيز المذكورة سابقاً، وبعدها أزيل المحلول الدارئ الزائد مع المسح حول العينة بلطف . ثم طبق الضد الأولي للكولاجين IV بواسطة الممص بحيث تغطى كامل العينة .وكان زمن الحضن 30 دقيقة .غسلت بعدها الشرائح بالمحلول الدارئ ووضعت في حوض من السائل الدارئ لمدة 5 دقائق.

5 – تطبيق Secondary Biotinylated و HRP Label لمدة عشر دقائق لكل منهما .

6 – تطبيقDAB :

حُضِّر حسب توصيات الشركة المنتجة (1مل من SUBSTRATE BUFFER مقابل 20 ميكروناً من

DAB+CHROMOGEN)مع المزج جيداً ضمن عبوة مناسبة، كذلك أُزيل المحلول الدارئ من حول العينة وطبقت المادة بلطف بواسطة الممص بحيث تغطي 1 مل العينة وتركت لمدة 5 دقائق، ثم غسلت الشرائح بالماء بلطف .

7– تم طُبِّق الهيماتوكسيلين على العينات لمدة تقارب 30 ثانية ثم غسلت بالماء .

8 – بعدها مررت الشرائح بحمامات متتالية من الكحول ثم كحول مطلق (كل حمام لمدة 3 دقائق) ثم حمامين من الكزيلول (3–5 دقائق لكل منها)، وفي النهاية سترت العينات ببلسم كندا وأصبحت جاهزة للدراسة المناعية.

2–4–5 – تقييم العينة الشاهدة:

فُحصت العينة الشاهدة بعد تلوينها بالهيماتوكسيلين و الإيوزين تحت المجهر الضوئي والتأكد من خلوها من أي علامات التهابية أو فرط تكاثر أو سوء تصنع أو أي مظهر غير طبيعي آخر.

2–4–6 –تقييم الدرجة النسيجية:

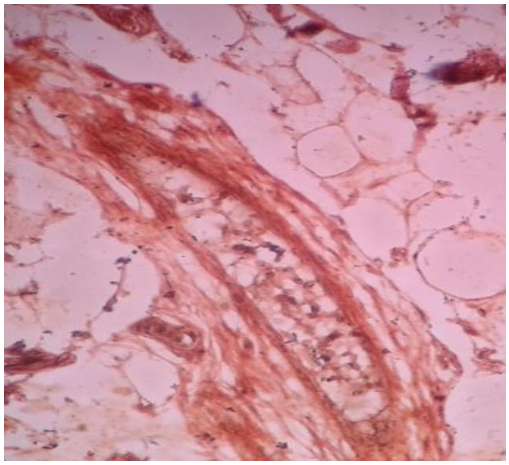
بعد إنهاء تلوين محضرات عينة الدراسة بالهيماتوكسيلين والإيوزين، فُحِصَت تحت المجهر الضوئي للتأكد من صحة التشخيص ، واِستبعدت أي حالة تدعو للشك والحالات سيئة الحفظ أو التثبيت، ثم قُيِّمَت درجة التمايز النسيجية لكل حالة بالاِعتماد على تصنيف منظمة الصحة العالمية 2005 (Barnes et al.,2005).

الدرجة النسيجية	الدرجة I	الدرجة II	الدرجة III
كرات التقرن	كثيرة العدد	متوسطة العدد	قليلة أو معدومة
علائم الكشم الخلوي	أقل من 25%	تقارب 50%	أكثرمن 75%
نمط الغزو	جزر كبيرة	جزر أو حبال متوسطة	جزر صغيرة أو حبال رقيقة وخلايا مفردة
الاستجابة المناعية	غزيرة	متوسطة	قليلة أو معدومة

الجدول (2-1) المعايير المتبعة في تقييم الدرجة النسيجية

2-4-7 -تقييم التلوين بملون الكولاجين III وطريقة الدراسة:

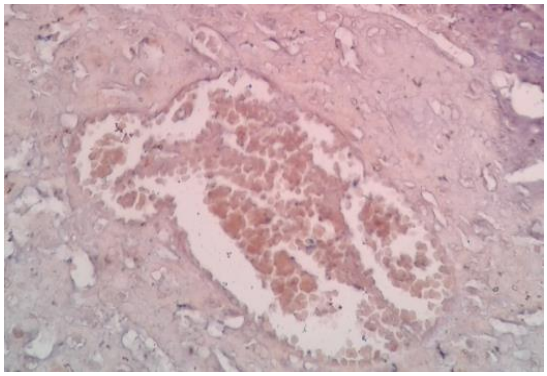
دُرِسَت المحضرات الملونة بملون الكولاجين **III** على اعتبار أن الكولاجين **III** موجود في حال ظهور الألياف بلون أسود أو بني غامق في النسيج الضام أسفل البشرة واللحمة الضامة المحيطة بالجزر الورمية في عينات السرطانة شائكة الخلايا، وأيضاً في النسيج الضام أسفل الغشاء القاعدي في البشرة السليمة في العينة الشاهدة ، وبالتالي تكون التعبيرية إيجابية ، وعُدَّ الملون سلبياً في حال غياب اللون الأسود أو البني الغامق في النسيج الضام، وبالتالي تكون التعبيرية سلبية . وقد لوحظ أن هناك تفاوت في كثافة الألياف أي تعبيرية الملون بين العينات المدروسة بين الخفيفة والمتوسطة والشديدة، وكما أنه استخدمت الأوعية الدموية للضبط الإيجابي Positive Control والتأكد من فعالية الملون المستخدم .



شكل (2-11) تعبيرية صباغ نترات الفضة في وعاء دموي

2-4-8 : تقييم التلوين المناعي بمضاد الكولاجين IV وطريقة الدراسة:

دُرِسَت المحضرات الملونة بمضاد الكولاجين IV على اعتبار أن الغشاء القاعدي يبدي تعبيرية إيجابية لمضاد الكولاجين IV في حال ظهور اللون البني على الغشاء القاعدي لكل من البشرة السطحية وحول الجزر الورمية الموجودة في النسيج الضام في عينات السرطانة شائكة الخلايا، وأيضاً في الغشاء القاعدي للبشرة السليمة في العينة الشاهدة، وعُدَّ الملون سلبياً في حال غياب اللون البني، وبالتالي تكون التعبيرية سلبية . وقد تمت ملاحظة أن هناك تفاوتاً بين العينات المدروسة في درجة أخذ اللون، أي تعبيرية الملون المناعي بين الجيد والمتوسط والضعيف أو غياب اللون كلياً، وهنا تجدر الإشارة إلى أنه قد اِستخدمت الأوعية الدموية أيضاً للضبط الإيجابي Positive Control و التأكد من فعالية الملون المستخدم .



شكل (2-12) تعبيرية مضاد الكولاجين IV في وعاء دموي

2-5 -الإختبارات الإحصائية المستخدمة:

اِستُخدِمَ برنامج SPSS v.19 لتحليل البيانات التي حصلنا عليها إحصائيا، بالإضافة إلى برنامج (MS Excel 2013) لإنجاز الرسوم البيانية ، وقد اِستُخدِم لتحليل البيانات الإختبار الآتي :

اِختبار كاي مربع للإستقلال:

هو اختبار إحصائي يستخدم لمعرفة فيما إذا كان هناك علاقة ما أو تأثير مشترك بين متغيرين مدروسين ، وهو يعتمد على حساب نسبة تكرار ظهور حالة لمتغير ما بالتزامن مع حالة أخرى في متغير آخر ، ويظهر في الجدول الخاص بهذا الاختبار قيمة إحصاء كاي مربع وقيمة مقدرة لمستوى الدلالة (P-value) التي تستخدم للإقرار فيما إذا كان المتغيران مستقلين أو مرتبطين، فعند مستوى الثقة 95% نقارن قيمة مستوى الدلالة المقدرة مع القيمة (α=0.05) ، فإذا كانت أصغر منها فإننا نقرر أن المتغيرين مرتبطان مع بعضهما (أي توجد

بينهما علاقة)، و إذا كانت أكبر من (α=0.05) فإن القرار سيكون أن المتغيرين مستقلّان و لا توجد علاقة بينهما .

ويمكن صياغة الفرضيات التي يختبرها بالشكل التالي :

فرضية العدم H0: إذا كانت قيمة (P-value>0.05) فإننا نقبل هذه الفرضية والمتغيرين مستقلين عن بعضهما أي لاتوجد علاقة بينهما .

الفرضية البديلة H1: إذا كانت قيمة (P-value<0.05) فإننا نقبل هذه الفرضية والمتغيرين مرتبطين مع بعضهما أي توجد علاقة بينهما .

الباب الثالث : النتائج والدراسة الإحصائية

Results and Statistical Study

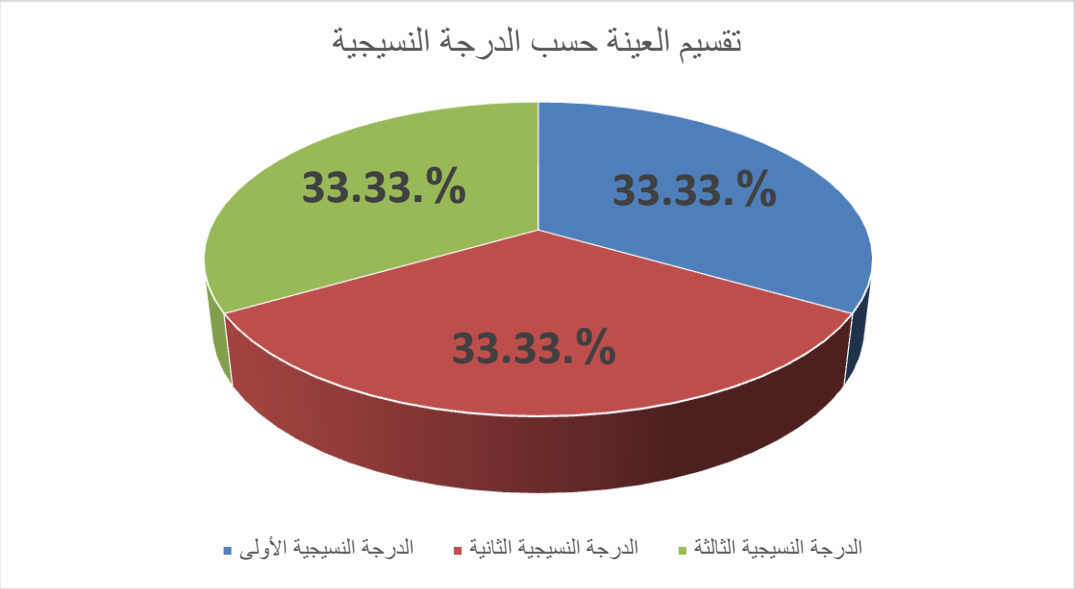
3-1 عينة البحث :

تألّفت عينة البحث من 30 حالة مأخوذة من 30 مريضاً مصاباً بالسرطانة شائكة الخلايا في منطقة الرأس والعنق. تم تقسيمهم حسب درجة الإصابة إلى ثلاث مجموعات بحيث اِحتوت كل من المجموعات الثلاث على 10 مرضى أي بنسبة (33.33%) لكل مجموعة .

الدرجة I: 10 حالات أي بنسبة 33.33%.

الدرجة II : 10 حالات أي بنسبة 33.33%.

الدرجة III: 10 حالات أي بنسبة 33.33%.



مخطط (3-1) تقسيم العينة حسب الدرجة النسيجية .

تم الحصول على ثلاث ساحات نسيجية من كل خزعة وتم تلوين أحدها بالهيماتوكسيلين و الإيوزين، و الثاني بصباغ نترات الفضة، والثالث بواسم كيميا نسيجي مناعي لمضاد الكولاجين IV.

تم تحديد حجم العينة باستخدام برنامج G*power عند حجم الخطأ من النوع الأول $\alpha=0.05$ ، وقوة اختبار 95% .

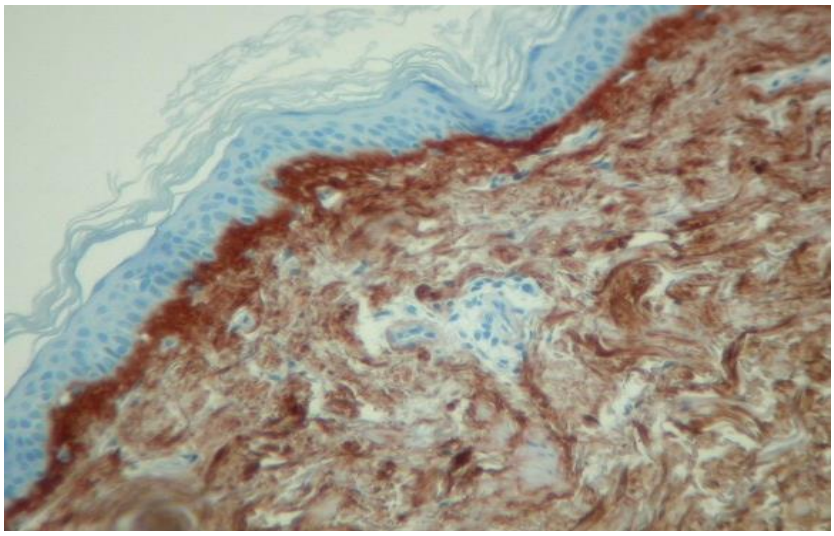
دُرسَت 5 ساحات نسيجية من كل محضر، وعُدَّت درجة تعبيرية الملون في كل محضر هي المتوسط للساحات الخمس المدروسة .

3-2 الاختبار الإحصائي:

3-2-1 : دراسة صباغ نترات الفضة :

أولاً-العينة الشاهدة :

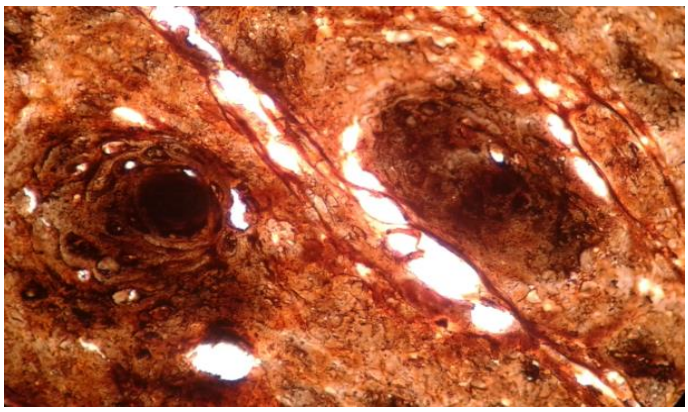
أظهر صباغ نترات الفضة تعبيرية قوية لألياف الكولاجين III في النسيج الضام، ولاسيَّما بمحاذاة الغشاء القاعدي لبشرة العينة الشاهدة .



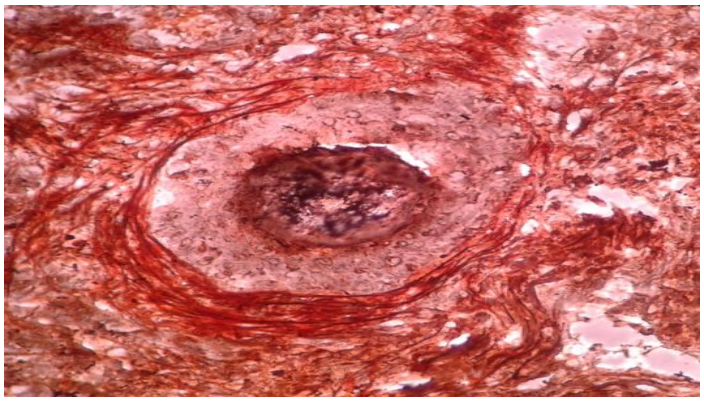
شكل(3-1) تعبيرية قوية لصباغ نترات الفضة في العينة الشاهدة. تكبير 100 مرة.

ثانياً- عينة الدراسة :

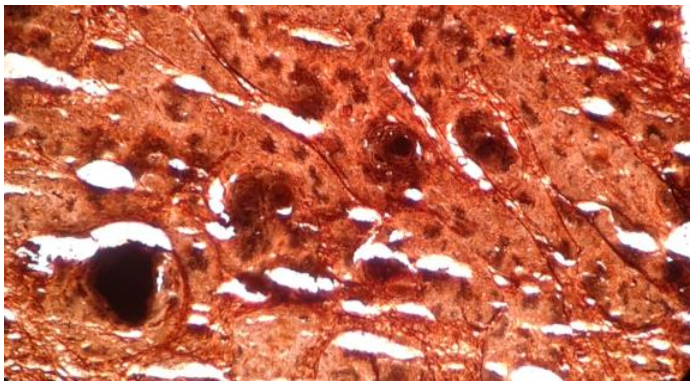
أظهر التلوين بنترات الفضة لعينة الدراسة تعبيرية متباينة تجاه الملون . وتراوحت التعبيرية بين القوية والمتوسطة والضعيفة .إلا أنه لم يلاحظ وجود سلبية للتعبيرية في أي من المقاطع النسيجية .



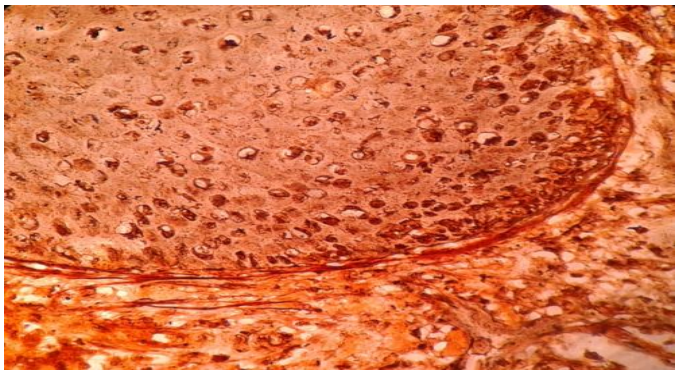
شكل (3-2)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



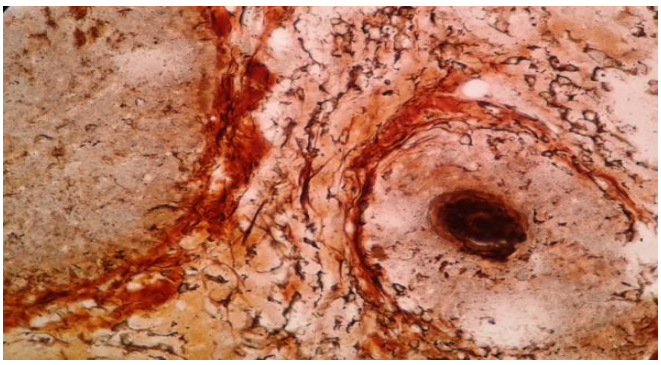
شكل (3-3)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



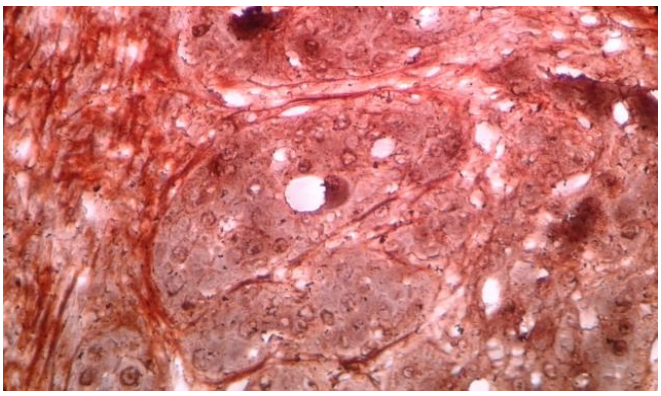
شكل (3-4)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



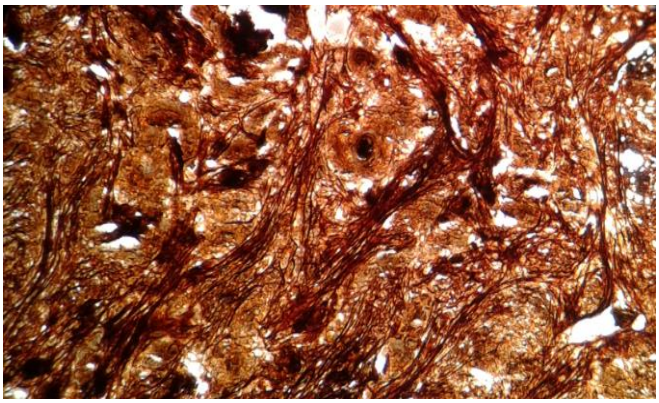
شكل (3-5)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



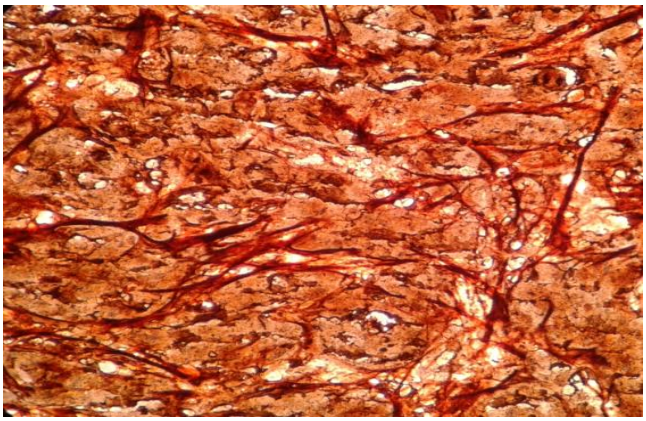
شكل (3-6)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400



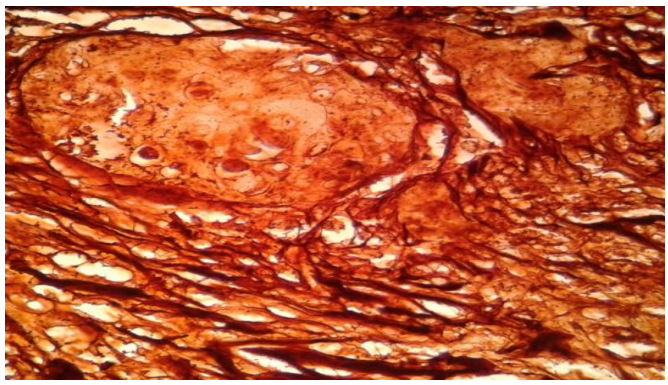
شكل (3-7)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400



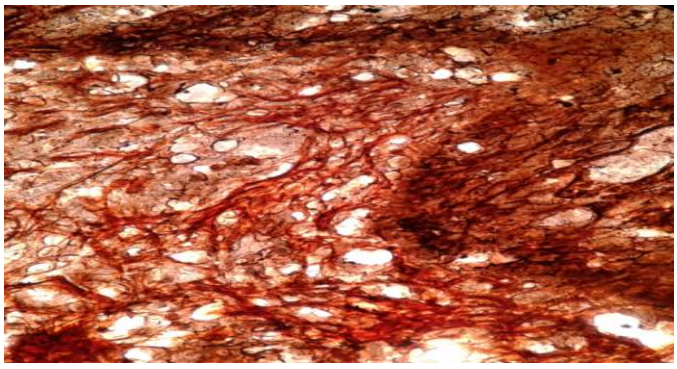
شكل (3-8)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 100



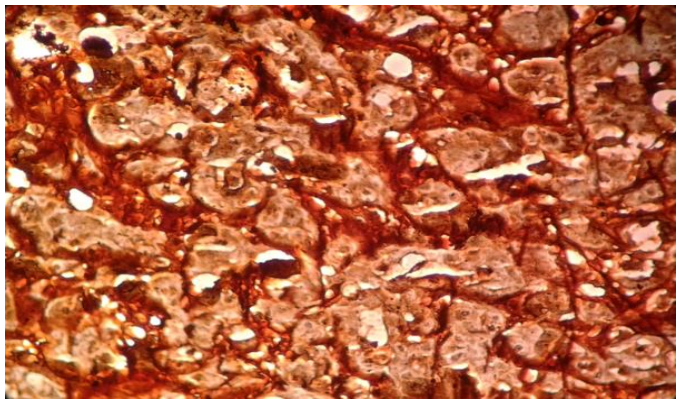
شكل (3-9)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400



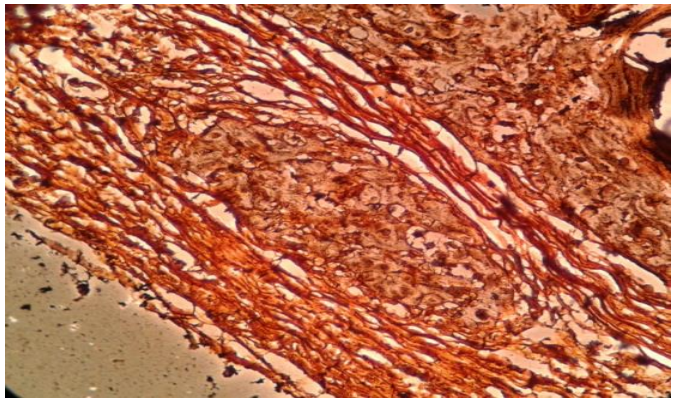
شكل (3-10)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز تكبير100



شكل (3-11)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز تكبير400 (منطقة الغشاء القاعدي للبشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



شكل (3-12)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز تكبير400



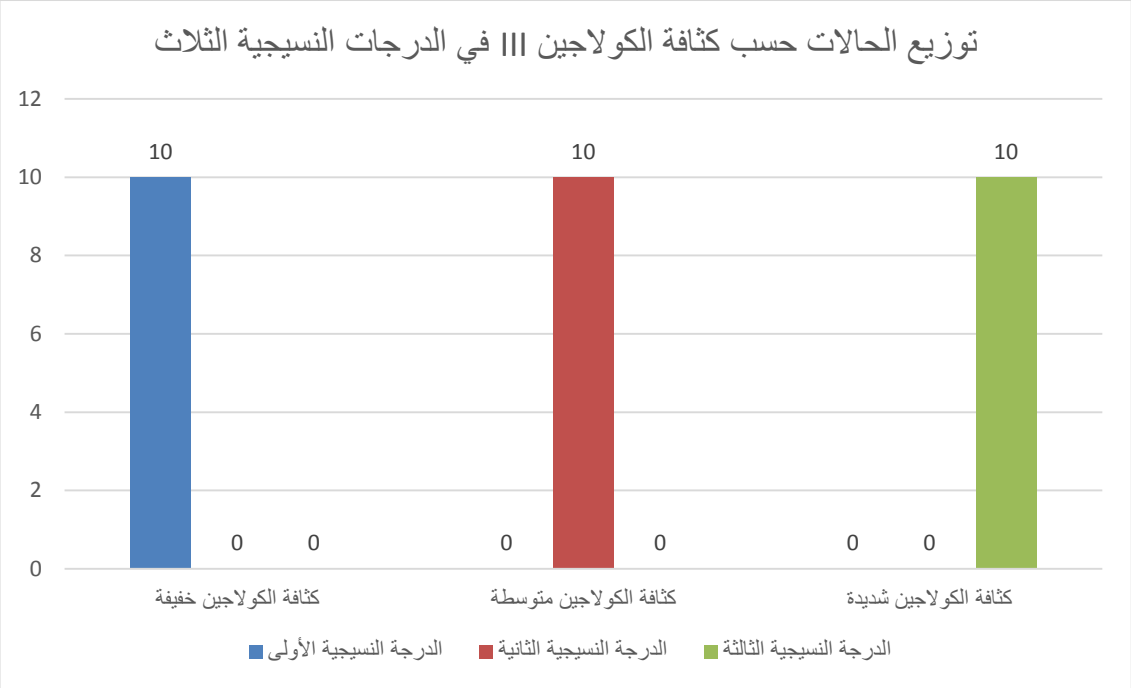
شكل (3-13)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز تكبير100

ثالثاً– الدراسة الإحصائية للكولاجين III:

يوضح الجدول التالي توزيع الحالات حسب كثافة الكولاجين III في الدرجات النسيجية الثلاث:

		الدرجة النسيجية		
		الأولى	الثانية	الثالثة
كثافة الكولاجين III	خفيفة	10 (100%)	0	0
	متوسطة	0	10 (100%)	0
	شديدة	0	0	10 (100%)

الجدول (3–2) توزيع الحالات حسب كثافة الكولاجين III في الدرجات النسيجية الثلاث



مخطط (3–3) يوضح توزيع الحالات حسب كثافة الكولاجين III في الدرجات النسيجية الثلاث

لبحث تأثير الدرجة النسيجية على كثافة الكولاجين III ، نجري إختبار كاي مربع للِاستقلال لدراسة الإرتباط بين الدرجة النسيجية وكثافة الكولاجين III:

إحصاء الاختبار χ^2	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
60.000	0.000 *	توجد علاقة

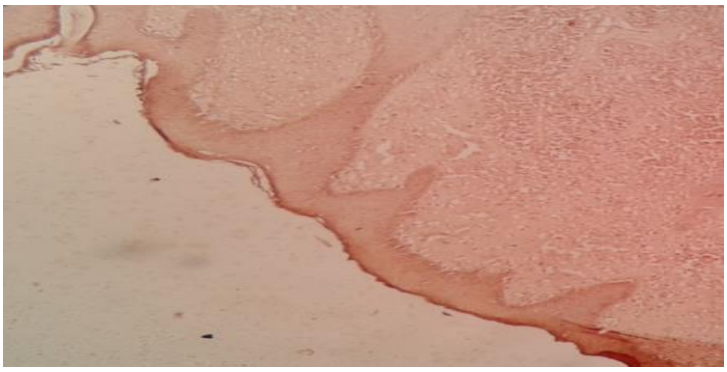
جدول (3–4)يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة تأثير الدرجة النسيجية على كثافة الكولاجين III

تبين النتائج وبثقة 95%، وجود علاقة تأثير للدرجة النسيجية على كثافة الكولاجين III ، بحيث إن كثافة الكولاجين III تزداد شدة بازدياد الدرجة النسيجية.

3-2-2 : دراسة ملون مضاد الكولاجين IV :

أولاً- العينة الشاهدة:

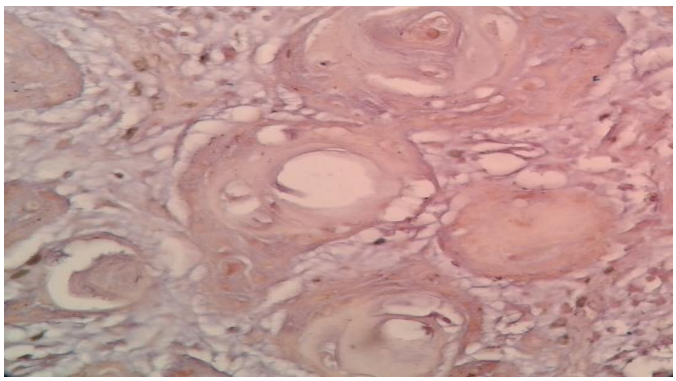
أظهر الغشاء القاعدي لبشرة العينة الشاهدة تعبيرية قوية لمضاد الكولاجين IV دون ملاحظة أي تعبيرية سيتوبلاسمية (هيولية) أو نووية .



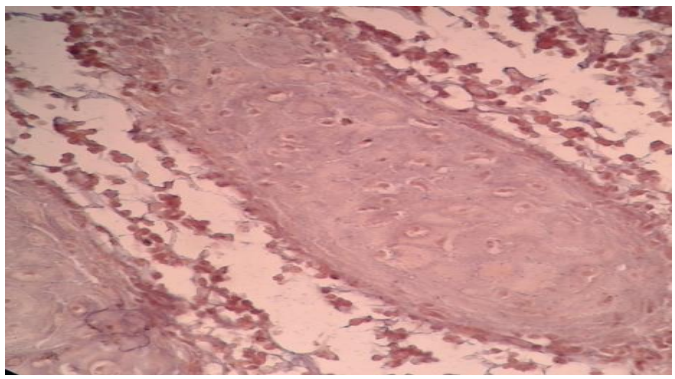
شكل (3-14)تعبيرية واسم الكولاجين IV في العينة الشاهدة

ثانياً- عينة الدراسة :

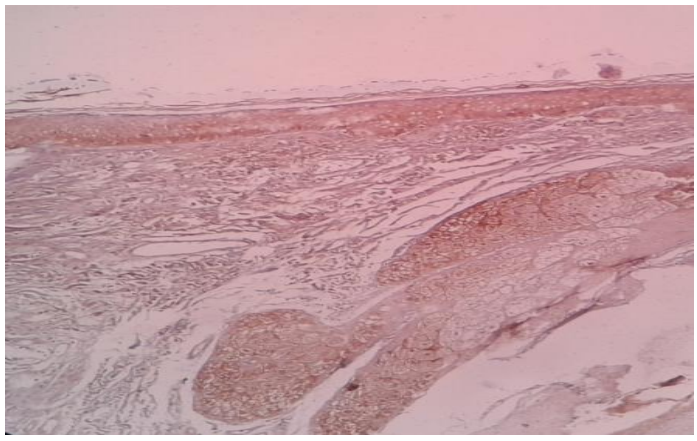
أظهر التلوين المناعي لعينة الدراسة تعبيرية متباينة تجاه الملون .وتراوحت التعبيرية بين الجيدة والمتوسطة والضعيفة .ولوحظ وجود سلبية للتعبيرية في بعض المقاطع كما ظهرت التعبيرية في هيولى بعض الخلايا .



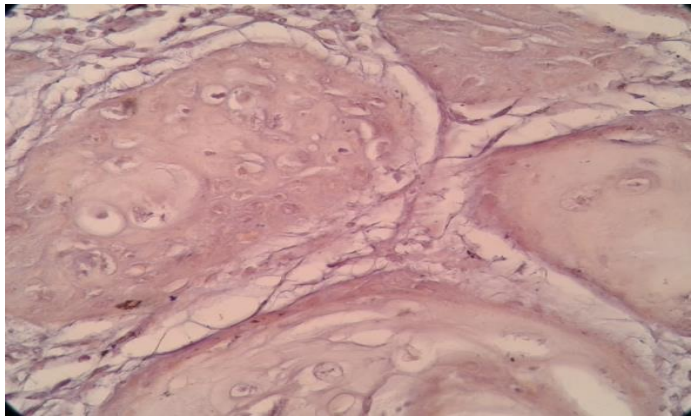
شكل (3–15) تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



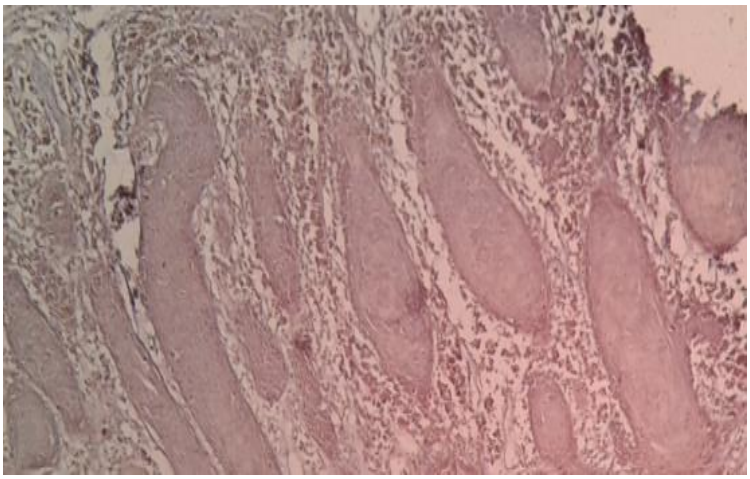
شكل (3–16)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجينIV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



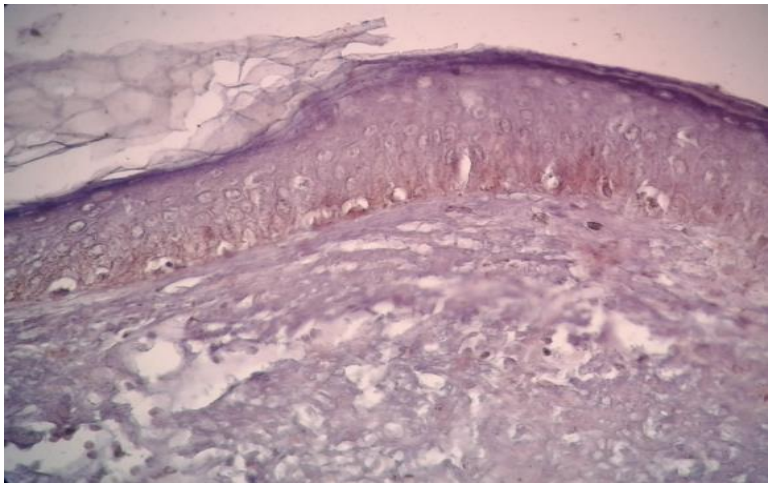
شكل(3–17)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايزتكبير 100(منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



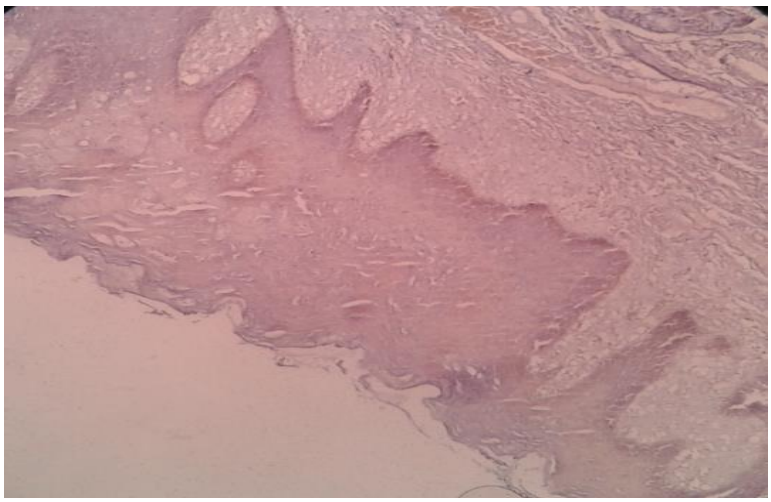
شكل (3–18)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز تكبير 400



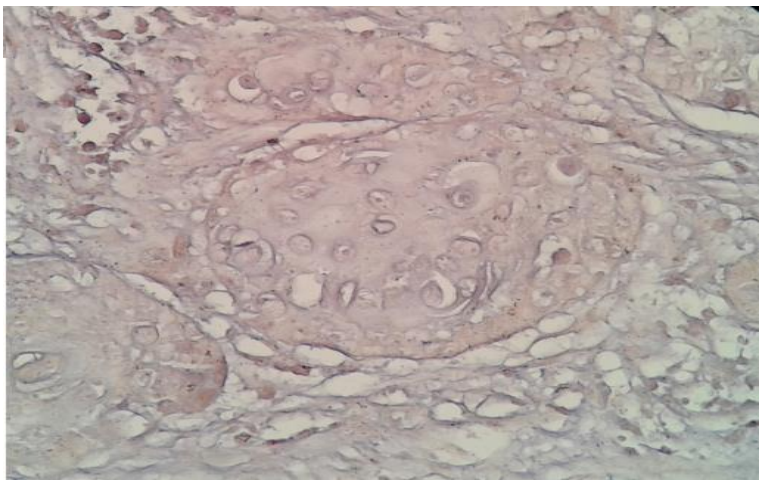
شكل(3–19) تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 100



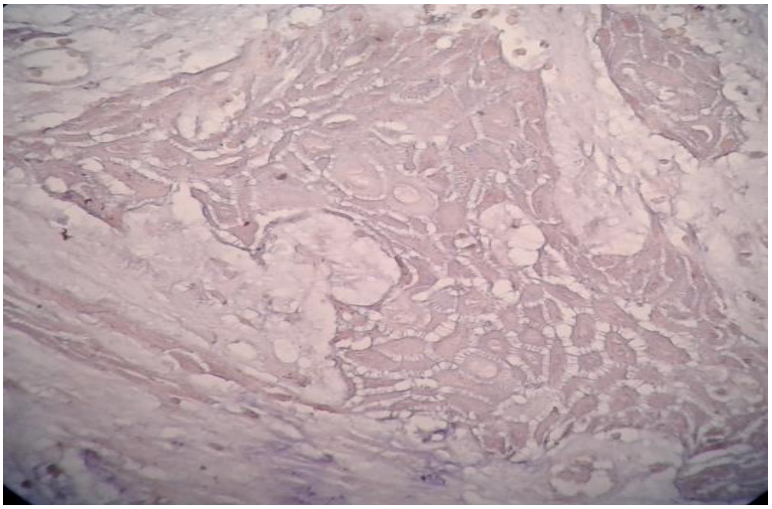
شكل (3–20)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 400 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



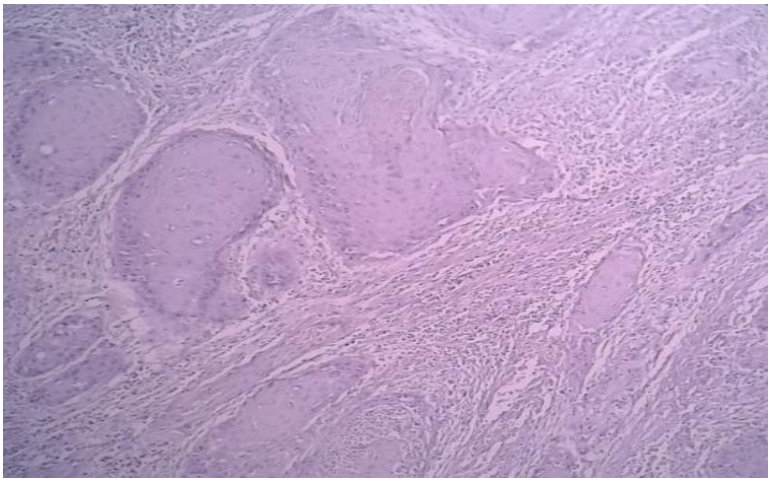
شكل (3–21)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



شكل (3-22) تعبيرية ضعيفة لواسم
الكولاجين IV
في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز
تكبير 400



شكل (3-23)تعبيرية سلبية لواسم
الكولاجينIV في السرطانة شائكة الخلايا
سيِّئ التمايز تكبير 400



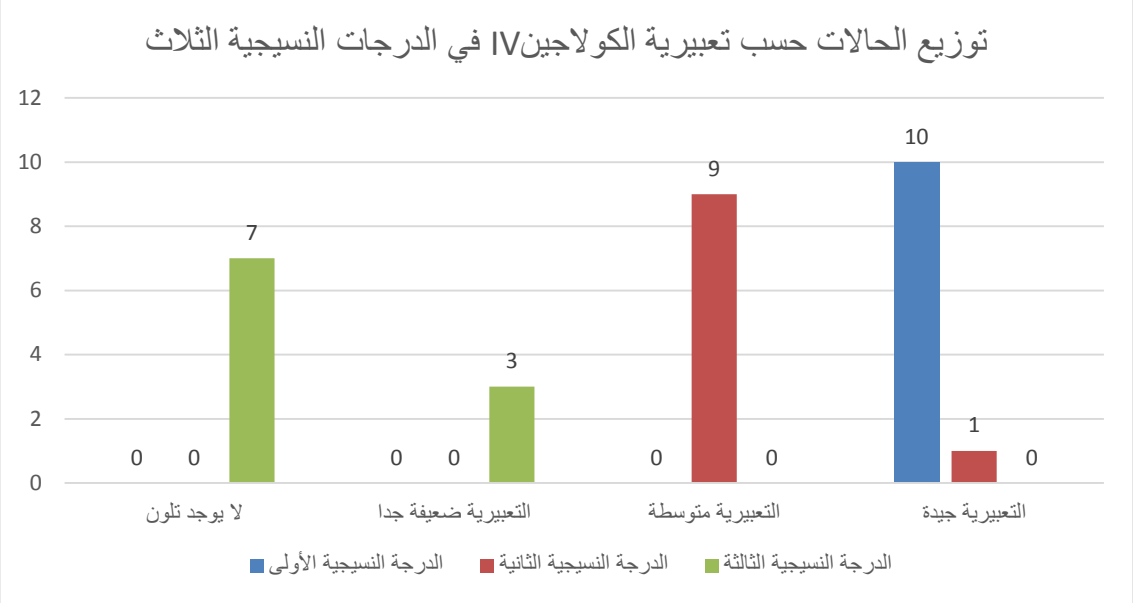
شكل (3-24)تعبيرية سلبية لواسم
الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا
سيِّئ التمايز تكبير 100

ثالثاً– الدراسة الإحصائية لمضاد الكولاجين IV :

يوضح الجدول التالي توزيع الحالات حسب تعبيرية الكولاجين IV في الدرجات النسيجية الثلاث:

		الدرجة النسيجية		
		الأولى	الثانية	الثالثة
التعبيرية	لا يوجد تلون	0	0	7 (70%)
	ضعيفة جدا	0	0	3 (30%)
	متوسطة	0	9 (90%)	0
	جيدة	10 (100%)	1 (10%)	0

جدول (3–5) توزيع الحالات حسب تعبيرية الكولاجين IV في الدرجات النسيجية الثلاث



مخطط (3–6) يوضح توزيع الحالات حسب تعبيرية الكولاجين IV في الدرجات النسيجية الثلاث

لبحث تأثير الدرجة النسيجية على تعبيرية الكولاجين IV ، نجري إختبار كاي مربع للإستقلال لدراسة الإرتباط بين الدرجة النسيجية و تعبيرية الكولاجين IV :

إحصاء الاختبار χ^2	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
54.545	0.000 *	توجد علاقة

جدول (3–7) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة تأثير الدرجة النسيجية على تعبيرية الكولاجين IV

تبين نتائج الاختبار وبثقة 95% وجود علاقة تأثير للدرجة النسيجية على تعبيرية الكولاجين IV بحيث تتناقص تعبيرية الكولاجين IV بتقدم الدرجة النسيجية .

الباب الرابع :المناقشة

Discussion

أولاً– الكولاجين **III**

تعد السرطانة شائكة الخلايا أحد أكثر السرطانات الخبيثة شيوعاً إذ تشكل ما يزيد عن 90% من سرطانات الرأس والعنق ، وعلى الرغم من تطور وسائل التشخيص والمعالجة خلال السنوات الأخيرة الماضية إلا أنه لايزال يسجل معدلات مرتفعة من الوفيات. (Hoffman et al ,2006).

تتصف الخلايا الورمية في هذا النوع من السرطانات البشروية بقدرتها على تخريب الغشاء القاعدي واختراقه، لتبدأ بغزو النسيج الضام تحت البشرة والإنتشار فيه ليصبح هناك مكونان منفصلان، يعتمد أحدهما على الآخر وهما الخلايا البشروية الخبيثة من جهة، واللحمة الضامة التي تنتشر وتتوزع ضمنها هذه الخلايا من جهة أخرى ، وقد كان يعتقد في البداية أن اللحمة الضامة هي عامل مضاد فعال تجاه غزو الخلايا الورمية، إلا أن الأدلة الحالية تقترح أن اللحمة الضامة الورمية Tumour Stroma هي ليست فقط مجرد بنية خاملة وهاجعة وغير فعالة، ولكنها ترتبط بتطور الورم وترقيه ، فقد تبين أن الوسط المحيط بالورم الذي يسهم في نموه وإرتشاحه واستعماره يحتوي على مكونات مختلفة ومتنوعة مثل الخلايا البطانية والخلايا حول الوعائية pericytes والخلايا الإلتهابية وخلايا مصورات الليف بالإضافة إلى القالب خارج الخلوي .

كما أظهرت الدراسات التي أجريت في المختبر من قبل IOZZO أن الخلايا الورمية تستطيع إفراز وسائط تحرض من خلالها على إحداث تبدلات في بروتينات اللحمة الضامة (Iozzo,1995) ، واقترحت العديد من الدراسات أن الخلايا البشروية الخبيثة تستمر في اصطناع مواد الغشاء القاعدي وإفرازه وتركيبه مثل اللامنين، والإنتاكتين entactin ، وسلفات الهيباران heparan sulphate ، و خلصت العديد من الدراسات التي أجريت على السرطانات السريرية و السرطانات المستحدثة بإستخدام المسرطنات إلى أن اللحمة الضامة تمر بتغيرات جذرية وجوهرية مثل إنحلال بعض أنماط الكولاجين وتكاثر خلايا مصورات الليف، وزيادة إفراز الغليكوزأمينوغليكانات في مراحل تسبق نمو الورم.

بينت دراسة (Sittichai Koontongkaew ,2013) بأن التفاعل المتبادل بين الورم وخلايا مصورات الليف المرتبطة بالسرطان يعزز من إنتاج كل من : عوامل النمو growth factors، والسيتوكينات cytokines ، والكيموكينات Chemokines، و matrix metalloproteinases (MMPs)، و الوسائط الالتهابية inflammatory mediator وبالتالي فإن البيئة المحيطة بالورم تمنحه القدرة على التطور والنمو والغزو والاستعمار.

في دراسة (**George,et al** 2012) قام بتحري التغيرات التي تصيب اللحمة الضامة بعد أن تغزوها الخلايا البشروية الخبيثة في سياق الإصابة بالسرطان شائك الخلايا الفموي وتبين من خلال هذه الدراسة بأن:

1–الغليكوبروتينات كانت موجودة بكميات قليلة وفسر ذلك على أنه انحلال لمكونات اللحمة الضامة لإيجاد طريق لهجرة الخلايا الخبيثة.

2–الفيبرين موجود في جميع درجات ال oscc و ولكن بكميات مرتفعة في السرطانات سيئة التمايز وهذا ينسجم مع قدرة النفوذية العالية للأوعية الورمية .

3–كان الكولاجين من بين البروتينات الليفية هو الأكثر غزارة من الألياف المرنة والشباكية في اللحمة الضامة والتي من المحتمل أن تكون منتجة من قبل خلايا مصورات الليف السليمة أو من قبل الخلايا الورمية التي تملك قدرة على اصطناع مركبات اللحمة الضامة.

لوحظ لدى دراسة الساحات النسيجية لعينات هذا البحث أن ألياف الكولاجين III كانت موجودة في جميع الدرجات النسيجية للسرطانة شائكة الخلايا، ولكن هناك زيادة ملحوظة في كثافة هذه الألياف في الدرجات سيئة التمايز بالمقارنة مع الدرجات جيدة التمايز وبفروق دالة إحصائياً، أي بالرغم من أن الخلايا الورمية في السرطانة شائكة الخلايا في المراحل سيئة التمايز في بحثنا كانت بشكل حبال قصيرة أو جزر صغيرة، فقد لوحظ وجود كميات غزيرة من ألياف الكولاجين III المتلون بالبني حول الخلايا الورمية، ويمكن تفسير ذلك بأن الخلايا السرطانية تؤثر في الخلايا الضامة، وتحرضها على إفراز كميات أكبر من ألياف الكولاجين III التي قد تكون ذات تركيب مشوه ولا تماثل ألياف الكولاجين III الطبيعية، والغاية من ذلك هو اِستخدام هذه الألياف لتسهيل عملية نفوذ وارتشاح الخلايا السرطانية باتجاه النسج المجاورة الأخرى ، بشكل مشابه تماماً لحدوث التنشؤ الوعائي الورمي ، فالأوعية الدموية المتشكلة تكون شاذة من حيث النفوذية وطريقة اِتصال الخلايا البطانية مع بعضها البعض، حيث تستطيع هذه الخلايا البطانية أن تحرض على نمو النسيج الورمي المجاور من خلال إفراز عدة عوامل مثل عامل النمو المشبه بالأنسولين وعامل النمو المشتق من الصفيحات PDGF، فكما أن هذه الأوعية ضرورية لنمو الورم من خلال إمداد الكتلة الورمية بالتغذية و الأكسجين، فهي تساعد أيضاً على الاستعمار البعيد وإعطاء النقائل (Nagy et al ,2007) and (Bergers and Benjamin,2003).

وتتوافق نتيجة هذه الدراسة مع دراسة (George *et al*,2012.) الذي قام بتحري التغيرات الضامة التي ترافق الدرجات النسيجية المختلفة للسرطانة شائكة الخلايا الفموي، وذلك في النسيج الضام بشكل كامل وحول الجزر والخلايا الورمية الغازية بشكل خاص، وسجل من خلال دراسته تأثير هذه التغيرات في التنبؤ بالسلوك الحيوي للأورام ، حيث لاحظ شدة تلون كل من الكولاجين والألياف الشباكية والمخاطين الحامضي Acid Mucins و Sulfated Mucins و الألياف المرنة و الفيبرين و الغليكوبروتنات، و توصل إلى أن شدة تلون الفيبرين و الألياف الشباكية كانت واضحة في اللحمة الضامة قرب الجزر و الخلايا الورمية في جميع الدرجات النسيجية، ولكنها كانت الأكثر شدة وغزارة في الدرجات سيئة التمايز لدى مقارنتها مع غيرها إلا أن George وزملائه فسر زيادة كثافة ألياف الكولاجين III بأن الخلايا الورمية التي تنمو في اللحمة الضامة بشكل مستمر ومتدرج بشكل تصاعدي تعمل بالدرجة الأولى على تحطيم استجابة المضيف لتضمن بذلك نموها وانتشارها إلا أن المضيف يقوم بزيادة إفراز الكولاجين III بشكل غزير في اللحمة الضامة خاصة حول جزر الخلايا الورمية في محاولة منه في تحديد وجود هذه الجزر في مكانها ومنع الخلايا الورمية من الهجرة لأماكن أخرى .

وبذلك يمكننا القول إن زيادة كثافة الكولاجين III بإزدياد الخباثة الخلوية هو أحد التغيرات الضامة الفعالة التي تحاول فيها الخلايا الورمية الإستمرار في الإرتشاح بإتجاه الأنسجة المجاورة لتتمكن بعدها من إحداث نقائل لأماكن بعيدة أخرى في الجسم .

ثانياً- الكولاجين IV:

يشكل الغشاء القاعدي للبشرات المصابة بالسرطانة شائكة الخلايا الحاجز الأول الذي يحول دون وصول الخلايا السرطانية إلى النسيج الضام . يوجد 4 جزيئات أساسية تدخل في تركيب الأغشية القاعدية وهي : الكولاجين IV واللامنين و Perlecan و Entactin (Lebleu et al ,2007)

يشكل الكولاجين IV الجزء الأساسي في تشكيل هيكل الغشاء القاعدي ويهدف هذا البحث إلى تحري تعبيرية الكولاجين IV في الغشاء القاعدي، وقد خلصت هذه الدراسة إلى أن تلون الكولاجين IV في العينات الشاهدة كان بدرجة جيدة، أما في العينات المرضية للسرطانة شائكة الخلايا فقد تناقصت تعبيرية مضاد الكولاجين IV في الغشاء القاعدي حول الجزر الورمية بتقدم الدرجة النسيجية وازدياد الخباثة الخلوية، أي أن السرطانات عالية التمايز ذات تعبيرية مرتفعة لمضاد الكولاجين IV إذا ما قورنت بالدرجات سيئة التمايز، ويمكن تفسير ذلك بأن الخلايا السرطانية تقوم بإفراز أنزيمات متعددة ومختلفة لحل مركبات الغشاء القاعدي، ومن بين هذه الأنزيمات الجيلاتيناز و الكولاجيناز (Supriatno et al,2003)، حيث يعمل الكولاجيناز IV وهو حال جيلاتيني للكولاجين IV على حل الكولاجين IV ويعمل Metalloproteinases 2 و9 على حل الكولاجين IV الموجود في الغشاء القاعدي . مما يسمح للخلايا السرطانية بغزو النسيج الضام وإستعمار الأنسجة والأعضاء البعيدة، فهناك العديد من الخمائر البروتينية proteases والخمائر الحالة للبروتين proteolytic enzymes و cathepsin بنوعيه D و B تسهل مرور الخلايا السرطانية واستعمارها للأنسجة المجاورة (Kawasaki et al 2002 and Myoung et al,2003)، وتتوافق هذه النتائج مع دراسة مماثلة للدكتور Barakat 2012, إذ قام أيضاً بالتحري عن تعبيرية الكولاجين IV حول الجزر الورمية في السرطانة شائكة الخلايا الفموي و خلصت دراسته إلى أن الدرجة النسيجية للسرطان تكون أدنى بما يتوافق مع خباثة نسيجية أقل كلما كان محيط الجزر الورمية يبدي إيجابية أكبر لمستضد الكولاجين IV ، كما لاحظ أنه كلما كانت الخلايا البشروية في الجزر الورمية متقاربة أكثر فإن مساحة الغشاء القاعدي الذي يبدي إيجابية أكبر للكولاجين IV حول هذه الجزر الورمية تكون أكبر.كما وجد كل من Arduino et al ,2009 و Lin et al ,2003 نقصاً في تعبيرية الكولاجين IV و اللامنين والفيبرونكتين، وهي أهم البنى التي تدخل في تركيب الغشاء القاعدي في السرطانة شائكة الخلايا بالمقارنة مع العينات الشاهدة والحالات التي تبدي سوء تصنع بشروي شديد(Guyton

& Hall , 2006). كما وجد العديد من العلماء أن اختفاء سلاسل ألفا للكولاجين IV المكونة للغشاء القاعدي كان أكثر حدة في السرطانات قليلة التمايز مقارنة مع السرطانات عالية التمايز .

Baba et al) (Tamamura et al,2006)(Quatresooz et al ,2005)(Cernea et al,2005) .(,2008

وبالتالي يمكن اِستنتاج أنه كلما ازدادت درجة التعبير عن الكولاجين IV في الغشاء القاعدي تتناقص قدرة الورم على الغزو والاِستعمار، وبالتالي يكون الإنذار أفضل حيث يمكن اعتبار الكولاجينIV مشعراً لتمزق الغشاء القاعدي وتخربه ، وبالتالي مؤشراً يمكن الاِستدلال به على الغزو والاِستعمار، بالإضافة إلى أن اِضطراب التركيب وتغيره في المناطق المحيطة بالجزر الورمية كما تمت الإشارة مسبقاً إلى تغير كثافة الكولاجين III تعدُّ واسماً مهماً لقدرة الورم على الغزو .

الباب الخامس :الإستنتاجات

Conclusions

تمثل تعبيرية الكولاجين IV واسماً مهماً للدلالة على درجة تخرب الغشاء القاعدي في السرطانة شائكة الخلايا للرأس والعنق ،حيث إن اِنخفاض درجة تعبيريته مع اِرتفاع الخباثة الخلوية للسرطان تعد دليلاً يمكن الإعتماد عليه للتنبؤ بإمكانية حدوث الغزو والإستعمار .

كما أن تعبيرية الكولاجين III ضمن حدود هذه الدراسة قد تعطي فكرة جديدة عن إنذار السرطانة شائكة الخلايا، حيث إن زيادة كثافة ألياف الكولاجين III مع تقدم الدرجة النسيجية للورم توضح مدى عدوانيته وتطوره لمراحل متقدمة يمهد فيها لإحداث النقائل باتجاه الأماكن البعيدة في الجسم .

الباب السادس : المقترحات والتوصيات

Suggestions and Recommendations

1 – نقترح إجراء دراسة مماثلة لدراستنا وذلك لتحري تعبيرية الكولاجين III في الدرجات النسيجية المختلفة للسرطانة شائكة الخلايا ولكن باستخدام الملون المناعي الخاص بالكولاجين III بهدف توثيق نتائج هذه الدراسة ودعمها من جهة، وإمكانية إجراء ربط لتعبيرية الكولاجين III مع تعبيرية الكولاجين IV من جهة أخرى بسبب توحّد معايير الدراسة حينئذ كون الملونات المستخدمة هي ملونات مناعية فقط.

2 – نقترح إجراء المزيد من الأبحاث العلمية لتحري وجود ارتباط أو تأثير للسرطانة شائكة الخلايا على بقية أنواع الكولاجين، وذلك بهدف تكامل المعرفة فيما يخص عائلة الكولاجين .

3 – نقترح إجراء المزيد من الدراسات لمعرفة التغيرات في النسيج الضام المرافقة للسرطانة شائكة الخلايا وخاصة حول الجزر الورمية، وذلك لجميع المكونات الضامة بما فيها الغليكوبروتينات والفيبرين و الألياف المرنة و الفيبرونكتين و المخاطين وغيرها .

4 –نقترح تسليط الضوء بشكل أكبر على السرطانة شائكة الخلايا الفموي حيث أن الدراسات غالباً ما تكون شاملة للرأس والعنق بسبب عدم توفر أعداد كافية من العينات لإجراء دراسة مفصلة للسرطانات الفموية.

5–نقترح إجراء دراسة مماثلة لهذه الدراسة ولكن بعد ربطها بالمعلومات السريرية اللازمة مثل عمر المريض ومكان الإصابة ووجود نقائل للعقد اللمفية وغيرها وذلك لتحري مدى الاستفادة من الكولاجين الثالث في التنبؤ بحدوث الغزو والاستعمار.

6– –نوصي بالتحري عن تركيب ألياف الكولاجين III المحيطة بالجزر الورمية في جميع الدرجات النسيجية لمعرفة تركيب هذه الألياف .

المراجع

References

1-Arduino, P.G., Carrozzo , M., Pagano, M., Broccoletti, R., Scully, C., and Gandolfo, S. (2009, June). *"Immunohistochemical Expression Of Basement Membraneproteins Of Verrucous Carcinoma Of The Oral Mucosa".* **Clin Oral Investig**, Turin, Italy.

2-Baba, Y., Iyama, K., Ikeda, K., Ishikawa, S., Hayashi, N., Miyanari, N., Sado, Y., Ninomiya, Y., And Baba, H. (2008, Feb). *"The Expression Of Type IV Collagen Alpha6 Chain Is Related To The Prognosis In Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma".* **Ann Surg Oncol**, Kumamoto , Japan, 15(2),555-65.

3- Barakat, SH.(2011). *"The Expression of the Collagen IV in the Basement Membrane around the Nests of Tumor Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma".* **Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series** Vol. (33) No. (3)

4-Barnes, L., Eveson, J., Rrichart, P., and Sidrasky, D. (2005). *"Oral Cavity And Oropharynx: World Health Organization Classification Of Tumours Pathology & Genetic Head And Neck Tumours".* **IARC**, France, 168-175.

5-Barsevick, A., Sweeney, C., Haney, E., and Chung, E. (2002). *"A Systematic Qualitative Analysis Of Psychoeducational Interventions For Depression In Patients With Cancer".* **Oncology Nursing**, 29,73-84,.

6-Bateman, J.F., Lamande, S.R., and Ramshaw, J.A.M. (1996). *"Collagen superfamily".* **Harwood Academic Press**, Melbourne, 1996, pp. 22– 67.

7-Bergers, G.; and Benjamin, L.E.."*Tumorigenesis and The angiogenic switch*". **Nat Rev Cancer**, 2003, 3(6):p 401-10.

8-Birk, D.E., Fitch, J.M., Babiarz, J.P., and Linsenmayer, T.F. (1988). *"Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma".* **J. Cell Biol.** 106 999–1008.

9-Blanchard, C., Courneya, K., and Laing, D. (2001). *"Effects of Acute Exercise on State Anxiety In Breast Cancer Survivors".* **Oncology Nursing**, 28,1617-1621.

10-Bruckner, P., and van der Restm, M. (1994). *"Structure and function of cartilage collagens",* **Microsc. Res. Tech.** 28 378– 384.

11-Cawson, R. A., and Odell, E .W. (2008). *"Cawson's Essentials Of Oral Pathology And Oralmedicine"*. Edinburgh; New York, **Churchill Livingstone**.

12-Cernea, C.R., Ferraz, A.R., De Castro, I.V., Sotto, M.N., Logullo, A.F., Potenza, A.S., and Bacchi, C.E. (2005, June) "*Evaluation Of Basement Membrane Status In Aggressive Skin Carcinomas With Skull Base Invasion: A Case-Control Study*". **Ann Diagn Pathol**, São Paulo, Brazil, 9(3):130-3.

13-Coulthard, P. (2003). *"Premalignancy and Malignancy"*. Master dentistry, **Churchill Livingston**.

14-Culling,C.F.A.*"Handbook of Histopathological And Histochemical Tichneque"* Third Edition. *London.*

15-Fleischmajer, R., MacDonald, E.D., Perlish, J.S., Burgeson, R.E., and Fisher, L.W. (1990). *"Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules"*. **J. Struct. Biol.** 105 162- 169.

16-Frenkel, S.R., Toolan, B., Menche, D., Pitman, M.I., and Pachence, J.M. (1997). *"Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair"*. **J. Bone Jt. Surg.** 79-B 831- 836.

17-Fritsch, V.A., and Lentsch, E. J. (2014). *"Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck : Location means everything"*. **J Surg Oncol**,109,616-22.

18-George, J., Narang, R.S., and Rao, N.N. (2012). *"Stromal response in different histological grades of oral squamous cell carcinoma: A histochemical study"*. **Indian J Dent Res**;23:842.

19-Guyton, C., and Hall, J.E. (2006). *"Textbook Of Medical Physiology"*. 11th ed, **ELSEVIRE**. China , 316-317.

20-Hoffman, H. T., Porter, K., Karnell, L., Cooper, J. S., Weber, R. S., Langer, C.J., and Ang, K.K. (2006). "*Laryngeal Cancer In The United States: Changes In Demographics, Patterns of Care, and Survival*". **The Laryngoscope** vol. 116, p. 1-13.

21-Hudson, B.G., Reeders, S.T., and Tryggvason, K. (1993). *"Type IV Collagen: Structure, Gene Organization, And Role In Human Diseases. Molecular Basis Of*

Goodpasture And Alport Syndromes And Diffuse Leiomyomatosis". **J. Biol. Chem.** 268 26033– 26036.

22-Hulmes, D.J., and Miller, A. (1981). "Molecular packing in collagen", **Nature** 293 234– 239.

23-Iozzo, R.V. (1995). "*Tumor Stroma As Regulator Of Neoplastic Behavior*". **Lab Invest**, 73:157-60.

24-Kawasaki, G., Kato, Y., and Mizuno, A. (2002, Apr). "*Cathepsin Expression In Oral Squamous Cell Carcinoma: Relationship With Clinicopathologic Factors*" . **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** , Nagasaki , Japan ,93(4),446-54 .

25- Koontongkaew, S.(2013). *"The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*".**Journal of Cancer** .;VOL 4(1): 66-83. doi: 10.7150/jca.5112

26-Kosmehl, H., Berndt, A., and Katenkamp, D. (1996). *"Molecular Variants Of Fibronectin And Laminin: Structure, Physiological Occurrence And Histopathological Aspects".* **Virchows Arch**;429:311-22.

27-Kuhn, K. (1986). *"The Collagen Family-Variations In The Molecular And Supermolecular Structure"*, **Rheumatology**, 10 29–69.

28-Lebleu, V. S., Macdonald, B., and Kalluri, R. (2007). *"Structure and function of basement membranes"*. **Exp Biol Med**, vol. 232 (9), p. 1121-1129.

29-Leslie, P.G., and James, L.H. (2007). *"Color Text Of Histology"*. 3d ed, **Saunders Elsever**.P.P:79-80,Chapter 4.

30-Liddington, R.C . (2001). *"Mapping Out The Basement Membrane"*. **The Burnham Institute Nature Structural Biology**, USA , 8, 573 – 574.

31-Lin, H., Niu, Y.J., Zhou, Z.Y., Liu, F.L., And Wang, H.Y.. (2003, Mar). "*Distribution And Expression Of Basement Membrane Proteins In Malignant Eyelid Tumors And Its Clinical Significance*". **Zhonghua Yan Ke Za Zhi**. Qingdao, China ,39(3):167-71.

32-Liotta, L. A. (1986). *"Tumor Invasion And Metastases-Role Of ECM"*. **Rhoads Memorial Awards Lecture**. Cancer Res;46:1-7.

33-Martini, F. H. (2006). *"Fundamentals of Anatomy and Physiology"*. 7th Ed. **Pearson Benjamin Cummings**. United States.

34-Mayne, R. (1989). *"Cartilage Collagens—What Is Their Function, And Are They Involved In Articular Disease"*. **Arthritis Rheum**. 32-3241- 246.

35-Mendler, M., Eich-Bender, S.G., Vaughan, L., Winterhalter, K.H., and Bruckner, P. (1989). *"Cartilage Contains Mixed Fibrils Of Collagen Types II, IX And XI"*. **J. Cell Biol**. 108 191-197

36-MYOUNG, H., HONG, S.P., YUN, P.Y., LEE, J.H., and KIM, M.J. (2003, Feb). *"Anti-Cancer Effect Of Genistein In Oral Squamous Cell Carcinoma With Respect"* . **Cancer Sci, Seoul**, Korea, 94(2),215-20.

37-Nagy, J.A., Brown, L.F., Senger, D.R., Lanir, N., Van de Water, L., and Dvorak, A.M. (1988). "*Pathogenesis Of Tumor Stroma Generation: A Critical Role For Leaky Blood Vessels And Fibrin Deposition*". **Biochim Biophys Acta**, 948:305-26.

38-Nagy, J.A.; Dvorak, A.M.; and Dvorak, H.F. " *VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis*" . Annu Rev Pathol . 2007, 2:p.251-75

39-Neville, B., Damm, D., Allen, C., and Bouquot, J. (2002). "Epithelial Pathology .Oral and Maxillofacial Pathology". 3rd ed .USA :**Saunders Elsevier**;:409-421.

40-Niyibizi, C., and Eyre, D.R. (1989). "*Bone Type V Collagen: Chain Composition and Location of a Trypsin Cleavage Site*", **Connect. Tissue Res.** 20 247- 250.

41-Piez, K.A., and Reddi, H. (1984). *"Molecular And Aggregate Structure Of The Collagens"*, Extracellular Matrix Biology, **Elsevier**, Amsterdam, , pp. 1- 39.

42-Quatresooz, P., Letot, B., And Pierard, G.E. (2005, Jul). *"Squamous Cell Carcinoma Of The Leg In An Octogenarian Woman"* . **Rev Med Liege**, France, 60(7-8),680-2.

43-Regezi, J.A., Sciubba, J.J., and Jordan, R.C.K. (2008). *"Oral Pathology :Clinical Pathologic Correlations"*. **Saunders Elsevier**. P:48-56.

44-Robbins. (2007). "Pathologic Basic Of Disease". 8th edition. p.p173-174

45-Rossert, J., and de Crombrugghe, B. (2002). *"Type I Collagen: Structure, Synthesis And Regulation, In: J.P. Bilezkian, L.G. Raisz, G.A. Rodan (Eds.), Principles In Bone Biology"*, **Academic Press**, Orlando, pp. 189–210.

46-Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yorihuzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N., and Nagata, K. (2002). *"Type XXVI Collagen, A New Member Of The Collagen Family, Is Specifically Expressed In The Testis And Ovary"*. **J. Biol. Chem**. 277 37678–37684.

47-Schuppan, D., Schmid, M., Somasundaram, R., Ackermann, R., Ruehl, M., Nakamura, T., and Riecken, E.O. (1998). *"Collagens In The Liver Extracellular Matrix Bind Hepatocyte Growth Factor"*. **Gastroenterology** 114 139–152.

48-Strum, J. M., Gartner, Leslie, P., and Hiatt J. L. (2007). *"Cell biology and histology"*. Hagerstwon, MD: **Lippincott Williams & Wilkins**. p. 83. ISBN 0-7817-8577-4.

49-Supriatno, H. K., Kawaguchi, S., Yoshida, H., and Sato, M. (2003, May). *Effect Of p27Kip1 On The Ability Of Invasion And Metastasis Of An Oral Cancer Cell Line*". **Oncol Rep**, Tokushima,japan.10(3),527-32.

50-Tamamura, R., Nagatsuka, H., Siar, C.H., Katase, N., Naito, I., Sado, Y., and Nagai, N. (2006, Sep). *"Differential Expression Of Basement Membrane Collagen-Iv Alpha1 To Alpha6 Chains During Oral Carcinogenesis*". **Virchows Arch**, Okayama, , Japan, ,449(3),358-66.

51-THOMAS, D., POLLAR, D., and WILLIAM, C. (2004). "cell biology". **Earnshaw** Philadelphia, USA, Pennsylvania, Saunders. P.P: 471-535

52-Thompson, L. D. R. (2006). "*Head And Neck Pathology*", Edinburgh, **Elsevier**/ Churchill Livingstone.

53-von der Mark, **K.** (1999). *"Structure, Biosynthesis And Gene Regulation Of Collagens In Cartilage And Bone, Dynamics Of Bone And Cartilage Metabolism"*, **Academic Press**, Orlando, pp. 3– 29.

54-von der Mark, **K.** (1981). *"Localization Of Collagen Types In Tissues"*, **Int. Rev. Connect. Tissue Res.** 9 265– 324.

55-von der Mark, **H.**, **Aumailley**, **M.**, **Wick**, **G.**, **Fleischmajer**, **R.**, **and Timpl**, **R.** (1984) *"Immunochemistry, Genuine Size And Tissue Localization Of Collagen VI"*. **Eur. J. Biochem.** 142 493–502.

56-van der Rest, **M.**, **Garrone**, **R.** (1991) "Collagen family of proteins". **FASEB J.** 5 2814– 2823.

57-van der Rest, **and R.**, **Mayne**, **R.** (1987). *"Regulation Of Matrix Accumulation, In: R. Mayne, R. Burgeson (Eds.), Structure And Function Of Collagen Types"*, **Academic Press**, Orlando.

58-Wakitani, **S.**, **Kimura**, **T.**, **Hirooka**, **A.**, **Ochi**, **T.**, **Yoneda**, **M.**, **Yasui**, **N.**, **Owaki**, **H.**, **Ono**, **K.** (1989). *"Repair Of Rabbit Articular Surfaces With Allograft Chodnrocytes Embedded In Collagen Gel"*. **J. Bone Jt. Surg.** 71-B 74–80.

59-Yamaguchi, **Y.**, **Mann**, **D.M.**, **and Ruoslathi**, **E.** (1990). *"Negative Regulation Of Transforming Growth Factor-β By The Proteoglycan Decorin"*, **Nature** 346 281– 284.

60-Zucker, **S.**, **Cao**, **J.**, **and Malloy**, **C.J.** (2002). *"Role Of Matrix Metalloproteinases And Plasminogen Activators In Cancer Invasion And Metastasis: Therapeutic Strategies"*. **Acedemic Press**; p.92.

الملخص

المقدمة :

يشكل السرطانة شائكة الخلايا ما يقارب 80–90%من مجمل سرطانات الرأس والعنق و95% من السرطانات الفموية. وتمتلك الخلايا الورمية في هذا السرطان القدرة على تخريب مكونات الغشاء القاعدي بما فيها الكولاجين IV، كما أن هذه الخلايا الخبيثة بعد اِجتياحها النسيج الضام تحت البشرة تقوم بإحداث مجموعة من التغيرات الفعالة في اللحمة الضامة المحيطة بالجزر الورمية، ويعد الكولاجين III أحد هذه العناصر المتأثرة، ويفيد التحري عن تعبيرية الكولاجين III و IV في تحديد قدرة هذا السرطان على الغزو والاستعمار .

الهدف من البحث:

تحري تعبيرية الكولاجين III و IV في الدرجات النسيجية المختلفة للسرطانة شائكة الخلايا للرأس والعنق .

المواد والطرائق:

في هذه الدراسة الرَّاجعة دُرِسَت تعبيرية الكولاجين III و IV في 30 حالة سرطانة شائكة الخلايا في منطقة الرأس والعنق مقسمة إلى 3 مجموعات وفقاً للدرجة النسيجية للورم، ولُوِّنَت بطريقة كيميا نسيجية للكولاجين III و كيميامناعية نسيجية للكولاجين IV .

النتائج والمناقشة:

لوحظ وجود اِرتباط واضح لتعبيرية الكولاجين III و IV مع الدرجة النسيجية للورم، حيث اِنخفضت شدة التلون للكولاجينIV مع تقدم الخباثة الخلوية للورم، وبخلاف ذلك لوحظ اِزدياد كثافة ألياف الكولاجين III بتقدم الدرجة النسيجية.

بينت هذه الدراسة دور الكولاجين IV الموجود في الغشاء القاعدي في حماية النسيج الضام الواقع تحته، كما بينت دور الكولاجين III الذي يجعل منه مشعراً مهماً للدلالة على إنذار الورم والتنبؤ بالسلوك الحيوي له .

الكلمات المفتاحية :

السرطانة شائكة الخلايا في الرأس والعنق، الكولاجين III و IV ، الدرجة النسيجية، الجزر الورمية .

Abstract:

Introduction:

80-90% of head and neck cancers along with 95% of oral caners are diagnosed as squamous cell carcinoma (SCC). Tumor cells in SCC can degrade the component of basement membrane especially collagen type IV; after invading the connective tissue underlying the epithelium, these tumor cells can make effective changes in stroma surrounding tumor islands among collagen type III. Therefore, investigating the expression of collagen III and IV could be useful in determining the ability of SCC to invade and its metastasis.

Aim of study:

The aim of this study is to investigating the expression of collagen type III and IV in different grade of head and neck squamous cell carcinoma .

Materials and Methods:

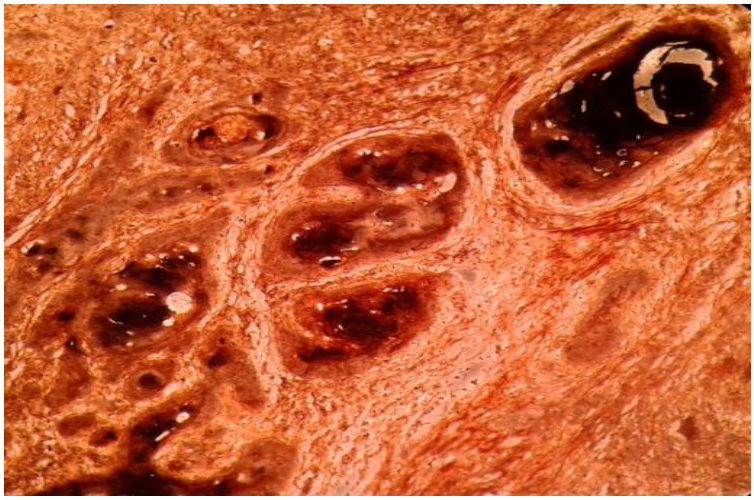
In this retrospective cohort study, the expression of collagen type III and IV has been studied in 30 samples of head and neck squamous cell carcinoma. These samples are divided to 3 groups according to the histological grade of tumor. Furthermore, the stain process of collagen type III has been histochemical while it has been immunohistochemial for collagen type IV.

Conclusion:

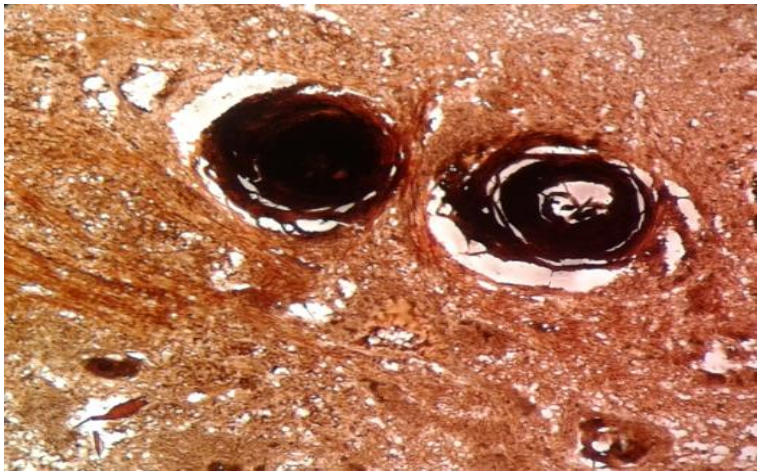
It has been evidenced that there is a great relation between collagen type III and IV with the histological grade of this cancer, so the stain intense of collagen IV is dropped significally with advanced stage of tumor. Conversely, type III collagen has shown higher density with advanced stage of tumor .
Holistically, this study has concluded that collagen type IV in basement membrane has an important role in protecting the connective tissues as well as the role of collagen type III which contributes an important index to tumor prognosis and its underpinning biological behavior.

Key words: squamous cell carcinoma, type III and IV collagens, histological grade, tumor islands.

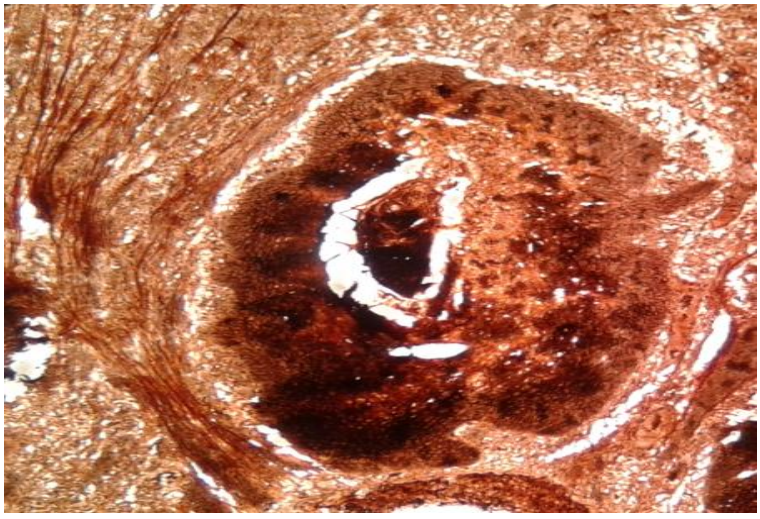
الملاحق



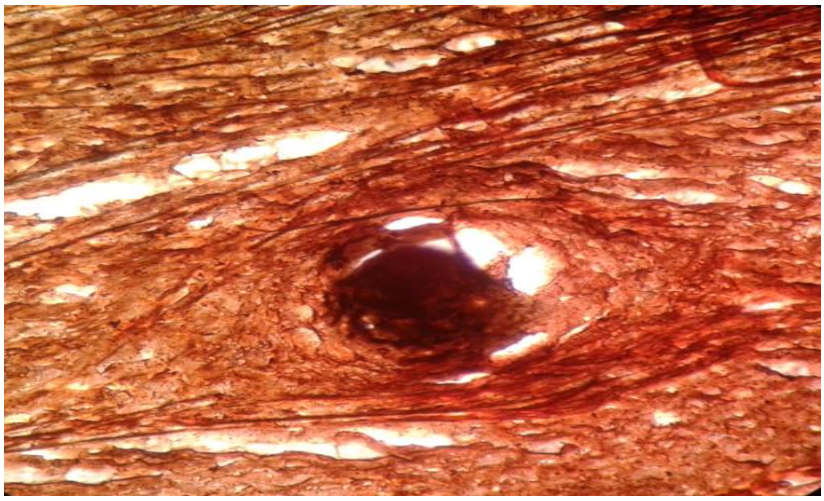
شكل (3-25)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



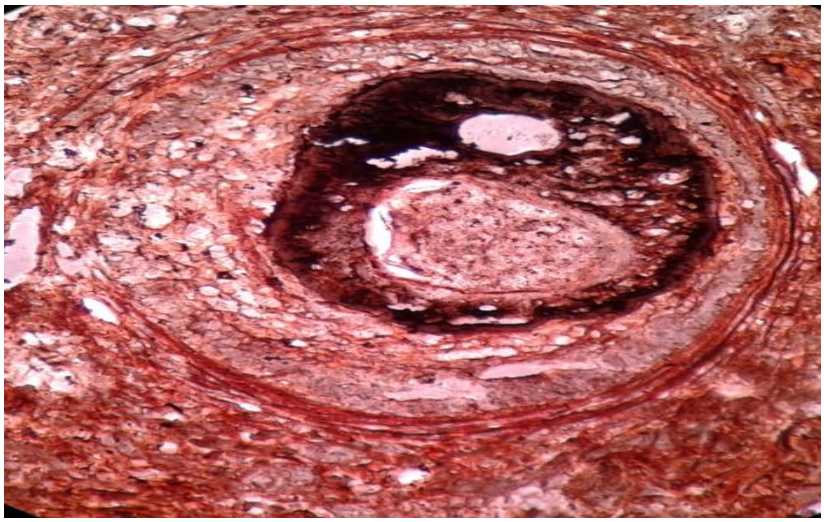
شكل (3-26)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



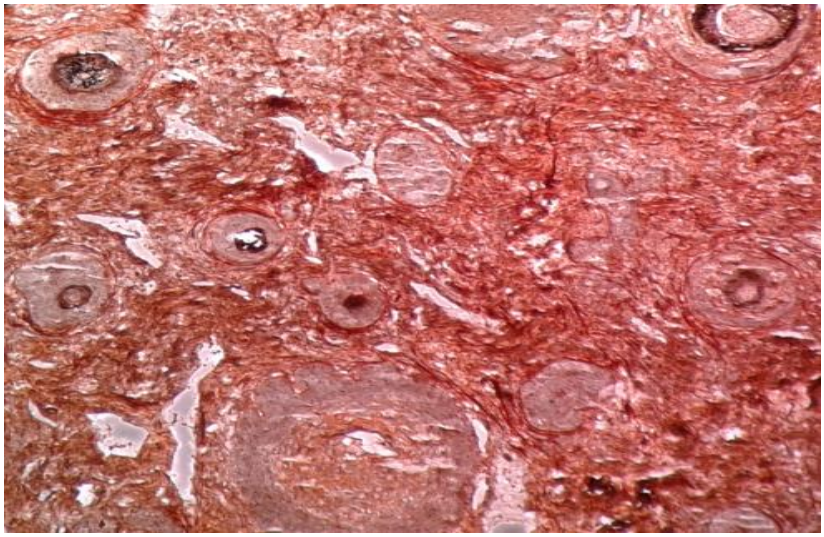
شكل (3-27)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



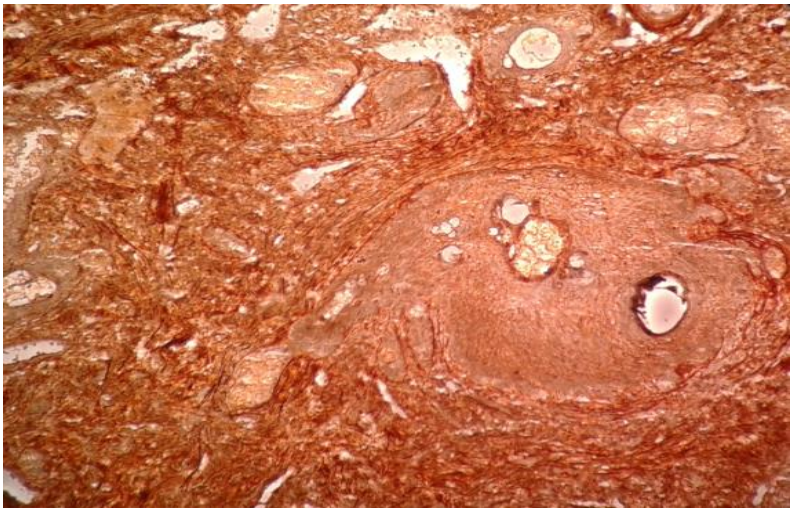
شكل (3-28)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



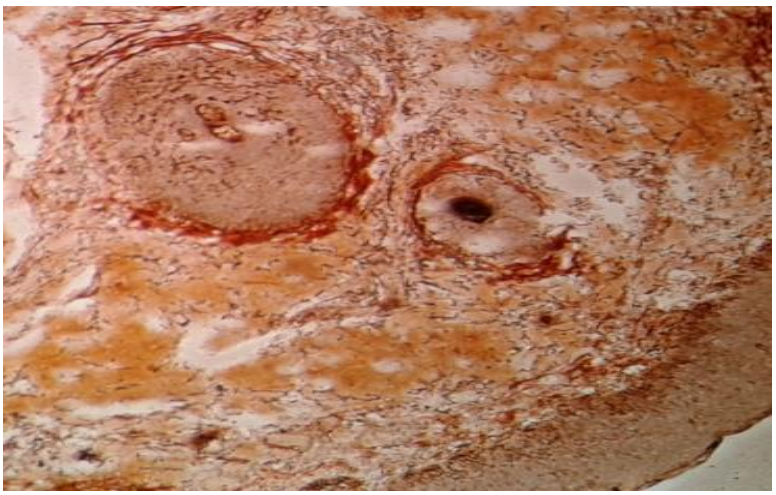
شكل (3-29)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



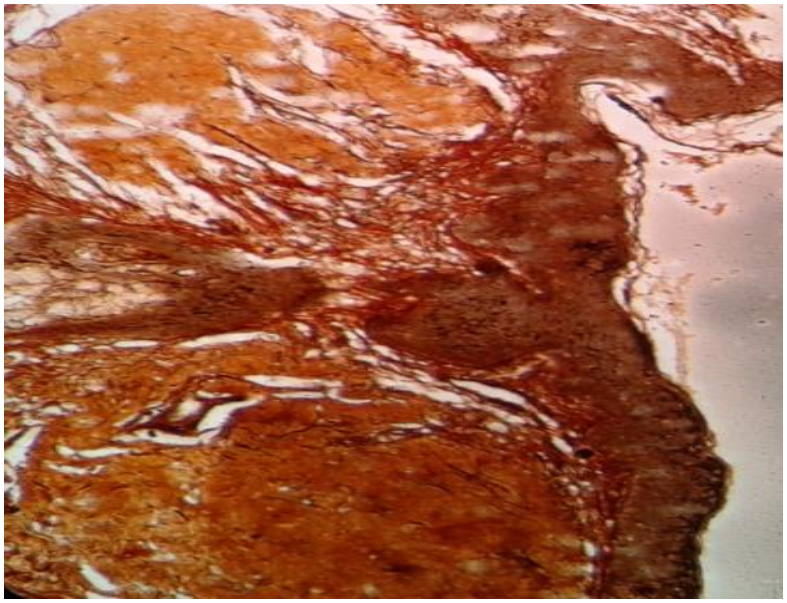
شكل (3-30)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



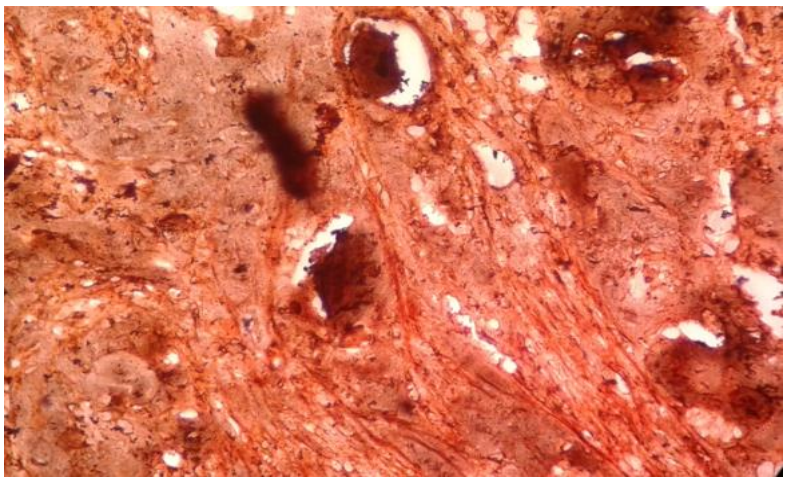
شكل (3-31)تعبيرية خفيفة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير100



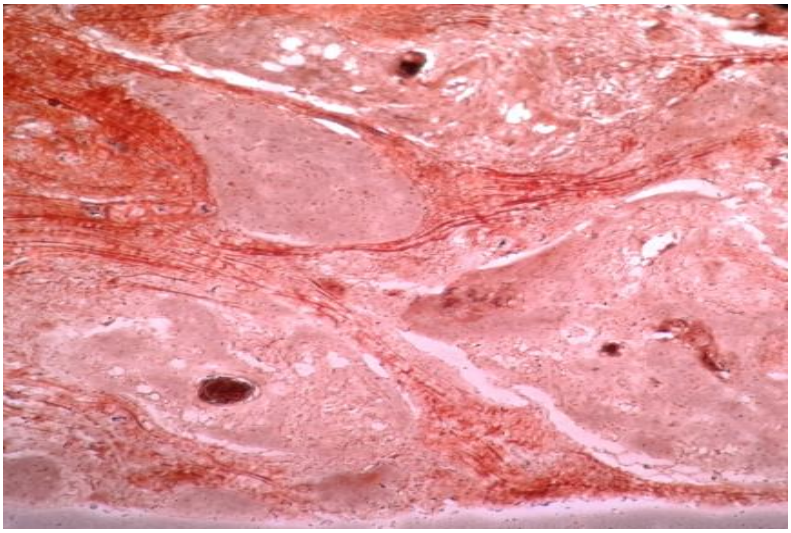
شكل (3-32)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



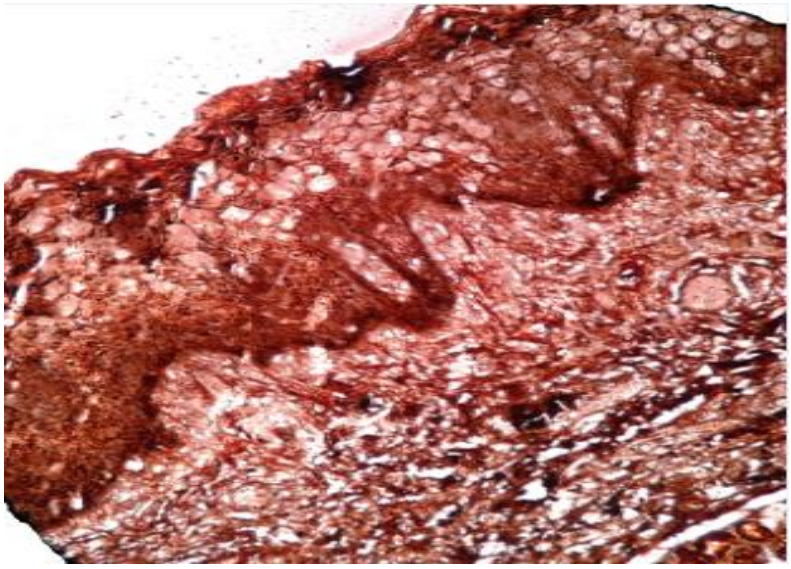
شكل (3-33)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100
(منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



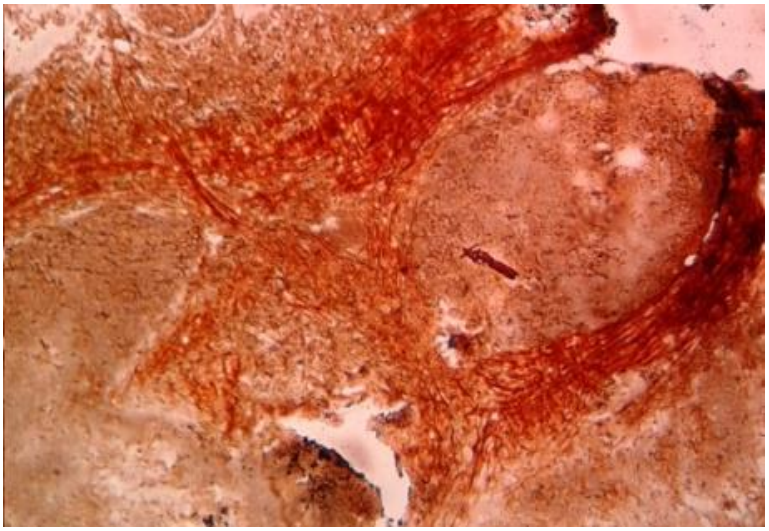
شكل (3-34)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



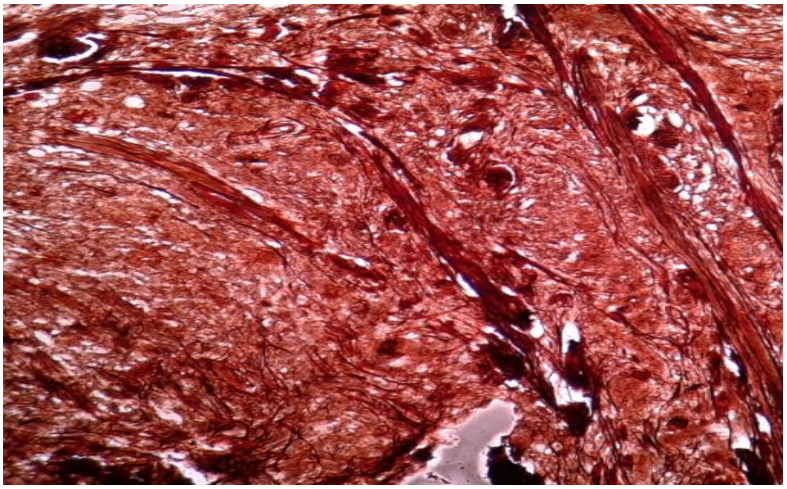
شكل (3-35)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



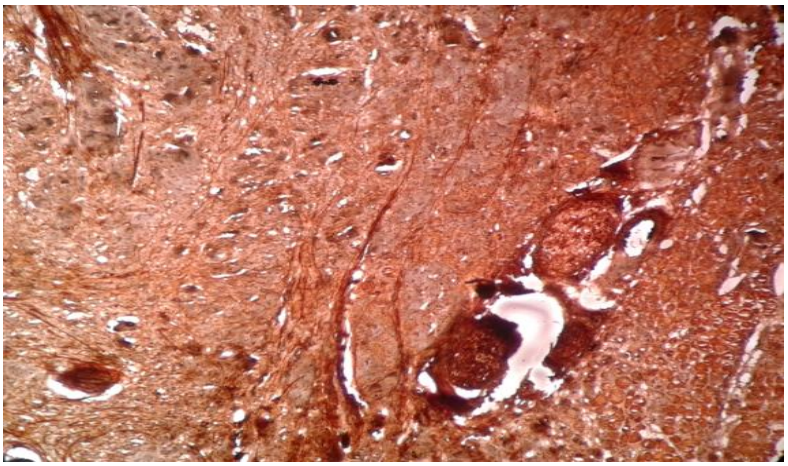
شكل (3-36)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100(منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



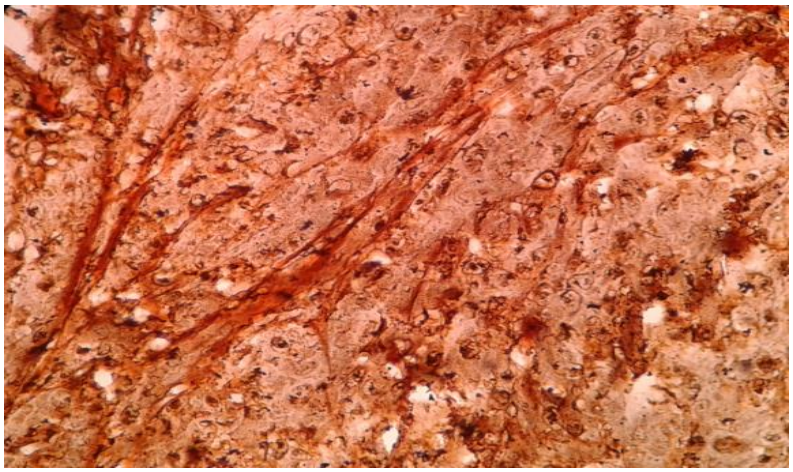
شكل (3-37)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



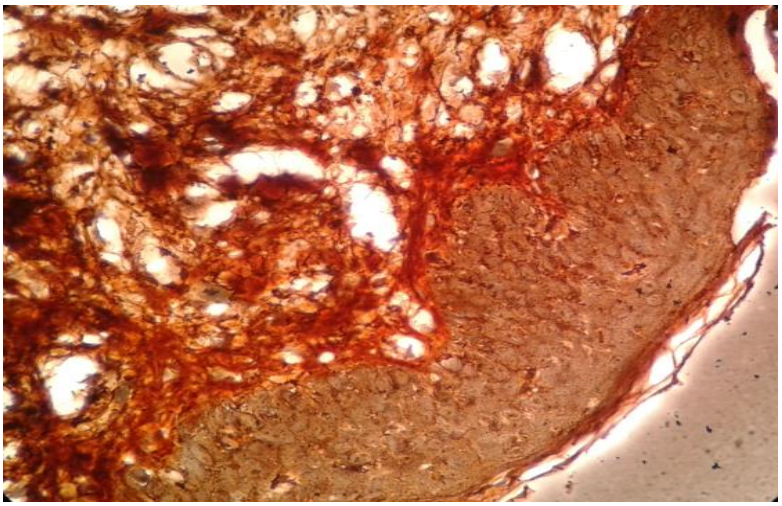
شكل (3-38)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



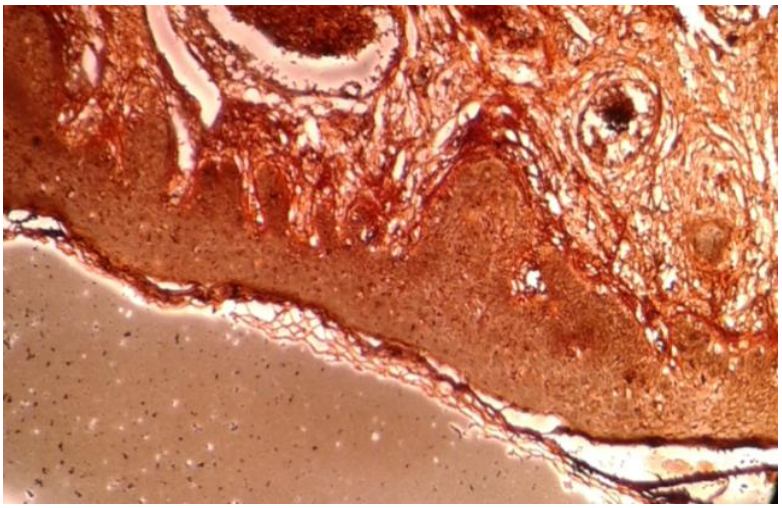
شكل (3-39)تعبيرية متوسطة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



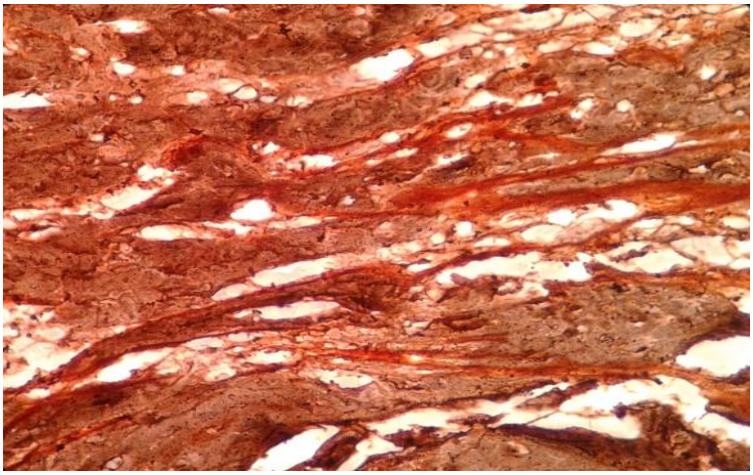
شكل (3-40)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100



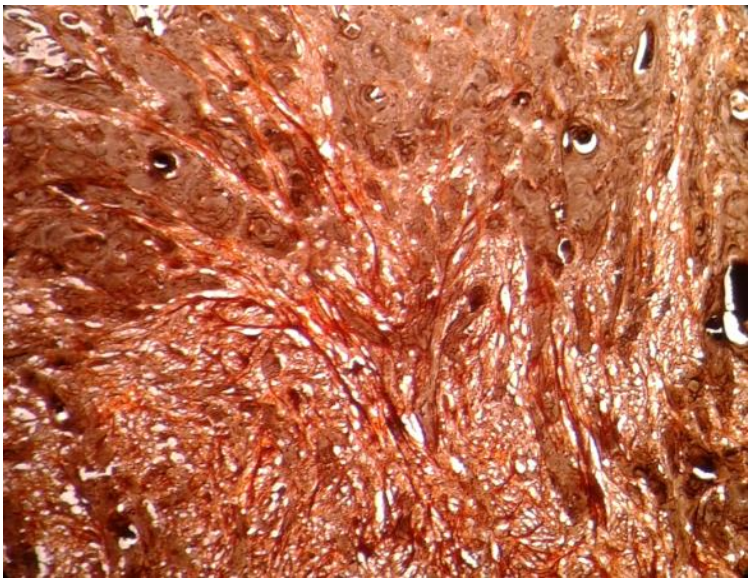
شكل (3-41)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



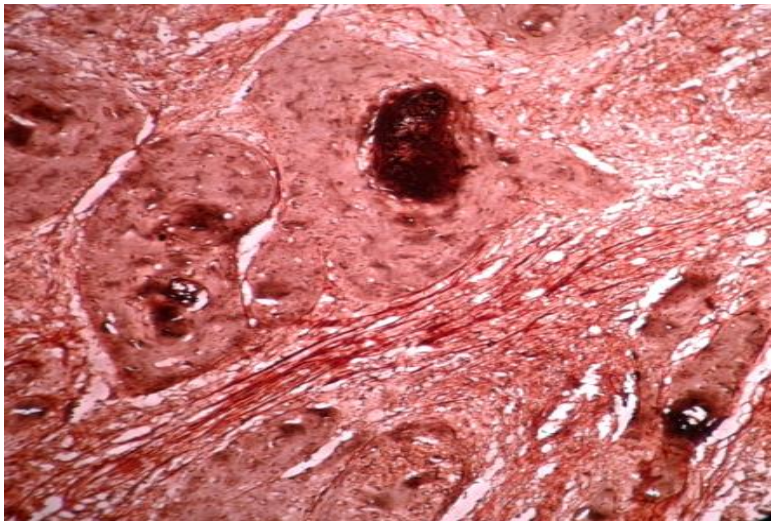
شكل (3-42)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



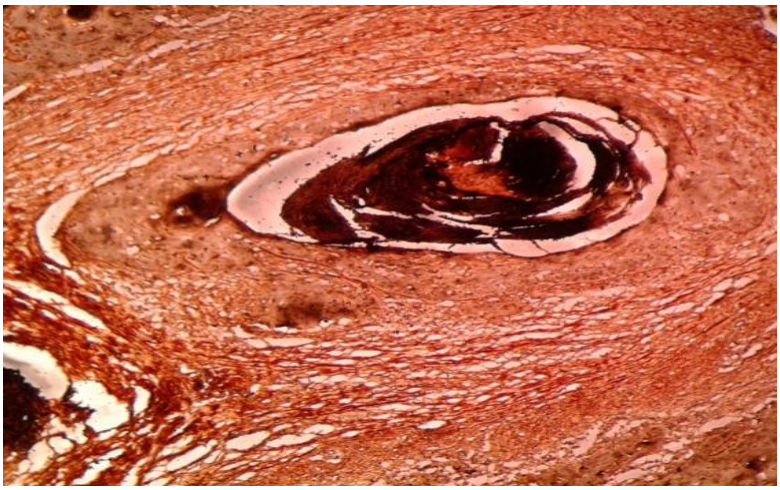
شكل (3-43)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100



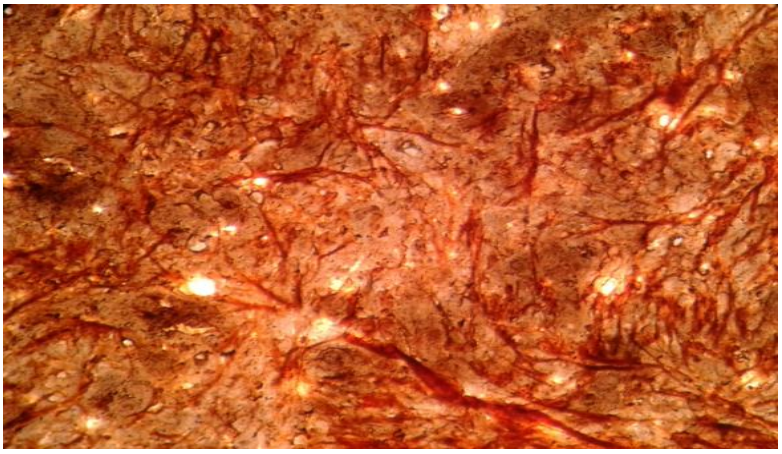
شكل (3-44)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100



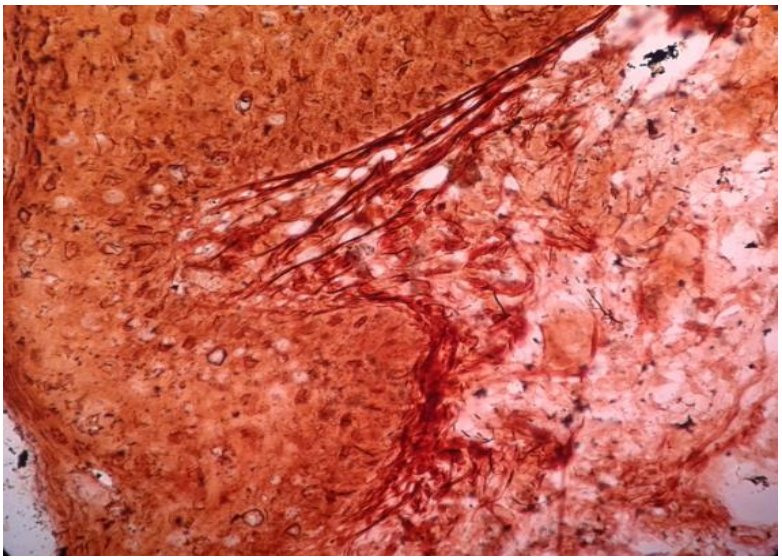
شكل (3-45)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100



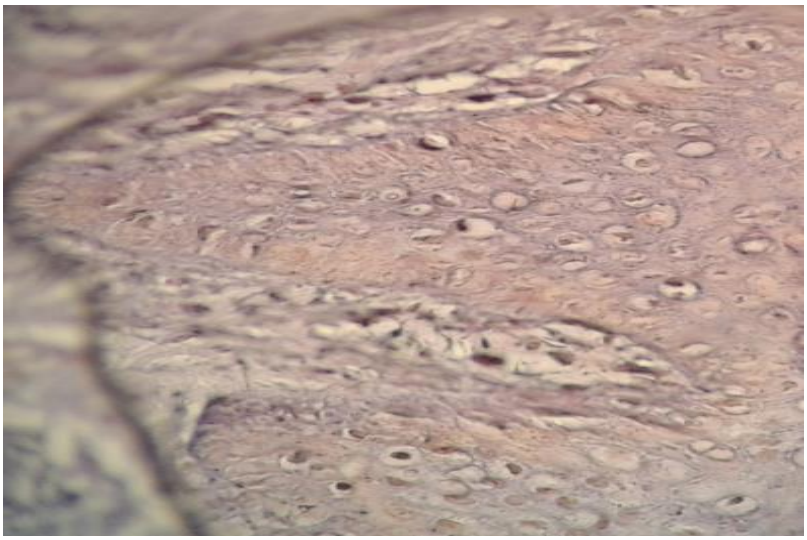
شكل (3–46)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير100



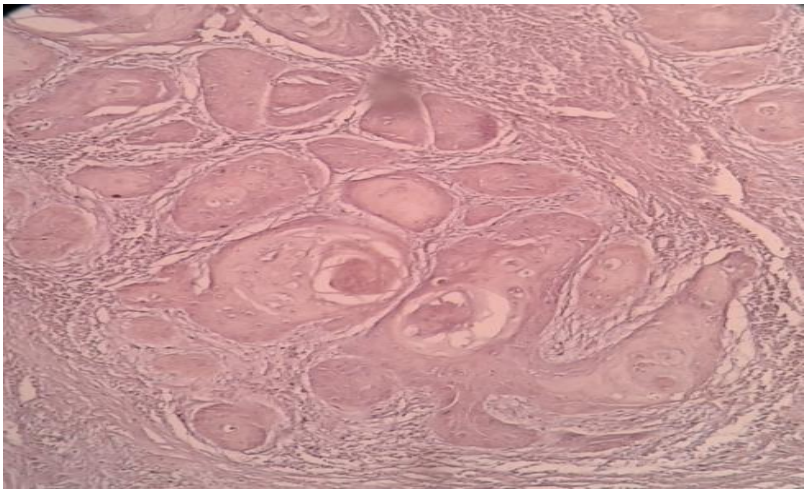
شكل (3–47)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير100



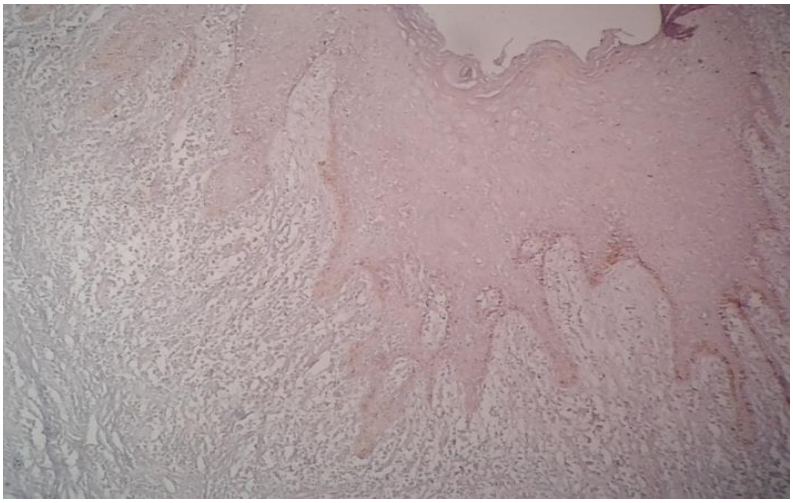
شكل (3–48)تعبيرية شديدة لنترات الفضة في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



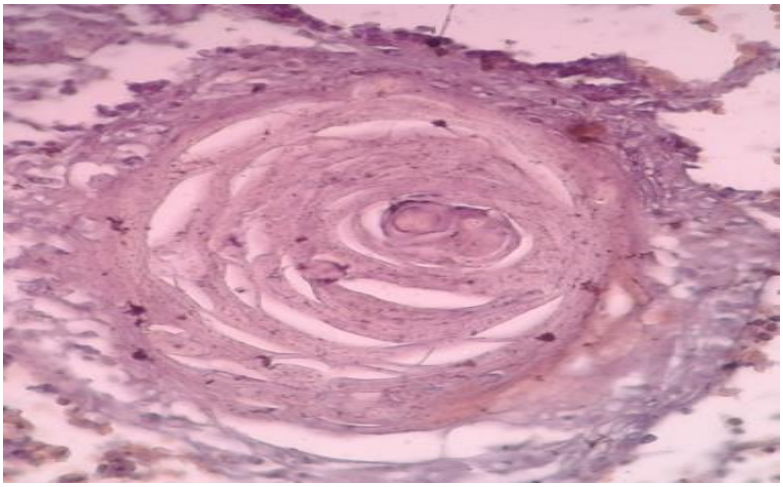
شكل (3-49)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



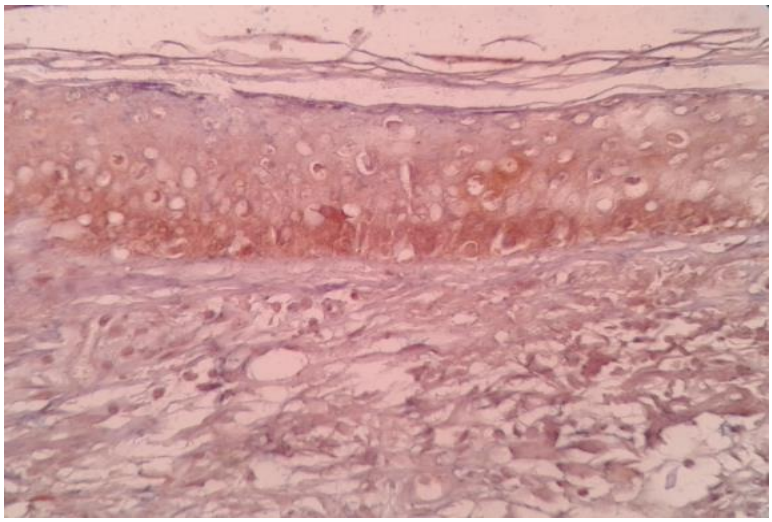
شكل (3-50)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



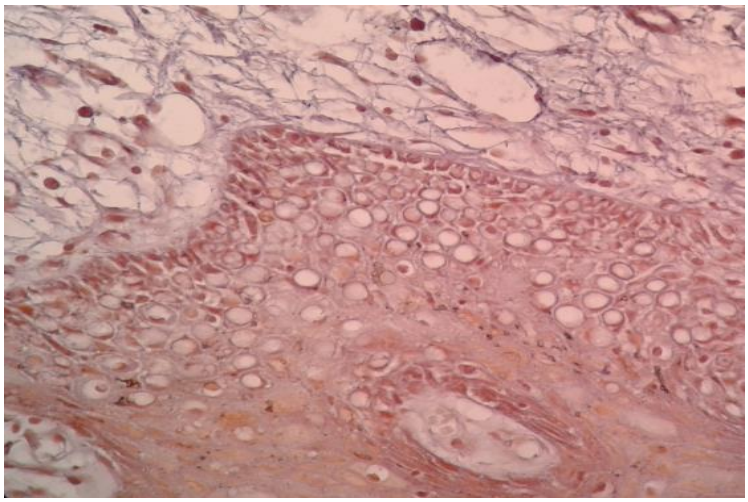
شكل (3-51)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



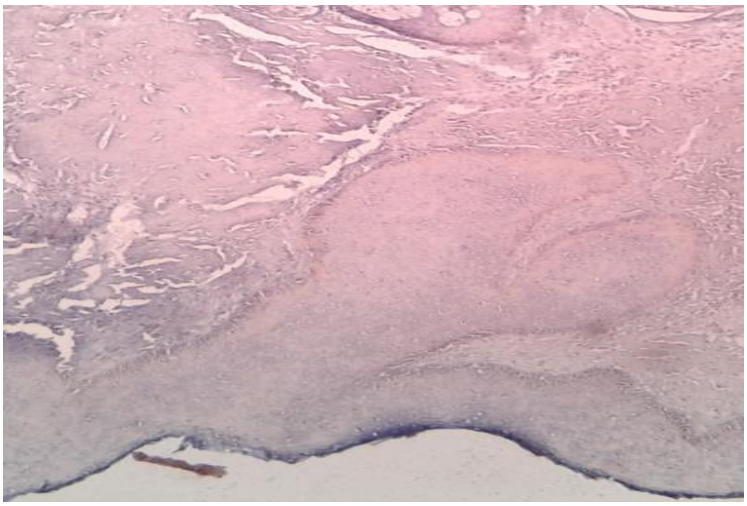
شكل (3-52)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100



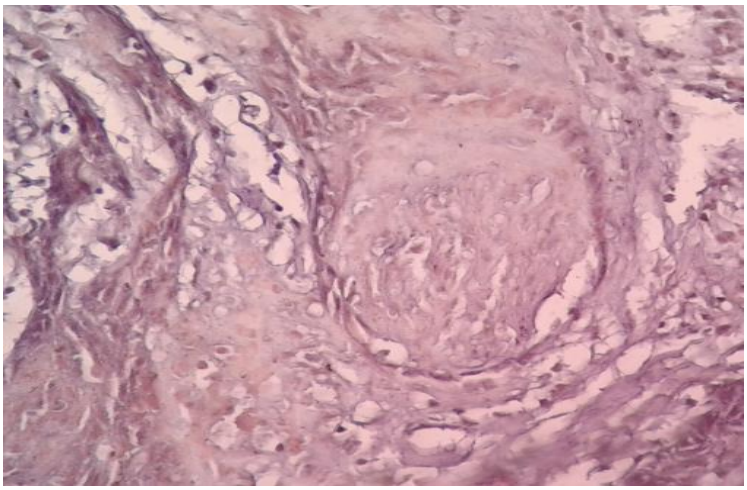
شكل (3-53)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



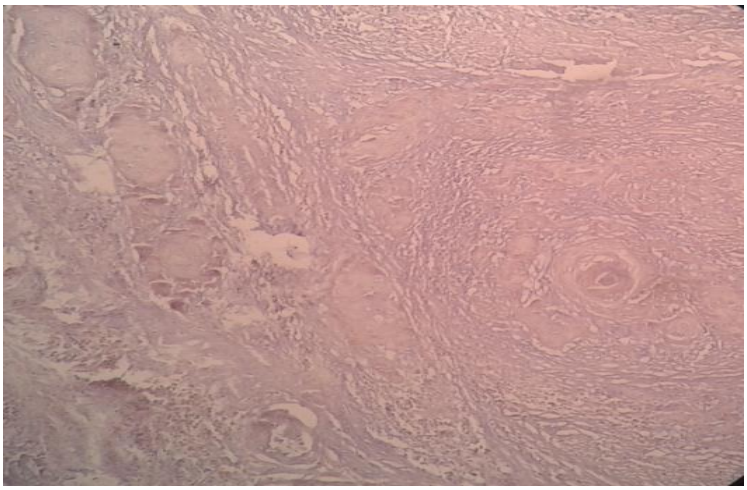
شكل (3-54)تعبيرية جيدة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا جيد التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



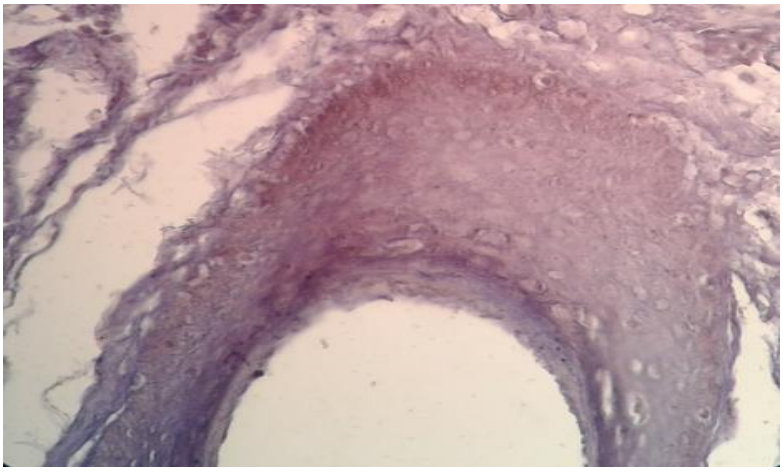
شكل (3-55)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



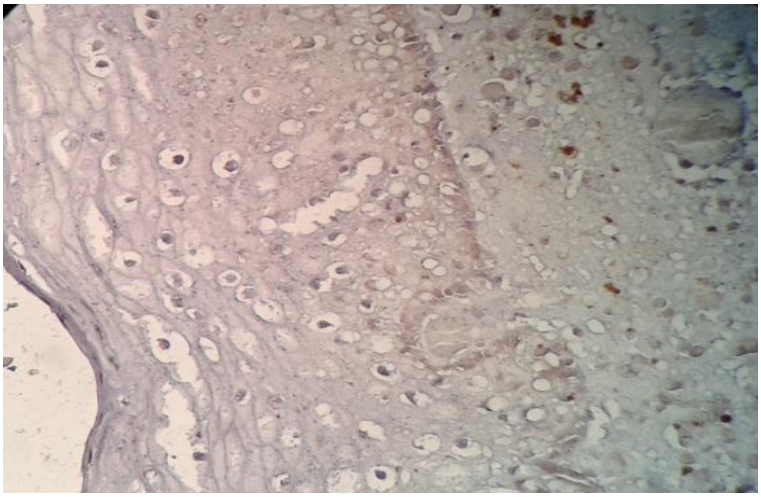
شكل (3-56)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



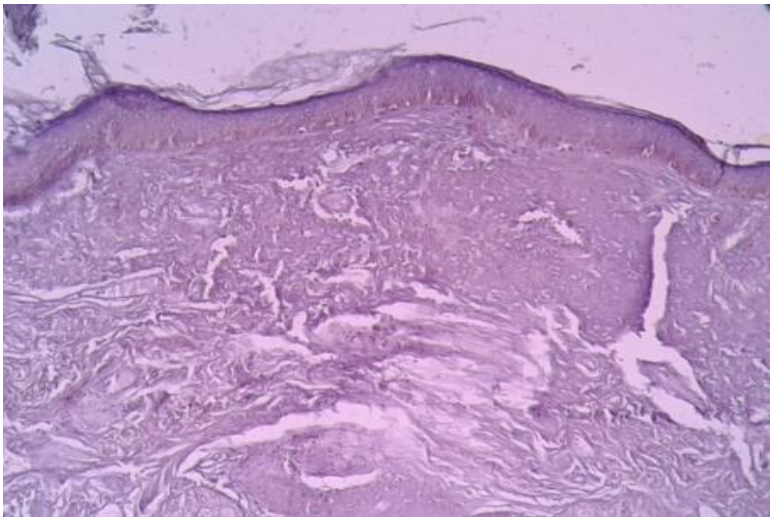
شكل (3-57)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



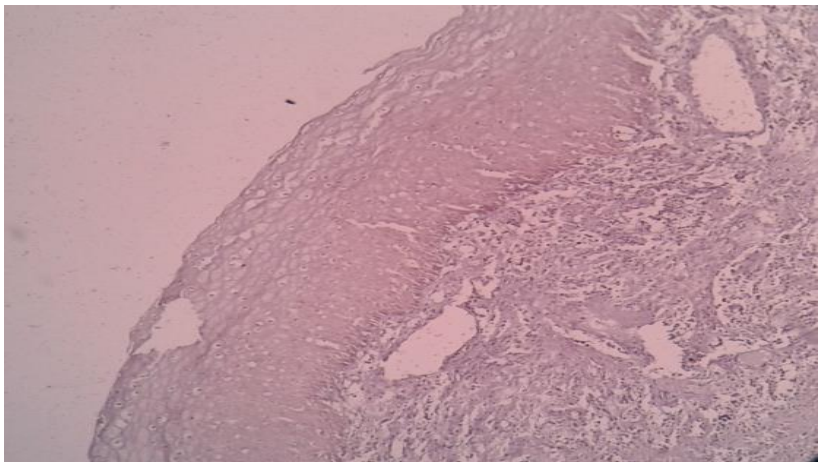
شكل (3-58)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100



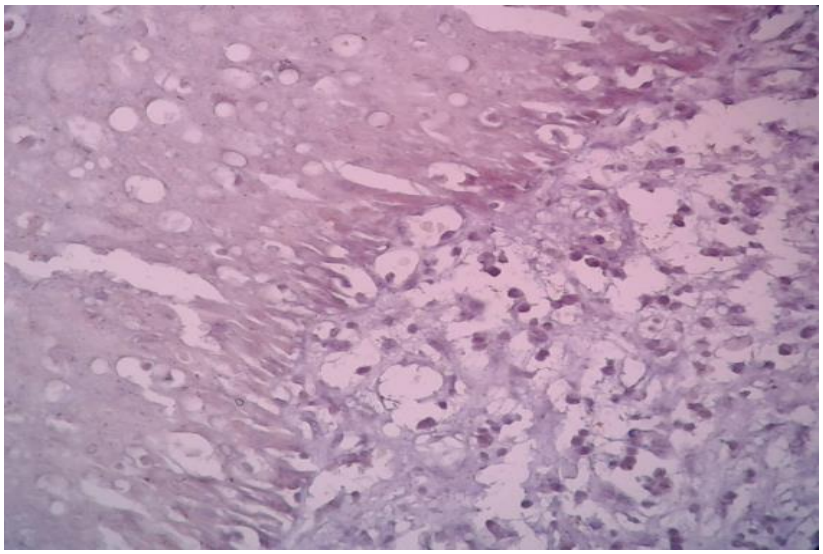
شكل (3-59)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



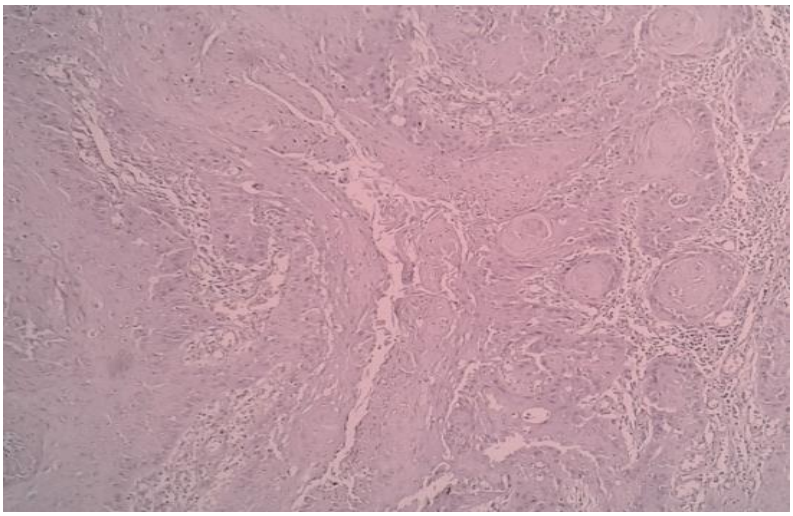
شكل (3-60)تعبيرية متوسطة لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا متوسط التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



شكل (3-61)تعبيرية سلبية لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



شكل (3-62)تعبيرية سلبية لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100 (منطقة البشرة السطحية القريبة من الجزر الورمية)



شكل (3-63)تعبيرية سلبية لواسم الكولاجين IV في السرطانة شائكة الخلايا سيِّئ التمايز. تكبير 100