



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الطب البشري
قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية

تعبيرية واسمات التحول الظهاري السدوي في سرطانات الثدي الغازية والموضعة عند مريضات سوريات

بحث علمي أعد لنيل شهادة الدكتوراه في الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية

إعداد

الطبيبة ميس واثق صالح

إشراف

الأستاذ الدكتور محمد اياد الشطي

مشرف مشارك الدكتورة ربا علي

٢٠٢٥

شكر وامتنان

صاحب الفضل الأول والأخير .. صاحب الفضل العظيم .. من ذلل العقبات حتى أبصر هذا العمل النور... ودعمني حتى اللحظة الأخيرة... الأستاذ والإنسان والقُدوة في العلم والعمل والأخلاق ... من حسن الحظ أنني من طلابك ... الأستاذ الدكتور محمد ايد الشطي

الدكتورة الرائعة التي رغم انشغالها الشديد لم تتوانى عن مساعدتي بكل ما أمكنها علميا وتقنيا .. لقد كان من دواعي فخري وسروري أن تشرفت بالعمل معك .. الدكتورة ربا العلي

أعضاء لجنة التحكيم الموقرين

أ.د. عبد الغني الشلبي أ.د. لينا الحفار أ.د. فريز أحمد أ.د. نسرين خازم

جزيل الشكر على وقتكم الذي منحتوه لقراءة الاطروحة ومناقشتها ... جزيل الشكر على ملاحظاتكم القيمة والغنية ... جزيل الشكر على قبول تواجدكم الكريم ضمن لجنة الحكم

أساتذتي في قسم التشريح المرضي في جامعة دمشق

أ.د. لينا الحفار أ.د. فريز أحمد أ.د. وليد الصالح أ.د. أيمن صمون

شكراً على مجهودكم معنا طوال سنوات الاختصاص والدكتوراه كنتم خير معلمين ومرشدين.. قدمتم لنا كل مساعدة ونصيحة ممكنة ... جزيل الشكر لكم أساتذتي

عميدة كلية الصيدلة في جامعة دمشق الأستاذة المحترمة لمى يوسف التي لطالما غمرتني بلطفها واهتمامها ودعمها وشرفتني بحضور المناقشة

الأستاذة القدوة والقامة العلمية والانسانية ألف شكر أساتذتنا

جميع زملائي وزميلاتي في قسم التشريح المرضي

طلاب وطالبات الماجستير والدكتوراه وأخص بالذكر

د. زين ابراهيم باشا – د. كنده أسود – د. ديمة الشعار اللواتي كن بمثابة مرشداتي حين بدأت مسيرتي في الاختصاص وأصبحن أفضل صديقات وزميلات تشاركنا في كل العقبات والصعوبات واليوم يشاركنني فرحتي على أمل أن أشاركهم أفراح مناقشتهم في القريب

الفنيات والموظفات والسكرتارية في قسم التشريح المرضي في المشفى الوطني الجامعي (آلاء، زبيدة، زينب، نور، مها، فرح، رهنف، غيداء، نور، مرام) ألطف وأحن صبايا

سكرتيرة قسم التشريح المرضي في كلية الطب البشري الأنسة مواهب لقطينة ... شكراً على
تعبك الدائم معنا

شكر خاص إلى الجامعة الدولية الخاصة IUST بكافة كوادرها:

رئاسة الجامعة ممثلة بالأستاذ الدكتور عمار ناصر آغا

عميد كلية الصيدلة الدكتور حبيب عبود ونائب العميد الدكتور عصام ناصر

إهداء..

والدي واثق ووالدتي سهام

ذكرتكما ضمن إهداء واحد لأنكما بالنسبة لي كل لا يتجزأ يمثل الطيبة والصدق والحنان
والعطاء والحب الخالص النقي

أي كلمة مديح تقال بحقي هي بفضلكما.. كنتما المثل الأعظم الذي نشأت عليه فاكتمت منه كل
ما هو جميل

أتمنى أن أكون دائما مصدر فخر لكما ... وأن تكونا دائما مصدر طمأنينتي..

إلى أخي الوحيد الذي يغني عن الدنيا كلها... السند بكل معنى الكلمة ... من ألجأ دائما إليه في
حزني وغضبي وخوفي ... أكثر من آمن بي وبقدراتي وساندني حتى حين فقدت أنا ثقتي بنفسي
.. أبو السلم الغالي

إلى زوجة أخي ... الروح الجميلة في عائلتنا ... التي تحمل نقاء الأطفال وبراءتهم مع حكمة
العقلاء وذكائهم ... اللطيفة الرقيقة وسام

إلى أبناء أخي واثق وكميت أحباء روعي وأجمل نعم الحياة..

إلى الصديقات الحق كل الكلام في حقن قليل ... دائما بجانبني في الأوقات الصعبة تشدون من
أزري وتخففن عني وفي الأوقات الجميلة تفرحن لي أكثر من فرحتي بنفسي تتمنين الخير
لي كما لأنفسكن أنتن سبب اتزان رغب كل الرياح أنتن هدية من الله غرسها في
دربي.... مجرد الجلوس أو حتى الحديث معكن هو السعادة والراحة

د. زين د. شاهناز د. آلاء

إلى بنات خالاتي الجميلات وبمثابة أخواتي الصغيرات ... دائما قلوبهن النقية مفتوحة لي ...
ذكرياتنا الجميلة وحدها تبني قصورا من السعادة والفرح رهف رشا نور

إلى صديقات الدراسة ورفيقات الدرب لم ولن تنجح دروبنا المختلفة في محو محبتنا... لا
زلت حين أجلس معهن ولو بعد غياب أشعر كأني تركتهن بالأمس نها نور هبة

مسك الختام إلى عائلة IUST الجميلة

لطالما كانت والدتي تدعو لي دعوة أحبها كثيراً (الله يبعثلك ولاد الحلال) أظن أن هذه الدعوة هي التي قادتني إلى أن أكون جزءاً من هذه العائلة لم أكن أعتقد أن مكانا للعمل يمكن أن يكون خالياً من كل أشكال الغيرة والمنافسة بل على العكس تسوده كل هذه المحبة والألفة إلى أن صادفتكن

الأستاذة المحترمة عائدة الخيمي

الرفيقة الراقية د. رنا ، الأنيقة قلبا وقالبا د. وئام

العزيزات جداً د. كنده، د. راما عياش، د. نسرين، د. رشا، د. وفاء، د. باسمه

من يحتضنني كأختهن .. من يمنحن الحياة لكل الأماكن د. حياة ، د. لبنى

الشريكة الأجل المجددة بصمت الذهب الخالص د. رهام

من تدخل القلب دون استئذان الهادئة النقية د. راما مصلح

صاحبة الابتسامة العذبة والقلب الجميل د. سالي

النشيطة اللطيفة المحبة د. يارا ، الملكة أينما حلت د. رولا

الروح المرححة الجذابة د. ريم ، الروعة بكل معنى الكلمة د. روعة

الغاليات الجميلات د. نيرمين ، د. لميا ، د. نور ، د. إسراء ، د. هلا

الحبيبات والمحبات الجنود المجهولين راما ، سوزان ، حسامة

وإلى كل من وقف بجانبني ودعمني..

قائمة المحتويات

٨	قائمة الجداول:
٩	قائمة الأشكال:
١١	قائمة الاختصارات:
١٩	الملخص
٢٠	المقدمة:
٢١	الدراسات المرجعية:
٢٢	خلاصة الدراسات المرجعية:
٢٢	أهمية البحث (المشكلة البحثية):
٢٣	الهدف من البحث:
٢٣	مبررات البحث:
٢٤	محدوديات البحث:
٢٤	منهج البحث وأدواته:
٢٥	١. التحول الظهاري السدوي (EMT) Epithelial mesenchymal transition:
٢٥	١,١. مصونية الخلايا الظهارية Epithelial Integrity:
٢٥	١,٢. لدونة النسيج الظهاري في الإصلاح والترميم Epithelial Plasticity in Repair and Remodeling:
٢٦	١,٣. التحول الظهاري-السدوي EMT
٢٦	١,٣,١. تعريف التحول الظهاري-السدوي وخطواته EMT definition and steps:
٢٩	١,٣,٢. التحول الظهاري السدوي في السرطان والنقائل EMT in cancer and metastasis:
٣١	١,٤. التحول السدوي الظهاري (MET) Mesenchymal Epithelial Transition:
٣٣	٢. مسارات نقل الإشارات في التحول الظهاري السدوي EMT signaling pathways:
٣٤	٢,١. مسار إشارات عامل النمو المحول-بيتا TGF-B Signaling Pathway:
٤٠	٢,٢. مسار إشارات (Wnt) Wnt signaling pathway:
٤١	٢,٣. مسار إشارات (Notch) Notch signaling pathway:
٤٣	٢,٤. مسار إشارات (Hedgehog) Hedgehog signaling pathway:
٤٣	٢,٥. إشارات نقص الأكسجين Hypoxia:
٤٥	٢,٦. مسار إشارات مستقبلات التيروزين كيناز RTK signaling pathway:
٤٧	٢,٧. إشارات المطرق خارج الخلوي Extra cellular matrix signaling:
٤٩	٢,٨. التداخل بين مسارات الإشارات المختلفة في ال EMT crosstalk between signaling pathways:
٥١	٣. واسمات التحول الظهاري السدوي Biomarkers for EMT:
٥١	٣,١. الكادهيرين والكاتينين (E-cadherin, N-cadherin, β -catenin)
٥١	٣,١,١. البنية والوظيفة:
٥٥	٣,١,٢. دور الكادهيرين/الكاتينين في التحول الظهاري السدوي والسرطان:
٦١	٣,١,٣. الكادرينات والكاتينينات في سرطان الثدي:

٦٣	٣,٢ Snail:
٦٣	٣,٢,١ بنية Snail:
٦٥	٣,٢,٢ دور Snail في التحول الظهاري السدوي والسرطان:
٦٧	٣,٢,٣ Snail في سرطان الثدي:
٦٨	٣,٣ Nuclear Factor- κ B (NF- κ B):
٦٩	٣,٣,١ البنية والوظيفة:
٧٢	٣,٣,٢ دور NF- κ B في التحول الظهاري السدوي والسرطان:
٧٥	٣,٣,٣ NF- κ B في سرطان الثدي:
٧٧	٣,٤ الفايمنتين Vimentin:
٧٧	٣,٤,١ البنية والوظيفة:
٧٩	٣,٤,٢ دور Vimentin في التحول الظهاري السدوي والسرطان:
٨٣	٣,٤,٣ Vimentin في سرطان الثدي:
٨٥	٤. الأهمية السريرية للتحول الظهاري السدوي EMT Clinical Significance of EMT:
٨٦	٤,١ الخلايا الجذعية السرطانية و التحول الظهاري السدوي Cancer Stem Cells and EMT:
٩١	٤,٢ التحول الظهاري السدوي ومقاومة الأدوية Drug-resistance and EMT:
٩٣	٤,٣ العلاجات التي تستهدف التحول الظهاري السدوي EMT Targeting EMT Treatments:
٩٨	الدراسة العملية
٩٨	المواد والطرق Materials and methods:
٩٨	منهج الدراسة:
٩٨	معايير الاشتمال:
٩٩	معايير الاستبعاد:
٩٩	الدراسة الإحصائية:
١٠٠	النتائج Results:
١٢٢	المناقشة Discussion:
١٣٥	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations:
١٣٧	المراجع:
١٥١	Abstract

قائمة الجداول:

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
جدول رقم (١)	الخصائص السريرية والباثولوجية للمرضى	٩٧
جدول رقم (٢)	الواسمات المستخدمة	٩٩
جدول رقم (٣)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ B-catenin	١٠١
جدول رقم (٤)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ TGF-B	١٠٣
جدول رقم (٥)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ Snail	١٠٥
جدول رقم (٦)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ NF-κB	١٠٧
جدول رقم (٧)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ Vimentin	١٠٩
جدول رقم (٨)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ Ki-67	١١١
جدول رقم (٩)	المعلّقات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ E-cadherin	١١٣
جدول رقم (١٠)	نسبة البقيا الإجمالية وفق الواسمات المدروسة باستخدام نموذج انحدار الخطر النسبي لكوكس	١١٥
جدول رقم (١١)	توزع الواسمات المدروسة تبعاً للنمطين النسيجين القنيوي والفصيصي فقط	١١٧

قائمة الأشكال:

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
شكل رقم (١)	يوضح الشكل التبدلات التي تطرأ على مكونات الهيكل الخلوي أثناء ال EMT	٢٥
شكل رقم (٢)	الدونة الظهارية السدوية أثناء حدوث النقائل	٢٧
شكل رقم (٣)	أشيع مسارات نقل الإشارة ضمن في التحول الظهاري السدوي ال EMT	٣٠
شكل رقم (٤)	الدور التناقضي ل β -TGF في السرطان	٣٢
شكل رقم (٥)	كمثبط للنمو ومحرض للموت الخلوي المبرمج	٣٣
شكل رقم (٦)	مسار إشارات ال β -TGF في ال EMT	٣٤
شكل رقم (٧)	مسار إشارات ال Wnt وال Notch وال Hedgehog في ال EMT	٣٩
شكل رقم (٨)	مسار إشارات نقص الأكسجة في ال EMT	٤١
شكل رقم (٩)	مسار إشارات ال RTK في ال EMT	٤٣
شكل رقم (١٠)	مسار إشارات المطرق خارج الخلوي في ال EMT	٤٥
شكل رقم (١١)	التداخل بين إشارات مسار ال β -TGF المعتمد على SMAD وبين إشارات مسارات ال Wnt وال Notch	٤٧
شكل رقم (١٢)	رسم توضيحي لمعقد ال cadherin-catenin	٤٩
شكل رقم (١٣)	بنية ال E-cadherin وال N-cadherin	٥٠
شكل رقم (١٤)	بنية ال β -catenin والمعقد الذي يصنعه مع المجال السيتوبلازمي لل E-cadherin	٥١
شكل رقم (١٥)	دور ال E-cadherin في انتشار الخلايا السرطانية	٥٧
شكل رقم (١٦)	شكل ترسمي يوضح بنية ال Snail	٦١
شكل رقم (١٧)	شكل ترسمي لبنية NF- κ B	٦٦
شكل رقم (١٨)	تفعيل إشارات NF- κ B بالطريق التقليدي وغير التقليدي	٦٨
شكل رقم (١٩)	مسارات NF- κ B في السرطان والنقائل	٧٠
شكل رقم (٢٠)	شكل ترسمي لبنية ال Vimentin	٧٤

٧٥	توزع خيوط الـ Vimentin في الخلية الميزانشيمية وعلاقتها مع الانتغرين $\beta 3$	شكل رقم (٢١)
٧٧	دور الـ Vimentin في التأثير على الالتصاق بين الخلايا	شكل رقم (٢٢)
٧٨	دور الـ Vimentin في تولد الأوعية الدموية	شكل رقم (٢٣)
٨١	مخطط يوضح مختلف مسارات الإشارة التي يساهم من خلالها الـ Vimentin في الـ EMT والغزو والنقائل.	شكل رقم (٢٤)
٩٢	مخطط يوضح آلية عمل العوامل التي تستهدف TGF-B في السرطان	شكل رقم (٢٥)
٩٤	الاستراتيجيات العلاجية الهدافية المحتملة للـ EMT	شكل رقم (٢٦)
١٢٠	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ B-catenin	شكل رقم (٢٧)
١٢٢	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ TGF-B	شكل رقم (٢٨)
١٢٤	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ Snail	شكل رقم (٢٩)
١٢٥	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ NF- κ B	شكل رقم (٣٠)
١٢٦	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ Vimentin	شكل رقم (٣١)
١٢٨	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ Ki-67	شكل رقم (٣٢)
١٣٠	صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ E-cadherin	شكل رقم (٣٣)

قائمة الاختصارات:

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ajs	Adherent Junctions
Akt (PKB)	Protein Kinase B
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ALK-1	Activin Receptor-Like Kinase-1
ANK	Ankyrin Repeats
AP-1	Activating Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
aPKC	Atypical Protein Kinase C
ASE	Anti-Silencer Element
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
Axl	Receptor Tyrosine Kinase
BAY 11-7082	NF- κ B Inhibitor
4-1BB(CD137)	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily
B-cat	β -catenin
BCL2	B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 Protein
BCL-XL	B-Cell Lymphoma-Extra Large
BCSCs	Breast Cancer Stem Cells
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
B7-H3	B7-Homologue 3
BIK	Bcl-2 Interacting Killer
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator
BLBC	Basal-Like Breast Cancer
BRCA	Breast Cancer Gene
BTLA	B- And T-Lymphocyte Attenuator
β -TRCP1	B-Transducing Repeat-Containing Protein 1

CBF1	C-Repeat/DRE Binding Factor 1
CDC42	Cell Division Cycle 42
CD49f	Integrin A6
CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin Depended Kinase
c-Myc	Cellular Myelocytomatosis Oncogene
COX-2	Cyclooxygenase-2
CS	Canonical Signaling
CSC	Cancer Stem Cell
CTC	Circulating Tumor Cell
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DAB2	Disabled Homolog 2
DCIS	Ductal Carcinoma in Situ
DD	Death Domain
DDR	Discoidin Domain Receptors
DFS	Disease Free Survival
4EBP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1
EC	Extra-Cellular
E-cad	E-cadherin
ECM	Extra-Cellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
ER	Estrogen

ERCC1	Excision Repair Cross Complementation Group-1
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXC2	Forkhead Box Protein C2
FOXO	Forkhead Box Transcription Factors
G1	Gap 1 Phase
G2	Gap 2 Phase
G9a (EHMT2)	Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2
GBM	Glioblastoma Multiforme
GN25	P53-Snail Binding Inhibitor, Calbiochem
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
GRR	Glycine-Rich Domain
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 Beta
HDAC	Histone Deacetylase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
Hey1	Hairy/Enhancer-Of-Split Related with YRPW Motif 1
HGF	Hepatocyte Growth Factor
Hh	Hedgehog
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
H3K9me	Histone H3 Lysine 9 Methylation
HMLEs	Immortalized Human Mammary Epithelial Cells
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
ICOS	Inducible T Cell CO-Stimulator
IDC	Invasive Ductal Carcinoma
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IF	Intermediate Filaments

IFN- γ	Interferon-Gamma
IGF	Insulin Growth Factor
IGFBP2	Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 2
IHC	Immunohistochemistry
IL-1	Interleukin 1
ILC	Invasive Lobular Carcinoma
ILK	Integrin-Linked Kinase
ITGA6	Integrin Subunit Alpha 6
ITGB4	Integrin Subunit Beta 4
JAG2	Jagged Canonical Notch Ligand 2
JNK	Jun N-Terminal Kinase
JUP	Junction Plakoglobin
LAP	Latency-Associated Peptide
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LIMK	LIM (LIN-11, Isl-1, MEC-3) Kinases
LOX	Lysyl Oxidase
LOXL2	Lysyl Oxidase-Like 2
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor
LSD1	Lysine-Specific Histone Demethylase 1
LZ	Leucine Zipper
M	Mitosis Phase
MAML	Mastermind-Like
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation -7
MDA-MB-231	Breast cancer cell line
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney

MED12	Mediator Complex Subunit 12
MEK	MAPK/ERK Kinase
MET	Mesenchymal Epithelial Transition
MLC	Myosin Light Chain
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT1–MMP	Membranetype–1 Matrix Metalloproteinases
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MSI	Micro Satellite Instability
NCS	Non–Canonical Signaling
NES	Nuclear Export Signal
NF– κ B	Nuclear Factor Kappa–Light–Chain–Enhancer of Activated B Cells
NICD	Notch Intracellular Domain
NIK	NF– κ B Inducing Kinase
NOD/SCID	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
OPN	Osteopontin
OS	Overall survival
OX40 L	OX4 Ligand
PAK 1	Serine/Threonine–Protein Kinase
Panc–1	Human Pancreatic Cancer Cell Line
Par–3	Partitioning Defective 3
Par–4	Prostate Apoptosis Response 4
Par–6	Partitioning Defective 6
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PDGF	Platelet–Derived Growth Factor
PDGF–Rb	Platelet–Derived Growth Factor Receptor Beta
PDK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1

PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PEA3	Polyoma Enhancer Activator 3
PHD	Prolyl Hydroxylases
PICH1	Protein Patched Homolog 1
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
PLAU	Plasminogen Activator, Urokinase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PR	Progesterone
pRb	Retinoblastoma Tumor Suppressor
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PUMA	P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PYK2	Proline-rich Tyrosine Kinase 2
RAC	Rac Family Small GTPase
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RBP-JK	Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region
RFS	Recurrence Free Survival
RHD	Rel Homology Domain
RHOA	Ras Homolog Family Member A
ROCK	Rho-Associated Protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS1	Ros Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases
S	Synthesis Phase
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SHC	Src Homology 2 Domain-Containing Transforming Protein

SHIP	Src Homology Domain Containing Inositol 5-Phosphatase
SMAD	Suppressor Of Mothers Against Decapentaplegic
Smurf2	Smad Ubiquitination Regulatory Factor 2
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SRD	Serine Rich Domain
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SUV39H1	Human Homologue of the Drosophila Protein Su(var)3-9
TAB1	TAK1-Binding Protein 1
TACE	Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme
TAD	Transcription Activation Domain
TAK1	Transforming Growth Factor- β -Activated Kinase-1
TAZ	Transcriptional Coactivator with PDZ-Binding Motif
TbRII	TGF- β Receptor Type II
TCF	T-Cell Factor
TF	Transcription Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIEG	Transforming Growth Factor β Inducible Early Gene
Tils	Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TIM-3	T-Cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3
TMA	Tissue Microarray
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNM	Tumor, Nodes, Metastasis
TRAF6	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand
Tregs	Regulatory T Cells

uPA	Urokinase Type Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIM	Vimentin
Wnt	Wingless-Related Integration Site
WSS	Wall Shear Stress
ZBP-89	Zinc-Finger Binding Protein-89
ZEB	Zinc-Finger E-Box Binding Homeobox

المخلص

مقدمة: التحول الظهاري السدوي EMT سرطان الثدي هو العملية التي تفقد خلالها الخلايا الظهارية المستقطبة والمتلاصقة هذه الخصائص وتكتسب بالمقابل خصائص النمط الظاهري السدوي مما يمنحها القدرة على الغزو. تتواسط هذه العملية العديد من المنظمات ومسارات الإشارة المتداخلة. يهدف هذا البحث إلى دراسة التعبير المناعي الكيميائي (IHC) للعديد من الواسمات المتعلقة بال EMT وآثارها على تشخيص وإنذار سرطان الثدي لدى مجموعة من النساء السوريات. الطرائق: تم في هذه الدراسة جمع بيانات ١١١ مريضة مشخصة بسرطان الثدي الغازي والموضع في الفترة بين ٢٠١٧-٢٠٢٠، تم تقييم تعبيرية كل من الواسمات التالية (β -catenin, TGF- β , Snail, NF- κ B, E-cadherin, Vimentin, Ki-67) عن طريق الكيمياء النسيجية المناعية (IHC) وباستخدام تقنية (TMA) وفقاً للمبادئ التوجيهية الواردة في الأدبيات الطبية. ثم درسنا علاقة هذه الواسمات الورمية مع المتغيرات السريرية والباثولوجية الأخرى ومع إنذار الورم. وتم استخدام اختبارات فيشر الدقيقة (Fisher's exact tests) لمقارنة المتغيرات الفئوية بين المجموعات النتائج: من ضمن ١١١ مريضة في الدراسة (٦٥.٨٪) من الحالات شخصت ب IDC مقابل (١٩.٨٪) من الحالات ILC وكان لدى (١٣.٥٪) سمات قنوية وفصيصية ولدى (٠.٩٪) سرطان قنوي موضع (DCIS). (٥٤.١٪) من الحالات كانت من الدرجة النسيجية الثانية مقابل (٤١.٤٪) من الدرجة الثالثة. وكانت معظم الأورام ايجابية لـ ER (٨١.٨٪) وال PR (٧٥.٧٪) وسلبية لـ HER-2 (٧٧.٥٪). ارتبط ارتفاع تعبيرية ال TGF- β مع ارتفاع تواتر الأورام من الدرجة الثالثة (p=0.036) والمرحلة الثالثة (p=0.042) وحجم الورم الأكبر (p=0.036) مقارنة بالحالات ذات التعبير المنخفض لـ TGF- β . كان الحالت إيجابية ال β -catenin أكثر عرضة للوفاة مقارنة بالحالات السلبية لـ β -catenin (HR, 3.90; 95% CI, 1.19 to 15.93; p=0.024). السرطانات من النمط القنوي الغازي أبدت زيادة ذات دلالة هامة إحصائياً في التعبير عن كل من TGF- β (69.9% vs. 45.5%,) و E-cadherin (76.7% vs. 13.6%, p<0.001) و β -catenin (39.7% vs. 0%,) (p=0.045) مقارنة بسرطانات النمط الفيضي الغازي. وأخيراً كانت نسبة البقيا الإجمالية لسنة واحدة (٩٦.٣٪) ولخمس سنوات (٨١.٧٪). الاستنتاج: أظهرت الأورام ذات التعبير المرتفعة لكل من β -catenin و TGF- β سلوكاً سريرياً أكثر عدوانية، مما يقترح وجود قيمة إنذارية وعلاجية محتملة لهذه الواسمات.

الكلمات الرئيسية: التحول الظهاري السدوي، سرطان الثدي، TGF- β ، β -catenin

المقدمة:

سرطان الثدي هو أشيع السرطانات المشخصة عالمياً [1]، وهو ثاني أشيع سبب للوفيات المتعلقة بالسرطان لدى الإناث. وتعتبر النقائل والنكس مسؤولة عن حدوث الوفيات في ٩٠٪ من مرضى سرطان الثدي [2].

إن الخلايا الورمية الظهارية لا تتطور بشكل معزول بل تعتمد على التفاعل مع الخلايا السدوية والبيئة المكروية المجاورة. إن الدور الذي تلعبه السدى ليس مفهوماً بشكل كامل بعد، فالتبدل البؤري في السدى قد يلعب دوراً مباشراً من خلال خلق بيئة مكروية ملائمة للتطور والنمو، بدءاً من مرحلة السرطان اللابد. ومع فهمنا بشكل أفضل للدور الذي تلعبه السدى قد يكون من الممكن تطوير معالجات تستهدف مكونات السدى.

الخطوة الأخيرة في عملية التسرطن - الانتقال من السرطانة اللابدة إلى السرطانة الغازية - هي من جهة أهم الخطوات ومن جهة أخرى أقلها وضوحاً. كما أن أغلب التبدلات الجينية الملاحظة في السرطانات الغازية تتواجد أيضاً ضمن السرطانة اللابدة المرافقة [3]. تسمى مجموعة الأحداث التي تحول الخلايا الظهارية المتلاصقة إلى خلايا مفردة قادرة على غزو المطرق خارج الخلايا بالتحول الظهاري السدوي Epithelial mesenchymal transition [4]، وتعتبر عملية معقدة متعددة الخطوات حيث ينحل الالتصاق بين الخلايا مع فقدان الواسمات الظهارية مثل E-cadherin واكتساب واسمات سدوية مثل Vimentin، ثم يتم فقدان الاستقطاب القمي القاعدي ضمن الخلايا واكتساب الاستقطاب الأمامي الخلفي، لاحقاً يتعرض الهيكل الخلوي إلى إعادة قولبة مع تبدلات في ألياف الأكتين، وفي النهاية يتبدل الالتصاق الخلوي السدوي مع تفعيل الأنزيمات الحالة للبروتين [5].

يتم استخدام العديد من الواسمات لتحري عملية التحول الظهاري السدوي في سرطان الثدي، وفي هذه الدراسة سنتحرى بعض أهم هذه الواسمات وعلاقتها بمختلف الخصائص الباثولوجية لسرطان الثدي.

الدراسات المرجعية:

- واسمات التحول الظهاري السدوي والتحول السدوي الظهاري في سرطان الثدي: تحديث (مراجعة)

Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update (Review)

- التحول الظهاري السدوي في تطور السرطان وأهميته السريرية

Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance

- التحول الظهاري السدوي وسرطان الثدي: دوره – آلياته الجزيئية – أثره السريري

Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact

- واسمات التحول الظهاري السدوي في سرطان الثدي والاستجابة الباثولوجية للعلاج الكيميائي

Epithelial–Mesenchymal Transition Markers in Breast Cancer and Pathological

Response after Neoadjuvant Chemotherapy

- برامج التحول الظهاري السدوي والأنماط الظهاري للخلايا الجذعية السرطانية: وسطاء مقاومة علاج سرطان

الثدي

Epithelial–Mesenchymal Transition Programs and Cancer Stem Cell Phenotypes:

Mediators of Breast Cancer Therapy Resistance

خلاصة الدراسات المرجعية:

العديد من الدراسات أظهرت أن التحول الظهاري السدوي EMT يلعب دوراً أساسياً في تطور السرطان والنقائل الورمية والمقاومة الدوائية. وقد تم دراسة العديد من العوامل التي تعتبر من واسمات الـ EMT، منها ما هو عبارة عن عوامل نمو أو عوامل انتساخ أو مستقبلات وواسمات خلوية. حيث أظهرت الدراسات السابقة ارتباطاً بين الـ EMT وازدياد تعبيرية كل من Vimentin و N-cadherin و NF- κ B و TGF- β ، مقابل انخفاض تعبيرية الـ E-cadherin وتبدل في نمط تعبيرية الـ β -catenin.

لكن لا يزال تحديد الآليات الجزيئية التي تكمن وراء عملية التحول الظهاري السدوي ضمن سرطانات الثدي غير مفهوم بشكل دقيق ولا تزال الأدلة السريرية التي تدعم دور EMT في تطور السرطان ضعيفة نسبياً ، لذا تبقى هناك حاجة ملحة لإجراء مزيد من الدراسات حول الارتباط بين واسمات الـ EMT وسرطان الثدي مما سوف يساهم في تحديد أكثر الواسمات فائدة في التنبؤ بحدوث النقائل الورمية الباكرة ، وفي تحديد العناصر التي يمكن استهدافها علاجياً مما سيساعد في تطوير العلاجات الهدافية لسرطان الثدي.

أهمية البحث (المشكلة البحثية):

سرطان الثدي من أكثر السرطانات انتشاراً ضمن العالم، وعلى الرغم من التقدم الحاصل في تقنيات الكشف المبكر تبقى هناك نسبة عالية من الوفيات المحدثة بسرطان الثدي معظمها بسبب النكس أو النقائل الورمية.

حديثاً يتجه الباحثون لمقاربة أعمق للأورام بشكل عام بما فيها أورام الثدي، تعتمد على الخصائص الجزيئية للورم وعلى مفهوم البيئة المكروية للورم Tumor Microenvironment مما يوسع إدراكنا لطريقة تطور هذه الأورام ويفتح آفاقاً تشخيصية وعلاجية مستقبلية واسعة.

أحد أهم عناصر البيئة المكروية للورم الذي يتم دراسته بشكل معمق في السنوات الأخيرة هو مفهوم التحول الظهاري السدوي EMT والذي يلعب دوراً كبيراً في عدائية الورم وحدوث النقائل والنكس. لذا سنقوم في هذا البحث بدراسة آليات حدوث ال EMT والواسمات المستخدمة في تقييمه (من خلال التلوينات الكيميائية المناعية)، وعلاقته مع المرحلة السريرية للورم وتطور الورم وانعكاس ال EMT على العلاجات الهدافية النوعية.

وبما أنه لا وجود لبحث سابق مماثل في سوريا، فسيكون هذا البحث الأول من نوعه وسيقدم نتائج جديدة ومثمرة في مجال سرطان الثدي.

الهدف من البحث:

- تقييم تعبيرية واسمات التحول الظهاري السدوي EMT في سرطان الثدي الغازي والموضع.
- الربط بين تعبيرية واسمات التحول الظهاري السدوي EMT وبين الخصائص السريرية والمرضية (قياس الورم - الدرجة النسيجية للورم - حالة العقد اللمفية - وجود أو غياب النقائل الورمية - حالة المستقبلات الهرمونية - المقاومة الدوائية - البقاء).

مبررات البحث:

- النسبة العالية للإصابة بسرطان الثدي.
- النسبة العالية للوفيات المسببة بسرطان الثدي.
- نسبة كبيرة من سرطانات الثدي في سوريا تشخص في مراحل سريرية متقدمة.
- ازدياد نسبة سرطانات الثدي المقاومة للعلاجات التقليدية.
- التطور المتزايد في العلاجات الحديثة للأورام، واعتماده بشكل أساسي على العوامل الجينية والبيئة المكروية للورم.

محدوديات البحث:

- المحدوديات التقنية والتمويلية من حيث عدم القدرة على إجراء الفحوصات البيولوجية الجزيئية المرجوة كافة.
- المحدوديات التي تتعلق بصعوبة متابعة حالة المريضات بعد التشخيص، حيث تمكنا من التواصل مع ٩٩ مريضة فقط من أصل ١١١ لتجري النكس والبقيا.
- استخدام تقنية الـ TMA في دراسة تعبيرية الواسمات قد يكون له تأثير على النتائج التي تتعلق بتعبيرية الـ Ki-67 والتي أبدت عدم توافق مع الدراسات العالمية المشابهة.
- على اعتبار أن نسبة عالية من سرطانات الثدي في سورية يتم تشخيصها في مراحل متقدمة، فمن المتوقع أن يؤثر هذا على نتائج البحث مقارنة بالأبحاث المشابهة المجراة في دول أخرى.
- ولنفس السبب المذكور سابقاً لم نتمكن من جمع حالات كافية في المراحل ما قبل الغازية (DCIS, LCIS) وبالتالي لم نتمكن من دراسة الفروقات في تعبيرية الواسمات بين السرطانات الموضوعة والغازية.

منهج البحث وأدواته:

- تم تضمين البحث عينات مأخوذة من أرشيف قسم التشريح المرضي في مستشفى الأسد الجامعي في دمشق
- مشخصة بسرطان الثدي الغازي أو الموضع في الفترة ما بين عام ٢٠١٧ وعام ٢٠٢٠
- تم تقييم بعض واسمات التحول الظهاري السدوي EMT عن طريق التلوينات المناعية الكيميائية (IHC).

١. التحول الظهاري السدوي (EMT) Epithelial mesenchymal transition

١.١. مصونية الخلايا الظهارية Epithelial Integrity

يعتبر تمايز الخلايا الظهارية وتكوينها لصفائح مستقطبة من السمات المميزة للكائنات الحية متعددة الخلايا. تعمل الخلايا الظهارية كحواجز مع البيئة الخارجية، مما يؤمن بيئة داخلية فيزيولوجية مصانة للقيام بوظائف الأنسجة والأعضاء والتمثيل الغذائي. أثناء التطور تتمايز الخلايا الظهارية بما ينسجم مع تقسيم الأعضاء وأنماطها وتنظيمها ووظائفها. كما أنها تساهم في تمكين الاستقطاب الخلوي أو إفراز البروتينات وامتصاص العناصر الغذائية وتبادل المستقلبات، حيث تنظم نفسها في أسطح الأنابيب والتجاويف كما هو الحال في الجهاز الهضمي. تتطلب هذه الوظائف سلامة الخلايا الظهارية، حيث تتفاعل الخلايا بشكل وثيق مع بعضها البعض باستخدام الموصلات المتخصصة وبالتالي تمنع مرور السوائل أو البروتينات بين الخلايا، وتؤدي بذلك وظيفتها كحاجز محكم تتوزع العناصر حوله عن طريق النقل عبر الخلايا. إن الموصلات الخلوية المتجانسة والمعقدات الغشائية متعددة البروتينات التي تتواصل من خلال التفاعل مع الهيكل الخلوي البنيوي وتساعد في تحديد القطبية القمية القاعدية للظهارة ضرورية للحفاظ على سلامة ومصونية النسيج الظهاري. وفي هذه النسيج تتلقى الخلايا المعلومات ليس فقط من الخلايا المجاورة ولكن أيضًا من المطرق خارج الخلوي (ECM) [6].

١.٢. لدونة النسيج الظهاري في الإصلاح والترميم Epithelial Plasticity in Repair and

:Remodeling

رغم أن سلامة الظهارة تتطلب تحكم شديد بالمصونية للحفاظ على النمط الظاهري الظهاري، فإن لدونة التمايز (القدرة التكيفية على التمايز) ضرورية أيضًا لانقسام الخلايا وإعادة بناء النسيج الظهاري باستمرار وإصلاح الجروح بعد الإصابة وتكوين بنى جديدة في بعض الأحيان. وبالتالي يمكن للخلايا الظهارية أن تقوم بتفكيك الروابط بين الخلوية بشكل مؤقت وتعيد تنظيم هيكلها الخلوي وتغير شكلها حسبما هو مطلوب للنمذجة وإعادة التشكيل الظهاري. في أثناء إصلاح الظهارة

بعد التعرض للأذية تقوم الخلايا الظهارية بمد استطالات وتغير تعبير الإنتغرين وتنظيم الأكتين وتكتسب خصائص حركية بهدف الإصلاح واستعادة مصونية الظهارة. في هذه الأنظمة وغيرها من أنظمة التئام الجروح تفقد الخلايا الظهارية خصائصها الظهارية بشكل ديناميكي وتظهر حركة متزايدة ثم تعيد تأسيس الروابط بين الخلوية وبنية الهيكل الخلوي الظهاري والقطبية القمية القاعدية، وفقًا لذلك يمثل فقدان المؤقت للخصائص الظهارية جانبًا أساسيًا من سلوك الخلايا الظهارية وشرطًا أساسيًا لإصلاح الظهارة وسلامتها واستتبابها.

في حين تسمح للدونة الظهارية بإعادة التشكيل وإجراء التغييرات في التنظيم، يمكن للخلايا الظهارية أيضًا أن تتفصل عن موقعها للهجرة جماعيًا كمجموعة استجابةً لإشارات جذب، وبالتالي تؤدي إلى ظهور مجموعات خلايا جديدة ذات خصائص مميزة. في الهجرة الجماعية للخلايا نحو موقع جديد غالبًا ما تحافظ الخلايا الخلفية على الخصائص الظهارية مع الموصلات بين الخلوية (connected cell-cell junctions)، في حين تخفف الخلايا الموجودة عند الحواف الأمامية صلاتها بين الخلوية وتعيد توجيه القطبية الظهارية نحو قطبية أمامية خلفية. يتميز هذا الانتقال نحو الحالة السدوية (mesenchymal) ليس فقط بفقدان الموصلات الظهارية وكبت التعبير الجيني الظهاري ولكن أيضًا التعبير عن البروتينات الموجودة في الخلايا السدوية وشكل الخلية المتطاوّل مع إعادة تنظيم الأكتين إلى ألياف إجهاد واكتساب القدرة على التحرك والغزو[6].

١.٣. التحول الظهاري-السدوي EMT

١.٣.١. تعريف التحول الظهاري-السدوي وخطواته EMT definition and steps:

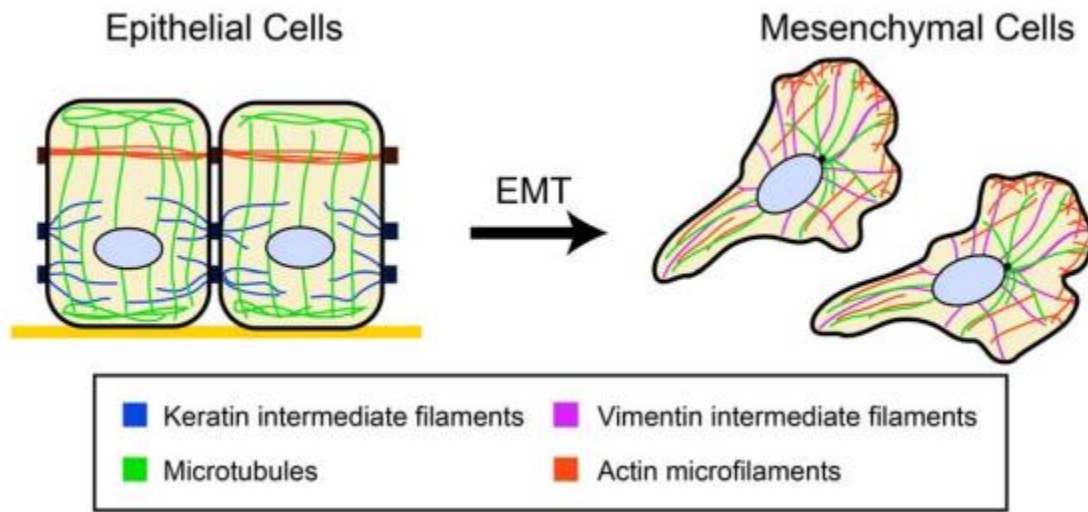
يتم تعريف التحول الظهاري-السدوي (EMT) بفقدان الخصائص الظهارية واكتساب النمط الظاهري السدوي[4]. في ثمانينيات القرن العشرين، قام Greenburg و Hey لأول مرة بتحليل التغيرات في النمط الظاهري للخلايا المرتبطة بالتحول الظهاري-السدوي في الظهارات البالغة والجينية[5].

تحدث عملية التحول الظهاري-السدوي ضمن ثلاثة أنماط مميزة مع عواقب وظيفية مختلفة:

- تتضمن عملية التحول الظهاري-السدوي من النمط الأول انتقال الخلايا الظهارية البدائية إلى الخلايا السدوية المتحركة أثناء التخلق الجنيني.
- في حين يشاهد التحول الظهاري-السدوي من النمط الثاني في سياق الحديثة الالتهابية.
- ويعرف التحول الظهاري-السدوي من النمط الثالث باعتباره التبدل الذي يحدث في الخلايا السرطانية الظهارية[4].

تتكون عملية EMT من خطوات متعددة: أولاً، يتفكك التصاق الخلية بالخلية مع فقدان الواسمات الظهارية مثل E-cadherin واكتساب الواسمات السدوية مثل Vimentin . بعد ذلك يحدث فقدان للاستقطاب القاعدي القمي واكتساب الاستقطاب الأمامي الخلفي. ثم يخضع الهيكل الخلوي لإعادة التشكيل مع حدوث تغييرات في الأكتين القشري وألياف إجهاد الأكتين. أخيراً يتغير التصاق الخلية بالمطرقة خارج الخلوي مع تنشيط الإنزيمات الحالة للبروتينات مثل ميتالوبروتيناز matrix metalloprotease [5]. عند تحريض استجابة الدونة الظهارية تقوم الخلايا بتنشيط برنامج الانتساخ الذي يؤدي إلى كبت الجينات المعبرة عن البروتينات التي تميز النمط الظاهري الظهاري، وعندما تنتقل الخلايا إلى EMT تقوم أيضاً بتنشيط الجينات التي تميز الخلايا السدوية. تقود هذه التغييرات في الانتساخ والتي يُنظر إليها أحياناً على أنها إعادة برمجة للجينات، ثلاث عائلات من عوامل الانتساخ وهي Snail و ZEB و Twist. وينظر إلى هذه العوامل على أنها محركات رئيسية لعملية EMT وتتعاون لضمان التنظيم السليبي لوصلات الالتصاق واستقطاب الخلايا القمية والقاعدية. تعمل إعادة برمجة الجينات أثناء EMT على تغيير ذخيرة بروتينات التصاق الخلايا؛ حيث يتم كبح التعبير عن بروتين الموصل الملتصقة E-cadherin وبالمقابل يتم التعبير عن بروتينات الالتصاق المتجانسة N-cadherin [6]. إحدى السمات المميزة لـ EMT هي التبدل بين الكادهيرين (cadherin switch) أي التحول من تعبير E-cadherin إلى تعبير N-cadherin وهذا لا يعني بالضرورة أن الـ E-cadherin سيتم استبداله بشكل تام بالكادهيرين N بل إن تعبير الكادهيرين N يزداد مع خضوع الخلايا لـ EMT [7].

تُظهر الخلايا الخاضعة لـ EMT تغييرات جذرية في الشكل حيث تأخذ الشكل المتطاوّل. الكيراتين هي الخيوط الوسيطة الرئيسية للبروتينات البنيوية في الخلايا الظهارية، وعند تحريض الـ EMT يتم تقليل تعبير الكيراتين وتبدأ الخلايا الانتقالية في التعبير عن خيوط الـ Vimentin الوسيطة. ترتبط خيوط الكيراتين بالجسيمات الرابطة (desmosomes) وتعزز الالتصاق القوي بين الخلايا وهو أمر ضروري للحفاظ على بنية الأنسجة الظهارية وبالتالي توفير عائق بوجه الـ EMT [8]. عند تفكك الموصلات الظهارية أثناء الـ EMT يتم إعادة تشكيل الهيكل الخلوي للأكتين من بنية قشرية إلى ألياف إجهاد طويلة وذلك بتوسط Rho GTPases وعوامل تبادل نوكلئوتيدات الجوانين المرتبطة



الشكل رقم (١): يوضح الشكل التبدلات التي تطرأ على مكونات الهيكل الخلوي أثناء الـ EMT

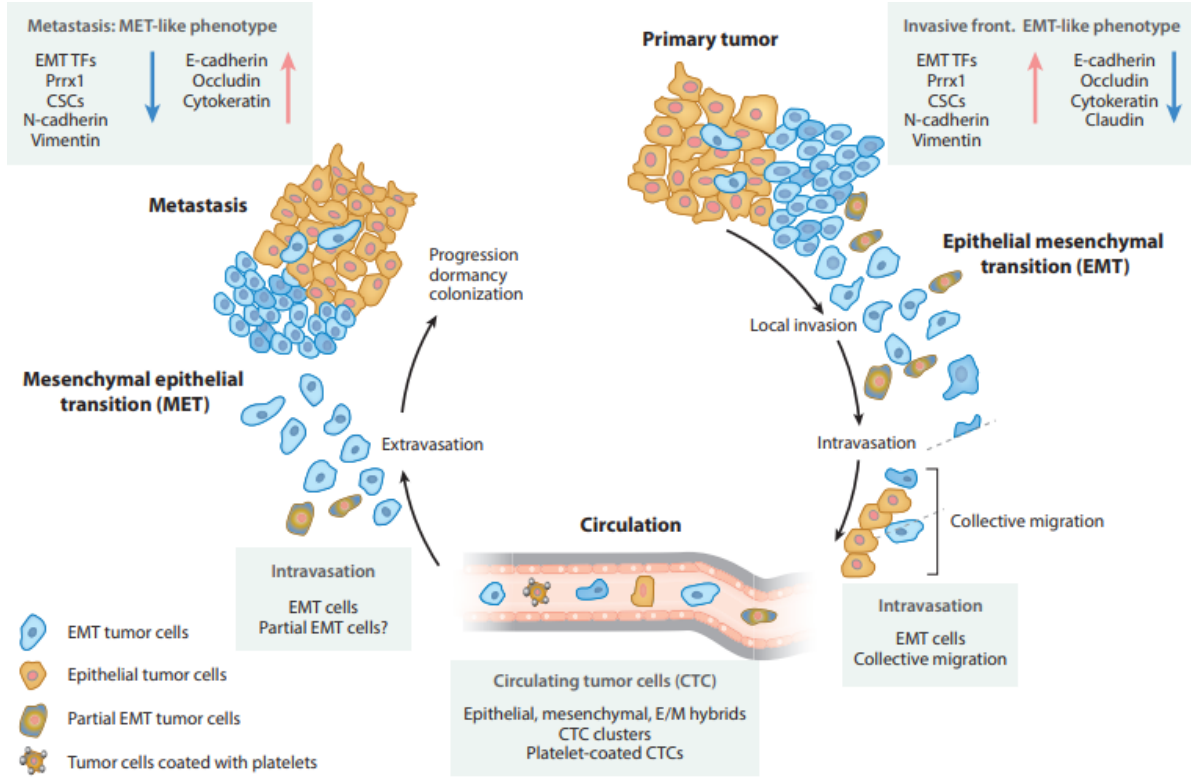
بها وبروتينات تنشيط GTPase وعوامل تفكك نوكلئوتيدات الجوانين. وهذه التغيرات في أنشطة Rho GTPase أثناء EMT تؤدي بالنتيجة إلى إعادة توجيه تنظيم الهيكل الخلوي وديناميكياته والالتصاق بين الخلايا، والتفاعلات التي تتوسطها الأنابيب الدقيقة بين الخلايا والمطرّق خارج الخلوي والغشاء القاعدي [6]. في الخلايا الظهارية تمتد الأنابيب الدقيقة (microtubules) بقطبية منتظمة عمودياً من الأسطح الخلوية القمية إلى القاعدية وهي مطلوبة للحفاظ على قطبية الظهارة. بالإضافة إلى ذلك تبدي الخلايا الظهارية العمودية مجموعات أنابيب دقيقة أفقية عند قمة الخلية وقاعدتها. على النقيض من ذلك تظهر الخلايا السدوية اصطفافاً شعاعياً للأنابيب الدقيقة مع أنابيب دقيقة تمتد نحو

اتجاه هجرة الخلايا [8] (الشكل رقم ١). الاسترخاء في الهيكل الخلوي المرتبط ب EMT يتيح تكوين نتوءات غشائية مثل تموج الغشاء ruffles (membrane) والأقدام الصفاحية (lamellipodia) والأرجل الكاذبة الخيطية (filopodia). تسمح الـ Lamellipodia بالالتصاق من خلال الإنتغرينات والكادهيرينات وتعزز الحركة المتزايدة، في حين قد يكون لدى filopodia وظيفة حسية أكثر مع أدوار رئيسية في توجيه الهجرة [6].

غالبًا ما يكون EMT مصحوبًا بزيادة في التعبير عن البروتياز لتسهيل الغزو عبر المطرق خارج الخلوي أو الغشاء القاعدي، وخاصة MMP-2 و MMP-9 و MMP-1. تتركز هذه البروتيازات على سطح النتوءات الغازية (invadopodia) وتقوم بحل المطرق، كما أنها غنية بإنتغرينات b1 و avb3 التي تتفاعل مع بروتينات ECM وتنظم نشاط Rho GTPase وإعادة تشكيل الأكتين [6].

١.٣.٢. التحول الظهاري السدوي في السرطان والنقائل EMT in cancer and metastasis:

يعد التحول الظهاري السدوي ظاهرة طبيعية في التطور وإصلاح الجروح ولكنه يمثل أيضًا أحد الواسمات المميزة للسرطان [9]. تتكون عملية النقائل في السرطان الظهاري من خطوات متعددة حيث أن الخلايا تنفصل عن الورم البدئي وتغزو السدى المحيط بالورم ثم تدخل بعد ذلك في الدورة الدموية وتصل إلى مواقع نقائل جديدة [5]، وقد ثبت أن التحول الظهاري السدوي يلعب دورًا محوريًا في هذه الخطوات لتعزيز النقائل. ومن المثير للاهتمام أن التحول الظهاري السدوي نادرًا ما يحدث بشكل متجانس عبر الورم بأكمله [10] [9]. على سبيل المثال يُلاحظ التحول الظهاري السدوي في منطقة محدودة فقط من الورم مثل الحافة الأمامية. ومع ذلك تشارك الخلايا السرطانية المتميزة مورفولوجيًا في عملية النقائل عبر ظاهرة الهجرة الجماعية والتي تنتشر فيها الخلايا وتغزو بشكل مجموعات وليس بشكل إفرادي [10]. تعد صلابة



الشكل رقم (٢): الدونة الظهارية السدوية أثناء حدوث النقائل.

في الورم البدني تخضع الخلايا للـ EMT مما يعزز فك الالتصاق والحركية والغزو ويمكنها من دخول الأوعية الدموية (intravasation)، بعد ذلك تتسرب خارج الأوعية الدموية (extravasation) ضمن المواقع النقيلية حيث تتعرض للـ MET كي تتمكن من إعادة الارتباط وإنشاء مستعمرات ورمية نقيلية. CSC: الخلايا الجذعية السرطانية. CTC: الخلايا الورمية الجوالّة في الدم.

المطرق مهمة في التحكم في قوة الالتصاقات الخلوية في الهجرة الجماعية. ومن المثير للاهتمام أن الواسم الورمي LOXL2 يزيد من الهجرة الجماعية للخلايا حيث يتفاعل LOXL2 مع SNAIL1 في الحافة الأمامية الغازية للخلايا المهاجرة. بالإضافة إلى ذلك يحفز LOXL2 الارتباط المتصالب لألياف الكولاجين ويساهم في تصلب المطرق [7]. تقوم الخلايا السرطانية المهاجرة ذات الخصائص الظهارية باتباع الخلايا الليفية/الخلايا الليفية المرتبطة بالسرطان أو الخلايا الغازية المتحركة المستمدة من EMT ، والتي تتواجد في المقدمة الغازية للورم. وقد تم الإبلاغ عن أن خلايا الـ EMT في الجبهة الغازية تحلل الـ ECM وتقود الخلايا التي لم تخضع للـ EMT والتي يمكن أن تلتصق بجدار الوعاء مما يؤدي إلى التسرب خارج الأوعية [10]. تمكنت الطرق الحديثة لرصد الخلايا الورمية الجائلة في الدم (CTC) من

رصد خلايا ورمية ظهارية وسدوية جائلة في الدورة الدموية. أظهر المزيد من التحليل أن خلايا CTC تظهر تبايناً ملحوظاً، حيث توجد في حالات مختلفة بما في ذلك الظهارية والظهارية والسدوية والسدوية وتعتبر مجموعات منها عن عوامل انتساح الـ EMT [11]. بالإضافة إلى ذلك فإن التحول الظهاري السدوي الذي يحدث في الخلايا السرطانية الجائلة يتسبب في اكتساب هذه الخلايا مقاومة لنقص الأكسجين والإجهاد الناجم عن ضغط الدم [10]. بمجرد تسرب الخلايا السرطانية إلى أعضاء بعيدة من المفترض أن تتخلص من النمط الظاهري السدوي عبر MET (التحول السدوي الظهاري) أثناء عملية تكوين النقائل [4] (الشكل رقم ٢).

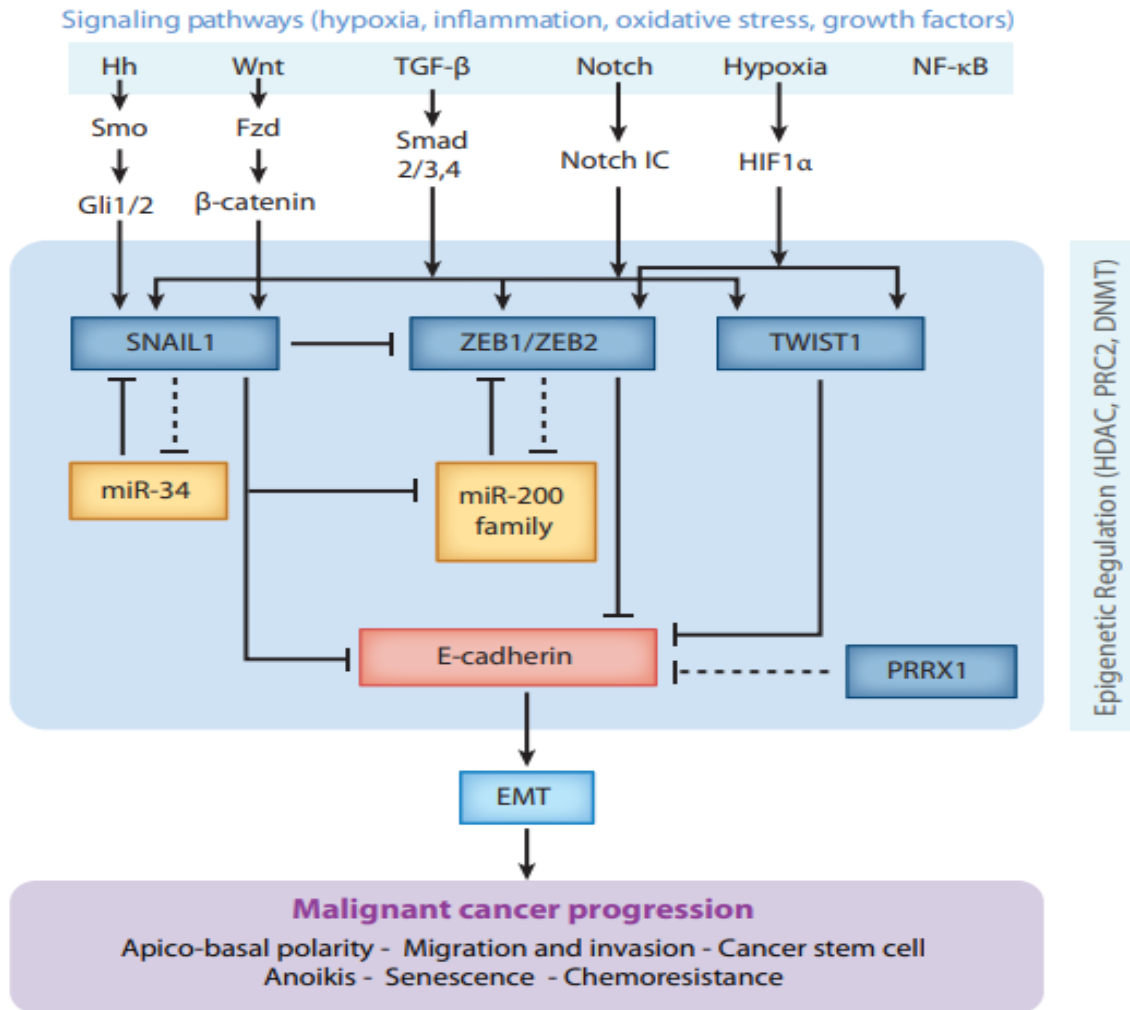
١.٤. التحول السدوي الظهاري (MET) Mesenchymal Epithelial Transition:

على عكس التحول الظهاري السدوي الذي يحدث فيزيولوجياً أثناء التطور الجنيني، تم تعريف التحول الظهاري السدوي في الأورام بأنه تحول سدوي عابر نظراً لأن واسمات وأنماط التحول الظهاري السدوي غالباً ما لا تكون واضحة في النقائل البعيدة [4]. تولد عملية التحول الظهاري السدوي خلايا سدوية وخلايا شبيهة بالخلايا الجذعية ذات قدرات غازية ونقيلية، ويبدو أن ما يهم لفعالية الانتشار النقيلي ونمو الورم الثانوي هو قدرة الخلايا الجذعية النقيلية على توليد خلايا سرطانية ظهارية جديدة بعد الخضوع للتحول السدوي الظهاري MET [12]. يوفر EMT-MET خلايا سرطانية ظهارية جديدة والتي بعد الخضوع للتحول الظهاري السدوي اكتسبت قدرات محسنة تجعلها قادرة على الانتشار بشكل جيد إلى مواقع نقيلية جديدة وتعزيز انتشار المرض [13].

تم تقديم الدليل على فكرة أن عكس EMT ضروري لكي يتم الاستعمار النقيلي بكفاءة وذلك من خلال الدراسات التي توضح أن تحريض EMT كان أمراً بالغ الأهمية للخطوات الأولية للنقائل، ولكن ليس للزرع النقيلي والنمو في الموقع البعيد حيث يكون كبح عوامل الانتساح المحرصة للـ EMT ضرورياً. على سبيل المثال في نموذج الفأر لسرطان الخلايا الحرشفية SCC، عزز التعبير عن Twist1 الغزو والانتشار ومع ذلك في الموقع النقيلي كان تعطيل Twist المؤدي إلى الـ MET ضرورياً للنقائل [11]. في سرطان الثدي الأولي يتم تحريض الـ EMT من خلال الـ TGF- β

ويمكن ل $TGF-\beta$ بعد ذلك تحريض ID1 في الخلايا السدوية المنتجة بواسطة عملية EMT ويرتبط ID1 مع Twist1 ويعطله مما يتسبب في MET ويعزز استعمار الخلايا الظهارية في الموقع النقيلي [14]. كما تم ربط البيئات المكروية الموجودة في الأعضاء النقيلية أيضًا بال MET . وعلى الرغم من هذا فإن الدراسات التي تستخدم أنظمة تتبع السلالات التي تبلغ في نفس الوقت عن ال EMT وال MET لديها القدرة على توفير نظرة ميكانيكية مباشرة واستبعاد احتمال أن الخلايا الإيجابية لل E-cadherin في الأورام الأولية قد تولد نقائل إما بمفردها أو ربما بالتعاون مع خلايا ال EMT [11].

٢. مسارات نقل الإشارات في التحول الظهاري السدوي EMT signaling pathways:



الشكل رقم (٣): أشيع مسارات نقل الإشارة ضمن في التحول الظهاري السدوي EMT

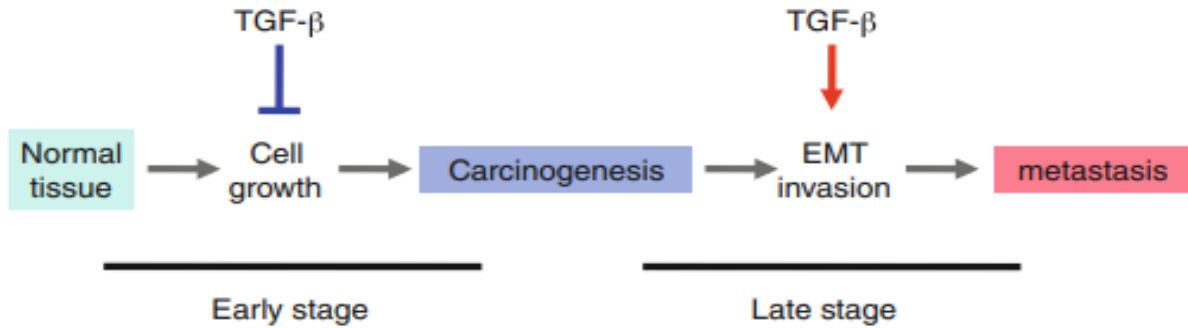
يتم تحفيز ال EMT بواسطة مجموعة متنوعة من المحفزات. مجموعة الإشارات التوجيهية خارج الخلية التي تبدأ وتحافظ على عملية EMT كبيرة وتشمل العوامل البيئية مثل التدخين والأشعة فوق البنفسجية والظروف المرضية الخاصة بالأنسجة مثل نقص الأكسجين والسيتوكينات المرتبطة بها بما في ذلك عامل النمو المحول بيتا ($TGF-\beta$) وعامل نمو الخلايا الليفية (FGF) و Notch وعامل النمو المشابه للأنسولين و Wnt، ومحفز ال EMT المشابه للإنترلوكين

وغيرها (الشكل رقم ٣). يمكن تفعيل عملية EMT بواسطة مجموعة محددة من عوامل الانتساخ استجابة لمسارات الإشارة المذكورة أعلاه (على سبيل المثال $TGF-\beta$ و FGF و Notch وما إلى ذلك) أثناء تطور أو تقدم السرطان [12]. هناك تداخل كبير بين إشارات EMT وعوامل الانتساخ كما تتضمن هذه العملية المعقدة حلقات تغذية راجع إيجابي متعددة تساهم في إعادة برمجة الخلايا الظهارية إلى الحالة السدوية [4].

٢.١. مسارات إشارات عامل النمو المحول-بيتا $TGF-\beta$ Signaling Pathway:

عامل النمو المحول بيتا ($TGF-\beta$) هو سيتوكين متعدد الوظائف ينظم نمو الخلايا وتميزها، وموت الخلايا المبرمج وحركة الخلايا وإنتاج المطرق خارج الخلية وتكوين الأوعية الدموية والاستجابات المناعية الخلوية [15]. تم ربط ($TGF-\beta$) لأول مرة بتطور الظهارة الثديية بواسطة Daniel و Silberstein في عام ١٩٨٧ وتم ربطه مع سرطان الثدي ومقاومة الهرمونات بواسطة Lippman وزملائه في عام ١٩٨٨ [16]. $TGF-\beta$ هو بروتين ثنائي الترابط مرتبط بثنائي كبريتيد يبلغ وزنه الجزيئي ٢٥ كيلو دالتون وله ٣ أشكال: $TGF-\beta 1$ و $TGF-\beta 2$ و $TGF-\beta 3$. يتم إنتاج $TGF-\beta$ الوظيفي من طليعة غير نشطة ($pro-TGF-\beta$) ويحتوي على بيتيد ارتباط كموني -latency associated peptide (LAP) في الطرف الأميني. يبدأ تحويل الشكل غير النشط عندما تخضع طليعة $TGF-\beta$ لعملية الترابط الثنائي ويقوم الفورين -وهو بروتين تحويلي شبيه بالسبتيليزين- بشطر طليعة $TGF-\beta$ إلى بيتيدات ناضجة في الطرف C و LAP في الطرف N (وهو المعقد الكامن الصغير). يتم نقل هذا المعقد إلى المطرق خارج الخلية (ECM) حيث يرتبط ببروتين ربط $TGF-\beta$ الكامن ويشكل معقدات كامنة كبيرة. تتفاعل المعقدات الكامنة الكبيرة مع البروتيازات في ECM وتحفز تنشيط $TGF-\beta$ ، بعدها يمكن لـ $TGF-\beta$ المنشط المشاركة في إشارات الخلية [17].

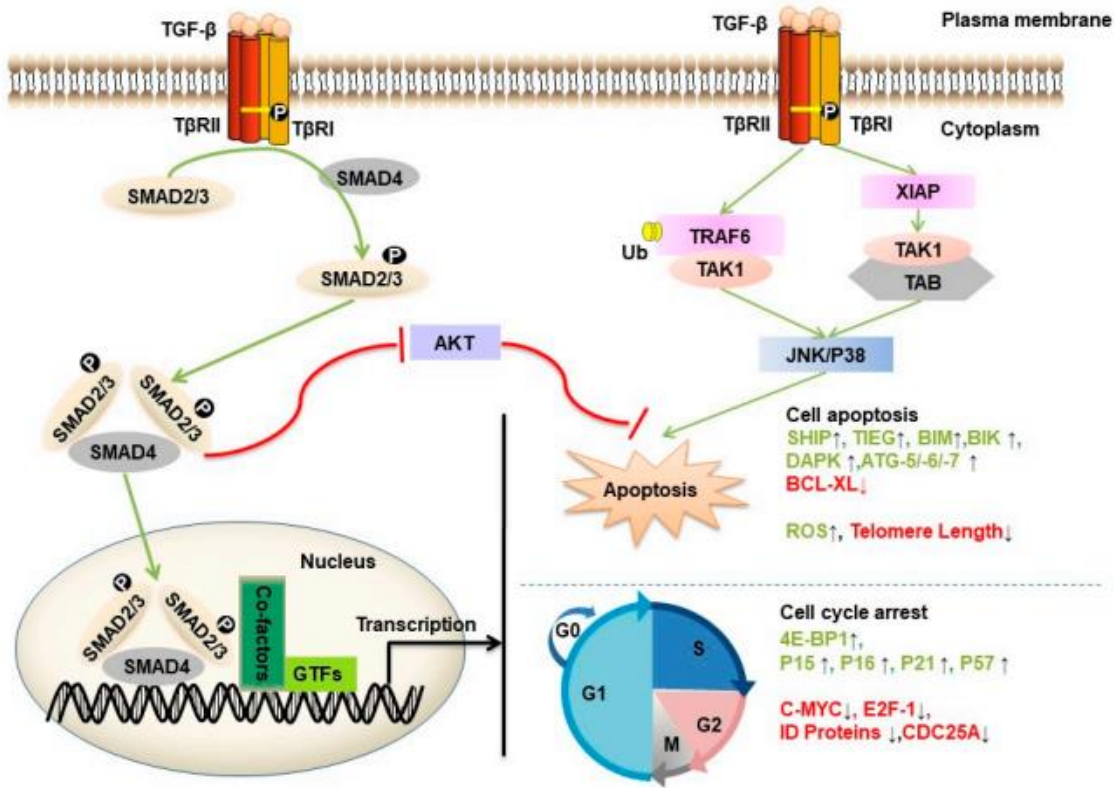
TGF- β هو العامل الأكثر أهمية في EMT وانتشار الخلايا السرطانية. يعزز مسار TGF- β الغزو والنقائل عن طريق تحفيز التعبير عن عوامل الانتساخ snail و slug و twist و ZEB1 و TCF3. يتمتع TGF- β بتأثير تناقضي في السرطانات (الشكل رقم ٤)، فمن ناحية يثبط تطور السرطان في المراحل المبكرة عن طريق منع الانتشار وتحفيز موت الخلايا، ومن ناحية أخرى يساهم في التقدم الخبيث لاحقاً عن طريق تعزيز الغزو والنقائل [18].



الشكل رقم (٤): الدور التناقضي لـ TGF- β في السرطان

في الظروف الفيزيولوجية الطبيعية يعد TGF- β 1 مثبطاً قوياً لنمو العديد من أنواع الخلايا بما في ذلك الخلايا السرطانية. الاستجابات الخلوية للـ TGF- β 1 تستهدف في المقام الأول مرحلة G1 من خلال تنظيم التعبير عن العديد من الجينات التي تعزز توقف دورة الخلية (الشكل رقم ٥). في الخلايا الظهارية الطبيعية يحفز TGF- β التعبير عن p15Ink4b والذي يثبط معقدات Cyclin D-Cdk4/6 ، ويحفز أيضاً p21 الذي يثبط معقدات Cyclin E/A- Cdk2 واستجابةً للـ TGF- β تستهدف معقدات الانتساخ (Smad-FoxO) المفعلة منطقة من مُحفِّز p21 وتتوسط تحريض p21. من ناحية أخرى فإن تحريض TGF- β لـ p15Ink4b بواسطة معقدات Smad-FoxO المفعلة يتطلب أيضاً C/EBPb من أجل الاستجابة للـ TGF- β [17].

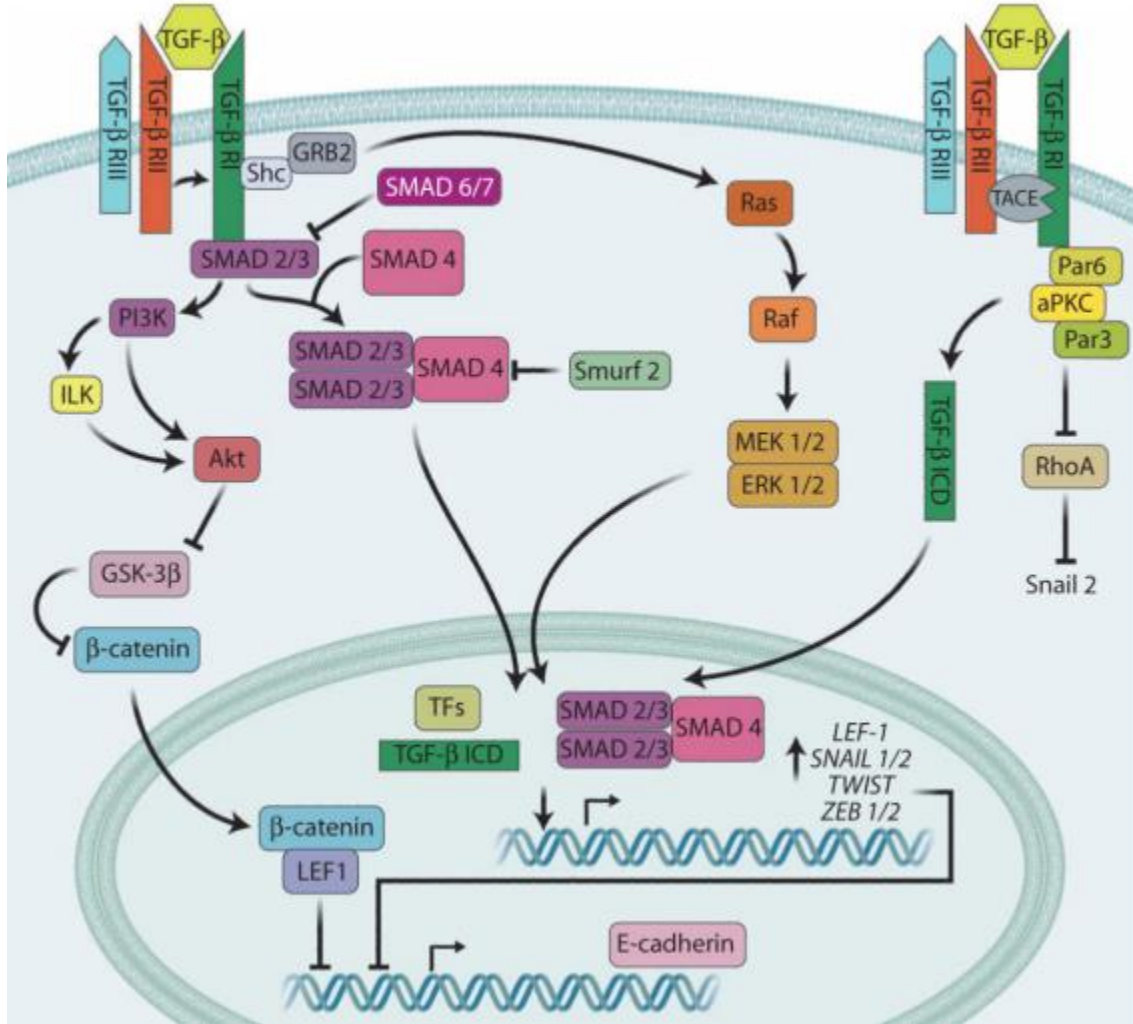
يتضمن التأثير الخلوي لـ $TGF-\beta 1$ أيضًا كبت انتساخ عوامل الانتساخ المعززة للنمو (c-Myc) ومثبطات التمايز (ID 1,2,3). في المراحل المبكرة من تطور السرطان تستجيب الخلايا السرطانية للتأثير المضاد للانقسام لـ $TGF-\beta 1$ ، كما ذكر أعلاه يتحكم $TGF-\beta$ في تكاثر الخلايا بشكل أساسي عن طريق تثبيط تقدم دورة الخلية من خلال توقف G1 عن طريق تحفيز أو تنشيط مثبطات الـ CDK. وعندما تدخل الخلايا السرطانية مرحلة النمو غير المضبوط تفقد أغلب هذه الخلايا حساسيتها لهذا التأثير المثبط. من المدهش أن هذا يحدث على الرغم من وجود مستقبلات $TGF-\beta 1$ على أغشية خلايا الورم. علاوة على ذلك تبدأ هذه الخلايا السرطانية أيضًا في إفراز $TGF-\beta$



الشكل رقم (٥): $TGF-\beta$ كمثبط للنمو ومحرز للموت الخلوي المبرمج.

يمكن لمسار $TGF-\beta$ /SMAD أن يوقف انقسام الخلايا في طور G1 من خلال تعديل التعبير عن جينات محددة مثل حث كل من 4EBP1 و p15INK4b و p16INK4A و p21WAF1 و p57KIP2 وكبح كل من بروتينات Id و E2F و c-MYC و CDC25a. يمكن لمسار $TGF-\beta$ /SMAD أن يحفز الموت الخلوي المبرمج من خلال تحفيز التعبير عن جينات محددة مثل BCL-XL و BIM و BIK و SHIP و TIEG

$\beta 1$ [17]. بالإضافة إلى إيقاف دورة الخلية يمكن لـ $\text{TGF-}\beta$ أن يحفز موت الخلايا في المرحلة المبكرة من تكوّن الورم. ومع ذلك تظل الآليات الدقيقة التي يحفز بها $\text{TGF-}\beta$ هذا التأثير في أنواع الخلايا المختلفة غير واضحة.



الشكل رقم (٦): مسار إشارات الـ $\text{TGF-}\beta$ في الـ EMT.

يرتبط $\text{TGF-}\beta$ مع مستقبلاته من النمط ($\text{TGF-}\beta$ RII و $\text{TGF-}\beta$ RIII) مما يؤدي إلى فسفرة $\text{TGF-}\beta$ RI وتنشيط مجموعة من مسارات الإشارة بما في ذلك المسارات المتواسطة بكل من SMAD2/3 و Ras و PI3K . على سطح الخلية يقوم TACE بشطر المجال داخل الخلوي للـ $\text{TGF-}\beta$ RI والذي يمكن أن يعمل بعد ذلك كمنظم انتساخي للتواسط في الـ EMT. بالإضافة إلى ذلك يقوم معقد (Par3-Par6-aPKC) أيضاً بالارتباط بمستقبلات $\text{TGF-}\beta$ في غشاء الخلية ويشارك في إعادة تشكيل الهيكل الخلوي لتعزيز النمط الظاهري السدي. يمكن للمسارات المستقلة عن SMAD مثل (PI3K و ILK) أن تنشط Akt والذي بدوره يمكن أن يكبح $\text{GSK-3}\beta$ وهو كيناز يثبط الانتقال النووي لكل من Snail و $\beta\text{-catenin}$.

يتم تثبيط إشارات الـ SMAD بواسطة SMAD6/7 والذي يمنع ارتباط وفسفرة SMAD2/3 لـ $\text{TGF-}\beta$ Rs، وبواسطة Smurf2 والذي من المعروف أنه يقوض المقعد المنشط SMAD2/3/4

لقد ثبت أن التعبير عن بعض منظمات موت الخلايا يتم تنظيمه بواسطة سبيل $TGF-\beta/SMAD$. بالإضافة إلى ذلك يمكن ربط مسار إشارات $TGF-\beta$ بآلية موت الخلايا من خلال تحفيز أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) وجينات موت الخلايا المبرمج (SHIP and TIEG) وتعديل المنظمات فوق الجينية ($H3K79me3$ and $H2BK120me1$) وتقصير التيلومير من خلال تنظيم الانتساخ العكسي لتيلوميراز البشري (hTERT) في خط خلايا سرطان الثدي MCF-7 [19].

في المرحلة المتأخرة من تطور السرطان تبقى الخلايا السرطانية مستجيبة لـ $TGF-\beta$ ولكنها تصبح مقاومة لتأثيراته المثبطة لنمو الخلايا وعوضاً عن ذلك يغير $TGF-\beta1$ في هذا المراحل عمله إلى محرض للورم [19]. في كثير من الحالات يرجع هذا إلى تغيير إشارات $TGF-\beta$ الناجم عن الطفرات الجسدية في مكونات إشارات $TGF-\beta$ أو عن طريق منع الاستجابات الخلوية الخلوية لـ $TGF-\beta$ بشكل انتقائي. من هذه الطفرات ما يشاهد في سرطانات القولون المعزولة والوراثية التي تبدي عدم استقرار في الساتل المجهري (MSI) والتي غالباً ما تحدث فيها طفرة في تسلسل ترميز $TbR-II$ ، كذلك تحدث طفرات مماثلة في سرطانات الجهاز الهضمي والأورام الدبقية ذات ال MSI. كما تلاحظ أحياناً طفرات $TbR-I$ في سرطانات المبيض والبنكرياس والثدي بالإضافة إلى بعض أورام الخلايا اللمفاوية التائية [13].

يمكن لـ $TGF-\beta$ إرسال إشارات من خلال بروتينات نقل إشارة Smad (المسار التقليدي)، وكذلك من خلال العديد من المسارات المستقلة عن Smad (غير التقليدية) بما في ذلك ERK و MAP kinase و PI3K و JNK و p38 و PKB (الشكل رقم ٦). يلعب مسار Smad دوراً حاسماً في الخصائص المضادة للتكاثر لـ $TGF-\beta$ وقد ثبت أن التغيرات مثل الطفرات المغلطة في نظام Smad أو كبح عملية الفسفرة أو كبح Smad2/3 من تكوين معقد، تلعب دوراً في تطور الورم. تخضع إشارات $TGF-\beta$ لتقليم راجع سلبي من قبل اثنين من أفراد Smads المثبطة وهما Smad6 و Smad7، ويمكن لكل منهما التدخل في فسفرة Smad2/3 عن طريق التفاعل مع $TGF-\beta$ RI [15].

يعتمد مسار إشارات $TGF-\beta$ 1 على طبيعة النسيج، فهناك حاجة إلى وجود مستقبلات محددة مرتبطة بالغشاء من أجل تفعيل إشارات $TGF-\beta$ 1 في الخلايا. أشهر هذه المستقبلات هي $T\beta RI$ و $T\beta RII$ و $T\beta RIII$. $T\beta RI$ و $T\beta RII$ هما مستقبلات عابرة للغشاء والتي لها نشاط كيناز سيرين-ثريونين في الحيز داخل الخلوي [17]. تبدأ عملية الإشارة عندما يرتبط $TGF-\beta$ بالمفعّل بمستقبل عامل النمو المحول بيتا-2 ($T\beta RII$) ذو الألفة العالية. يتطلب هذا الارتباط مشاركة مستقبل عامل النمو المحول بيتا-3 ($T\beta RIII$) والمعروف أيضًا باسم β glycan والذي يسبب تغييرًا تكوينيًا في $T\beta RII$ يسهل ارتباط الربطة بالمستقبل. ثم يتم تجنيد $T\beta RI/ALK-5$ وهو كيناز سيرين/ثريونين لمعقد $TGF-\beta/T\beta RII$ ويبدأ عملية الإشارة عن طريق فسفرة $Smad2$ و $Smad3$. يتحد $Smad2$ و $Smad3$ المفسفران لتكوين معقد غير متجانس مع $Smad4$ ينتقل إلى نواة الخلية للتفاعل مع عوامل انتساخ مختلفة تؤدي في النهاية إلى الاستجابة الخلوية [20].

يمكن لـ $TGF-\beta$ أيضًا أن يحفز EMT بطريقة غير معتمدة على SMAD على سبيل المثال من خلال تعزيز إعادة تشكيل الهيكل الخلوي مما يؤدي إلى تنشيط ERK ثم من خلال التفاعل مع SHC و GRB2 يتم تشكيل معقد SHC-GRB2-ERK وهو مكون رئيسي لعملية الغزو الورمي والنقائل المستحثة بواسطة $TGF-\beta$. تعمل ركائز ERK على تعزيز النشاط الانتساخي لـ SMAD لتنظيم التعبير الجيني و استحداث EMT بواسطة $TGF-\beta$. تشارك أيضًا GTPases الشبيهة بـ RHO بما في ذلك RHOA و RAC و CDC42 في EMT المستحثة بواسطة $TGF-\beta$. كما ينظم $TGF-\beta$ التغيرات الهيكلية الخلوية عن طريق التوسط في RHO GTPase لحل الموصلات المحكمة بين الخلايا. كما يتوسط $TGF-\beta$ مستوى نشاط RHOA ويعزز تنشيط كيناز LIM (LIMK) بواسطة كيناز مرتبط بـ Rho (ROCK) والسلسلة الخفيفة المفسفرة للميوزين (MLC) من أجل تثبيط الكوفيلين. بالإضافة إلى ذلك يؤثر $TGF-\beta$ على الموصلات المحكمة من خلال CDC42-PAK1 المعتمد على SMAD7، وعلى تكوين الأرجل الكاذبة الخيطية. يعد كل من مسار TRAF6-TAK1-JNK/P38 وإشارات PI3K-PKB-mTOR أيضًا مسارات

غير معتمدة على SMAD لتحريض EMT بواسطة TGF- β ، وقد أظهر العلماء أن إشارات PI3K/PKB تعزز نقائل الورم عن طريق تحريض فسفرة TWIST1 عبر تفاعل متبادل بين إشارات PKB و TGF- β [19].

٢.٢. مسارات إشارات (Wnt) Wnt signaling pathway:

يعد تنشيط مسار WNT/ β -catenin مهمًا لتكوين الأورام بشكل خاص ويشكل جزءًا من عملية التحول الظهاري السدوي واللدونة الظهارية في التطور الطبيعي. يؤدي تنشيط WNT/ β -catenin إلى تحفيز التعبير عن SNAIL1 وما يتبعه من تقويض تنظيم E-cadherin وزيادة تنظيم Vimentin [9]. يعد بروتين β -catenin المنظم الأساسي لإشارات مسار Wnt/ β -catenin [18]. في غياب الإشارة يتم فسفرة β -catenin بواسطة معقد مكون من GSK-3 β و Axin ومثبط الورم APC، مما يؤدي لحجز β -catenin في السيتوبلازم ووسمه ليتم تقويضه بواسطة البروتينوزوم [21]. عندما يتم تنشيط مسار إشارات Wnt بواسطة عوامل مختلفة ترتبط بربطات Wnt بمستقبلات سطح الخلية مثل Frizzled (FZD) والبروتين المرتبط بمستقبلات البروتين الدهني منخفض الكثافة (LRP)، ثم تنشط البروتينات المستهدفة APC و Axin مما يتسبب في إزالة الفسفرة من GSK-3 β وتجنيد البروتينات السيتوبلازمية Dishevelled (Dvl) مما يؤدي إلى تراكم β -catenin في السيتوبلازم. تؤدي المستويات المرتفعة من β -catenin إلى انتقاله إلى النواة لتكوين معقد مع عامل تعزيز اللمفاويات (LEF) وعامل الخلايا التائية (TCF) ومن ثم تنظيم التعبير عن جين Wnt المستهدف [18] (الشكل رقم ٧). إن تقييد GSK-3 β في السيتوبلازم بعد تنشيط Wnt/ β -catenin يمنع أيضًا الفسفرة المزعزعة للاستقرار لـ Snail1. في العديد من أنواع السرطان تكون إشارات Wnt نشطة بشكل غير ملائم وتحفز بشكل مباشر التعبير عن SNAIL1 و SNAIL2. يحفز محور Wnt-GSK-3 β - β -TRCP1 نشاط Snail2 الذي يعزز EMT ومن خلال الارتباط بمُحفِّز التعبير عن BRCA1. يتوافق تحريض EMT بواسطة Wnt من خلال Snail2 مع تقارير أخرى عن انخفاض E-cadherin وزيادة فيبرونيكتين fibronectin بعد تراكم بيتا كاتينين في النواة، كما ارتبط Wnt بزيادة التعبير عن TWIST في الخلايا الظهارية الثديية. تم وصف عدة

مستويات من التفاعل المتبادل crosstalk بين مسارات إشارات $TGF-\beta$ و Wnt؛ على سبيل المثال LEF-1 قد يتم تنشيطه عن طريق الارتباط ببروتينات β -catenin أو SMAD [21].

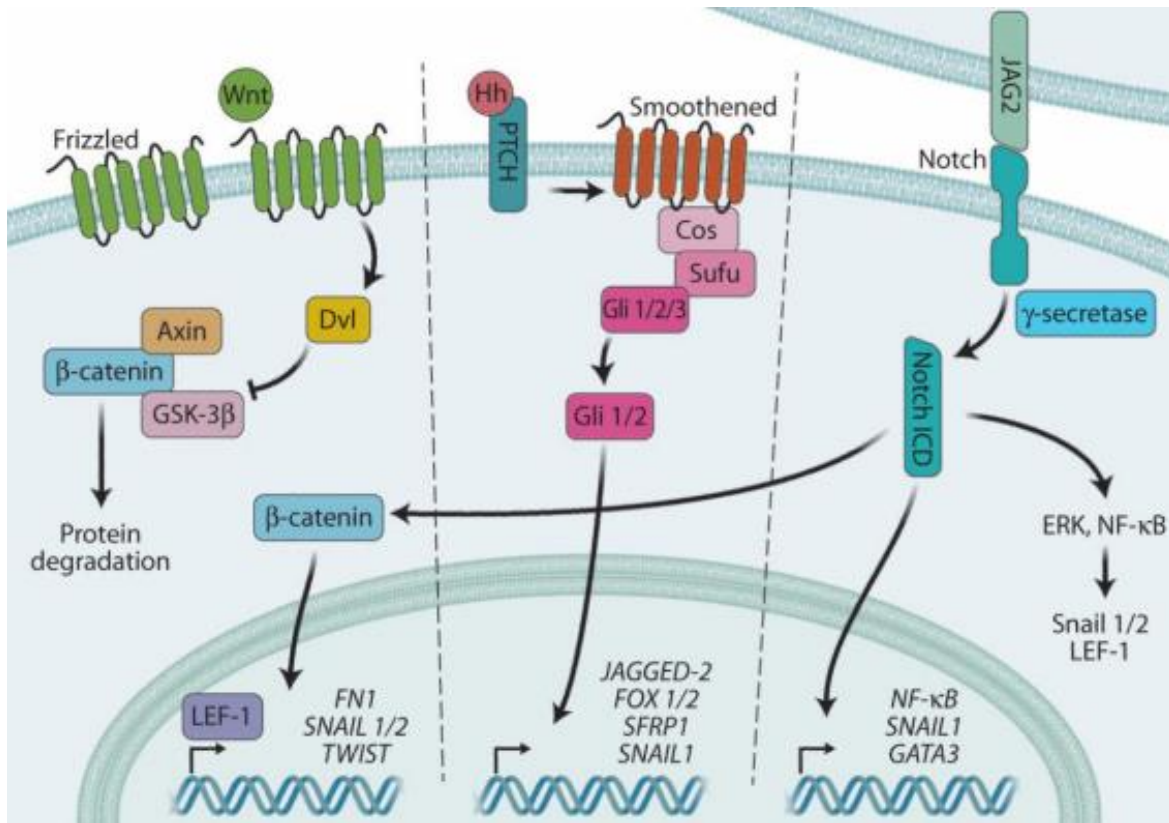
٢.٣. مسار إشارات (Notch) Notch signaling pathway:

إشارات Notch هي نظام إشارات أساسي ينظم العديد من العمليات الخلوية بما في ذلك موت الخلايا المبرمج والهجرة والغزو وتكوين الأوعية الدموية، ويمكن أن تكون إما مسببة للورم أو مضادة للتكاثر. تعبر الثدييات عن أربعة أنماط فرعية لمستقبلات Notch، وهي Notch-1 و Notch-2 و Notch-3 و Notch-4 وخمسة ربيطات هي Delta-like 1,3,4 و Jagged-1 و Jagged-2 وتنتمي هذه الربيطات الخمسة إلى عائلة Serrate وعائلة Delta [18]. تتحكم إشارات Notch في تعبير Snail من خلال آليتين تآزريتين: التنشيط الانتساخي المباشر لـ Snail، وآلية غير مباشرة تعمل عبر أوكسيداز الليزيل (LOX). كما يعمل Notch على زيادة LOX عن طريق تجنيد $HIF-1\alpha$ والذي يعمل على استقرار Snail، مما يؤدي إلى تفعيل عملية EMT والهجرة والغزو لدى الخلايا السرطانية [9].

يتم تنشيط المسار من خلال تفاعل مستقبل Notch مع ربيطة Jagged أو Delta-like مما يؤدي إلى انشطارات لمستقبل Notch في موقعين محددين، حيث أن الانشطار الثاني يحرر ببتيداً خارج خلوي قصيراً ويولد وسيطاً قصير العمر بواسطة معقد γ -secretase، ويحرر الانشطار الثالث الحيز داخل الخلوي لـ Notch (NICD) مما يسمح له بدخول النواة والارتباط بمشبث الانتساخ RBP-JK المعروف أيضاً باسم (CSL/ CBF-1) ومن ثم تجنيد المنشطات- المساعدة coactivators مثل بروتين (MAML) Mastermind-like والعمل كمنشط انتساخي يقوم بتنشيط انتساخ الجينات المستهدفة (الشكل رقم ٧). تم الإبلاغ عن أن التعبير عن Notch يتم تفعيله في العديد من الأورام الخبيثة لدى البشر [18].

أظهر التحليل التلوي لـ ٣٨٦٧ سرطاناً في الثدي أن زيادة التعبير عن Notch ارتبطت بتقدم الورم وسوء الانذار مع زيادة فرط التعبير عن Notch بين السرطانات ذات النمط الشبيه بالقاعدي. حالياً يعد تثبيط Notch استراتيجية علاج

تجريبية للعديد من أنواع السرطان بما في ذلك سرطان الثدي [9]. بالإضافة إلى التأثيرات المباشرة التي يتوسطها الحيز داخل خلوي ل Notch فهو أيضاً ينظم بشكل غير مباشر عملية ال EMT من خلال مسارات إشارات مختلفة مثل NF- κ B و β -catenin ومن خلال عمل العديد من miRNAs التنظيمية. يؤدي تنشيط Notch في خطوط خلايا سرطان البنكرياس إلى تقليل إمكانية ربط NF- κ B ب DNA ويقلل من التعبير عن MMP9 الذي يشفر MMP المشارك في إعادة تشكيل ECM لتسهيل تسرب وغزو خلايا سرطان البنكرياس. يعمل بربط بربطة Notch (JAG2) Jagged2



الشكل رقم (٧): مسار إشارات ال Wnt وال Notch وال Hedgehog في ال EMT.

يرتبط ال Wnt بالمستقبلات من نمط Frizzled وينشطها مما يعزز تثبيط GSK-3 β والذي هو كيناز يسبب تفويض ال β -catenin السيتوبلازمي، مما يتيح تراكم ال β -catenin وانتقاله للنواة حيث يفعل عامل الانتساخ LEF-1 والذي بدوره يعزز التعبير عن العديد من الجينات المرتبطة بال EMT. التفاعل بين الخلوي ما بين ال JAG2 ومستقبله Notch يحفز الانتساخ المتواسط ب-g-secretase وتحرر ال Notch ICD والذي يمكنه تنشيط الجينات المستهدفة المرتبطة بإشارات ال EMT بشكل مباشر. يمكن ل ال Notch ICD أيضاً أن يقوم بتثبيت ال β -catenin السيتوبلازمي وتنشيط مسارات أخرى مثل ERK و NF- κ B والتي تحفز عوامل الانتساخ LEF-1 و Snail1/2 على تحفيز التعبير الجيني المرتبط بال EMT من خلال تنشيط عوامل الانتساخ من عائلة Gli

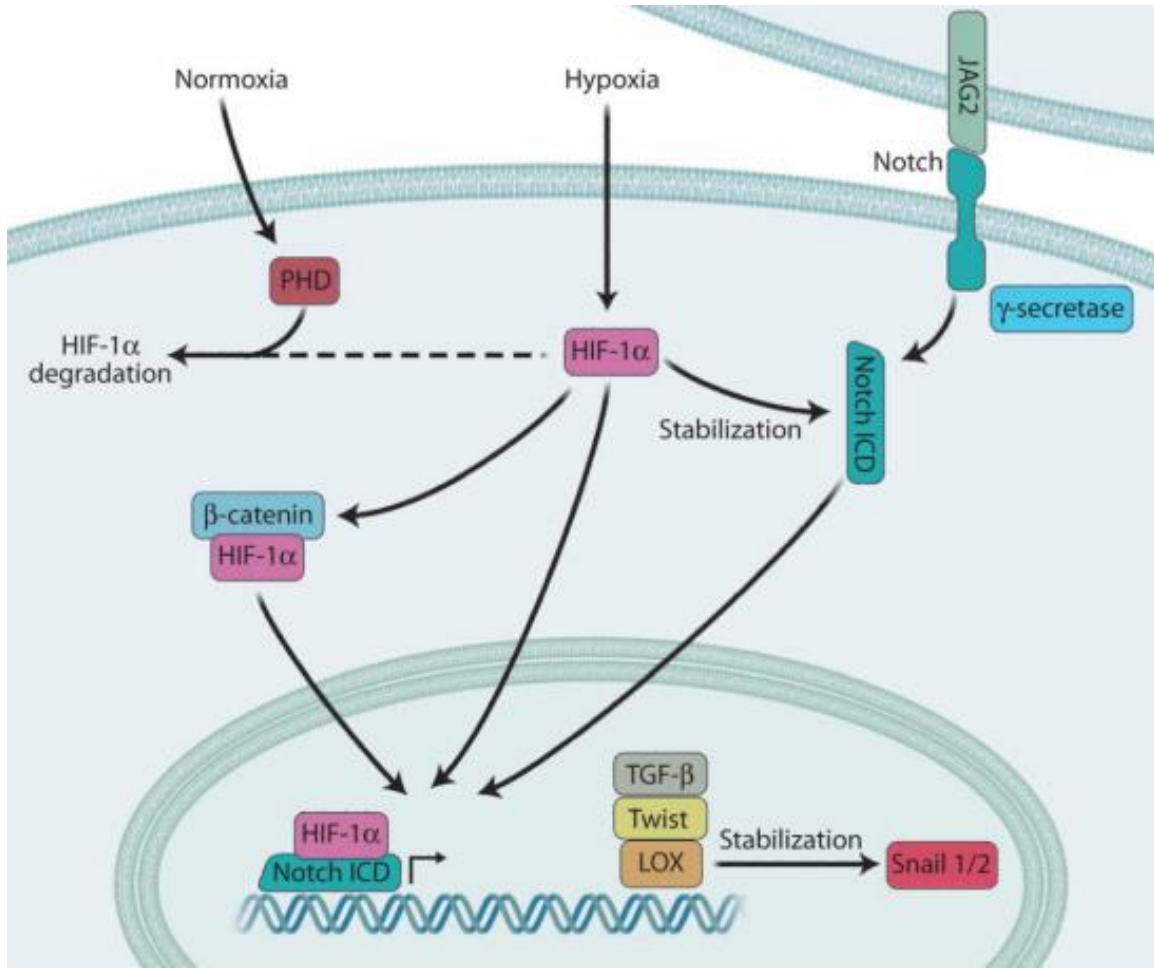
على تعزيز عملية EMT من خلال تحفيز البروتين الرابط لـ $GAT\alpha$ والذي يشبط عائلة miR-200 وقد سلطت التقارير الأخيرة الضوء على دور miR-200 في استهداف JAG1 لتنظيم تنشيط Notch ضمن حلقة تلقيم راجع [21].

٢.٤. مسارات إشارات (Hedgehog) Hedgehog signaling pathway:

يعد مسار إشارات Hedgehog (Hh) ضروريًا للعديد من العمليات أثناء التطور الجنيني بما في ذلك نمو الخلايا وتمايزها وتكوين الأعضاء. في الأنسجة البالغة الطبيعية يشارك هذا المسار في الحفاظ على تعداد الخلايا الجذعية وإصلاح الأنسجة وتجديدها. تشمل أعضاء عائلة الـ Hedgehog كل من Shh و Desert Hedgehog (Dhh) و Indian Hedgehog (Ihh). يتم تنظيم إشارات Hh بواسطة مستقبلين عابرين للغشاء Patched (Ptch) و Smoothened (SMO). يبدأ ذلك عن طريق ارتباط ربيطة Hh ببروتين عابر للغشاء ذي اثني عشر النفاذ وهو PTCH ، بعدها يتم تحرير تأثيره المثبط لـ SMO مما يؤدي إلى تنشيط إصبع الزنك الثلاثي Gli لنقله إلى النواة وزيادة انتساخ الجينات الهدف لـ Hh مثل PTCH و WNT و SNAIL1 (الشكل رقم ٧). بدون الارتباط بروابط Hh يشبط PTCH نشاط SMO وهو بروتين مستقبل عابر للغشاء ذي سبعة الثقافات ويمنع إرسال الإشارات إلى الجينات ضمن المسار. يعد التعبير عن SMO و Gli من واسمات تنشيط مسار Hh. بالإضافة إلى ذلك تحفز إشارات Hh إفراز $TGF-\beta 1$ لزيادة الحركة وتحفز التعبير عن JAG2 مما يؤدي إلى انشطار الحيز الخلوي لـ Notch (NICD) [21][18].

٢.٥. إشارات نقص الأكسجين Hypoxia:

يعد نقص الأكسجين أحد المحرضات الفيزيولوجية الرئيسية المسؤولة عن EMT متضمنًا تفعيل عامل نقص الأكسجين $HIF1\alpha$ 1- α وعامل نمو الخلايا الكبدية (HGF) و SNAIL1 و TWIST1؛ وتنشيط مسارات Notch أو NF- κB ، وتحفيز DNA hypomethylation. وقد أظهرت الأدلة أن البيئة الخالية من الأكسجين تلعب دورًا رئيسيًا في تنظيم تقدم سرطان الثدي ونقائله مع ارتباط ارتفاع التعبير عن الجينات المرتبطة بنقص الأكسجين بسوء الإنذار [9].



الشكل رقم (٨): مسار إشارات نقص الأكسجة في الـ EMT

في ظل الظروف المعيارية يعمل بروليل هيدروكسيلاز (PHD) على تعزيز تقويض عامل الانتساخ HIF-1α، بينما في ظروف نقص الأكسجة يتم تعطيل PHD مما يتيح تراكم وتنشيط HIF-1α مما يحفز التعبير عن الجينات المرتبطة بالـ EMT مثل TGF-β و TWIST و LOX وتنشيط مثبطات الانتساخ Snail1/2. وقد ثبت أيضاً أن HIF-1α يعمل على تثبيت كل من β-catenin و Notch ICD واللذان يعملان أيضاً على تعزيز التعبير عن الجينات المرتبطة بالـ EMT

يؤدي نقص الأكسجين إلى تثبيط حالات الهيدروكسيل البروليلية prolyl hydroxylases مثل PHD2 و PHD3 والتي تعمل على تحفيز وتحليل HIF-1α. HIF-1α هو عامل انتساخ يحفز التعبير عن عدد من الجينات المرتبطة بـ EMT مثل TGF-β و TWIST و LOX (الشكل رقم ٨). أثناء EMT المحرصة بنقص الأكسجين تزداد وفرة HDAC3 بواسطة HIF-1α فيرتبط HDAC3 بمحفزات CDH1 و JUP (المعروف أيضاً باسم g-catenin) وبالتعاون مع Snail1 يشبط انتساخهما. بالإضافة إلى ذلك يتوسط HDAC3 تكوين معقدات ميثيل ترانسفيراز الهيستون

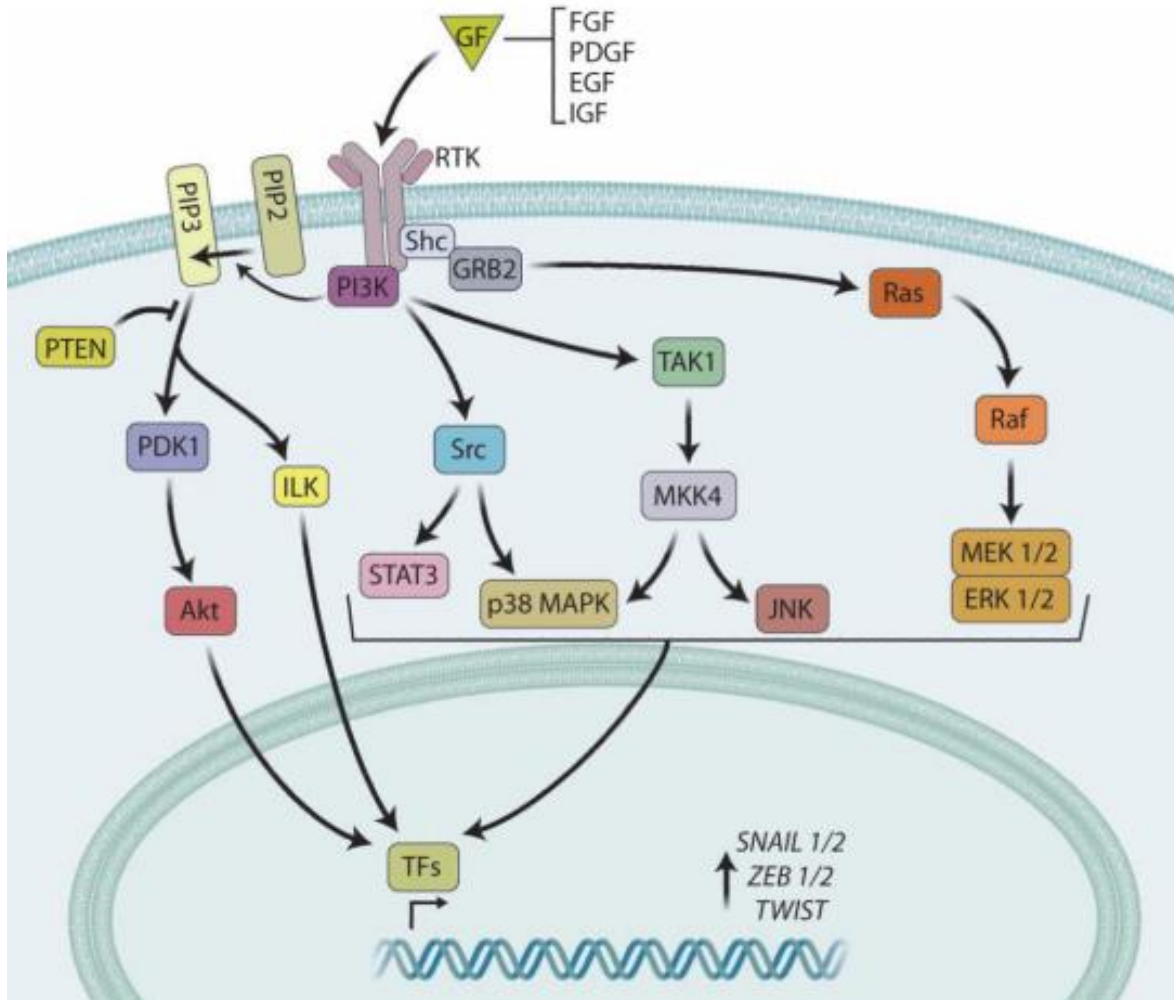
الضرورية لتحفيز التعبير عن الواسمات السدوية مثل ال Vimentin و N-cadherin [21]. أظهرت الدراسات التي أجراها يانغ وزملاؤه Yang et al. أن التعبير عن جين HIF-1 α كان مرتبطاً بنتيجة سيئة للعلاج الهرموني في سرطان الثدي إيجابي ال ER. علاوة على ذلك كان HIF-1 α قادراً على المساهمة في مقاومة العلاج الهرموني لخلايا سرطان الثدي إيجابي ال ER. تظهر الدراسات المختبرية على العديد من سلالات خلايا السرطان البشرية أن مستويات الأكسجين المنخفضة (3%) يمكن أن تحفز EMT عن طريق تثبيط نشاط GSK3 β وبالتالي تحفظ β -catenin من الفسفرة والتدمير اللاحق مما يؤدي إلى استقراره. في دراسات أخرى كان تنشيط إشارات Notch مطلوباً لـ EMT الناجم عن نقص الأكسجين عن طريق تنشيط إشارات WNT/ β -catenin وما ينتج عنها من تحفيز لـ SNAIL1، وقد يؤدي نقص الأكسجين أيضاً إلى تنشيط حلقات التغذية الراجعة الإيجابية ذاتية التعزيز التي تساعد في استقرار الحالة السدوية [9].

٢.٦. مسارات إشارات مستقبلات التيروزين كيناز RTK signaling pathway:

تقوم عوامل نمو متنوعة بتفعيل RTKs ومن خلال الإشارات اللاحقة لذلك يمكن أن تحفز EMT. تمتلك مستقبلات TGF- β نشاط كيناز وبالتالي فإن العديد من مسارات الإشارات غير المعتمدة على SMAD التي يحفزها TGF- β مثل Ras و PI3K و FAK و Src و TAK يتم تحريضها أيضاً من خلال تنشيط RTK استجابة لعوامل النمو مثل EGF و FGF و IGF و PDGF.

يحفز ارتباط عامل النمو بـ RTKs فسفرة المجالات داخل الخلوية، وبالتالي نقل الإشارة إلى مسارات داخل خلوية. بالإضافة إلى المشاركة في مسارات الإشارات التي تمت مناقشتها أعلاه فإن العديد من هذه الربائط تزيد أيضاً من تكاثر الخلايا وتساهم في تفعيل EMT (الشكل رقم ٩). حيث أن FGF-2 قادر على إحداث تغييرات في الهيكل الخلوي للأكتين من خلال التفاعل المتبادل بين Rho GTPases و PI3K مما يعزز النمط الظاهري السدوي المتطاول المرتبط بحركة الخلايا. كما يتم تحفيز حركة الخلايا بواسطة EGF بطريقة تعتمد على integrin $\alpha 2$ في الخلايا الظهارية

الثديية. وعند ارتباط EGF بمستقبله يتم سحب E-cadherin من غشاء الخلية مما يقلل من الاتصالات بين الخلايا ويضعف الطبقة الظهارية، بالإضافة إلى ذلك يحفز EGF أيضاً التعبير عن SNAIL1 و TWIST مما يؤدي إلى كبت محفز ال CDH1.



الشكل رقم (٩): مسار إشارات ال RTK في ال EMT.

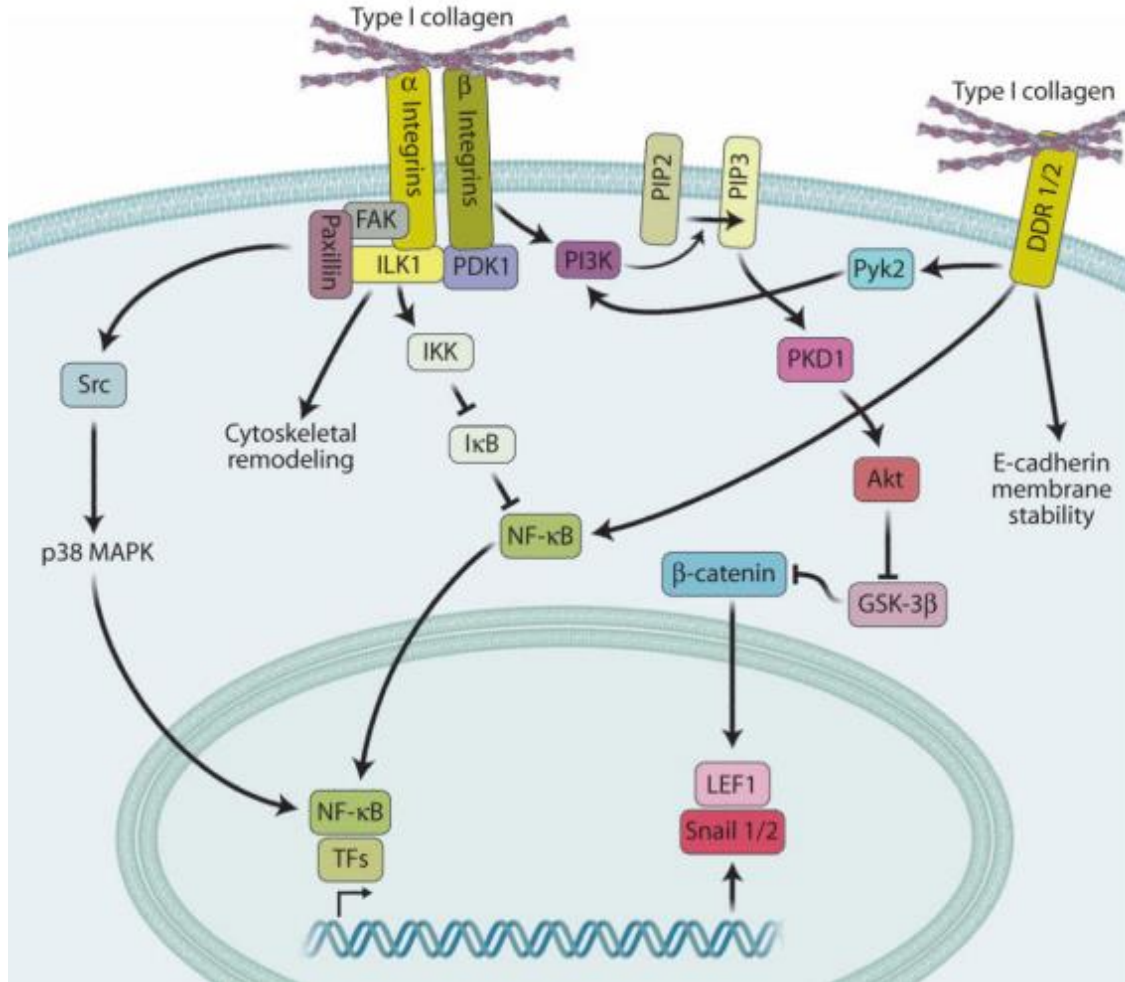
تقوم عوامل نمو مثل FGF أو EGF أو PDGF أو IGF بتحفيز ال RTKs والتي تنشيط مسارات إشارات متنوعة بما في ذلك تلك التي تتوسطها Ras و PI3K و Src و ILK. تعمل مجموعة الإشارات هذه على تنشيط عوامل الانتساخ التي ترتبط بمحفزات الجينات المشفرة لعوامل انتساخ ال EMT مثل Snail1/2 و ZEB1/2 و Twist والتي تحفز ال EMT عن طريق تثبيط تعبير الجينات المشفرة لجزيئات التصاق الخلايا. عندما يكون مثبط الورم PTEN موجوداً وفعالاً وظيفياً فإنه يمكن أن يكبح تحفيز ال EMT بواسطة ال PI3K.

وبالمثل يؤدي الإفراط في التعبير عن عامل النمو الشبيه بالأنسولين (IGF-1) في الخلايا الظهارية الثديية إلى حدوث EMT وزيادة الهجرة وانخفاض E-cadherin من خلال تنشيط β -catenin ، كما ينشط عامل النمو الشبيه بالأنسولين NF- κ B لزيادة التعبير عن SNAIL1 في الظهارة الثديية ويزيد من التعبير عن ZEB1 من خلال تنشيط ERK. ومن الجدير بالذكر أن عامل نمو الخلايا الكبدية HGF يشارك أيضًا في حدوث EMT من خلال تحريض Snail1 أو Snail2 بطريقة تعتمد على نوع الخلية. يتحكم PDGF في التعبير عن CDH2 (المشفّر لـ N-cadherin) في الأديم السدوي من خلال تنشيط مسار PI3K مما يوفر معلومات اتجاهية لتكوين الخطوط البدائية. يحدث تثبيط N-cadherin في المقام الأول من خلال فقدان PKB المفسر، إضافة إلى ذلك يحفز PDGF فسفرة هيليكاز DNA الرببي p68 والذي يعزز EMT من خلال نقل β -catenin إلى النواة بطريقة مستقلة عن Wnt في سلالات خلايا السرطان الظهارية المختلفة [21].

٢.٧. إشارات المطرق خارج الخلوي Extra cellular matrix signaling:

ينتج عن EMT إعادة تنظيم ECM (المطرق خارج الخلية) حيث تعمل العديد من العوامل التي تحفز EMT على زيادة التعبير عن بروتينات ECM (مثل الفيبرونيكتين والكولاجينات) والبروتياز (مثل MMPs) وغيرها من إنزيمات إعادة البناء [9]. تعد الإشارات التي يتوسطها ECM منظمًا مهمًا لمصير الخلايا الظهارية، حيث تزداد وفرة الكولاجين من النوع الأول والثالث أثناء EMT ويمكن أن يؤدي زرع الخلايا الظهارية مباشرة على هذا المطرق إلى تحفيز EMT من خلال مسارات إشارات مختلفة. وقد ثبت أن مسارات إشارات EMT تحفز التعبير عن الجينات التي تشفر MMP-2 و MMP-9 والتي تشطر الكولاجين من النوع الرابع في الصفيحة القاعدية لتعزيز غزو الأنسجة حول الورم بعد حدوث EMT. كما ثبت أن MMP-3 يحفز EMT بشكل مباشر من خلال تنشيط إشارات Rac1 GTPase-ROS والتي تعزز التعبير عن SNAIL1. كما أن MMPs قادرة على تقويض E-cadherin في غشاء الخلية وتعطيل وصلات الالتصاق وإضعاف الطبقة الظهارية.

ترتبط الإنتغرينات ببروتينات المطرق عند غشاء الخلية وتنشط المسارات داخل الخلية التي تتوسط EMT. إن التنوع في إلفة الارتباط لبروتينات الإنتغرين المختلفة يمكن الخلايا من الاستجابة لمجموعة كبيرة من العناصر خارج الخلية



الشكل رقم (١٠): مسار إشارات المطرق خارج الخلوي في ال EMT.

يحفز الكولاجين من النمط الأول عملية ال EMT من خلال إشارات الإنتغرين أو ال DDR1/2 ، كلا النوعين من المستقبلات يقوم بتنشيط NF-κB وعوامل انتساخ أخرى مما يعزز التعبير عن LEF1 و SNAIL1/2 . هناك مسارات أخرى موضحة في الشكل مثل تلك المتوسطة بـ PI3K و ILK و PYK2- PDK1 و FAK-paxillin يتم تنشيطها بواسطة الكولاجين من النمط الأول ومن خلال الإنتغرينات و DDRs ، مما يعزز في النهاية استقرار ونشاط عوامل الانتساخ المرتبطة بال EMT Snail1/2 و LEF-1 . من المعروف أيضاً أن DDR1 يشكل معقدًا مع E-cadherin على سطح الخلية والذي يتم تعطيله عقب الارتباط بالكولاجين من النمط الأول.

والتوسط في مسارات إشارات مختلفة استجابة لبيئة المطرق المتغيرة. تسهل إنتغرينات αvβ3 الفسفرة التي يتوسطها

Src ↓ TGF-βRII ، مما يخلق موقع إرساء لـ ShcA و GRB2 والتي ترسل إشارات عبر مسار p38 MAPK لتحفيز

EMT. يمكن أيضًا ربط التفاعلات بين وحدة فرعية من إنتغرين β3 ومعقدات TGF-βRII بواسطة FAK كوسيط

أساسي لـ EMT والنقائل في سرطان الثدي، وتعمل وحدات فرعية من إنتغرين b1 أيضًا كوسطاء مهمين لمسار p38 MAPK بالإضافة إلى دورها في إشارات JNK وتنظيم التعبير عن DAB2 [21] (الشكل رقم ١٠).

٢.٨. التداخل بين مسارات الإشارات المختلفة في الـ EMT crosstalk between signaling pathways

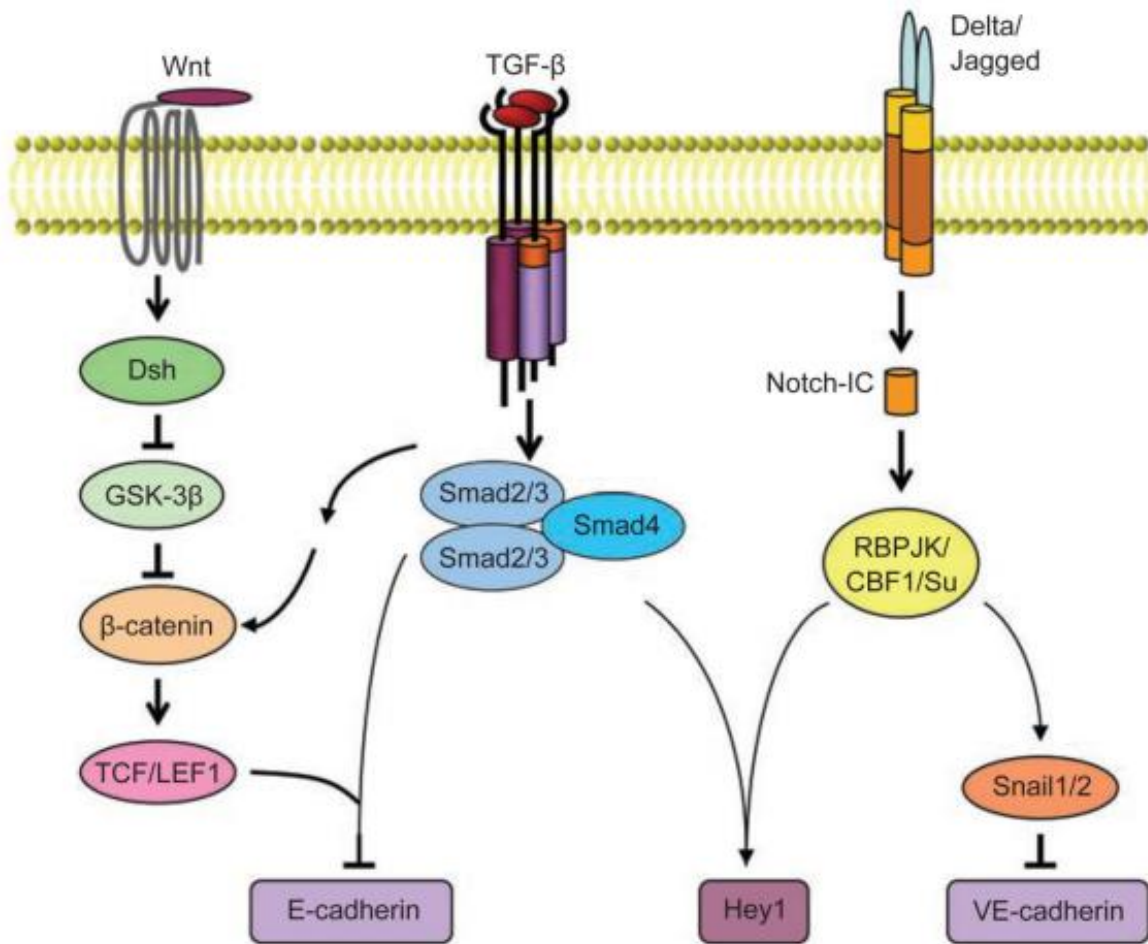
TGF- β هو المحفز الأكثر أهمية لـ EMT، ولكن يتم أيضًا تعزيز EMT من خلال عدد من العوامل الأخرى بما في ذلك Wnt و Notch والعديد من ربيطات التيروسين كيناز، مثل FGF و EGF و PDGF و HGF. لا يزال من غير الواضح كيف تساهم كل هذه العوامل في تحول الخلايا الظهارية السدوية، إلا أنه من المرجح أن تنشيط مسارات كيناز Ras-Erk MAP المستحث بواسطة مستقبلات التيروسين كيناز يعمل بشكل تآزري مع TGF- β يساهم في جوانب متعددة من EMT بما في ذلك السلوك المحرض للغزو والسلوك المحرض لتشكيل النقائل الورمية ضمن الأنسجة المختلفة. علاوة على ذلك فإن العديد من عوامل النمو والسيتوكينات هذه تحفز بعضها البعض مما يؤدي لتضخيم عملية الـ EMT ودعمها [22]. أفضل نموذج يوضح تعقيد التداخل بين الإشارات أثناء EMT هو التداخل بين مساري TGF- β و Wnt (الشكل رقم ١١)، حيث تتفاعل مكونات مسار Wnt وهي بروتين المحول Axin وبروتين GSK3b و β -catenin وتعديل نشاط بروتينات Smad لمسار TGF- β في السيتوبلازم أو في النواة.

يرتبط Axin السيتوبلازمي بـ Smad3 ويسهل فسفرة Smad3 والكفاءة للاستجابات الانتساخية اللاحقة لـ TGF- β ، من ناحية أخرى يجلب Axin السيتوبلازمي GSK3b إلى Smad3 فيقوم بفسفرته ويحفز تحلله وبالتالي يحافظ على الحالة الثابتة من Smad3 تحت السيطرة. تؤدي هذه الآلية إلى التحكم في إشارات Smad3 بواسطة Axin/GSK3b [12].

وقد تم إثبات التداخل في الإشارات بين مسارات Notch و TGF- β أيضاً، ففي الخلايا الظهارية وجد أن Hey1 وهو جين مستهدف معروف لإشارات Notch مطلوب لـ EMT المستحثة بواسطة TGF- β . يحفز TGF- β تعبير ثنائي

الطور عن Hey1: يعتمد الحث المبكر الفوري على Smad3 ولا يعتمد على Notch في حين يعتمد الحث المتأخر على Notch ويتوسطه كل من Smad3 و Jagged1 المستحث بواسطة Erk [23].

تُظهر دراسات أخرى تسلط الضوء على التفاعل المتبادل بين الإنتغرينات وإشارات TGF- β أن β -catenin المفسفر و SMAD2 يشكلان معقدات من خلال التعاون بين إشارات TGF- β و $\alpha3\beta1$ integrin، والتي تعزز EMT في المختبر وفي الجسم الحي في نموذج لتليف الرئة.



الشكل رقم (١١): التداخل بين إشارات مسار الـ TGF- β المعتمد على SMAD وبين إشارات مسارات الـ Wnt والـ Notch

تتفاعل إشارات الـ TGF- β مع مسار الـ Wnt على عدة مستويات من خلال تنظيم نشاط الـ β -catenin أو من خلال تفاعلات معقدات الـ SMAD مع الـ β -catenin و/أو TCF/LEF1. تتداخل إشارات الـ TGF- β مع مسار الـ Notch من خلال تفاعلات معقدات الـ SMAD مع RBPJK/CBF1/Su لتنظيم انتساخ الجينات المرتبطة بالـ EMT

التفاعل المتبادل بين نقص الأكسجين وإشارات Notch هو ظاهرة راسخة تساهم في إشارات EMT. يزيد التعبير عن HIF-1 α من وفرة LOX وهو إنزيم مطلوب لنشاط FAK والالتصاق بين الخلايا والمطرق الخلوي، مما يعمل على تثبيت نشاط Snail1 عن طريق نزع أمين هيستون ثلاثي الميثيل H3 Lys4 في مُحفِّز CDH1. يمكن أن يؤدي التنشيط الشاذ لإشارات Notch عن طريق نقص الأكسجين إلى إحداث EMT أثناء تطور الورم. بالإضافة إلى ذلك يعمل نقص الأكسجين على كبح miR-34 α الذي يثبط مسار إشارات Notch [21].

٣. واسمات التحول الظهاري السدوي **Biomarkers for EMT**:

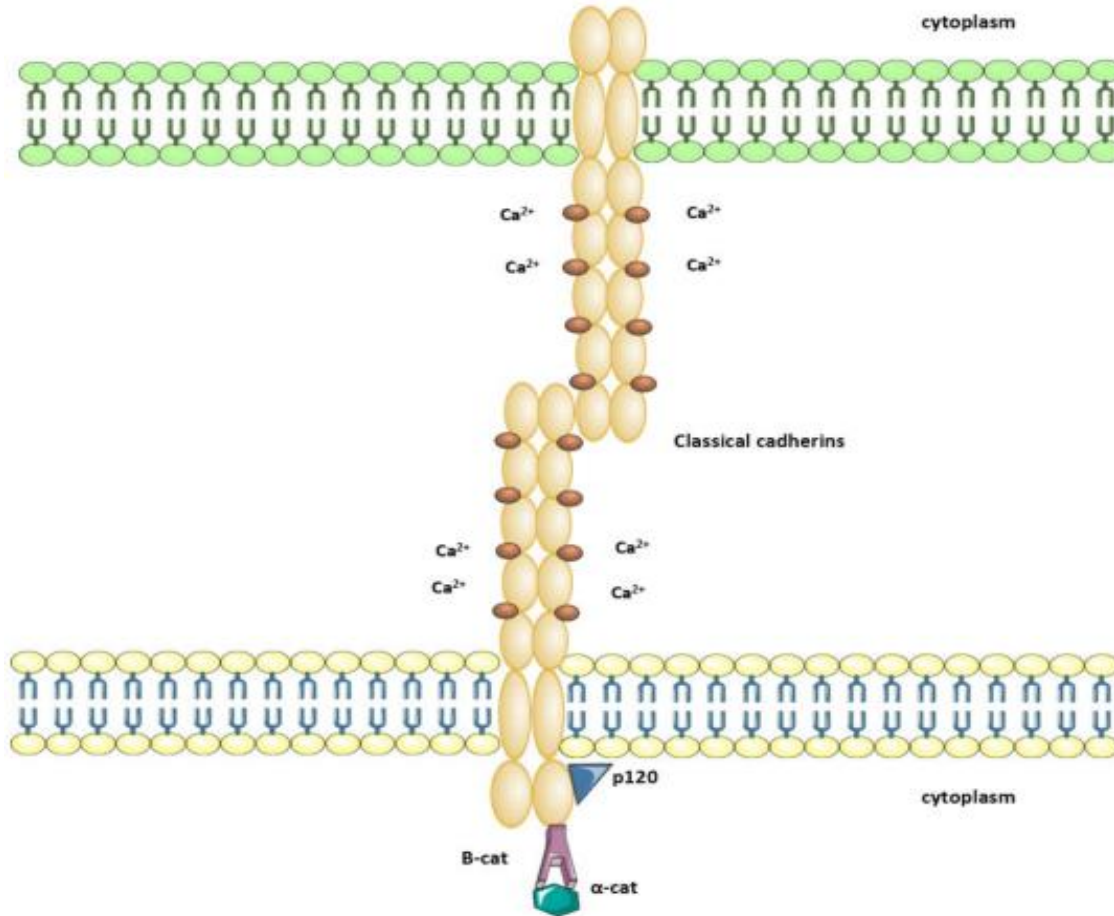
٣.١. الكادهيرين والكاتينين (E-cadherin, N-cadherin, β -catenin)

٣.١.١. البنية والوظيفة:

تعتبر الموصلات الخلوية مهمة للحفاظ على قطبية الخلايا والأنسجة وسلامتها، بشكل عام تمتلك الحيوانات الفقارية ثلاثة أنظمة وصلات بين الخلايا: (١) الموصلات الفجوية gap junctions (٢) الموصلات المحكمة tight junctions (٣) الموصلات الملتصقة adherent junctions (Ajs) التي ترتبط بالهيكل الخلوي القشري للتوسط في سلوك الخلايا والأنسجة. ومن بين الجزيئات البنيوية التي تتجمع لتكوين الموصلات الملتصقة تعتبر الموصلات القائمة على الكادهيرين/الكاتينين مسؤولة عن تنظيم وربط الخيوط الدقيقة للحفاظ على خصائص التصاق الخلايا ومصونية الإشارات داخل الخلايا وبينها، بما في ذلك تنظيم الوظائف النووية ومسارات الانتساخ [24].

الكادهيرينات هي بروتينات سكرية عابرة للغشاء مسؤولة عن التصاق الخلايا والحفاظ على بنية الأنسجة الطبيعية. تم العثور على الكادهيرينات ليس فقط بين الخلايا السرطانية ولكن أيضًا في سوائل الجسم. الكادهيرينات الكلاسيكية والتي يوجد من بينها العديد من المجموعات الفرعية هي فئة من جزيئات الالتصاق التي تتفاعل مع الكاتينينات من خلال المجال السيتوبلازمي. الكادهيرينات الكلاسيكية هي الكادهيرين الظهاري والكادهيرين المشيمي والكادهيرين العصبي (E-cadherin و P و N على التوالي) [25].

ال E-cadherin هو جزيء التصاق بين خلوي معتمد على الكالسيوم وهو بروتين مشبط للورم أيضاً. يلعب بروتين E-cadherin دوراً حاسماً في إنشاء والحفاظ على الظهارة المستقطبة والتميزة من خلال معقدات الالتصاق بين الخلايا. يعتبر هذا الجزيء مشبطاً للغزو وغالباً ما يوجد خلل في تنظيمه في الحالات المتقدمة لبعض سرطانات الخلايا الظهارية.



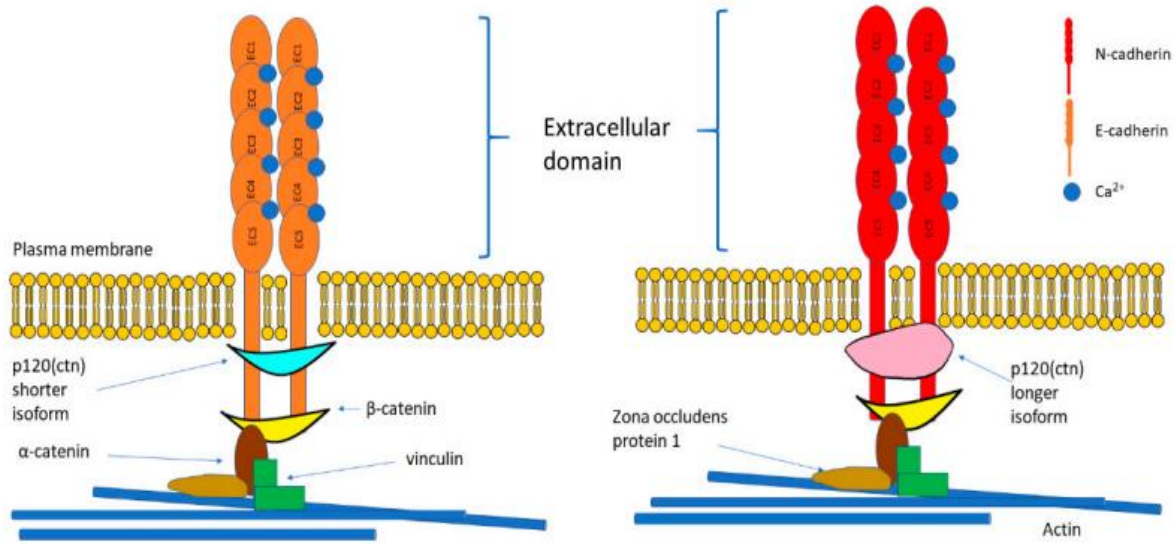
الشكل رقم (١٢): رسم توضيحي لمعقد ال cadherin-catenin .

تملك جزيئات الكادهيرين مجال خارج خلوي ومجال عابر للغشاء وذيل سيتوبلازمي، تتكون المجالات العابرة للغشاء من خمسة تكرارات من الكادهيرين وتكون مسؤولة عن التصاق بين الخلايا المعتمد على الكالسيوم.

كما يرتبط حذف أو إلغاء تنظيم E-cadherin بالقدرة التسليية والنقائلية للورم بسبب تعطيل معقد الكادهيرين-الكاتينين مع فقدان التصاق الخلايا والزيادة المصاحبة في حركة الخلايا [26].

الكادهيرينات الكلاسيكية هي كادهيرينات عابرة للغشاء مع خمسة مجالات تكرارية للكادهيرين خارج الخلية (EC) تتعاون مع أفراد عائلة الكاتينين عبر مجالاتها السيتوبلازمية للارتباط بالهيكل الخلوي الأساسي للأكتين [27] (الشكل

رقم ١٢). تتوسط الكادهيرينات الكلاسيكية فصل مجموعات الخلايا المختلفة بناءً على آلية الالتصاق المتجانس حيث تبقى الخلايا التي تعبر عن أنواع فرعية مختلفة من الكادهيرين منفصلة عن بعضها البعض. تم قبول نموذج "ثنائي الخيوط" (strand-dimer) على نطاق واسع كنموذج لآلية الالتصاق المتجانس للكادهيرين من النوع الأول. هذا النموذج عبارة عن تفاعل بيني بين ستة ثملالات أمينية طرفية عالية الحفظ من EC1 تُعرف باسم ذراع الالتصاق (adhesion arm) وبين جيب المستقبل (acceptor pocket) في جسم EC1 المقابل، حيث يتم إدخال ذراع الالتصاق من أحد جزيئات الكادهيرين في جيب المستقبل للكادهيرين المقابل [27].



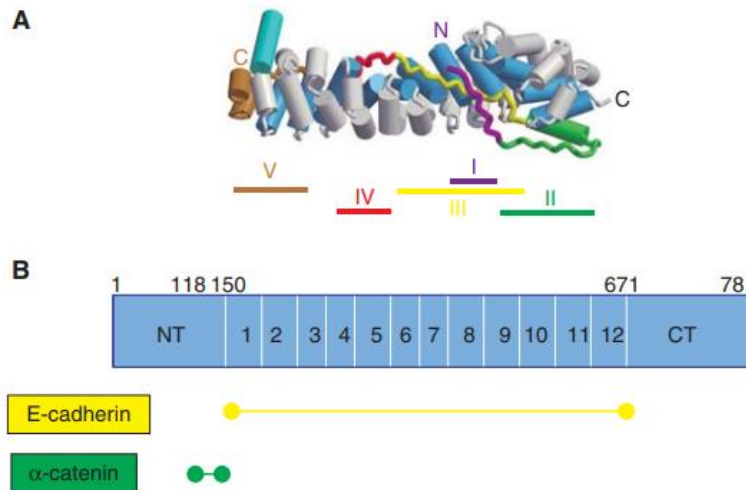
الشكل رقم (١٣): بنية E-cadherin والN-cadherin .

يتشارك الE-cadherin والN-cadherin بنفس البنية. وهما يشكلان معقد cadherin-catenin حيث يتكون المجال السيتوبلازمي من تكرارات الكادهيرين خارج الخلوي EC التي ترتبط بالكاتينين لتعديل خيوط الهيكل الخلوي ومن ضمنها الأكتين. الاختلاف في البنية بين الE-cadherin والN-cadherin هو أن الE-cadherin يرتبط بالشكل الأسوي الأقصر للكاتينين p120 بينما يرتبط الN-cadherin بالشكل الأسوي الأطول منه.

ترتبط المنطقة السيتوبلازمية للكادهيرينات E و N و P بـ β -catenin أو plakoglobin والتي ترتبط بدورها بـ a-catenin. وتشير التقديرات إلى أن جميع الكادهيرينات الكلاسيكية تتفاعل مع الكاتينين بهذه الطريقة. يمتلك a-catenin عدد من شركاء الارتباط بما في ذلك الأكتين. بالإضافة إلى ذلك يرتبط بروتين p120 catenin بجزء الغشاء المجاور للمجال السيتوبلازمي للكادهيرين. تتجمع معقدات الكاديرين-الكاتينين بعد ذلك في بنى نقطية متوافقة

مع خيوط الأكتين المتشعبة من حزام الأكتين القشري الأساسي. يتم التغيير اللاحق من الاتصال الصفائحي إلى الالتصاق المحكم من خلال إعادة تنظيم الهيكل الخلوي للأكتين [28] (الشكل رقم ١٣).

كجزء من الموصلات الملتصقة يرتبط β -catenin بالجزء السيتوبلازمي من الكادهيرينات وألفا-كاتينين، وهو أيضاً منشط انتساخي مركزي لمسار إشارات Wnt الذي يحدد مصير الخلية أثناء التخلق الجنيني وتجديد الأنسجة لدى البالغين. البنية الأساسية لل- β -catenin تحوي ٧٨١ حمضاً أمينياً، وتتكون من منطقة طرفية أمينية بها حوالي ١٥٠ حمضاً أمينياً، ونطاق مركزي من ٥٢٠ ثمانية مكوناً من ١٢ ذراع متكرر، ومنطقة طرفية كربوكسيلية مكونة من ١٠٠ ثمانية. يرتبط ال-E-cadherin بنطاق الذراع بينما يرتبط ألفا-كاتينين بالثملات ١١٨-١٤٩ قبل بداية نطاق الذراع مباشرة (الشكل رقم ١٤).



الشكل رقم (١٤): بنية ال-b-Catenin والمعد الذي يصنعه مع المجال السيتوبلازمي لل-E-cadherin

(A) هيكل ثلاثي الأبعاد لمنطقة تكرار ذراع ال-b-Catenin ضمن المعد مع المجال السيتوبلازمي لل-E-cadherin ، تتكون تكرارات الذراع من ثلاثة حلزونات (ذات اللون الرمادي والأزرق). الثملات ١٣٤-١٦١ التي تحوي موقع ربط ال-a-catenin وجزء من تكرار الذراع الأول تشكل حلزوناً واحداً ضمن هذا الهيكل البلوري. ينقسم ال-E-cadherin إلى خمسة مناطق (موضحة بخمسة ألوان مختلفة). (B) البنية الأولية لل-b-catenin ، وقد تمت الإشارة إلى مواقع ارتباط ال-cadherin وال-a-catenin.

P120 Catenin هو بروتين من عائلة أرماديلو armadillo-family protein يرتبط بنطاق الذراع التكراري

الخاص به بالمنطقة المجاورة للغشاء لذي الكادهيرين السيتوبلازمي. يبدو أن هناك دورين رئيسيين ل-p120 أولهما أنه قد يعمل على تنظيم مستويات الكادهيرين من خلال التحكم في معدل تبديل الكادهيرين cadherin switching.

ثانيهما أن p120 يتحكم في GTPases الصغيرة ومؤثراتها التي تنظم الهيكل الخلوي للأكتين. يُعتقد أن التفاعل مع الكادهيرين يحدد موقع النشاط التنظيمي لـ GTPase الصغيرة لـ p120 عند الموصلات الملتصقة، بهدف التأثير على تنظيم الأكتين [28]. (الشكل رقم ١٣)

a-Catenin هو بروتين يتكون من حوالي ٩٠٠ حمض أميني وقد تم وصف ثلاثة أشكال آسوية isoforms من a-catenin وهي E (الظهاري) و N (العصبي) و T (يوجد في القلب والخصيتين). يتم التعبير عن كل من a-catenin و E-catenin و a-N-catenin معًا في عدد من الأنسجة على مستويات مختلفة وفي مراحل نمو مختلفة. يربط ألفا كاتينين معقد الكادهيرين/بيتا كاتينين بالأكتين مما يوفر ارتباطًا ميكانيكيًا مستقرًا بين الاتصال خارج الخلية والهيكل الخلوي الأساسي. (الشكل رقم ١٣)

يعتمد التصاق الخلايا بواسطة الكادهيرين على وجود الكالسيوم Ca^{2+} ، وتُظهر البنى البلورية لمناطق المجال الخارجي التي تحتوي على مجالات متعددة خارج خلوية (EC) أن الاتصالات بين المجالات المتعاقبة تكون صلبة بفضل تنسيق الكالسيوم، حيث يتم تنسيق ثلاثة جزيئات من Ca^{2+} بواسطة الأحماض الأمينية المحفوظة التي تساهم بها كل من قاعدة المجال الأول، وقمة المجال التالي، ومنطقة الرابط بينهما [٢٨]. في حالة ارتباط Ca^{2+} يتم تثبيت المجالات المتعاقبة في اتجاهات محددة جيدًا والتي تمنح انحناءً قويًا لكامل طول المجال الخارجي، بينما تؤدي إزالة Ca^{2+} إلى اضطراب اتجاهات المجالات المتعاقبة وزيادة الحساسية للتحلل البروتيني، وزيادة الحركة بين المجالات المتعاقبة [28].

٣.١.٢. دور الكادهيرين/الكاتينين في التحول الظهاري السدوي والسرطان:

إلى جانب دوره في الحفاظ على بنية الأنسجة تعتمد المراحل الأكثر أهمية من التخلق الجنيني على التعبير عن الكادهيرين. وفي الأنسجة الناضجة يكون الكادهيرين مسؤولاً عن الحفاظ على قطبية الخلايا وسلامة الأنسجة والتوازن الداخلي. أم أثناء التسرطن فغالبًا ما يتم تعطيل الكادهيرين أو تعطيل وظيفته مما يسمح بتطور وتقدم السرطان وحدوث

النقائل. تمت دراسة دور الكادهيرين في عملية تطور السرطان على نطاق واسع على مدى العقود الماضية، وقد وصفت العديد من الدراسات وظيفة E-cadherin بأنها مثبطة للورم، ومع ذلك أظهرت الدراسات الحديثة أن E-cadherin وخاصة في السرطانات ذات المرحلة المتأخرة قد يعزز أيضًا هجرة الخلايا والغزو وحتى تطور الورم [25]. وكما ذكرنا سابقاً أثناء عملية التحول الظهاري السدوي تخضع الخلايا لتغيرات ظاهرية وتعديلات جزيئية تمثل التمايز السدوي، يؤدي هذا إلى فقدان الخلايا السرطانية للواسمات الظهارية مثل E-cadherin واكتساب واسمات ميزانشيمية مثل Vimentin و N-cadherin [29].

• E-cadherin كمضاد للورم:

هناك العديد من الآليات لكبح الورم بواسطة E-cadherin قد تأتي آلية كبح الورم من الوظيفة اللاصقة لـ E-cadherin والتي تمنع خلايا الورم من الانفصال عن بعضها البعض وبالتالي تمنع هجرتها إلى أنسجة أخرى. الآلية البديلة لكبح الورم هي من خلال مناهضة الإشارة النووية لـ β -catenin وتغيير قدرته على تنظيم الجينات المستهدفة التي تدعم غزو الورم حيث أن β -catenin هو طليعة جينة ورمية proto-oncogene. وقد تبين أن جزيئات E-cadherin التي كان لها ارتباط بـ β -catenin فقط كانت قادرة على تثبيث نمو الورم وليس جزيئات E-cadherin التي أظهرت نشاطاً لاصقاً بدون ارتباط بـ β -catenin. بالإضافة إلى ذلك يمتلك معقد E-cadherin/catenin القدرة على تعديل نشاط NF- κ B مما يؤدي إلى التسرطن المرتبط بالالتهاب. هناك أيضاً آلية متعلقة بالتخلق epigenetic تتحكم في عمل E-cadherin مرتبطة بشكل مباشر بالتعبير عن microRNAs و microRNA-9 و microRNA-10b [25]. في الخلايا السرطانية قد يتفاعل المجال خارج الخلية من E-cadherin أيضاً بشكل مباشر مع مستقبلات عوامل النمو (مثل EGFR و IGF-1 R و c-Met)، ينظم هذا التفاعل سلباً تنشيط مستقبلات التيروزين كيناز المعتمدة على الربطة ويكبح إشارات تحفيز النمو من المستقبلات.

على الرغم من أن دور E-cadherin في كبح الورم معروف منذ فترة طويلة، إلا أن الأدلة المتراكمة تُظهر أن E-cadherin قد يلعب أيضًا دورًا في تعزيز الورم. تحتفظ العديد من السرطانات الغازية والخبيثة بتعبير E-cadherin (على سبيل المثال، سرطانات الثدي القنوية، وسرطان القولون والمستقيم، وسرطان البروستات، وسرطان الخلايا الحرشفية الفموي)، وفي وقت سابق ثبت أن E-cadherin المفرط في التعبير يلعب دورًا مهمًا في الشكل العدوانى من سرطان الثدي وسرطان الثدي الالتهابي وربط الخلايا في الصمات الورمية التي تنتشر داخل الأوعية اللمفاوية الجلدية[30].

• β -catenin وارتباطه بالWnt

إضافة لكونه مكون بنيوي مركزي لمعقد الالتصاق E-cadherin/ β -catenin، يعمل β -catenin أيضًا كمنشط مشارك في الانتساخ في مسار إشارات Wnt، وهو مسار يساهم في مراحل محددة أثناء التطور للتحكم في قرارات مصير الخلية ومتورط في السرطان في العديد من الأنسجة. والفهم الحالي لهذا المسار هو أن تنشيط مستقبل Wnt يثبط تحلل β -catenin المصنّع حديثًا مما يسمح لـ β -catenin غير المرتبط بالكادهيرين بالدخول إلى النواة وبالاشتراك مع LEF/TCF يقوم بتنشيط جينات Wnt المستهدفة. وقد ثبت أن إشارات Wnt تولد شكلًا من أشكال β -catenin يرتبط بـ TCF ولكن ليس الكادهيرين مما يشير إلى أن β -catenin المستخدم للانتساخ يختلف جزيئيًا عن المستخدم للالتصاق، وعلى الرغم من هذا فقد كان هناك الكثير من التكهّنات حول ما إذا كانت مجموعات نقل الإشارة المرتبطة بالكادهيرين ومجموعات نقل الإشارة الخاصة ببروتين β -catenin قابلة للتبادل وظيفيًا. وإذا كان الأمر كذلك فقد يسمح هذا بتحفيز الجينات الهدف للـ Wnt بشكل مستقل عن ربيطة Wnt حيث يتم استخدام بروتين β -catenin المنطلق من الغشاء مباشرة للإشارة. إن استخدام بروتين β -catenin المرتبط بالكادهيرين في إشارات Wnt أمر مثير للاهتمام، حيث تعتبر الكادهيرينات بشكل عام منظمات سلبية للمسار من خلال عزل بروتين β -catenin، وقد ثبت أن زيادة وانخفاض مستويات التعبير عن الكادهيرين تثبط وتنشط الانتساخ المعتمد على بروتين β -catenin

على التوالي[31]. تعمل إشارات Wnt على تثبيط قدرة معقد التدمير على فسفرة وتقويض β -catenin السيتوبلازمي مما يؤدي إلى تراكم β -catenin في السيتوبلازم وانتقاله إلى النواة والتنشيط اللاحق لجينات مختلفة عبر عوامل الانتساخ TCF/LEF1. يشارك مسار Wnt/ β -catenin في تطور الورم بما في ذلك الحفاظ على الخلايا الجذعية السرطانية (CSCs) وتعزيز النقائل وبقيا الخلايا السرطانية والتهرب المناعي ومقاومة العلاج الكيميائي وتكوين الأوعية الدموية للورم[30].

• تبديل الكادهيرين (Cadherin switching)

إن الحدث الرئيسي أثناء التحول الظهاري السدوي هو فقدان الالتصاق القوي بين الخلايا بسبب كبح التعبير عن E-cadherin والتحول اللاحق للخلايا الظهارية إلى نمط ظاهري ميزانشيمي يتميز باتصالات خلوية-خلوية فضفاضة والتعبير عن أنواع أخرى من الكادرينات مثل N-cadherin و R-cadherin و P-cadherin، ويُعرف هذا الحدث على نطاق واسع باسم تبديل الكادرين[13].

لقد ثبت أن تبديل الكادرين مهم لاكتساب الخلايا السرطانية للسلوك المهاجر والغزوي. وقد تم وصف التعبير الشاذ عن N-cadherin في العديد من أنواع السرطان مثل سرطان الثدي والبروستات والمثانة وسرطان الرئة غير صغير الخلايا وسرطان الخلايا الكبدية، حيث قد يكون N-cadherin علامة إنذارية سلبية. يحل N-cadherin محل E-cadherin أثناء التحول الظهاري السدوي وقد تبين أن N-cadherin يوفر التصاقاً أضعف بين الخلايا مقارنة بـ E-cadherin، كما أظهرت العديد من الدراسات أن زيادة تنظيم N-cadherin كانت مرتبطة بزيادة حركة الخلايا السرطانية وغزوها في المختبر مما يؤكد مساهمة N-cadherin في النشاط المهاجر للخلايا السرطانية، كما زاد N-cadherin من هجرة خلايا سرطان الثدي وغزوها بغض النظر عن تعبير E-cadherin. يتفاعل المجال خارج الخلوي لل-N-cadherin مع مستقبل عامل نمو الخلايا الليفية FGFR مما يمنع دخول FGFR ويؤدي إلى تنشيط ERK والتعبير عن MMP-9 وتحريض هجرة الخلايا والغزو والنقائل. بالإضافة إلى تحريض هجرة الخلايا يعزز N-cadherin بقيا

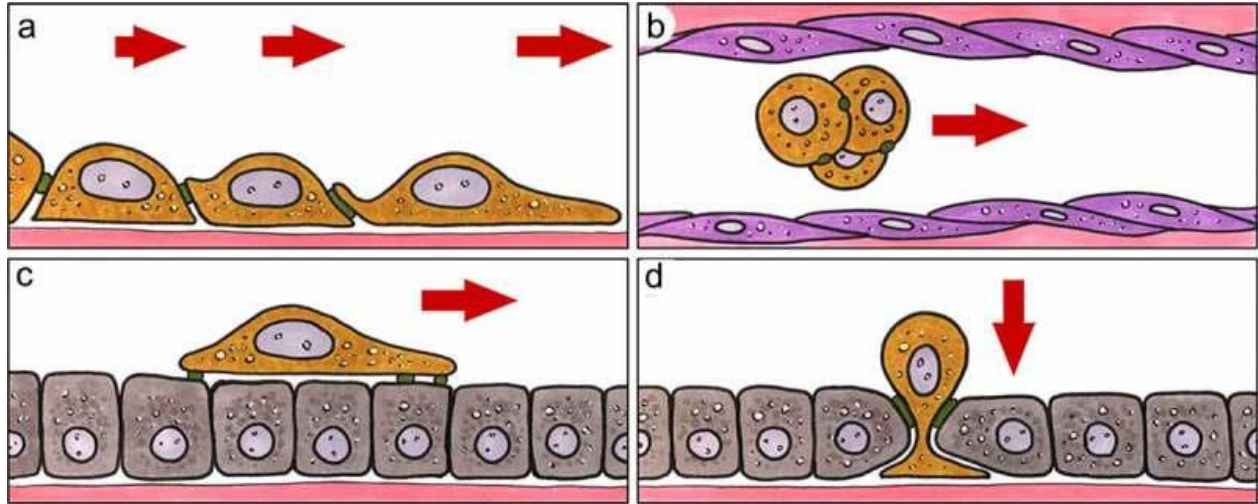
الخلايا السرطانية عن طريق زيادة تنظيم البروتين المضاد للموت الخلوي المبرمج Bcl-2 كما هو موضح في سلالة خلايا سرطان البروستاتا البشرية DU-145. في نماذج الفئران لسرطانات الثدي ارتبط N-cadherin بزيادة عدائية الورم وزيادة احتمالية النقائل وساهم في تطور الورم، على سبيل المثال عزز النقائل الرئوية [30]. يتحقق تبديل الكادهيرين في المقام الأول نتيجة للتنظيم الانتساخي لتعبير الكادهيرين من خلال عدد من العوامل مثل SNAIL1 و SLUG و TWIST و ZEB1 و ZEB2 [13].

• كاتينين p120

بشكل عام، تم التعرف على كاتينين-P120 باعتباره مهمًا في تنظيم الإشارات وسلوك الخلايا عند تبديل الكادرين. وعلى الرغم من أن ارتباط الكاتينين-P120 ب-E-cadherin ضروري للحفاظ على النمط الظاهري الظاهري ووظائفه في كبح الورم فإن ارتباطه بالكادهيرينات السدوية يعزز تنشيط Rac1 والتحريض اللاحق للغزو الخلوي. يرتبط كل من E-cadherin و N-cadherin أيضًا بأشكال آسوية مختلفة من بروتين p120 وفق الآتي: يرتبط N-cadherin بالشكل الآسوي 1 لبروتين p120 طويل الفسفرة والذي يمكن أن يعزز الغزو، في حين يرتبط E-cadherin بشكل أساسي بالشكل الآسوي 3 لبروتين p120 الصغير غير المفسر والذي يفتقر إلى هذه الوظيفة. وبخلاف الدور المهم الذي يلعبه بروتين p120 في التوسط في إشارات الكادهيرين تم الإبلاغ عن العديد من آليات العمل الأخرى في مجرى الكادهيرينات السدوية أثناء عملية ال-EMT التي تعزز التحول الخلوي والأنماط الظاهرية المحرصة للورم. يسهل N-cadherin نشاط مستقبل FGF ومستقبل PDGF وبالتالي يعزز حركة الخلايا والسلوك النقيلي. ومن المثير للاهتمام أن N-cadherin يمكن من تفاعلات أقوى بين الخلايا الظاهرية البطانية مما يشير إلى دوره في تعزيز الغزو والنقائل عبر الأوعية الدموية.

في كثير من الحالات، تغزو الخلايا السرطانية السدى المحيط ليس بشكل فردي ولكن كمجموعات متماسكة حيث ترتبط الخلايا معًا بواسطة Ajs القائمة على E-cadherin (الشكل رقم ٥١). غالبًا ما تُظهر الخلايا التي تتحرك

كمجموعة هجرة أكثر استمرارًا من الخلايا الفردية. لوحظ الغزو الجماعي لخلايا الورم لكولاجين المطرق الخلوي لأول مرة خارج الجسم الحي، على سبيل المثال في سرطان الخلايا الحشرية الفموي وسرطان القناة الثديية. في سرطان



الشكل رقم (١٥): دور الـ E-cadherin في هجرة الخلايا السرطانية.

(a) الهجرة الجماعية لمجموعة من الخلايا المرتبطة بواسطة وصلات التصاق الـ E-cadherin. (b) مجمع من CTCs مرتبطة ببعضها بواسطة وصلات التصاق الـ E-cadherin مسافرة ضمن الدوران. (c) هجرة الخلايا السرطانية فوق الخلايا الظهارية، حيث تستخدم هذه الخلايا السرطانية الـ E-cadherin من أجل الارتباط بالخلايا الظهارية الطبيعية وتحريك جسمها. (d) غزو الخلية السرطانية للطبقة الظهارية، حيث تقوم وصلات التصاق الـ E-cadherin بين الخلايا السرطانية والخلايا الطبيعية بتسهيل الغزو.

البنكرياس والقولون والمستقيم والرئة والثدي لدى البشر أظهر التحليل النسيجي المرضي أن مجموعات الخلايا الغازية عند مقدمة السرطان إيجابية للـ E-cadherin.

يتم دفع الهجرة الجماعية بواسطة عوامل النمو والسيوتوكينات وربيطات المطرق خارج الخلوي وتتحول الخلايا الأكثر استجابة لهذه المحفزات إلى خلايا قائدة للمجموعة. تخضع الخلايا القائدة لعملية التحول الظهاري السدوي وتكتسب النمط الظاهري السدوي بينما تظل متصلة بالخلايا التابعة التي يمكنها الحفاظ على القطبية القمية القاعدية الظهارية. ترتبط الخلايا المتحركة جماعياً ببعضها البعض بواسطة عوامل التصاق بشكل أساسي Ajs القائمة على الـ E-cadherin. تدعم Ajs القطبية الأمامية-الخلفية في الخلية القائدة وتنشيط تكوين النتوء في الخلايا التابعة. كما تم توضيحه سابقاً فإن التوزيع غير المتماثل للوصلات القائمة على الكادهيرين N أو E في مجموعة الخلايا كافٍ لتعزيز استقطاب

الخلايا نحو الحافة الحرة. تساهم الموصلات القائمة على الكادهيرين في تنسيق الهجرة الجماعية عن طريق تقييد نشاط الأقدام الصفاحية في مناطق التلامس بين الخلايا وتحفيز نتوءات الغشاء التي يقودها Rac [30].

٣.١.٣. الكادريينات والكاتينينات في سرطان الثدي:

يرتبط تطور سرطان الثدي وقدرته على الغزو والانتشار إلى مواقع بعيدة ارتباطاً وثيقاً بفقدان E-cad، وقد ثبت أن تعطيل E-cad يرتبط بنمط عدواني من سرطان الثدي وخاصة الغزو للمفاوي الوعائي والنقائل في العقد اللمفاوية الإبطية. تعد المؤشرات الحيوية الجزيئية التنبؤية أساسية لتقييم خطر نكس الورم بعد العلاج [26]. قامت العديد من الدراسات بتقييم الآثار السريرية المحتملة لتعطيل E-cad في سرطان الثدي: قام تحليل تلوي حديث يشتمل على دراسات تراجمية شملت ٧٣٥٣ مريضة بسرطان الثدي بتقييم علاقة E-cadherin مع كل من OS و DFS والعوامل السريرية المرضية في سرطان الثدي، حيث ارتبط انخفاض تعبير E-cadherin الغشائي بشكل كبير بـ OS و DFS. علاوة على ذلك ارتبط التعبير المنخفض لـ E-cadherin بحجم الورم وحالة العقدة اللمفاوية ومرحلة TNM والدرجة النسيجية. بالتفصيل، ارتبط انخفاض التعبير عن E-cad بشكل كبير بحالة العقدة اللمفاوية (إيجابية مقابل سلبية) وحجم الورم (≥ 2 سم مقابل < 2 سم) والدرجة النسيجية (III-IV مقابل I) ومرحلة TNM (T3/T4 مقابل T1/T2) [26].

في سرطان الثدي يرتبط فقدان الجزئي أو الكلي لتعبير E-cadherin بفقدان خصائص التمايز واكتساب القدرة على الغزو وزيادة درجة الورم والسلوك النقيلي وسوء الإنذار. علاوة على ذلك يمكن أيضاً ربط انخفاض التعبير عنه ببعض سرطانات الثدي غير الفصيصية من النمط الظاهري الثلاثي السلبية. كشفت تحليلات تشوي وزملاؤه Choi et al أن فقدان E-cadherin في السرطان الغازي أكبر منه في السرطان القنوي الموضع DCIS، وفي دراسة سابقة أفاد تشاو وزملاؤه Chao et al عن إستعادة التعبير عن E-cadherin في الأورام النقيلية البعيدة الناشئة عن الأورام الأولية منخفضة التعبير أو السلبية لـ E-cadherin، حيث وثق الباحثون في تلك الدراسة تعبيرية قوية لل E-cadherin في أكثر من ٥٠٪ من نقائل الكبد والدماغ والرئة الناشئة عن سرطان الثدي القنوي الغازي [1].

يُلاحظ ارتفاع التعبير عن N-cadherin بشكل أكثر وضوحًا بين سرطانات الثدي الشبيهة بالقاعدية Basal-like وكذلك في الأورام الالجابية للHER2. تُظهر أورام الثدي الشبيهة بالقاعدية العدوانية سريريًا تعبيراً أعلى عن N-cadherin، وخاصة بالقرب من المناطق الغنية بالأوعية الدموية. ارتبط ارتفاع تنظيم N-cadherin في الخلايا السرطانية التي قل فيها E-cadherin بازدياد حركية الخلايا وبناتج سريرية سيئة لدى المرضى [9].

يؤدي التراكم النووي لـ β -catenin الناتج عن إشارات Wnt الشاذة أو طفرة جين β -catenin إلى سرطان الثدي. بالاشتراك مع LEF/TCF يقوم بيتا كاتينين النووي بتنشيط الجين الذي يشفر السيكلين D1 والذي يحفز فرط التصنع في الثدي، كما يعمل بيتا كاتينين النووي على زيادة التعبير عن البروتينات المؤيدة للغزو، لذلك يؤثر التوزيع الخلوي للبيتا كاتينين بشكل ملحوظ على النمط الظاهري وسلوك الخلايا السرطانية. قد يكون تراكم بيتا كاتينين السيتوبلازمي المفرط أيضًا علامة خبيثة لسرطان الثدي، بسبب وجود علاقة معينة بين بيتا كاتينين السيتوبلازمي والنووي في السرطانات الغدية [32]. قدم براساد وزملاؤه Prasad et al أدلة سريرية تدعم زيادة تنظيم إشارات Wnt/ β -catenin في سرطان الثدي القنوي الغازي. وأبلغ تشوي وزملاؤه Choi et al عن زيادة التعبير عن بيتا كاتينين في السرطانات الغازية مقارنة بالسرطان القنوي الموضع، وخاصة في سرطانات النمط القاعدي [1].

إن التعبير الشاذ عن β -catenin كما تم تحديده من خلال تقييم موقعه الخلوي يشكل علامة بديلة لتنشيط مسار إشارات Wnt وقد تم الإبلاغ عنه في مجموعة فرعية من سرطانات الثدي. ومع ذلك فإن ارتباط تنشيط مسار β -catenin/Wnt بالنتائج السريرية والآليات التي تؤدي إلى تنشيطه في سرطانات الثدي لا يزال موضع جدل، حيث أظهرت بعض الدراسات أن التغيرات التراكمية في أكثر من مناهض لل Wnt وزيادة تراكم β -catenin تلعب دورًا مهمًا في تطور سرطان الثدي بينما أظهرت دراسات أخرى أن التغيرات في مسار Wnt مرتبطة ببرمجة EMT لكن β -catenin وحده لا يكفي لتحريض EMT [9].

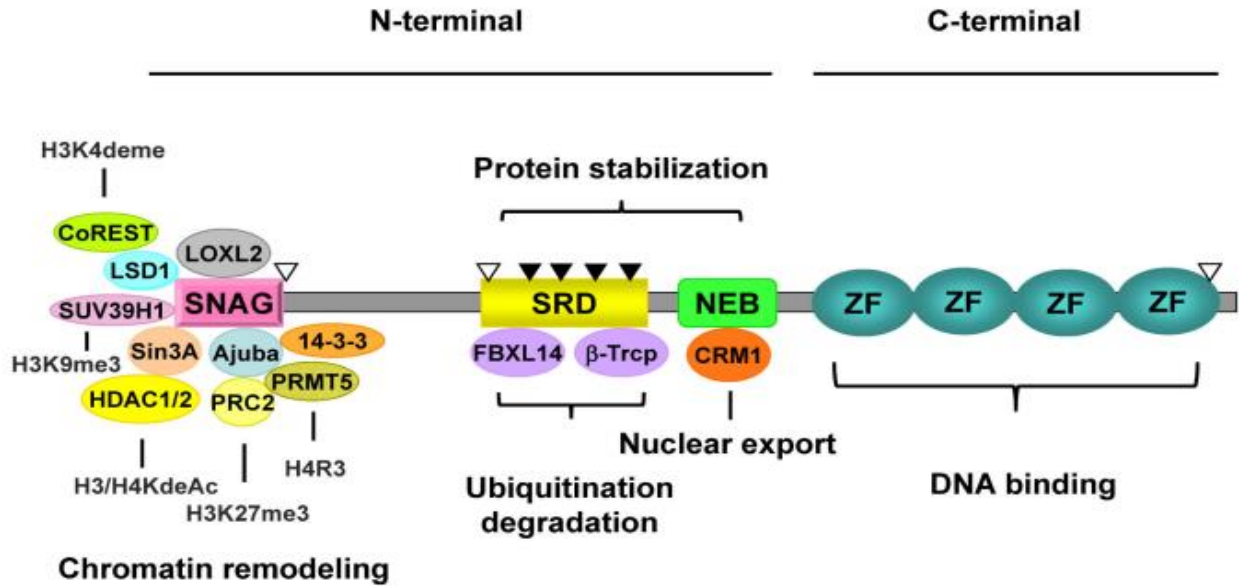
يلعب معقد E-cadherin/ β -catenin دورًا أساسيًا في الحفاظ على سلامة الظهارة ويؤثر التعبير الشاذ وتعطيل هذا المعقد على ذخيرة الالتصاق في الخلية ويرتبط بمجموعة متنوعة من الأورام الخبيثة الناتجة عن عملية ال-EMT. كما ذكر أعلاه في ظل الظروف العادية يتم التعبير عن هذه الجزيئات في الغشاء السيتوبلازمي للخلايا الظهارية، حيث تتفاعل المجالات السيتوبلازمية لـ E-cadherin مع β -catenin وهذا الفعل المتبادل أمر بالغ الأهمية لوظيفة الالتصاق لـ E-cadherin. في المقابل في ظل الظروف المرضية مثل السرطان قد يتم تدمير التفاعل بين المجالات السيتوبلازمية لـ E-cadherin و β -catenin مما يؤدي إلى ضعف التصاق الخلية بالخلية. استنادًا إلى وظائفه البيولوجية يُعتبر E-cadherin مثبطًا للغزو والنقائل. أظهرت الدراسات أن التعبير الشاذ عن E-cadherin وال- β -catenin يرتبط بزيادة الغزو والنقائل في عدد من سرطانات الإنسان بما في ذلك سرطان الثدي. من المعروف أن فقدان التعبير عن E-cadherin هو سمة نسيجية مميزة لسرطان الثدي الفصيصي. ومع ذلك اقترحت الدراسات الحديثة أن انخفاض التعبير عن E-cadherin قد يكون مرتبطًا بالنقائل البعيدة والنتائج السيئة لسرطانات الثدي غير الفصيصية. من ناحية أخرى وجد أيضًا أن التعبير السيتوبلازمي/النوي الشاذ عن ال- β -catenin يرتبط بسوء الانذار لدى مرضى سرطان الثدي. ومع ذلك فإن الملاحظات حول القيم التنبؤية لـ E-cadherin وال- β -catenin في سرطان الثدي الثلاثي السلبية محدودة أو غير متسقة. علاوة على ذلك فإن الدراسات المتزامنة لكلا البروتينين في سرطان الثدي الثلاثي السلبية نادرة في الأدبيات [33].

٣.٢. Snail:

٣.٢.١. بنية Snail:

تم وصف Snail لأول مرة في ذبابة الفاكهة حيث تبين أنه ضروري لتكوين الأديم السدي mesoderm. بعد ذلك تم العثور على نظائر Snail في العديد من الأنواع من اللافقاريات و الفقاريات. تم تحديد ثلاثة بروتينات لعائلة Snail في الفقاريات: Snail1 (تم وصفه أولاً باسم Snail)، و Snail2 (المعروف أيضًا باسم Slug) و Snail3 الذي تم

وصفه مؤخرًا. تشترك عوامل الانتساخ الخاصة بـ Snail في تشابه هيكلي واسع النطاق، حيث تحتوي على مجال طرفي C مميز مع أربعة إلى ستة أصابع زنك تتوسط ارتباط الـ DNA النوعي بعناصر C/A(CAGGTG) E-box. يحتوي الطرف الأميني لجميع أعضاء Snail الفقاري على مجال (Snail/Gfi) SNAG المحفوظ تطوريًا والذي يعد ضروريًا لربط العديد من معقدات تثبيط الانتساخ. في المنطقة المركزية من Snail تم العثور على مجال غني بالسرين



الشكل رقم (١٦): شكل ترسمي يوضح بنية الـ Snail

يحتوي Snail على مجال SNAG للطرف N ومجالات إصبع الزنك للطرف C. يتفاعل المجال SNAG في الطرف N مع العديد من المثبطات ومعقدات إعادة التشكيل التخلقية، أما مجالات غصبع الزنك في الطرف C تكون مسؤولة عن ربط الـ DNA. يتحكم المجال الغني بالسرين SRD وإشارة التصدير النووي NES باستقرار وتموضع بروتين الـ Snail. المثلثات في الشكل تشير إلى مواقع الفسفرة.

(SRD) وإشارة تصدير نووي (NES) التي تقوم بتنظيم استقرار بروتين الـ Snail والتموضع الخلوي له على التوالي.

تعمل بروتينات Snail كمثبطات للانتساخ وتعتمد أنشطتها على مجال إصبع الزنك ومجال SNAG الطرفي الأميني

(Gfi/Snail) [34]. (الشكل رقم ١٦)

يتم التحكم في انتساخ SNAIL1 بواسطة سبيل TGF-β و Smads التقليدي. وفي كثير من الحالات يؤدي التداخل

مع هذا المسار إلى تقليل mRNA لـ SNAIL1. NFκB هو محفز قوي آخر لانتساخ SNAIL1، الإيثروبوتين أيضًا

يزيد من ارتباط وحدات NFκB بمعزز SNAIL1. يؤدي الإفراط في التعبير عن v-PKB إلى زيادة RNA لـ SNAIL1.

يتضمن تأثير PKB العديد من العوامل اللاحقة لأن بروتين الكيناز هذا ينظم RNA الخاص ب-SNAIL1 من خلال تنشيط NFκB وفسفوريل Smad3. عامل آخر موثق جيداً ينظم انتساخ SNAIL1 هو STAT3. أشارت اختبارات ترسب الكروماتين المناعي في الخلايا السرطانية غير النمطية المقاومة للسيبلائين إلى أن STAT3 يرتبط أيضاً بمعزز SNAIL1 في منطقة أبعد من NFκB. وجد أن STAT3 يعزز تحريض SNAIL1 بواسطة TGF-β بالتعاون مع Ras [35].

٣.٢.٢. دور Snail في التحول الظهاري السدوي والسرطان:

Snail هو منظم رئيسي للتحول الظهاري السدوي لخلايا الأورام الظهارية. فهو يكبح بشكل مباشر انتساخ جزئي التصاق الخلايا E-cadherin بينما يحفز انتساخ الجينات السدوية. وقد أظهرت العديد من الدراسات أن التعبير النووي عن Snail هو عامل إنذاري سلبي في السرطان. وجد شين وزملاؤه Shin et al. أن التعبير النووي عن Snail مرتبط بشكل كبير بتطور الورم ونقائل العقد اللمفاوية وقصر فترة البقاء على قيد الحياة في سرطانات المعدة. وبالمثل يرتبط التعبير النووي عن Snail بمرحلة الورم ودرجته الأعلى ويشكل مؤشراً إنذارياً مستقلاً لمعدل البقاء الخالي من النكس RFS في سرطان الخلايا الظهارية البولية ويرتبط بسلوك الورم العدوانية وسوء البقاء على قيد الحياة OS في سرطان الخلايا الكبدية [36]. كما لوحظ أن مستوى التعبير عن Snail مرتفع في الآفات النقيية في سرطان المبيض. إن تثبيط Snail يشبط بشكل كبير نمو الورم ونقائله عن طريق زيادة الخلايا اللمفاوية المتسللة إلى الورم والاستجابات المناعية الجهازية لذلك يعد Snail هدفاً فعالاً لمنع النقائل [34].

الآلية الأساسية لـ EMT المستحث بواسطة Snail1 هي كبح E-cadherin مما يتسبب في انخفاض التصاق الخلايا ويعزز القدرة على الهجرة. يوفر التوضيح الإضافي لدور Snail1 في EMT نظرة ثاقبة مهمة في تطور السرطان النقيلي. بالإضافة إلى ذلك تم مؤخراً إثبات تورط Snail1 في تنظيم مقاومة الأدوية/المناعة وتنظيم نمط الخلايا الجذعية السرطانية CSC [37]. الخلايا الجذعية التي تتمتع بإمكانات تكاثرية غير محدودة وعمر طويل، هي الأساس لاستقرار

الأنسجة في الكائن الحي البالغ. تسهل عملية EMT تكوين الخلايا الجذعية السرطانية ذات السمات السدوية المطلوبة للانتشار بالإضافة إلى خصائص التجديد الذاتي اللازمة لبدء الأورام الثانوية. يؤدي تحريض EMT في الخلايا الظهارية الثديية البشرية الخالدة (HMLE) عن طريق التعبير غير الطبيعي عن Snail أو Twist أو التعرض لـ $TGF-\beta$ إلى زيادة القدرة على تكوين كرات ورمية tumor-spheres وإنتاج خلايا غنية بواسمات CD44high/CD24low. تتبنى هذه الخلايا النمط الظاهري السدوي وهي تشبه الخلايا الجذعية السرطانية في الثدي [34]. أظهرت دراسة حديثة أن تحريض EMT يمنح الخلايا خصائص الخلايا الجذعية. يزيد التعبير غير الطبيعي عن Snail بشكل كبير من تكوين mammospheres والتي تحتوي على مجموعات غزيرة من الخلايا الجذعية الظهارية. وبالتالي فإن الإفراط في التعبير عن Snail لا يحفز EMT فحسب، بل يؤدي أيضًا إلى اكتساب خلايا الجذعية السرطانية [38].

تقليل التعبير عن Snail1 أثبت تورط Snail1 في مقاومة الورم للعديد من الأدوية الكيميائية والعلاجات المناعية. في الورم الميلانيني melanoma يؤدي تثبيط Snail1 نتيجة لعلاج siRNA إلى إيقاف نقائل الورم وكبح المناعة. بالإضافة إلى ذلك تم ربط Snail1 بمقاومة المعالجة الإشعاعية والباكليتاكسيل paclitaxel في سلالات خلايا سرطان المبيض وكذلك الحماية ضد 5-fluorouracil وجيمسيتابين gemcitabine في خلايا Panc-1. كما يلعب Snail1 دوراً في المقاومة الدوائية بسبب مشاركته في مسارات البقاء، حيث يؤدي تنشيط Snail1 لمسارات البقاء MAPK و PI3K إلى مقاومة $TNF-\alpha$. يؤدي كبح NF- κ B وبالتالي Snail1 إلى حساسية خلايا الورم لـ cisplatin و TNF-related apoptosis-induced apoptosis (TRAIL). أفاد أكالاوي وزملاؤه Akalay et al. أن الإفراط في التعبير عن Snail1 في سلالات خلايا سرطان الثدي أدى إلى مقاومة القتل بواسطة CTL [37]. يعزز التعبير الشاذ عن Snail و/أو Slug مقاومة موت الخلايا المبرمج في خلايا MCF7 المعرض من قبل عامل العلاج الكيميائي المدمر للحمض النووي doxorubicin ويترافق ذلك باكتساب خصائص النمو الغازية. باستخدام نموذج فأر متحول وراثيًا لدراسة نكس أورام الثدي المستحثة بواسطة HER2/neu وجد أن Snail يرتفع تلقائيًا في الأورام الناكسة وأن النكس مصحوب بـ EMT. كما ثبت أن Snail كافٍ لتعزيز نكس الورم الثديي في الجسم الحي وأن

المستويات العالية من Snail تتنبأ بانخفاض البقايا الخالية من النكس لدى النساء المصابات بسرطان الثدي. وهذا ما تؤكد البيانات السريرية أيضًا بأن التعبير العالي عن Snail هو مؤشر مهم لنكس الورم في أورام المثانة السطحية[34].

٣.٢.٣. Snail في سرطان الثدي:

لقد لوحظ تحريض التعبير عن Snail1 في جميع عمليات EMT التي تمت دراستها، وقد ارتبطت مستويات Snail1 المتزايدة بأنواع الأورام الأكثر قدرة على الغزو. يتم التعبير عن Snail2 على نطاق أوسع من Snail1، ويبدو في بعض الحالات أن تعبيره غير مرتبط ب EMT. يتم تحريض كلا الجينين استجابة ل $TGF-\beta$ في الخلايا التي تخضع ل EMT المستحث بواسطة $TGF-\beta$. يتم تحريض التعبير عن Snail1 استجابة ل $TGF-\beta$ بواسطة Smad3 حيث يرتبط Smad3 بمعزز Snail1 وينشط انتساخه. يتوسط Smad3 أيضًا التعبير المستحث بواسطة $TGF-\beta$ عن Snail2 في خلايا MDCK، حيث يشكل Smad3 معقدًا مع عوامل الانتساخ المرتبطة بالمايوكاردين ويرتبط بمعزز Snail2 لتنشيط الانتساخ[23]. بصفته منظمًا حاسمًا لمسارات الإشارة المتعددة المؤدية إلى EMT يرتبط التعبير عن Snail ارتباطًا وثيقًا بنقائل السرطان. لقد ثبت أن Snail مطلوب لنقائل العقد اللمفاوية لخلايا سرطان الثدي البشري MDA-MB-231 [34]. كما تم ربط طفرات بروتينات Smad بتكوين الورم مع حدوث الطفرات بشكل أكثر شيوعًا في Smad4 مقارنة ب Smad2. وتشمل الطفرات المغلطة missense mutations أو فقدان تغاير الزيجوت loss of heterozygosity على الكروموسوم ١٨ q وقد لوحظت هذه الطفرات بشكل متكرر في سرطان البنكرياس بالإضافة إلى الأورام الخبيثة الأخرى. لم يتم تحديد طفرات Smad3 المرتبطة بالسرطان[15]. تم وصف Slug وهو عضو آخر في عائلة Snail بأنه مثبط قوي ل E-cadherin ومحفز رئيسي ل EMT ويرتبط بالنقائل البعيدة. Slug هو وسيط أساسي ل EMT والنقائل المستحثة بواسطة Twist. يحتاج Twist إلى تحريض Slug لكبح التعبير الظاهري ثم يعمل Twist و Slug معًا لتعزيز EMT والنقائل[34].

إن كل من Snail1 و Snail2 يكبحان التعبير عن جين الواسم الظهاري كادهيرين ١ (CDH1) والذي يشفر E-cadherin. إن EMT المستحث بواسطة Snail يرجع إلى الكبح المباشر لانتساخ E-cadherin. Snail هو الكابت الأكثر شهرة لعبيرية ال E-cadherin. ينتج EMT المستحث بواسطة Snail تغييرات بيوفيزيائية متضافرة بسبب تغير التعبير الجيني للهيكل الخلوي. التغييرات البيوفيزيائية المرتبطة بنقائل السرطان بما في ذلك قوى الجر المرتفعة وفقدان الهيكل الخلوي والبنية النووية يتم تحريضها مباشرة بواسطة EMT في غياب أي إشارات بيئية خارجية. يعزز Snail عملية ال EMT في خلايا سرطان الثدي جزئياً عن طريق تنشيط ERK2 النووي. علاوة على ذلك فإن الإفراط في التعبير عن Snail في خلايا سرطان الثدي MCF-7 يحفز EMT وزيادة هجرة الخلايا وتقليل التصاق الخلايا وزيادة استحداث الورم. كما يلعب العضو الثاني من عائلة Snail وهو Slug دوراً رئيسياً أثناء EMT حيث يمكن كبح الانتشار النقيلي لسرطان الثدي الثلاثي السلبية عن طريق منع نشاط Slug والذي قد يثبط تشكل النقائل العظمية [1]. مؤخراً تم اكتشاف الارتباط بين Snail والتنظيم الجيني ل EMT. وجدت دراسات متعددة أن Snail يجند العديد من الإنزيمات المعدلة للكروماتين مثل LSD1 و G9a و Suv39H1 و HDAC1/2 و PRC2، من أجل كبح انتساخ معزز ال E-cadherin مما يؤدي إلى إسكات تعبيرية E-cadherin. على سبيل المثال يتفاعل Snail بشكل منفصل مع مثيل ترانسفيرازات اليوكروماتين G9a و Suv39H1 المسؤولة عن H3K9me2 و H3K9me3 على التوالي ويجندها لتعديل كروماتين معزز E-cadherin. أدى إسقاط G9a أو Suv39H1 إلى استعادة تعبير E-cadherin عن طريق منع هذه التنظيمات الجينية التي توسطها Snail، مما أدى إلى تثبيط هجرة الخلايا وغزوها ونقائلها في BLBC [38].

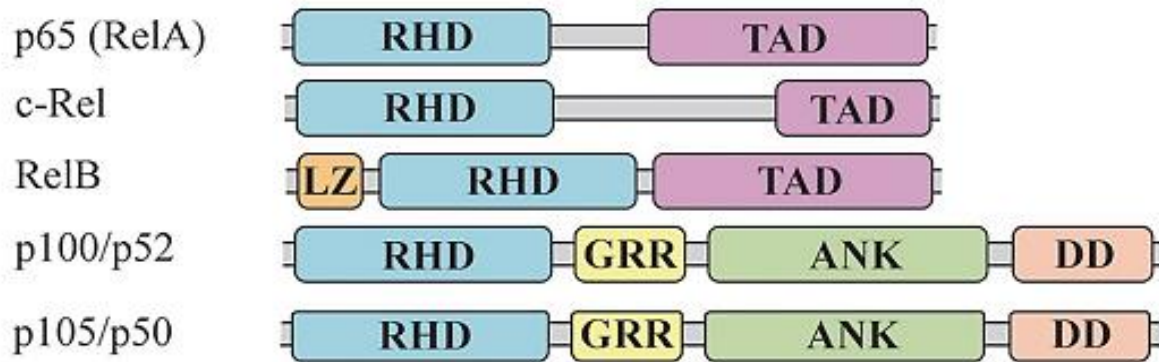
٣.٣. Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)

NF- κ B هو عامل انتساخ رئيسي يربط الالتهاب بالسرطان. وقد ثبت أنه يشارك في تكوين الأورام في سرطان الثدي ومقاومة العلاج الهرموني. ويلعب NF- κ B دوراً أساسياً في إدارة الالتهاب والتكاثر وبقيا الخلايا.

٣.٣.١. البنية والوظيفة:

تنظم عائلة عوامل الانتساخ Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) عددًا كبيرًا من الجينات المشاركة في العديد من الوظائف بما في ذلك البقاء والتكاثر والاستجابات المناعية [39]. في عام ١٩٨٦ تعرف سين وزملاؤه Sen et al.

NF- κ B subunits



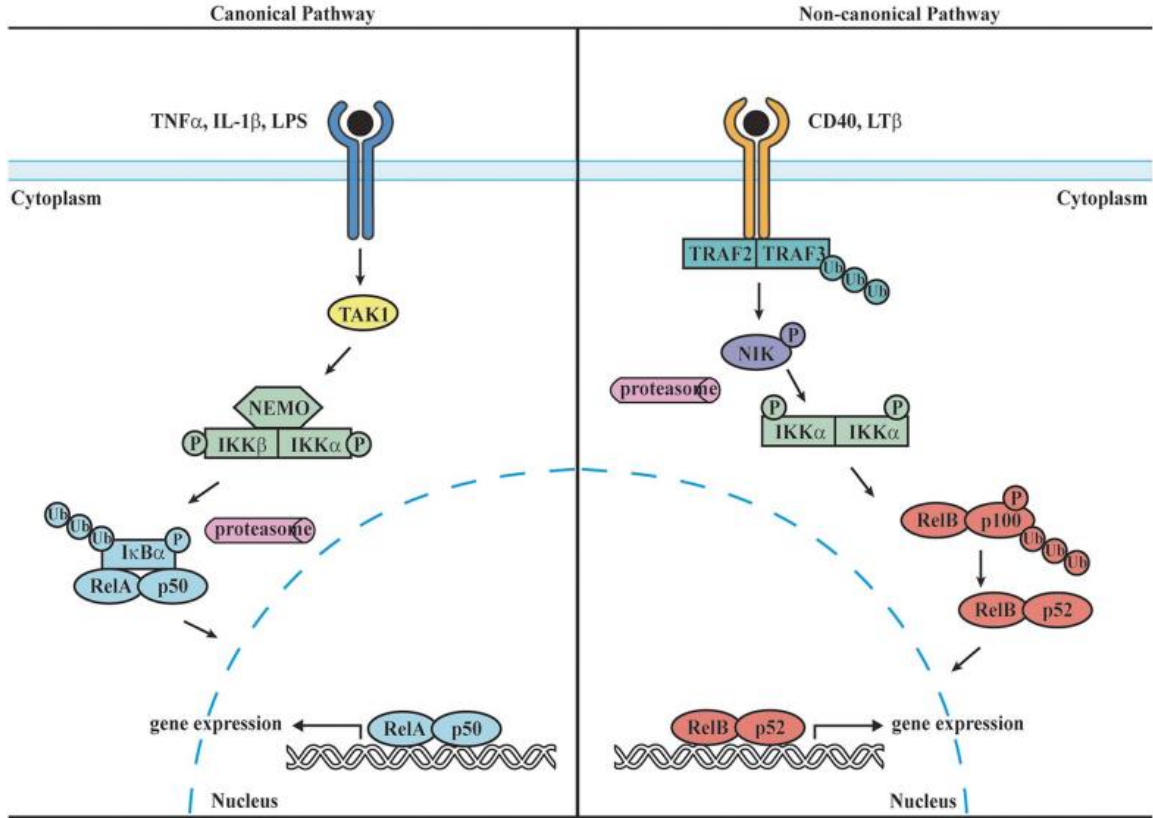
الشكل رقم (١٧): شكل ترسمي لبنية NF- κ B

تتشارك أفراد العائلة في مجال التماثل النسبي RDH الضروري لربط الـ DNA، المجالات الوظيفية للوحدات الفرعية هي TAD (مجال تنشيط الانتساخ) و LZ (سحاب الليوسين) و GRR (المجال الغني بالغليسين) و ANK (متواليات الانكرين) و DD (مجال الموت)

على NF- κ B في نوى الخلايا للمفاوية البائية الناضجة كعامل انتساخ يرتبط بـ DNA في معزز السلسلة الخفيفة من الجلوبيولين المناعي كابا [40]. NF- κ B هي عائلة من عوامل الانتساخ تشمل NF- κ B1 (p50) و NF- κ B (p52) و RelA (p65) و RelB و C-Rel [41]. وكلها تحتوي على منطقة طويلة محفوظة للغاية يبلغ طولها ٣٠٠ ثمانية تسمى مجال التماثل Rel (RHD) وهي مسؤولة عن ترابط الجزيئات (dimerization) والتعرف على DNA وربط DNA وتوضع النواة (الشكل رقم ١٧). يمكن تقسيم أعضاء عائلة NF- κ B إلى مجموعتين فرعيتين بناءً على التسلسلات الطرفية C لـ RHD. تحتوي المجموعة الأولى المكونة من RelA و RelB و c-Rel على منطقة طرفية C نشطة، بينما تحتوي المجموعة الأخرى المكونة من p50/p105 و p52/p100 على طرفها C على عنصر بنيوي يدعى

مجال الموت (DD). يمكن لأعضاء كل مجموعة تكوين ثنائيات متماثلة وغير متماثلة بين وداخل الخلايا. اعتماداً على وجود أو غياب المجال المنشط للانتساخ فإنها تعمل إما كمنشطات أو كبحات للانتساخ [39]. الطرف الأميني الذي يحتوي على Rel مسؤول عن ربط DNA النوعي بينما الطرف الكربوكسيلي مسؤول عن الارتباط بعوامل الانتساخ الأخرى [41]. يوجد NF- κ B في السيتوبلازم كشكل غير نشط عن طريق تشكيل معقد مع الوحدات المثبطة I κ B- α أو I κ B- β أو I κ B- γ (والذي يعرف أيضاً باسم NEMO). في معظم الخلايا غير المحفزة تكون ثنائيات NF- κ B غير نشطة بسبب الارتباط ببروتينات I κ B التي تحجب تسلسل التوضع النووي لـ NF- κ B وبالتالي الاحتفاظ به في السيتوبلازم ومنع ارتباطه بال DNA [42]. بينما تفكك الوحدات المثبطة (I κ Bs) يؤدي إلى تنشيط وانتقال NF- κ B بسرعة إلى النواة للارتباط بـ DNA [41]. على سبيل المثال تحفيز الخلايا عن طريق السيتوكينات المؤيدة للالتهابات مثل TNF- α و IL-1 يؤدي إلى فسفرة I κ B عند ثمانية سيرين تقع داخل المجال الطرفي الأميني للبروتينات. تؤدي فسفرة I κ B هذه إلى وبكنة ubiquitination ثمانية اللايسين القريبة والتي تمثل إشارة للتحلل بواسطة بروتيازوم 26S. يؤدي تحلل بروتينات I κ B إلى تحرير NF- κ B مما يسمح بالانتقال إلى النواة والارتباط بـ DNA في المناطق التنظيمية لمجموعة من الجينات المستهدفة [42]. ثم تبدأ الوحدة الفرعية p65 نشاطها الانتساخي وتحفز التعبير عن جينات NF- κ B المستهدفة التي تمنع موت الخلايا المبرمج وتشكل شبكة تنظم دورة حياة الخلية وتعزز غزو الخلايا والالتهاب وتكوين الأورام والنقائل وفي النهاية تسبب مقاومة العلاج الإشعاعي والكيميائي [41].

يتم تنظيم NF- κ B من خلال مسارات الإشارات التقليدية (CS) (يتم تنشيطها بواسطة IL-1 و TNF- α و ROS و LPS) ومسارات الإشارات غير التقليدية (NCS) والتي يتم تنشيطها بواسطة المحفزات الالتهابية من خلال IKK α [41] (الشكل رقم ١٨). يتضمن مسار التنشيط التقليدي التحلل البروتيني الناجم عن إشارات I κ Bs وخاصة I κ B α والذي يتم تنظيمه بواسطة كينازات I κ B. عند التنشيط بواسطة الإشارات المؤيدة للالتهابات تقوم IKKs بفسفرة ثمالي السيرين في مجال استقبال الإشارة الطرفي الأميني لـ I κ Bs، مما يؤدي إلى وبكنة متعددة polyubiquitination لثلاث اللايسين المجاورة وينتج عن ذلك تحلل I κ Bs في البروتيازوم وتحرير NF- κ Bs [39].



الشكل رقم (١٨): تفعيل إشارات NF-κB بالطريق التقليدي وغير التقليدي

يتم تنشيط المسار التقليدي عن طريق ارتباط السيٲوكينات المولدة للالتهاب (مثل IL1B و TNF-a) بمستقبلاتها على سطح الخلية. يؤدي هذا إلى تفعيل TAK1 والذي ينشط بدوره معقد IKK المتكون من المنظم NEMO والوحدتين التحفيزيتين IKKα و IKKβ. بعد ذلك يقوم معقد IKK المفعل بفسفرة بروتين IκB مما يؤدي إلى وبكنة IκB وتقويضه. يتم تحرير ثنائيات ال NF-κB الكلاسيكية ونقلها للنواة لتنظم التعبير الجيني. يتم تنشيط المسار غير التقليدي من خلال مجموعة محددة من المحفزات تنشط عائلة ال TNFR مما يؤدي إلى استقرار وتراكم كيناز NIK، زيادة تركيز بروتين NIK يؤدي إلى فسفرة IKKα والذي بدوره يفسفر بروتين p100 وذلك يؤدي إلى تقويضه جزئياً وتحويله إلى الودة الفرعية p52 المفعله. تشكل ال p52 ثنائياً متغائراً مع RelB والذي ينتقل إلى النواة وينشط انتساخ الجينات المستهدفة.

من المعروف أن مجموعة مختارة من محفزات التمايز والنمو والتي تنتمي في معظمها إلى عائلة مستقبلات عامل نخر الورم (TNFR) تعمل على تنشيط المسار غير التقليدي. ويتميز هذا المسار بمعالجة بروتين السلف NF-κB وهو p100 من خلال فسفرة شمالة السيرين الطرفية C بواسطة الكيناز المحفز ل NF-κB (NIK) و/أو IKKα. ثم يتم دمج الوحدة الفرعية p52 المعالجة مع RelB لدخول النواة لتنظيم انتساخ الجينات المشاركة في نمو الأعضاء للمفاوية ونضج الخلايا البائية وتمايز الخلايا الناقضة للعظم والاستجابات المناعية الذاتية والالتهابية على نطاق واسع. إن

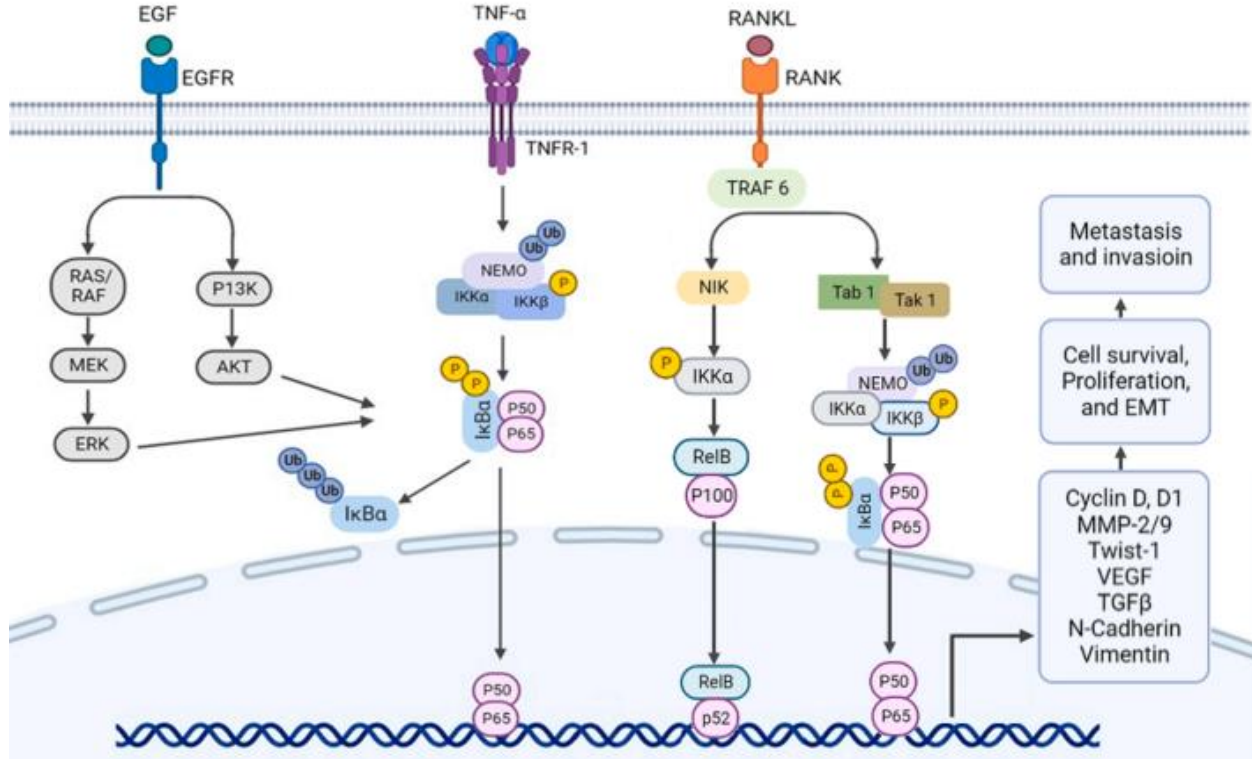
تنشيط NF- κ B من خلال المسار التقليدي سريع ولكنه مؤقت وينتهي بإعادة تخليق بروتينات I κ B بواسطة NF- κ B، مما يعطل ارتباط NF- κ B بـ DNA ويؤدي إلى تصدير عوامل الانتساخ مرة أخرى إلى السيتوزول. وعلى النقيض من ذلك فإن التنشيط غير التقليدي بطيء بسبب اعتماده على استقرار NIK المنظم بواسطة الوبكنة [39].

هناك أدلة متزايدة على أن NF- κ B يشارك في تنظيم موت الخلايا المبرمج ويبدو أن دوره معقد للغاية ويشمل كل من المسارات المؤيدة والمناهضة لموت الخلايا المبرمج. وقد أشارت العديد من الأدلة إلى تورط NF- κ B في نمو وتطور الغدد الثديية. أدى تثبيط NF- κ B إلى تعزيز موت الخلايا المبرمج بواسطة TRAIL (عامل نخر الورم المرتبط بالربطة المحفزة لموت الخلايا المبرمج) في خطوط خلايا سرطان الثدي، كما أدى تنشيط NF- κ B بواسطة HER-2/neu إلى منع موت الخلايا المبرمج المستحث بعامل نخر الورم TNF. وقد اقترحت أدلة أخرى أن NF- κ B حفز تكاثر الخلايا الظهارية وتفرعها في ظهارة الثدي لدى الفئران، وتثبيط موت الخلايا المبرمج في ظهارة الثدي لدى الفئران [40].

٣.٣.٢ دور NF- κ B في التحول الظهاري السدوي والسرطان:

تشير البيانات التجريبية والسريرية إلى أن جين NF- κ B ضروري لتشكل الأورام البشرية وتطورها، مما يجعله واسماً محتملاً للأورام الخبيثة وهدفاً علاجياً محتملاً [43]. وقد ثبت أن إشارات NF- κ B متورطة في جوانب متعددة من تكوين الأورام، بما في ذلك الإشارات المؤيدة للالتهابات وتمايز الخلايا والهجرة وإعادة تشكيل الأنسجة. وقد أظهرت الأبحاث السابقة الطفرات في الجينات التي تشفر منظمات NF- κ B في عدد كبير من سرطانات الإنسان، وخاصة تلك التي تنشأ من الخلايا المناعية مثل اللوكيميات (الابيضاضات) والأورام اللمفاوية (اللمفومات). وفي الآونة الأخيرة اقترحت الدراسات أن NF- κ B يلعب دوراً أساسياً في تحريض والحفاظ على النمط الظاهري الغازي في السرطان بما في ذلك عملية التحول الظهاري السدوي والنقائل [39]. وقد ثبت أن المستويات العالية من NF- κ B ضرورية لتحول النمط الظاهري لخلايا ورم لمفوما هودجكين، وتم الكشف عن طفرات في الجين الذي يشفر I κ B α في بعض حالات لمفوما

هودجكن. وفي الوقت نفسه برز نشاط NF- κ B النووي كعلامة مميزة للعديد من أنواع اللوكيميا الأخرى والأورام اللمفاوية والأورام الصلبة. ورغم أن الدور الدقيق لNF- κ B في التسبب في الأورام البشرية لا يزال غير محدد فإن كبح موت



الشكل رقم (١٩): مسارات NF- κ B في السرطان والنقائل

يقوم الـ TNF- α بتنشيط معقد p50/p65 والذي ينظم كل من cyclin D و MMP2 و D1. ارتباط الـ RANKL بمستقبله يفعل TRAF 6 والذي يفعل بدوره Table1/Tak1 و NIK. يقوم معقد Table1/Tak1 بتنشيط p50/p65 عبر المسارات التقليدية ويقوم NIK بتنشيط RelB/p52 عبر المسارات غير التقليدية، ويقوم كل من p50/p65 و RelB/p52 بتنظيم التعبير عن cyclin D1. تقوم مسارات PI3K/Akt و Mek/Erk بتوسط من EGFR بتنشيط انتساخ جينات كل من vimentin و N-cadherin و Twist1 و TGF- β و MMP-2/9 و VEGF، والتي بدورها تساهم في الـ EMT و حدوث النقائل.

الخلايا المبرمج له أهمية كبيرة بشكل واضح، حيث أن تثبيط NF- κ B يجعل العديد من خلايا الورم حساسة للمحفزات المسببة للموت بما في ذلك العوامل العلاجية الكيميائية [42]. بالإضافة إلى دوره في بقيا الخلايا السرطانية تم تحديد نشاط NF- κ B أيضًا على أنه يلعب دورًا رئيسيًا في مقاومة العلاج الكيميائي؛ لذلك فإن معرفة الواسمات الجزيئية لـ NF- κ B بالإضافة إلى مسارات الإشارات والتفاعل المتبادل بينها هي أهداف واعدة لاكتشاف حلول لمقاومة العلاج الكيميائي [44].

هناك العديد من التقارير التي تسلط الضوء على الارتباط بين NF- κ B و E-cadherin في Ajs. وجد Solanas et al. أيضًا أن NF- κ B بالإضافة إلى المنشط الانتساخي β -catenin يرتبطان كلاهما بـ E-cadherin في Ajs. يعمل هذا التفاعل على تثبيت AJs وله تأثير مثبط على النشاط الانتساخي لـ NF- κ B و β -catenin، مما يكبح التعبير عن العديد من الواسمات السدوية الأساسية لـ EMT [39]. قام غاو وزملاؤه Gao et al. بالتحقيق في دور البروتين الرابط لعامل النمو المشابه للأنسولين ٢ (IGFBP2) في سرطان القناة البنكرياسية (PDAC)، ووجدوا أن الإفراط في التعبير عن IGFBP2 أدى إلى زيادة كبيرة في التعبير عن Snail وانخفاض التعبير عن E-cadherin عند الموصلات بين الخلايا، وزيادة التعبير عن الواسمات السدوية والتموضع النووي لـ NF- κ B والإفراط في تنشيطه وحل الموصلات بين الخلايا. علاوة على ذلك أظهر توصلوا إلى أن EMT المستحث بواسطة IGFBP2 يعتمد على زيادة تنشيط NF- κ B والذي وجدوا أنه مرتبط بزيادة تنشيط محور الإشارة PI3K/PKB/IKK/I κ B α /NF- κ B. باختصار تشير هذه النتائج إلى أن تفكك الموصلات بين الخلايا وخاصة من خلال التنظيم السليبي E-cadherin يرتبط ميكانيكيًا بزيادة نشاط NF- κ B أثناء EMT سواء من خلال زيادة انتقال NF- κ B إلى النواة و/أو عن طريق زيادة التعبير الكلي و/أو نشاط NF- κ B [39]. (الشكل رقم ١٩)

تم التعرف على NF- κ B باعتباره مشاركًا في عملية EMT ويلعب دورًا مهمًا في تعديل الخصائص المميزة لـ EMT من خلال تنظيم التعبير عن الجينات المرتبطة بـ EMT انتساخيًا وما بعد الانتساخ. غالبًا ما يُستشهد بخلل تنظيم مسار PTEN/PI3K/PKB ومحور CXCL12/CXCR4 بالإضافة إلى تنشيط عائلة الميتالوبروتيناز كمساهمين رئيسيين في عملية اكتساب النمط الظاهري الغازي، وقد أفاد عدد من الدراسات بمساهمة NF- κ B في هذه التغييرات [39].

٣.٣.٣. NF- κ B في سرطان الثدي:

تم اقتراح أن NF- κ B هو هدف علاجي محتمل في السرطان. وقد أثبتت العديد من الدراسات وجود صلة بين NF- κ B وسرطان الثدي. في البداية تم الكشف عن زيادة في التعبير عن NF- κ B في مزارع خلايا سرطان الثدي. وتم الإبلاغ عن أن التعبير عن NF- κ B مرتبط بيولوجياً بعدوانية في سرطان الثدي وسوء الانذار، ومؤشر لمقاومة العلاج الكيميائي. بالإضافة إلى ذلك يعزز كل من HER-2 و EGF تطور الورم عن طريق تحفيز مسار NF- κ B. يكون NF- κ B نشطاً بشكل دائم ويتم اكتشافه في نواة الخلايا السرطانية في العديد من الأورام بما في ذلك سرطان الثدي. وجد سابقاً أن التعبير النووي عن NF- κ B يمكن اعتباره مؤشراً لمقاومة سرطان الثدي للعلاج المساعد. وبالتالي فإن تنشيط NF- κ B قد يوفر استراتيجية فعالة لعلاج السرطان [43]. يتوسط إعطاء إنزيمات توبوايزوميراز SN38 والدوكسوروبيسين تلف DNA وتنشيط NF- κ B عبر المسار الوظيفي لمعقد IKK، مما يتسبب في فسفرة I κ B α وتحلل NF- κ B وبالتالي تنشيط انتساخ الجينات المضادة للموت الخلوي.

في أنسجة سرطان الثدي وجد أن نشاط NF- κ B يزداد في السرطانات السلبية لمستقبلات الاستروجين ER- وخاصة مع تضخيم HER2 [44]. تنشيط NF- κ B في سرطان الثدي هو فقدان التعبير عن ER وفرط تعبيرية HER-2 عبر مستقبل عامل نمو البشرة EGFR ومسار بروتين كيناز المنشط للمايتوجين MAPK. وقد ارتبط فقدان وظيفة ER بنشاط NF- κ B البنيوي و النشاط المفرط ل MAPK بسبب إفراز السيتوكين وعوامل النمو، والتي تتوج في النهاية بسرطانات عدوانية ونقيلية ومقاومة للهرمونات. يمكن أن يؤدي تنشيط PR إلى تثبيط التعبير الجيني ل NF- κ B، مما يقلل من ارتباطه ب DNA ونشاطه الانتساخي. يقوم NF- κ B بتنشيط ال HER-2 من خلال المسار التقليدي الذي يتضمن ال IKK α . يعزز تنشيط NF- κ B بقيا الخلايا السرطانية، حيث يكتسب سرطان الثدي بمرور الوقت طفرات مختلفة وتزداد نسبة الخلايا السلبية لمستقبلات هرمون الاستروجين في الورم. يمنح هذا التحول خصائص بيولوجية عدوانية لسرطان الثدي مثل النمو السريع وضعف التمايز وضعف الاستجابة للعلاج الهرموني. ويلعب مسار NF- κ B دوراً مهماً في هذا [45]. بالإضافة إلى ذلك فقد ثبت أن NF- κ B يثبط نشاط p53، ولأن p53 معروف بأنه

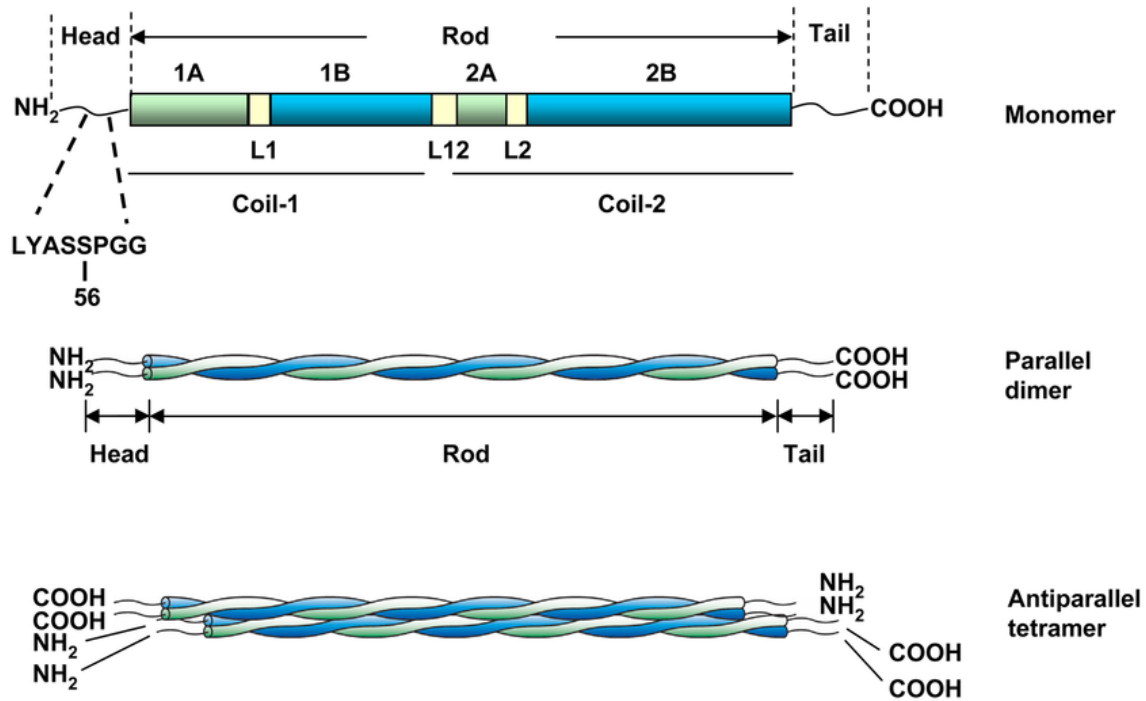
يحفز موت الخلايا المبرمج في الخلايا التي تحتوي على DNA تالف فإن NF- κ B يعزز بقيا هذه الخلايا المتحورة ويؤدي إلى التحول الورمي. تحدث نقائل سرطان الثدي في المقام الأول من خلال الجهاز اللمفاوي، ومدى إصابة العقد اللمفاوية هو عامل إنذاري رئيسي للمرض. وقد تم الإبلاغ عن أن نظام إشارات NF- κ B يحفز عددًا من الجينات المستهدفة المشاركة في تكوين الأوعية الدموية/تكوين الأوعية اللمفاوية. يتم التعبير بشكل مفرط عن كل من أكسيد النيتريك سينثيز وسيكلوأوكسجيناز-2 (COX-2) في سرطانات الثدي المتقدمة، مما يرتبط بزيادة تكوين الأوعية الدموية وإمكانية النقائل في سرطان الثدي. بالإضافة إلى ذلك يتم إفراز عامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF) من خلايا سرطان الثدي حيث يعمل كعامل قوي لتكوين الأوعية اللمفاوية مما يعزز نمو الورم ونقائله. وقد تم الإبلاغ عن أن NF- κ B يعمل على تنظيم VEGF mRNA في خلايا سرطان الثدي، مما يدعم دوره في تكوين الأوعية الدموية والنقائل.

يعزز NF- κ B تنكس المطرق خارج الخلية وبالتالي هجرة خلايا سرطان الثدي عن طريق التحريض المباشر على التعبير عن منشط البلازمينوجين من نوع يوروكيناز (uPA)، وميتالوبروتيناز 9 (MMP-9)، ومستقبل الكيموكين CXCR4 [40]. توضح إشارات NF- κ B الآلية الجزيئية الكامنة وراء EMT المستحث بواسطة ميتالوبروتيناز 3 (MMP3). وقد ثبت أن MMP3 يحفز EMT في الخلايا الظهارية الثديية من خلال زيادة التعبير عن Rac1b وما يتبعه من تحفيز لإنتاج ROS. وقد أكد سيشون وراديسكي Cichon and Radisky أن MMP-3/Rac1b/ROS يحفز حدوث EMT في الخلايا الظهارية الثديية. وقد أدى وجود MMP3 إلى زيادة كبيرة في التعبير عن Snail وتنشيط كبير للانتساخ المسبب للورم، بما في ذلك التغيرات في الانتساخ المتعلقة بالالتصاق بين الخلايا ومورفولوجيا الميزانشيم وحل الموصلات بين الخلايا [39].

٣.٤. الفايمنتين Vimentin

٣.٤.١. البنية والوظيفة:

تعد بروتينات IF من المكونات الرئيسية للهيكل الخلوي. وهي مشفرة بواسطة أكبر عائلة من الجينات في الجينوم البشري وتنقسم إلى أربع مجموعات وفقاً لبنيتها. هذه المجموعات هي: (أ) النوع الأول: الكيراتين (ب) النوع الثاني: الكيراتين الخلوي (ج) النوع الثالث: البروتينات المرتبطة بالـ Vimentin (د) النوع الرابع: الخيوط العصبية.



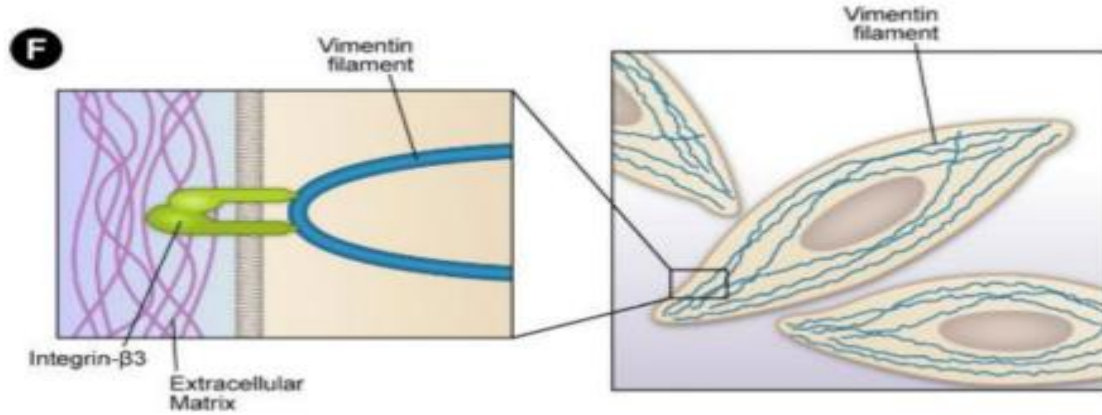
الشكل رقم (٢٠): شكل ترسمي لبنية الـ vimentin

يتألف الفايمنتين من مجال الرأس غير الحلزوني Head ومجال الذيل غير الحلزوني Tail يحصران بينهما مجال العصا الحلزوني Rod

يبلغ حجم بروتين IF من النوع الثالث Vimentin ٥٤ كيلو دالتون ويرتبط بالعضيات الخلوية وعناصر الهيكل الخلوي والاتصاقات الغشائية، مما يعكس تكامله في بنية الخلية ووظيفتها [46]. الـ Vimentin هو بولي ببتيد يتألف من ٤٦٦ حمض أميني مع مجال "عصا" حلزوني عالي الحفظ محاط بمجالات طرفية غير حلزونية N و C هي مجال "الرأس"

(٧٧ ثمالة) ومجال "الذيل" (٦١ ثمالة) على التوالي. ترتبط هذه الجزئيات معاً بالتوازي لتشكيل ملف لولبي، والذي يشكل اللبنة الأساسية للبناء الهيكلي لعائلة البروتينات IF بأكملها (الشكل رقم ٢٠).

من المعروف أن مجالات الرأس في الـ Vimentin المثنوي تشكل بنية متناظرة، وقد تم تحديد ثلاثة مواقع تشير إلى أن المسافة بين مناطق الرأس تزداد عند الفسفرة وهو تعديل ما بعد الترجمة ينظم تجميع/تفكيك الـ Vimentin [47]. تتوسط



الشكل رقم (٢١): توزع خيوط الـ Vimentin في الخلية الميزانشيمية وعلاقتها مع الانتغرين $\beta 3$

أحداث الفسفرة تجميع الـ Vimentin وتتجمع مواقع الفسفرة في المجال الرئيسي للبروتين. تمتد شبكة الـ Vimentin السيتوبلازمية من غشاء الخلية إلى الغشاء النووي حيث تتفاعل مع نيسبرين ٣. يتم تجنيد الـ Vimentin إلى الغشاء الخلوي عن طريق الارتباط المباشر بـ $\beta 3$ integrin بدلاً من الديزموسومات (الشكل رقم ٢١). إن تعطيل integrin $\beta 3$ كافٍ لانحيار خيوط الـ Vimentin حول النواة، في حين أن الإفراط في التعبير عن $\beta 3$ integrin يؤسس شبكة خيوط الـ Vimentin من النواة إلى الغشاء السيتوبلازمي. عند الغشاء السيتوبلازمي يتم تجنيد الـ Vimentin إلى نقاط الالتصاق والتي تعمل في الاستشعار الميكانيكي وتفاعل الخلية مع المطرق خارج الخلية [48].

لوحظ أن الـ Vimentin يظهر نمطاً معقداً مع التعبير الخاص بالأنسجة والتطور. يتم التعبير عن الـ Vimentin في البداية إلى حد كبير في الجنين ثم تدريجياً يصبح محصوراً في الخلايا التي تنتمي إلى سلالة الميزانشيم. يتم التعبير عن الـ Vimentin في الغالبية العظمى من الخلايا المزروعة، حيث يتم في هذه الخلايا تنظيم

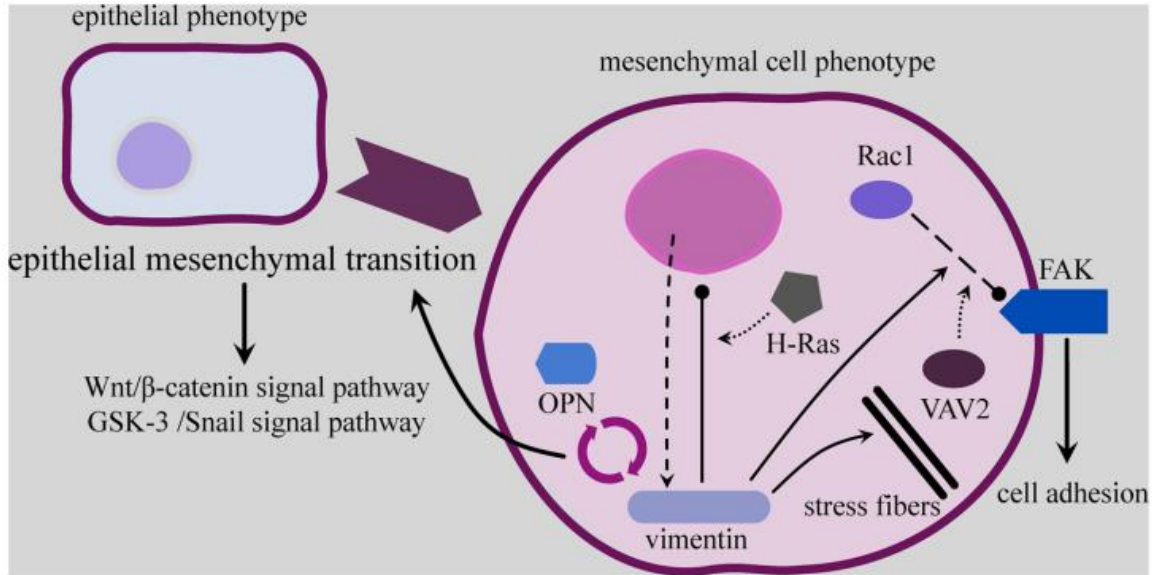
التعبير عن الـ Vimentin من خلال عوامل النمو مثل $TGF-\beta 1$ و FGF و PDGF و $INF-\gamma$ [49]. يشكل الـ Vimentin شبكة مرنة للغاية تحافظ على قابلية الخلية للبقاء من خلال تعزيز قابلية الخلية للتمدد والقوة واللدونة والصلابة من خلال تشتيت الإجهاد الميكانيكي المحلي إلى مناطق أخرى من الخلية؛ وهذا ضروري عندما تكون الخلايا مهاجرة، حيث يقدم فعل الهجرة ضغوطاً فريدة على الخلية نسبة إلى الإجهاد الذي تعاني منه الخلية غير المتحركة [48]. كشفت بعض الدراسات أن فقدان الـ Vimentin يؤدي إلى نمو غير طبيعي للغدة الثديية وتصلب الأوعية الدموية في الشرايين وضعف التئام الجروح [48].

٣.٤.٢ دور الـ Vimentin في التحول الظهاري السدوي والسرطان:

يعد الـ Vimentin العلامة السدوية الأكثر شيوعاً المرتبطة بالتحول الظهاري السدوي. في الجنين يرتبط التعبير عن الـ Vimentin بحركة الخلايا والتي هي من أهم تبعات التحول الظهاري السدوي. على سبيل المثال لوحظ ارتفاع تنظيم الـ Vimentin في تكوين المعيدة gastrulation والعرف العصبي [46]. وأوضحت العديد من الأدلة أن مستوى التعبير عن الـ Vimentin يرتبط ارتباطاً وثيقاً بتطور السرطان [50]. بالإضافة إلى ذلك لوحظ زيادة التعبير عن الـ Vimentin داخل العديد من خطوط الخلايا والأنسجة السرطانية بما في ذلك سرطان البروستات وسرطان الثدي وسرطان بطانة الرحم وأورام الجهاز العصبي المركزي والورم الميلانيني الخبيث وأورام الجهاز الهضمي التي تشمل سرطان البنكرياس والقولون والمستقيم والكبد [49]. كما يتم تنظيمه بشكل تصاعدي في الـ EMT لخلايا سرطان المثانة ويتم تنظيم التعبير عنه بواسطة مسار β -catenin/TCF/LEF1 [46].

يعتمد التعبير عن الـ Vimentin في الخلايا السرطانية وأثناء EMT على تفاعل مُحفز الـ Vimentin مع عوامل الانتساح، والتي تشمل العوامل ذات التأثير الإيجابي مثل AP-1 و NF- κ B و PEA3، والعوامل السلبية التأثير مثل ZBP-89 و ASE و Stat3. بالإضافة إلى ذلك من المرجح أن يتم تنظيم التعبير عن الـ Vimentin بشكل غير مباشر بواسطة مسار β -catenin/Smad/ZEB2/SIP1 أثناء EMT بالتزامن مع هجرة خلايا الورم الثديي [49].

يرتبط التعبير المرتفع والشاذ للـ Vimentin بشكل وثيق بالهجرة والغزو من قبل الخلايا السرطانية، إلى جانب ما يقابله من انخفاض التعبير عن الواسمات الظهارية وهو ما يميز الـ EMT [46]. ينظم الـ Vimentin هجرة الخلايا بناءً على خصائصه البنيوية والإشارات الخاصة به. بالإضافة إلى ذلك يثبط الـ Vimentin البروتينات المرتبطة بالالتصاق البؤري

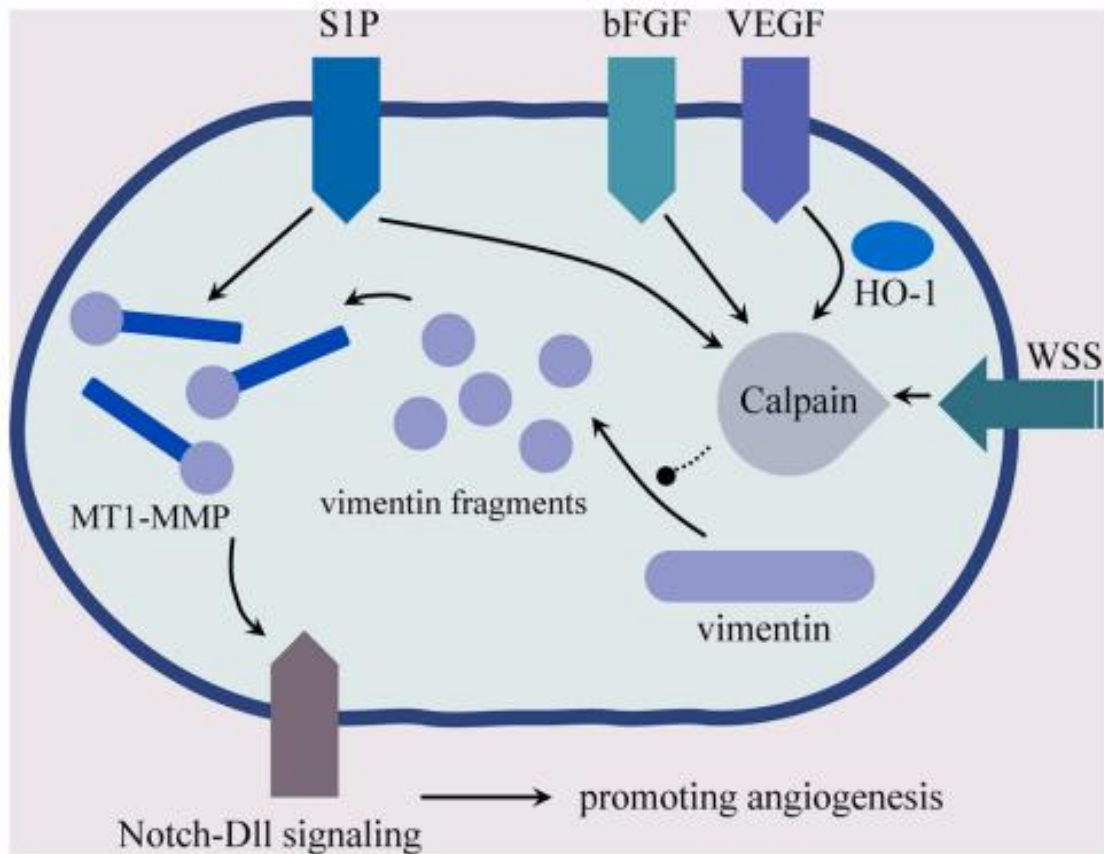


الشكل رقم (٢٢): دور الـ Vimentin في التأثير على الالتصاق بين الخلايا

التعبير عن الـ vimentin يمكن أن يعزز استقرار الـ VAV2 المتواسط بـ Rac1 على كيناز الالتصاق الموضعي وبالمحصلة ينظم الـ vimentin الالتصاق بين الخلايا الورمية. يمكن للتفاعل بين الـ vimentin والـ OPN (osteopontin) أن يحفز عملية الـ EMT بل وينظم مسارات الإشارة فيها مثل Wnt/β-catenin و GSK-3/Snail. قد يثبط H-Ras وظيفة الـ vimentin عن طريق تحفيز نقل موضع الـ vimentin إلى ما حول النواة.

لتحفيز هجرة الخلايا وبالعكس في غياب الـ Vimentin سيتم تثبيط هجرة الخلايا عن طريق الالتصاق البؤري [50]. ينظم الـ Vimentin أيضًا نشاط GTPase Rac1 الصغير، والذي يشارك في بلمرة الأكتين والهجرة [48]. أظهرت دراسة أجراها فيرتاكوفو وزملاؤه Virtakoivu et al. أيضًا أن الـ Vimentin يسهل هجرة الخلايا من خلال الارتباط المباشر بـ Erk وتجنيد Slug للفسفرة التي يتوسطها Erk. تماشيًا مع الدور المعزز لهجرة الخلايا للـ Vimentin من خلال تفاعلاته مع بروتينات الإشارة فقد ثبت أن فرط فسفرة موقع هدف PKB على الـ Vimentin يعزز هجرة وغزو ساركوما الأنسجة الرخوة [51].

تشير التجارب التي أجريت على سرطان الرئة في المختبر إلى أن إسكات الـ Vimentin يقلل من نشاط Rac1 وهو هدف لـ VAV2 (عضو في عائلة VAV الفرعية لعامل تبادل النوكليوتيدات الجوانين)، وبالتالي يؤثر على التصاق الخلايا، وعلاوة على ذلك يمكن للإفراط في التعبير عن Rac1 عكس هذه العملية. توفر هذه النتائج دليلاً قوياً على فكرة أن الـ Vimentin يعزز استقرار كيناز الالتصاق البؤري من خلال تنشيط Rac1 بواسطة VAV2. بالإضافة إلى ذلك يمكن تثبيط هجرة الخلايا بواسطة الـ Vimentin بواسطة H-Ras وقد تكون آلية ذلك أن H-Ras يحفز تجميع الـ Vimentin حول النواة بدلاً من الالتصاق البؤري [50]. (الشكل رقم ٢٢)



الشكل رقم (٢٣): دور الـ Vimentin في تولد الأوعية الدموية

يقوم الكالبيين calpain الذي يتم تفعيله من خلال إشارات محفزة للتولد الوعائي مثل S1P و bFGF و VEGF و WSS بشطر الـ Vimentin إلى أجزاء، وهذه الأجزاء تتحد مع MT1-MMP قبل أن تتم فسفرتها من قبل S1P في الموقع Y573. بعد ذلك يمكن للـ MT1-MMP المفسفرة أن تشارك في مسار Notch-Dll وتعزز في النهاية تولد الأوعية الدموية.

يتم تنظيم دور الـ Vimentin في الهجرة عن طريق الفسفرة. فسفرة الـ Vimentin عند Ser39 المحفزة بواسطة بروتين كيناز ب (AKT1) تتوسط تجميع وتفكيك خيوط الـ Vimentin، في حين أن إزالة فسفرة Ser39 من خلال استبدال الألانين كافٍ لتقليل القدرة على الهجرة والغزو لخلايا الساركوما في الأنسجة الرخوة. وعلى النقيض من ذلك فإن الطفرة المحاكية للفسفور عند الثمالة ٣٩ تؤدي إلى زيادة الهجرة والغزو. تشير هذه النتائج إلى أن السرطانات الغازية من المرجح أن يكون لديها كمية عالية من الفسفرة في هذا الموقع أثناء الهجرة [48]. كما ينظم الـ Vimentin البنية الشبيهة بالكوب "cuplike" للخلايا البطانية لتعزيز هجرة الخلايا. الخلايا البطانية التي يتم تنشيطها بواسطة إشارات مختلفة خارج الخلية داعمة لتكوين الأوعية الدموية مثل سفينجوزين-١-فوسفات (S1P) وعامل نمو الخلايا الليفية الأساسي (bFGF) وعامل نمو بطانة الأوعية الدموية (VEGF)، يتم شطر الـ Vimentin إلى قسيمات. بعد ذلك تتحد هذه القسيمات مع ميتالوبروتيناز المطرق خارج الخلوي ذو النمط الغشائي ١ (MT1-MMP)، ثم يقوم S1P بفسفرة MT1-MMP عند Y573 قبل أن ينتقل المعقد أخيرًا إلى الغشاء مما يؤدي إلى تقويض المطرق خارج الخلية وتكوين براعم بطانة الأوعية الدموية. من ناحية أخرى يعمل مسار نقل إشارة Notch كوسيط رئيسي لتكوين الأوعية الدموية، وقد وجد أن الـ Vimentin يؤثر على تكوين الأوعية الدموية من خلال تنظيم الرابطة النوعية Dll4 لإشارات Notch [50] (الشكل رقم ٢٣). مؤخرًا أظهر أنفولك وزملاؤه Antfolk et. Al. أن الـ Vimentin ينظم أنشطة إشارات رابطة Notch لتكوين الأوعية الدموية، حيث يرتبط الـ Vimentin بروابط Jagged المؤيدة لتكوين الأوعية الدموية وينظم عملية الانتقام الخاصة بها [51]. وقد أكدت العديد من البيانات أن الـ Vimentin يساهم في عملية الغزو في الخلايا السرطانية. وفي المختبر ثبت أن الـ Vimentin مطلوب لحركة الخلايا الليفية المرتبطة بالسرطان أثناء الغزو الجماعي، في حين أن كبت الـ Vimentin يمنع غزو الخلايا السرطانية. تشير جميع النتائج المذكورة أعلاه إلى أن الـ Vimentin يشارك في نقائل الخلايا السرطانية ويسهل تطور الورم. أظهرت نتائج الكشف المناعي الكيميائي أن الـ Vimentin تم اكتشافه في ١٤٥ من ٢٩٥ مريضًا بسرطان الرئة ذي الخلايا غير الصغيرة

وتم التعبير عنه بشكل أساسي في الأنسجة شديدة الغزو. وفي الوقت نفسه أكدت نتائج المتابعة لـ ١٩٣ مريضاً أيضاً أن التعبير عن الـ Vimentin كان مرتبطاً ارتباطاً وثيقاً بنقائل سرطان الرئة ذي الخلايا غير الصغيرة [50].

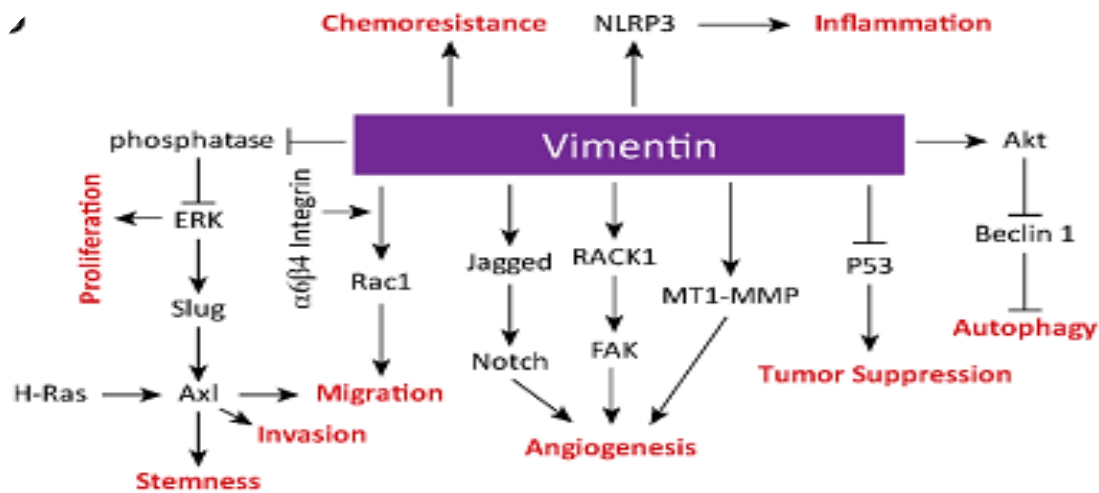
٣.٤.٣. الـ Vimentin في سرطان الثدي:

أظهر التعبير عن الـ Vimentin ارتفاعاً في العديد من خطوط خلايا سرطان الثدي العدوانية، وكان هذا الإفراط في التعبير مرتبطاً بشكل وثيق جداً بزيادة الهجرة والغزو في خلايا سرطان الثدي. علاوة على ذلك أظهرت خلايا MCF-7 غير الغازية زيادة في الحركة والغزو عند الإفراط في التعبير عن الـ Vimentin. ومن المثير للاهتمام أن نلاحظ أن الـ Vimentin تم التعبير عنه بشكل مفرط في خلايا MCF-10A على حافة الجرح في اختبار التنام الجروح وزود الخلايا بإمكانية هجرة خلوية أفضل [47].

أفادت العديد من الدراسات عن الإفراط في التعبير عن الـ Vimentin في الأورام الخبيثة بما في ذلك الثدي [46]. وقد ورد أن معدل التعبير الإيجابي عن الـ Vimentin في المرضى المصابين بسرطان الثدي المبكر كان أعلى من معدل التعبير الإيجابي لدى المرضى المصابين بأورام الثدي الحميدة؛ وقد تم تحديد ذلك من خلال فحص التعبير عن الواسم السدوي Vimentin والواسم الظهاري E-cadherin في المرضى المصابين بسرطان الثدي المبكر أثناء عملية EMT. تشير هذه النتيجة إلى أن الـ Vimentin يلعب دوراً أساسياً في التشخيص المبكر لسرطان الثدي. وبالمثل بالنسبة للتشخيص المبكر لسرطان الثدي، يصل معدل دقة التشخيص اعتماداً على الـ Vimentin فقط إلى ٧٨.٢٪ وتصل النوعية إلى ٨٢.١٪ والحساسية ٧١.٣٪، مما يشير إلى أن الـ Vimentin هو مؤشر حيوي شديد الحساسية والنوعية في التشخيص المبكر لسرطان الثدي [50]. من جهة أخرى يرتبط التعبير عن الـ Vimentin بمؤشرات الإنذار السيء مثل الدرجة النووية السيئة ونقص مستقبلات هرمون الاستروجين [46]. وجد الفحص النسيجي لعينات سرطان الثدي البشري أن التعبير عن الـ Vimentin يوجد بشكل أساسي في سرطانات الثدي القنوية عالية الدرجة ذات مستويات مستقبلات هرمون الاستروجين المنخفضة [47]. أظهر هندريكس وزملاؤه Hendrix et al أن التعبير المشترك

عن الـ Vimentin وخيوط الكيراتين الوسيطة في خلايا سرطان الثدي البشري ينتج عنه نمط ظاهري تحويلي وزيادة في السلوك الغازي [52]. في دراسة حديثة تم الكشف عن التعبير عن الـ Vimentin وأكتين العضلات الملساء smooth muscle acting في ٢٤.٥ و ٩.٨٪ من سرطانات الثدي الثلاثية السلبية على التوالي، بينما كانت النسب المئوية لأورام الثدي غير الثلاثية السلبية ٤.١ و ٠.٤٪ [53]. وأفادت دراسات حديثة أن الـ Vimentin يلعب دوراً رئيسياً في عملية EMT لسرطانات الثدي، وقد أدى تثبيطه إلى انخفاض في الجينات المرتبطة بغزو سرطان الثدي والنمط الظاهري الشبيه بالقاعدي بما في ذلك جينات Axl و ITGB4 و PLAU. وعلاوة على ذلك فقد ثبت أن الـ Vimentin يلعب دوراً رئيسياً في تنظيم Axl وفي هجرة خلايا سرطان الثدي المستحثة بواسطة Slug و Ras [47]. (الشكل رقم ٢٤)

كشفت نتائج تحليل ٢٩ حالة من مرضى سرطان الثدي المتقدم الإيجابي لمستقبلات الهرمونات الذين يخضعون للعلاج الهرموني أن التعبير عن الـ Vimentin كان مرتبطاً بشكل بارز بمعدل فشل العلاج الهرموني، وأظهر التحليل المتعدد المتغيرات أن مستوى التعبير عن الـ Vimentin كان يُعتبر عاملاً تنبؤياً مستقلاً للعلاج غير المستجيب. كل النتائج السابقة تثبت أن الـ Vimentin قد يكون مؤشراً جديداً لفعالية العلاج الهرموني لمرضى سرطان الثدي [50].



الشكل رقم (٢٤): مخطط يوضح مختلف مسارات الإشارة التي يساهم من خلالها الـ Vimentin في الـ EMT والغزو والنقل.

في دراسة استقصائية أجريت على التعبير عن الـ Vimentin في ٥٣ امرأة أمريكية من أصل أفريقي مصابة بسرطان الثدي الثلاثي السلبي، أوضحت النتائج أن مريضات سرطان الثدي الثلاثي السلبي مع التعبير الإيجابي عن الـ Vimentin كن حساسات بشكل خاص للعلاج الكيميائي، وكانت الفعالية العلاجية بين هذه المجموعة من المرضى أفضل بكثير من فعالية المرضى السلبيين للـ Vimentin. وعلاوة على ذلك من خلال دراسة التعبير عن الـ Vimentin في ٣٥ مريضة بسرطان الثدي من نمط luminal في المرحلة IIIB واستكشاف فعالية العلاج الكيميائي المساعد (neoadjuvant)، وجد أن متوسط مستوى التعبير عن الـ Vimentin في المرضى الذين يعانون من تأثيرات علاجية من مجموعة العلاج الكيميائي المساعد كان أعلى بكثير من ذلك في المرضى الذين ليس لديهم تأثير علاجي. بعد العلاج الكيميائي المساعد انخفض التعبير عن الـ Vimentin في أنسجة سرطان الثدي من المرضى الذين استجابوا للعلاج التدخلي بشكل كبير، مما يشير إلى أن الـ Vimentin هو متنبئ جديد لتقدير فعالية العلاج الكيميائي المساعد [50]. يبدو أن الـ Vimentin يلعب أيضًا دورًا في تنظيم قدرات الخلايا السرطانية الجذعية. وقد أدى استنفاد التعبير عن الـ Vimentin من خلال shRNA إلى انخفاض عدد خلايا سرطان الثدي الجذعية المقاس من خلال التعبير العالي عن ألدريد ديهيدروجينيز، مما يشير إلى أن الـ Vimentin مطلوب للحفاظ على الخواص الجذعية لخلايا سرطان الثدي. ومن المثير للاهتمام أن دراسات متعددة أظهرت أن الخلايا الجذعية السرطانية تعبر عن سمات الخلايا التي خضعت للـ EMT. على سبيل المثال أدى تحريض الـ EMT عن طريق الإفراط في التعبير عن Snail أو twist إلى تعزيز تكوين خلايا جذعية سرطانية في الخلايا الظهارية الثديية البشرية، وكانت واسمات الخلايا السدوية بما في ذلك الـ Vimentin مرتفعة في الخلايا الجذعية CD44high/CD24low لسرطان الثدي [51].

٤. الأهمية السريرية للتحويل الظهاري السدوي Clinical Significance of EMT:

تنشط الخلايا السرطانية أثناء حياتها بشكل متكرر عملية الـ EMT من أجل تحفيز عملية النقائل التي تتميز بسلسلة معقدة من الأحداث الفيزيائية والخلوية التي تؤدي إلى فقدان الخلايا الظهارية لسماتها الظهارية واكتساب العديد من

خصائص الخلايا السدوية. هذا التغيير في النمط الظاهري للخلايا هو أساس تخليد الخلايا الظهارية الثديية البشرية التي تولد نوعاً جديداً من الخلايا السرطانية مع التعبير عن واسمات الخلايا الجذعية وبالتالي اكتساب خصائص الخلايا الجذعية الوظيفية، مثل مقاومة الأدوية والانتشار إلى أعضاء بعيدة أو القدرة على تكوين كرات الثدي mammospheres [4].

٤.١. الخلايا الجذعية السرطانية و التحول الظاهري السدوي Cancer Stem Cells and

:EMT

تتكون الخلايا الجذعية السرطانية من مجموعة صغيرة من الخلايا داخل الورم، والتي يمكن التعرف عليها من خلال مجموعة من الواسمات. تتميز الخلايا الجذعية السرطانية بتنشيط الجينات المرتبطة بالتطور الجنيني المبكر والتي تمنح قدرات مسببة للورم، مثل القدرة على تجديد الذات وإمكانية التمايز ومقاومة الموت [54]. يُعتقد بشكل متزايد أن الخلايا الجذعية لسرطان الثدي تلعب دوراً رئيسياً في نمو سرطان الثدي وتكوين النقائل [55]. الخلايا الجذعية السرطانية بالتعريف يجب أن تمتلك القدرة على (أ) البدء بشكل تفضيلي في تكوين الورم (ب) الخضوع للتجديد الذاتي (ج) التمايز إلى مجموعات فرعية غير متجانسة من الخلايا التي تلخص تلك الموجودة في غالبية خلايا الورم الأولي [2].

لم يتم تحديد الخلية الأصلية للخلايا الجذعية السرطانية في الثدي بعد ولكن قد تكون نتيجة للتحويل الخبيث للخلايا الجذعية/السلفية الطبيعية [55]. ومع ذلك تشير النتائج الأخيرة إلى أن الخلايا الجذعية السرطانية قد تنشأ من خلال قدرتها على الاستيلاء على مجموعة أساسية من عوامل الانتساخ أثناء التحويل الخبيث للخلايا الجذعية الطبيعية، أو أثناء فقد تمايز خلايا الورم [56]. تعتبر الخلايا الجذعية السرطانية وكذلك الخلايا التي تخضع للتحويل الظاهري السدوي أكثر مقاومة للأدوية والعلاج الكيميائي الإشعاعي من الخلايا المتميزة [5]. إن العمر الطويل للخلايا الجذعية/السلفية يجعلها أكثر عرضة لتراكم طفرات DNA [55]. علاوة على ذلك تكتسب الخلايا السرطانية في ظل ظروف نقص الأكسجين خصائص الخلايا الجذعية السرطانية. كشف ماني وزملاؤه Mani et al. أن الخلايا الظهارية الثديية البشرية

الخالدة (HMLEs) التي تخضع للتحويل الظاهري السدوي تشبه الخلايا الجذعية السرطانية كما تتميز بنمطها الظاهري CD44high /CD24low [5]. في الآونة الأخيرة تم اقتراح واسمات إضافية بما في ذلك ألدريد ديهيدروجينيز ١ (ALDH1) وCD133 (برومينين-١) وITGA6 كواسمات حيوية للخلايا الجذعية السرطانية في الثدي. تم العثور على ALDH1 وهو إنزيم مزيل للسموم يعمل على أكسدة الألدريدات داخل الخلايا، في كل من الخلايا الجذعية الثديية الطبيعية وخلايا سرطان الثدي الجذعية. وكان ما لا يقل عن ٥٠٠ خلية من خلايا سرطان الثدي التي تحتوي على ALDH1 قادرة على تكوين أورام عند زرعها في فئران NOD/SCID. ومن الجدير بالذكر أن هذه المؤشرات الحيوية لا يتم التعبير عنها عبر جميع أنواع خلايا سرطان الثدي الجذعية، بل يتم التعبير عنها بشكل مختلف وفقاً للنوع الفرعي. بالإضافة إلى النمط الظاهري النسيجي قد يعتمد التعبير عن المؤشرات الحيوية أيضاً على بيئة الورم [55].

وجدت دراسات متعددة أن الخلايا التي تخضع للEMT لها خصائص الخلايا الجذعية السرطانية، بما في ذلك التجديد الذاتي والقدرة على تكوين كرات الثدي. تشير هذه النتائج إلى أن الEMT قد يلعب دوراً في تطور الخلايا الجذعية السرطانية وخصائص الغزو والنقائل والنكس ومقاومة العلاج الكيميائي [5]. قدم ماني وزملاؤه Mani et al. لأول مرة الأدلة التي تربط بين الEMT وخلايا سرطان الثدي الجذعية BCSCs، حيث أظهروا أن تحريض الEMT في المختبر في الخلايا الظهارية الثديية يولد خلايا ذات خصائص جذعية. وقد تم تأكيد ذلك أيضاً من قبل مجموعات أخرى وفي الجسم الحي في خلايا سرطان الثدي الظاهري لنماذج الفئران. وقد ثبت أن خلايا سرطان الثدي الجذعية BCSCs المعزولة من أورام الثدي والانصباب الجنبى النقيلي تعبر عن واسمات موجودة في الخلايا التي تخضع للتحويل الظاهري السدوي [4]. تؤدي التغييرات في الإشارات أو التعبير الجيني التي تعزز أو تمنع الEMT إلى تعزيز أو تقليل تعداد الخلايا الجذعية السرطانية CSC، وبالتالي القدرة على بدء الورم. تقوم إشارات TGF- β /Smad في الخلايا الظهارية الثديية وسرطان الثدي بشكل مباشر بتحفيز التعبير عن واسمات الخلايا الجذعية السرطانية وEMT وتعزز تشكل الكريات الثديية mammospheres وتكوين الورم [6]. توجد العديد من الأمثلة لمسارات الإشارات وعوامل الانتساخ التي تنظم كل من EMT واكتساب الخصائص الجذعية. يتم تحديد الحالة السدوية للخلايا الثديية بواسطة

EMT-TF FOXC2، والذي يساهم أيضًا في إمكانيات الخلايا الجذعية السرطانية عن طريق تحريض انتساخ مستقبل PDGF b. الإشارات عبر PDGF-Rb مطلوبة أيضًا لبقيا الخلايا السرطانية التي تخضع ل-EMT. مثال ثانٍ هو مسار Hippo والبروتين المتأثر به TAZ، والذي يمكنه تعطيل بروتين الاستقطاب الظهاري Scribble وبالتالي التسبب في EMT. بالإضافة إلى ذلك فقد ثبت أن TAZ يعزز الجذعية في خلايا سرطان الثدي عند الإفراط في التعبير عنه وتنشيطه بواسطة كينازات مسار Hippo. ومن المثير للاهتمام أن عوامل انتساخ التحول الظهاري السدي مثل Twist1 و ZEB1/2 تتداخل مع المسارات الرئيسية التي تنظم بقيا الخلايا مثل p53 و pRb و PP2A phosphatase، مما يؤدي إلى تطور سرطانات الثدي التي تتميز بإثراء مميز في السمات الشبيهة بالخلايا الجذعية. واستنادًا إلى مجموعة متنوعة من النتائج يمكن القول إن التحول الظهاري السدي والتغيرات في التمايز تحفز خصائص شبيهة بالخلايا الجذعية في الخلايا السرطانية، على عكس الفرضية التي تفترض أن الخلايا الجذعية السرطانية مشتقة من التحول الخبيث لأنواع الخلايا السلفية الشبيهة بالخلايا الجذعية في الغدة الثديية[12].

في سرطانات الثدي ترتبط خصائص الخلايا الجذعية السرطانية بالتحول الظهاري السدي الجزئي، في حين يقل تطور التحول الظهاري السدي من عدد الخلايا ذات خصائص الخلايا الجذعية. كما أن الارتباط بين التحول الظهاري السدي الهجين والخلايا الجذعية مدعوم أيضًا بمتطلبات ال-EMT أثناء إعادة برمجة الخلايا الليفية إلى خلايا جذعية متعددة القدرات[6]. إن المفهوم الذي يربط EMT بجذعية السرطان يمكن أن يقدم إمكانيات جديدة لتحسين الإنذار والتدخل العلاجي لسرطان الثدي البشري. كشفت دراسة حديثة تناولت النمط الظاهري للخلايا السرطانية المنتشرة في دم مرضى سرطان الثدي عن مجموعة متنوعة من الخلايا التي تظهر سمات ظاهرية وميزانثيمية[12]. تظهر الخلايا السرطانية بعد التعرض المطول ل- $TGF-\beta$ سمات جذعية بشكل أعلى من تلك التي تظهر بعد التعرض المؤقت ل- $TGF-\beta$ ، علماً أن سمات التحول الظهاري السدي هي نفسها في الحالتين. يرتبط هذا التزايد في السمات الجذعية بنشاط mTOR المتزايد ويعتمد عليه. تشير هذه النتائج وغيرها إلى أن الجذعية ليست مجرد نتيجة ل-EMT ولكنها تتطلب تغييرات إضافية في الإشارات والتعبير الجيني[6]. غالبًا ما تتجمع أوجه التشابه الميكانيكية بين الخلايا الجذعية

السرطانية وعملية ال EMT في المسارات المرتبطة باكتساب المقاومة العلاجية في خلايا سرطان الثدي. في الواقع دراسة عوامل الانتساخ في سرطانات الثدي البشرية المقاومة للعلاج الهرموني أو العلاج الكيميائي أبدت أنماط تعبير جيني متسقة مع تلك التي تم اكتشافها في الخلايا الجذعية السرطانية الثديية BCSCs. ومن المهم أن هذه الآفات المتبقية (أي المقاومة) من سرطان الثدي كانت في الغالب من النمط الفرعي منخفض الكلودين claudin-low، وهو نمط من سرطان الثدي يكون في الغالب ذو طبيعة ميزانشيمية [2]. ويتم حالياً تقييم الخلايا المقاومة للعلاج CD44+/CD24-/low _كونها منشأ محتمل للنمو النقلي_ كأهداف علاجية.

قد توفر بيئة الخلايا الجذعية (العش niche) أيضاً للخلايا وسيلة للتهرب من العلاج الكيميائي من خلال وجود بيئة مكروية واقية. البيئة المكروية هي بيئة دقيقة معقدة تشارك بشكل فعال في نمو الخلايا الجذعية، وتعمل البيئة المكروية على حماية الخلايا الجذعية من إشارات الموت الخلوي المبرمج ومحفزات التمايز والاضطرابات البيئية. تحدث إشارات ثنائية الاتجاه بين البيئة المكروية الداعمة والخلايا الجذعية، وهناك احتمال أن تؤدي الإشارات غير الوظيفية من البيئة المكروية الداعمة إلى نمو الخلايا الجذعية السرطانية. لذلك فإن استهداف بيئة الخلايا الجذعية السرطانية بعوامل علاجية جديدة قد يعطل هذه الاتصالات الخلوية ويتداخل مع نمو الخلايا الجذعية السرطانية [55]. تشير هذه النتائج مجتمعة إلى أن استراتيجيات العلاج الشائعة ستكون غير فعالة في سرطانات الثدي التي خضعت لعملية EMT وتتواجد في حالة جذعية مقاومة للعلاج الكيميائي [2].

أظهرت الدراسات من طب زراعة الأعضاء أن الخلايا الجذعية الفيزيولوجية لها خصائص مناعية. وقد استوحيت فكرة أن الخلايا الجذعية السرطانية قد تمتلك أيضاً قدرات التهرب المناعي من الملاحظة التي مفادها أن مناعة المضيف المضادة للأورام قد تتفقد هذه الخلايا. والواقع أن الخلايا الجذعية السرطانية قادرة على التهرب من الرفض بواسطة المناعة في مضيف يتمتع بالمناعة الكافية، حتى في سياق الورم الميلانيني الذي يتميز بقدرة عالية على توليد المناعة. وقد أشار أول توصيف مناعي حيوي للخلايا الجذعية السرطانية المعزولة من مرضى مصابين

بالورم الأرومي الدبقي GBM إلى أن هذه الخلايا الجذعية السرطانية كانت تتمتع بقدرة مناعية أقل ونشاط كبجي أعلى من الخلايا السرطانية غير الجذعية. وقد قام وي وزملاؤه Wei et al. بعزل وتوليد مستعمرات مفردة من خلايا CD133 المسببة للسرطان من مرضى مصابين بالورم الأرومي الدبقي GBM وأكدوا أن الخلايا المسببة للسرطان في الورم الدبقي تحفز تثبيط الخلايا التائية. كما أظهروا أن بروتين STAT3 كان نشطاً بشكل دائم في الخلايا الجذعية السرطانية المعزولة من GBM. وفي المقابل يمكن للعوامل التي يفرزها الورم بفعل بروتين STAT3 أن تنشط بروتين STAT3 في الخلايا المناعية لكل من الجهازين المناعيين الفطري والمكتسب. وقد أدى هذا التنشيط إلى خلق حلقة تغذية راجعة إيجابية بين الخلايا السرطانية والبيئة المكروية للورم مما أدى إلى التهرب المناعي. إن CD44 هو علامة مميزة جيداً لمجموعة فرعية من الخلايا السرطانية المرتبطة بزيادة تكوين الورم ومقاومة الإشعاع ومقاومة العلاج الكيميائي. أظهرت سلالات خلايا سرطان الثدي الثلاثي السلبية والتي تبدي واسمات جذعية مثل ALDH و CD44 مستويات متزايدة من PD-L1 مقارنة بنظيراتها السلبية لـ ALDH و CD44low. أدى علاج خلايا سرطان الثدي الثلاثي السلبية بمثبطات أو منشطات Wnt الانتقائية إلى تقليل أو زيادة التعبير عن PD-L1 على التوالي، مما يعني أن نشاط Wnt المرتبط بالجذعية يمكن أن يخرط في تفاعل وظيفي مع البروتينات المشاركة في التعبير عن PD-L1. أنتجت خلايا TNBC-PD-L1high المزيد من Mammospheres وأظهرت زيادة في نمو الورم في الجسم الحي مقارنة بخلايا TNBC-PD-L1low. علاوة على ذلك أقامت خلايا TNBC-PD-L1high اتصالات وثيقة مع الخلايا التائية PD1+ في عينات الأورام لدى الفئران والبشر؛ وقد دعم هذا الاكتشاف فكرة أن الخلايا الجذعية السرطانية كانت مرتبطة بالتهرب المناعي.

في الواقع تحفز EMT استجابة مناعية تكيفية تتميز بزيادة كبيرة في CD3 Tils و Tregs والعديد من واسمات التنشيط بما في ذلك CD80 و CD86 و OX40 و 4-1BB و ICOS و CD127 و IFN γ وبروتين CXCL10 المستحث بواسطة IFN γ وإنزيمIDO القابل للتحريض بواسطة IFN γ . وعلاوة على ذلك في سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة أظهرت خلايا النمط الظاهري السدوي مستويات أعلى بشكل ملحوظ من جزيئات نقاط التقشيش المناعية المتعددة

بما في ذلك PD-L1 و PD-L2 و PD1 و TIM-3 و B7-H3 و BTLA و CTLA-4 مقارنة بخلايا النمط الظاهري الظاهري [54].

٤.٢. التحول الظاهري السدوي ومقاومة الأدوية Drug-resistance and EMT:

تعد مقاومة العلاج الكيميائي واحدة من المشاكل الرئيسية التي يواجهها أطباء الأورام في الممارسة السريرية. وقد تم الإبلاغ عن العديد من الآليات المرتبطة بمقاومة الأدوية ومناقشتها على نطاق واسع. تشير الأدلة الحديثة إلى أن EMT مرتبط بنمط ظاهري مقاوم للعلاج الكيميائي في العديد من الأورام بما في ذلك سرطان الثدي. تم الإبلاغ عن النمط الظاهري المقاوم المرتبط ب EMT لكل من العوامل المضادة للسرطان الكلاسيكية مثل تاكسول والأدوية المحتوية على البلاتين وقلويدات فينكا والعوامل المضادة للسرطان الهدفية مثل مثبطات EGFR أو HER-2 [4]. تشمل الآليات المحتملة لمقاومة العلاج الكيميائي والإشعاعي في سرطان الثدي وجود تركيزات أقل من أنواع الأكسجين التفاعلية ROS وهجوم الخلايا وآليات إصلاح DNA والإفراط في التعبير عن إشارات Wnt/ β -catenin و Notch [55].

وكما ذكرنا سابقاً فإن EMT يرافقه إن لم يكن ناتجاً عنه_ تغيرات في ملف التعبير الجيني gene expression profile. في خزعات سرطان الثدي وسرطان الرئة غير صغير الخلايا ترتبط مقاومة العلاج الكيميائي بالتعبير الجيني المرتبط ب EMT. في نماذج الفئران يرتبط EMT بانخفاض الحساسية للعلاج الكيميائي، مما يسمح بالنقائل المتكررة بعد علاج السرطان بالأدوية [6]. إن التحول في التعبير الجيني الذي يمكن ملاحظته أثناء EMT يذكرنا بنمط التعبير الجيني الذي يمكن ملاحظته في الخلايا الجذعية السرطانية. عادةً ما يتم التعبير عن الجينات مثل Snail و ZEB1 و Notch و Twist بمستويات أعلى في الخلايا السدوية كما هو الحال في الخلايا الجذعية السرطانية. ومع ذلك أدى التعبير القسري لبعض هذه الجينات إلى خلية أكثر مقاومة بخصائص النمط الظاهري الشبيه بالخلايا السدوية [4]. وقد وجد أن عامل الانتساخ المرتبط بال EMT (SLUG) يعاكس موت الخلايا المبرمج بواسطة p53 عن طريق كبح PUMA وبالتالي تعزيز وظيفة BCL2 وبقيت الخلية [57]. وقد تبين أن مسارات TGF- β و NF- κ B و Wnt و FGF

وEGF/HER2 التي يتم تنشيطها استجابة للعلاج الكيميائي/العلاج الإشعاعي قادرة على تحفيز التعبير عن EMT-TF. وقد تعمل إشارات TGF- β نفسها على توجيه الانخفاض في حساسية الأدوية المستخدمة لعلاج السرطان المرتبط بEMT. أحد المكونات الرئيسية لمعقد الوسيط الانتساخي MED12 _ والذي عادة ما يكون غير مفعل في السرطانات عند الإنسان _ يقوم بالارتباط بالجليكوزيلات ويمنعها من الارتباط بمستقبل TbrII وبالتالي يضعف نقله إلى سطح الخلية، ويعزز كبح MED12 إشارات TGF- β و EMT ويضعف حساسية الأدوية المستخدمة لعلاج السرطان. كما يحقق EMT المستحث بواسطة TGF- β إسكانًا للجين الذي يشفر البروتين المؤيد لموت الخلايا المبرمج Par-4، والذي يعزز فسفرة بروتينات الهيكل الخلوي وبالتالي يساعد في العلاج الكيميائي الهدي. يؤدي علاج TGF- β المطول لخلايا السرطان إلى تقليل حساسية أدوية السرطان بما يتجاوز ما يُرى مع علاجات TGF- β الأقصر التي تحفز EMT القابل للعكس [6][57]. في سلالة خلايا سرطان الثدي البشرية MCF-7 المقاومة للدوكسوروبيسين أو باكليتاكسيل أو دوسيتاكسيل في المختبر، أظهر تحليل التعبير الجيني زيادة في التعبير عن الجينات المرتبطة بEMT (N-cadherin و SNAI2 و Vimentin)، جنبًا إلى جنب مع كبح E-cadherin ومستقبلات الإستروجين. وبالمثل أظهرت نفس خلية سرطان الثدي البشرية المقاومة للتاموكسيفين تبدلاً مورفولوجياً نموذجياً لEMT وكان لديها فقدان لارتباط E-cadherin/ β -catenin وزيادة في شكل فسفرة التيروسين ل β -catenin [4].

من المعروف أن ER و NF κ B يخفان من نشاط بعضهما البعض، وبالتالي فإن تثبيط ER بواسطة مضادات الإستروجين قد يؤدي في الواقع إلى دفع تقدم الورم بواسطة NF κ B من خلال فصل NF κ B عن التحكم المثبط لER. يمكن لNF κ B أيضًا إضعاف تعبير ER و/أو نشاطه، مما يؤدي إلى ظهور مجموعات خلايا سلبية ER والتي تكون مقاومة بشكل طبيعي للعلاج الهرموني. تؤدي المقاومة الهرمونية في الخلايا السرطانية إلى نمط ظاهري عدواني يتميز بالتعبير عن الجينات المرتبطة بEMT والجذعية [58]. يؤدي الإشعاع ونقص الأكسجين إلى توليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، وقد تم اقتراح أن EMT يمكن تنشيطها من خلال ارتفاع أنواع الأكسجين التفاعلية مع عواقب محتملة على مقاومة الأدوية أو الإشعاع.

يؤثر العلاج الإشعاعي والعديد من عوامل العلاج الكيميائي على سلامة الجينوم. تظهر الأدلة الحديثة أن عوامل EMT-TFs تنظم عدم الاستقرار الجينومي في أنظمة نموذجية مختلفة عن طريق تنشيط جينات الاستجابة لتلف DNA مثل ERCC1 و DNA ligase1 و ATM، أو عن طريق تنظيم التعبير عن BRCA1 في سرطانات الثدي [57]. تم إثبات ازدياد خلايا CD44+/CD24-/low بعد العلاج الإشعاعي، في نموذج الجسم الحي كانت هذه الخلايا قادرة على التكاثر حتى أربعة أجيال على الأقل من الفئران، مما يشير إلى أنها تلعب أدواراً مهمة في نكس الورم ونقائله [55]. في الآونة الأخيرة نُشرت دراسة تغيد بأن خلايا سرطان الثدي البشرية التي تم تحويلها تجريبياً إلى خلايا ميزانشيمية بواسطة TGF- β أظهرت أن هذه الخلايا تظهر خصائص الخلايا الجذعية وكانت أكثر مقاومة للأدوية التقليدية مثل باكليتاكسيل ودوكسوروبيسين. جميع النتائج التي تُظهر أن الخلايا المقاومة تكتسب نمط EMT مع التغييرات المتوقعة في ملف التعبير الجيني، يتم تأكيدها بشكل أكبر من خلال الأدلة التي تثبت أن التعبير غير الطبيعي عن جينات EMT أو الجينات المعروفة بتحفيز EMT يؤدي إلى نمط مقاومة في المختبر [4].

٤.٣. العلاجات التي تستهدف التحول الظهاري السدوي Treatments Targeting EMT

إن فهمنا لمسارات الإشارات التي تحرك التحول الظهاري السدوي جنباً إلى جنب مع التفاعلات المعقدة بين الخلايا السرطانية والبيئة المناعية وغير المناعية للسرطان يتوسع بشكل مطرد، ومع ذلك لم نتمكن بعد من الاستفادة بشكل فعال من هذه المعرفة بشكل علاجي مفيد. تم اقتراح العديد من الاستراتيجيات لاستهداف التحول الظهاري السدوي بما في ذلك تثبيط الإشارات خارج الخلية والمسارات الخاصة بها، وتثبيط التعبير عن ووظيفة عوامل الانتساخ الرئيسية للتحول الظهاري السدوي، واستهداف الخلايا السدوية على وجه التحديد وتثبيط التحول السدوي الظهاري MET [39]. توفر المسارات المرتبطة بالتحول الظهاري السدوي أهدافاً للعلاج. على سبيل المثال يؤدي تثبيط إنزيم كيناز مرتبط بالإنترجرين (ILK) إلى زيادة حساسية الخلايا السدوية لعلاج EGFR المستهدف في سرطان الخلايا الكبدية. في الدراسات المختبرية تمنع مشطبات إنزيم كيناز Src نمو الخلايا الخاضعة للتحول الظهاري السدوي بشكل فعال. علاوة

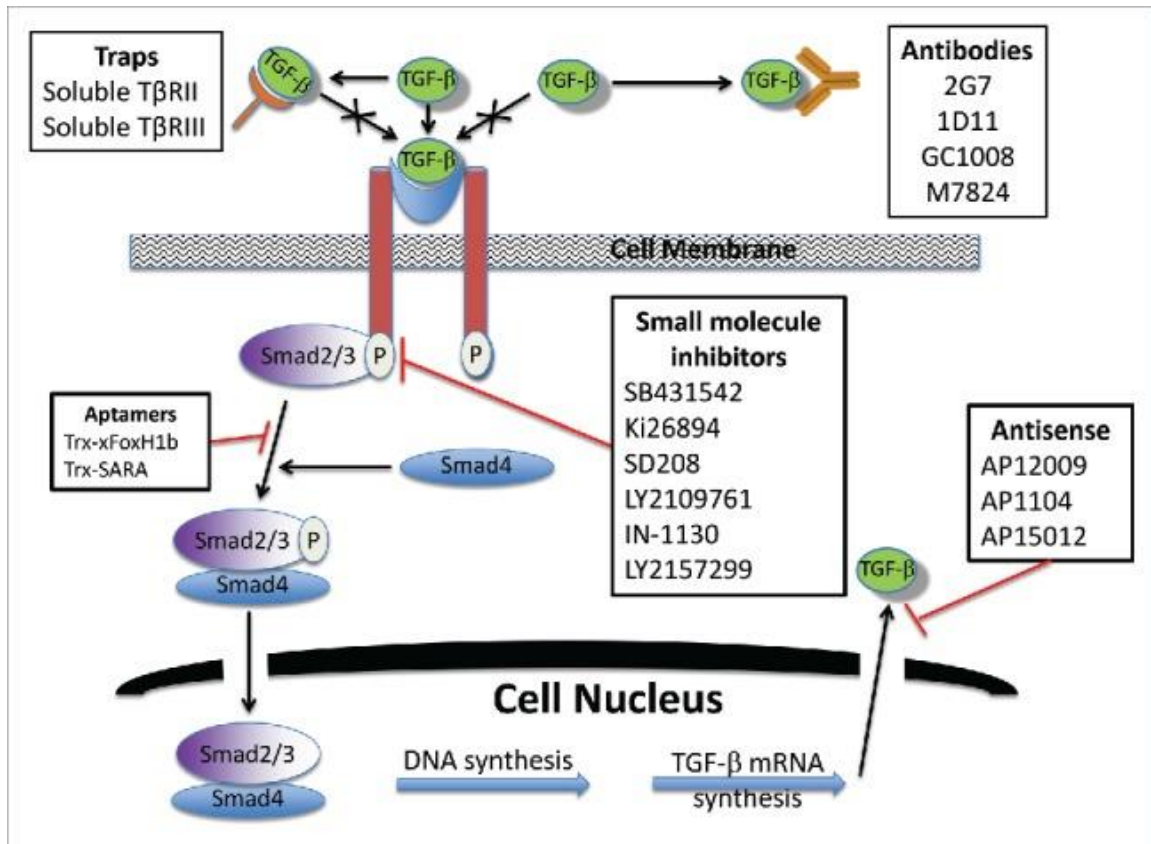
على ذلك يمكن أن يمنع تثبيط إشارات سبيل Hedgehog خلايا سرطان البنكرياس من اكتساب خاصية بدء الورم والخضوع لEMT [5].

تم التعرف على استهداف عوامل الانتساخ المؤثرة في EMT بما في ذلك Snail و Slug و Twist و Zeb1/2 كاستراتيجية علاجية محتملة في خلايا سرطان الثدي، حيث أدى التعطيل المستهدف لعائلة Snail إلى كبح تكاثر الخلايا السرطانية ونقائلها [39]. مؤخرًا تم تطوير معقد Co(III)-E-box، Co(III)-DNA، للتثبيط الانتقائي لعائلة Snail من عوامل الانتساخ. تم تصميم معقد Co(III)-E-box هذا لربط عوامل انتساخ إصبع الزنك بشكل لا رجعة فيه من خلال آلية تبادل الربطة على Co(III) ويستهدف عوامل عائلة Snail من خلال تسلسل E-box (CAGGTG). معًا تعمل قاعدة Schiff-Co(III)-E-box على التوسط في التثبيط الدقيق لبروتينات إصبع الزنك المستهدفة. ركزت دراسة أخرى على تثبيط ارتباط Snail-p53، وقد وجد أن p53 يتم كبحه وإزالته من خلايا السرطان المتحولة بواسطة K-Ras من خلال التفاعل المباشر مع Snail. بناءً على هذه الملاحظات يتم إنشاء مثبطين نوعيين (GN29 و GN25) ضد ارتباط p53-Snail لتحفيز التعبير عن p53 ووظائفه بطريقة تعتمد على K-Ras. ومع ذلك فإنه لا يظهر تأثيرًا سامًا على الخلايا الطبيعية أو خلايا ذات النوع البري من K-Ras (K-Ras-wild-type cells). علاوة على ذلك يمكن لـ GN25 تنشيط p53 من النوع البري بشكل انتقائي في خلايا السرطان [34]. كما أدى إسكات Twist إلى إضعاف الإمكانات النقيلية بكفاءة في خلايا أورام الثدي، مما قلل من تكرار نقائل الرئة في دراسة الفئران الحية [39].

يعتبر تداخل RNA و microRNA من التقنيات الجديدة في تطوير الأدوية. على سبيل المثال أدى إسكات Snail بواسطة shRNA إلى تحفيز MET وتقليل نمو الورم في الجسم الحي. أما بالنسبة لـ microRNA فقد كشف كروتزفيلد وزملاؤه Krutzfeldt et al. أن مثبطات معينة لـ miRNAs الذاتية هي أدوات قوية للإسكات النوعي

miRNAs في الجسم الحي. لذلك يمكن استغلال microRNAs المرتبطة بـ EMT مثل عائلة miR-10b و miR-200 كاستراتيجيات علاجية في المستقبل [5].

يمكن للعديد من الإشارات المستلمة من بيئة الورم أن تحفز EMT بما فيها السيتوكينات المؤيدة للالتهابات مثل TGF- β أو TNF α . قد تمثل المثبطات التي تستهدف مستقبلات السطح أو الأجسام المضادة المعدلة للربطة استراتيجية مفيدة لتثبيط EMT. تم الإبلاغ عن تثبيط فسفرة I κ B α المستحثة بـ TNF α بواسطة BAY 11-7082 في خلايا



الشكل رقم (٢٥): مخطط يوضح آلية عمل العوامل التي تستهدف TGF- β في السرطان

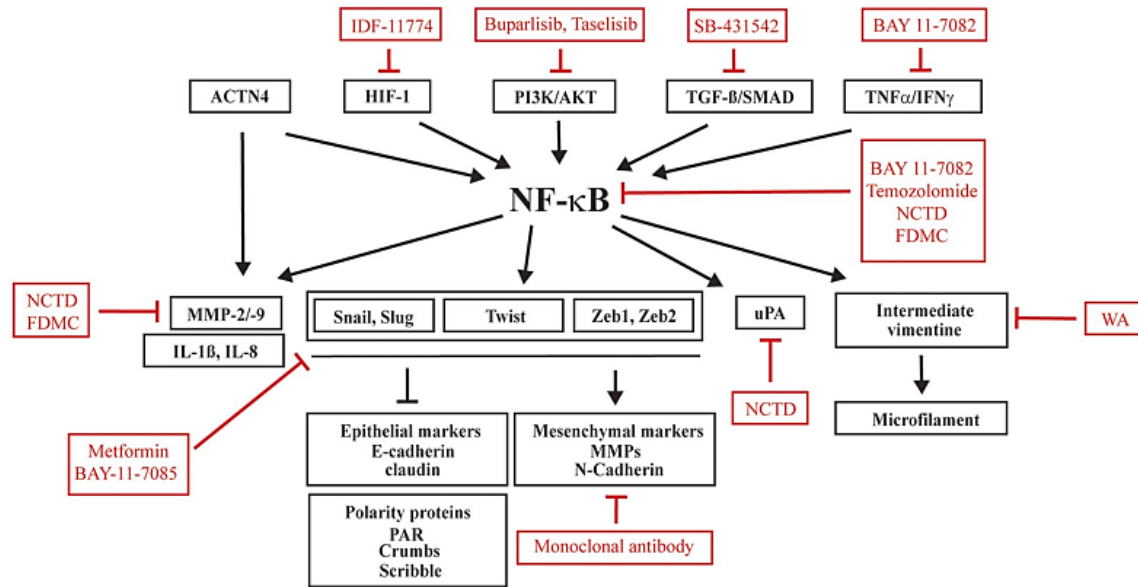
الورم الأرومي الدبقي. PI3K/PKB هو أحد المسارات المشاركة في تنظيم EMT والعديد من الأدوية التي تستهدف PI3K/PKB مثل buparlisib و taselesib هي حاليًا في المرحلة الثالثة من التجارب السريرية [39]. يتم تنشيط مسار PI3K/PKB عند فقدان E-cad في غياب الطفرات السرطانية النوعية. ومن المثير للاهتمام أنه تم في المختبر إثبات

أن خلايا سرطان الثدي الفصيصي حساسة للتثبيط الدوائي لـ PKB باستخدام مثبط تنافسي للـ ATP (AZD5363) ومثبطين تآزرين (MK2206 و VIII). مؤخرًا حدد باجرامي وزملاؤه Bajrami et al. تفاعلًا مميًا اصطناعيًا بين E-cad و ROS1. تمثل إعادة تنظيم جين ROS1 انحرافات معروفة مرتبطة بالسرطان وأهداف علاجية للأدوية. أظهر المؤلفون أن تثبيط ROS1 في خطوط خلايا الورم الثديي ذات التعبير المعيب للـ E-cad أدى إلى موت الخلايا السرطانية. يشير هذا الدليل إلى دور محتمل لمثبطات ROS1 في علاج المرضى الذين يعانون من أورام معيبة E-cad وقد يمثل عنصرًا أساسيًا للدراسات والتجارب السريرية المستقبلية [26].

نتيجة لقدراته على تعزيز الورم يوفر $TGF-\beta$ ومسار إشاراته فرصًا محتملة للعلاج الهدي (الشكل رقم ٢٥). يعمل حجب $TGF-\beta$ ومنع تفاعله مع مستقبله باستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة مثل 1D11 (Genzyme) على تحييد جميع أشكال $TGF-\beta$ الثلاثة النشطة (١ و ٢ و ٣) وينتج نشاطًا مضادًا للنقائل في نماذج الفئران لسرطان الثدي. أظهر جسم مضاد آخر مستعدل 2G7 نشاطًا مضادًا للأورام مماثلًا في النماذج قبل السريرية.

لا توجد حاليًا تجارب جارية على البشر باستخدام الأجسام المضادة غير البشرية بسبب أن مناعتها وحركيتها الدوائية دون المستوى الأمثل [15]. أوردت الدراسات أن small-interfering RNA الذي يستهدف $TGF-\beta$ يقلل من النقائل في الجسم الحي، ويمكن تطبيق هذه الملاحظة على $TGF-\beta$ الذي يفرزه سدى الورم [5]. وقد ثبت أن مثبطًا نوعيًا لمستقبل $TGF-\beta$ مثل kinase-SB-431542 أو HIF-1 α -IDF-11774 يعمل على كبح التأثيرات المعززة للورم بكفاءة في خلايا سرطان البنكرياس وسرطان القولون والمستقيم على التوالي [39]. كما ثبت أن مثبط آخر لـ $T\beta RI$ وهو Ki26894 (Kirin) يمنع غزو وتطور نقائل العظام بواسطة خطوط خلايا سرطان الثدي البشري وسرطان المعدة في الجسم الحي [15].

لقد تم توجيه الكثير من الجهود لاستكشاف وتطوير استراتيجيات لاستهداف مسار NF- κ B بشكل فعال (الشكل رقم ٢٦). تتضمن الأدوية المستخدمة حاليًا في العلاج السريري لاستهداف إشارات NF- κ B مناهضات مستقبلات المسار التقليدي وغير التقليدي (مثل ibudilast) ومثبطات بروتينات المحول المتتالي (مثل JKB-122, IKK α أو IKK β أو NEMO أو NIK مثل (CHS-828 or IKK module inhibitors) ومثبطات البروتيازوم مثل (AS-602868) ومثبطات البروتيازوم مثل (disulfiram, bortezomib) [39].



الشكل رقم (٢٦): الاستراتيجيات العلاجية الهدفية المحتملة لـ EMT

قد يكون استهداف واسمات الخلايا السدوية مثل الـ Vimentin أو N-cadherin استراتيجية أخرى للقضاء على النمو النقلي أو تثبيطه. وقد ثبت أن ويزافيرين أ (WA) وهو معقد ستيرويدي طبيعي موجود في نبات طبي يسمى *Withania somnifera* يرتبط بالـ Vimentin وشبكة الخيوط الوسيطة ويعطلها، مما يثبط عملية التحول الظهاري السدوي في أورام الثدي المخبرية والحيوية. يزيد ويزافيرين أ من موت الخلايا المبرمج بطريقة تعتمد على الجرعة، مما يثبط تكاثر الخلايا عن طريق إيقاف دورة الخلية أثناء نقطة تفتيش G2/M [39].

الدراسة العملية

المواد والطرق :Materials and methods

منهج الدراسة:

✓ في هذه الدراسة قمنا بتضمين ١١١ مريضة مصابة بسرطان الثدي الأولي تم تشخيص إصابتهن في الفترة ما بين عامي ٢٠١٧ و ٢٠٢٠ في مستشفى الأسد الجامعي في دمشق، سوريا.

✓ تم تضمين الأنسجة المستأصلة جراحياً (استئصال ثدي جذري - استئصال ثدي ربعي).

✓ تم تثبيت عينات الأنسجة بالفورمالين وغمرها بالبارافين قبل تقطيعها إلى شرائح بسمك ١٠ ميكرومتر.

✓ تم تقييم التعبير عن الواسمات المدروسة عن طريق التلوينات المناعية النسيجية الكيميائية IHC وباستخدام

تقنية Tissue Micro-Array (TMA).

✓ تم تجميع البيانات الديموغرافية بما في ذلك العمر عند التشخيص ودرجة الورم ومرحلة الورم TNM وحالة

مستقبلات الهرمونات (حالة مستقبلات البروجسترون والإستروجين) وحالة Her2، وذلك من أرشيف قسم

التشريح المرضي في مستشفى الأسد الجامعي.

✓ تم الاتصال بالمريضات عبر الهاتف لجمع معلومات حول سير المرض والنكس والبقيا.

✓ تم دراسة العلاقة بين تعبيرية الواسمات المدروسة وبين الخصائص السريرية والباثولوجية للعينات المدروسة.

معايير الاشتمال:

✓ استئصالات الثدي الجذرية المعدلة أو استئصالات الثدي الربعية.

✓ على أن تحتوي على سرطان ثدي بدئي ظهاري غازي أو موضع أو الاثنتين معاً.

معايير الاستبعاد:

- ✓ الأورام غير الظهارية.
- ✓ المرضى الذين تلقوا العلاج المساعد.
- ✓ استئالات كتل الثدي التي لا تحتوي على تجريف العقد اللمفاوية الإبطية.

الدراسة الإحصائية:

- ✓ نوع الدراسة: دراسة حشدية تراجعية.
- ✓ تم تلخيص الخصائص الأساسية للمرضى باستخدام المتوسط (النطاق) للمتغيرات المستمرة والتردد (النسبة المئوية) للمتغيرات الفئوية.
- ✓ تم استخدام اختبارات فيشر الدقيقة لمقارنة المتغيرات الفئوية بين المجموعات، وتم استخدام اختبارات مجموع رتب ويلكوكسون أو اختبار كروسكال واليس للمتغيرات المستمرة.
- ✓ لتحليل البقاء على قيد الحياة بشكل عام، تم استخدام طريقة انحدار فيرث كوكس لتقليل التحيز في تقدير أقصى احتمالية ناتجة عن أحجام الأحداث الصغيرة.

النتائج Results:

- تم تضمين مائة وإحدى عشرة حالة ضمن الدراسة: (الجدول رقم ١)
- (٦٥.٨%) منهم كان الورم لديهم من نمط السرطانة القنوية الغازية IDC و (١٩.٨%) من نمط السرطانة الفصيصية الغازية ILC و (٠.٩%) مصابون بالسرطانة الموضوعة داخل الأبنية DCIS.
- (٥٤.١%) من الحالات كانت من الدرجة النسيجية الثانية و (٤١.٤%) من الدرجة الثالثة.
- (٦٠%) من الحالات أبدت نقائل للعقد اللمفاوية الإبطية مقابل (٤٠%) لم تبدي نقائل للعقد اللمفاوية NO.
- معظم الأورام كانت إيجابية لمستقبلات هرمونات الأستروجين ER+ (٨١.٨%) والبروجسترون PR+ (٧٥.٧%)، وسلبية لمستقبلات عامل النمو الظهاري Her2- (٧٧.٥%).
- تم تقييم حالة الانتكاس في ٩٩ من أصل ١١١ مريضة. من بين هؤلاء الـ ٩٩، عانت ٨ (٨.٠٨%) منهن من النكس، بينما كان ٨١ (٨١.٨%) منهن خاليات من النكس.
- وكان متوسط أعمار السيدات عند التشخيص ٥٢ عاماً.

Table 1. Patient characteristic

جدول رقم (١): الخصائص السريرية والباثولوجية للمرضى

N=111	
Age, years – median (range)	53 (26,80)
Diagnosis – no. (%)	
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)
Ductal + lobular features	15 (13.5)
Grade – no. (%)	
1	4 (3.6)
2	60 (54.1)
3	46 (41.4)
Missing	1 (0.9)
Stage–N – no. (%)	
0	45 (40.5)

Stage 1	34 (30.6)
Stage 2	14 (12.6)
Stage 3	18 (16.2)
Stage-T – no. (%)	
Stage 1	27 (24.3)
Stage 2	55 (49.5)
Stage 3	22 (19.8)
Stage 4	7 (6.3)
AJCC stage – no. (%)	
Stage I	16 (14.4)
Stage II	58 (52.3)
Stage III	37 (33.3)
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)
Positive lymph nodes – no. (%)	
None	46 (41.4)
≥1	65 (58.6)
Median (range)	4 (1,25)
ER – no. (%)	
Positive	90 (81.1)
Negative	21 (18.9)
PR – no. (%)	
Positive	84 (75.7)
Negative	27 (24.3)
Her2 neu – no. (%)	
Positive	7 (6.3)
Negative	86 (77.5)
Equivocal	18 (16.2)
chemotherapy – median (range)	2 (1,99)
Missing	1
Radiotherapy – no. (%)	
Not received	15 (13.5)
Received	39 (35.1)
Missing	57 (51.4)
Hormonal therapy – no. (%)	
Not received	9 (8.1)

Tamoxofon	38 (34.2)
Anasrazol	7 (6.3)
Missing	57 (51.4)
Diabetes – no. (%)	
Positive	10 (9)
Negative	41 (36.9)
Missing	60 (54.1)
Hypertension – no. (%)	
Positive	12 (10.8)
Negative	39 (35.1)
Missing	60 (54.1)

■ تم تقييم تعبيرية الواسمات المدروسة حسب التوصيات المتبعة كما يوضح (الجدول رقم ٢)

Table 2. Marker summary

جدول رقم (٢): الواسمات المستخدمة

N=111	
Ki67 – no. (%)	
<20% stain intensity = low Ki-67 expression	58 (52.3)
≥20%: stain intensity = high Ki-67 expression	32 (28.8)
NT: no tumor	8 (7.2)
Missing	13 (11.7)
TGF-β classification – no. (%)	
Intensity of stain is 0	13 (11.7)
Intensity of stain is 1-2	72 (64.9)
NT: no tumor	7 (6.3)
Missing	19 (17.1)
NFK classification – no. (%)	
The score of the % is 0-1	3 (2.7)
The score of the % is 2-4	86 (77.5)
Missing	22 (19.8)
Snail classification – no. (%)	
≤4: low expression	11 (9.9)

	N=111
>4: high snail expression	73 (65.8)
Missing	27 (24.3)
Vimentin e – no. (%)	
Positive	13 (11.7)
Negative	70 (63.1)
No tumor	4 (3.6)
Missing	24 (21.6)
E-cad – no. (%)	
Positive	68 (61.3)
Negative	16 (14.4)
No tumor	7 (6.3)
Missing	20 (18)
B-cat – no. (%)	
Membranous staining (positive)	38 (34.2)
Cytoplasmic staining (negative)	48 (43.2)
No tumor	7 (6.3)
Missing	18 (16.2)

■ الحالات ذات التعبير الإيجابي لل B-catenin أبدت تواتراً أعلى للأورام من النمط القنيوي الغازي IDC مقارنة

بالحالات ذات التعبير السلبي لل B-catenin (76.3% vs. 62.5%, $p < 0.001$) (تم توضيح العلاقة بين

تعبيرية ال B-catenin والسمات السريرية والباثولوجية المدروسة ضمن الجدول رقم ٣)

B-catenin		B-cat			P value*
	All (n=111)	Membranous	Cytoplasmic	No tumor (n=7)	
		staining	staining		
		(positive) (n=38)	(negative) (n=48)		
Diagnosis – no. (%)					<0.001
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	1 (2.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	29 (76.3)	30 (62.5)	3 (42.9)	
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	0 (0.0)	14 (29.2)	4 (57.1)	
Ductal + lobular features	15 (13.5)	8 (21.1)	4 (8.3)	0 (0.0)	
Grade – no. (%)					0.935
1	4 (3.6)	2 (5.3)	2 (4.2)	0 (0.0)	
2	60 (54.1)	20 (52.6)	26 (54.2)	5 (71.4)	
3	46 (41.4)	16 (42.1)	19 (39.6)	2 (28.6)	
Missing	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (2.1)	0 (0.0)	
Stage–N – no. (%)					0.958
0	45 (40.5)	15 (39.5)	18 (37.5)	4 (57.1)	
Stage 1	34 (30.6)	11 (28.9)	15 (31.2)	2 (28.6)	
Stage 2	14 (12.6)	5 (13.2)	6 (12.5)	1 (14.3)	
Stage 3	18 (16.2)	7 (18.4)	9 (18.8)	0 (0.0)	
Stage–T – no. (%)					0.430
Stage 1	27 (24.3)	5 (13.2)	9 (18.8)	3 (42.9)	
Stage 2	55 (49.5)	24 (63.2)	23 (47.9)	4 (57.1)	
Stage 3	22 (19.8)	7 (18.4)	11 (22.9)	0 (0.0)	
Stage 4	7 (6.3)	2 (5.3)	5 (10.4)	0 (0.0)	
AJCC stage – no. (%)					0.596
Stage I	16 (14.4)	4 (10.5)	5 (10.4)	2 (28.6)	

Table 3. Clinicopathological parameters by B-catenin classification

جدول رقم (٣): المعلومات السريرية والباثولوجية المدروسة

تبعاً لـ B-catenin

	All (n=111)	B-cat		No tumor (n=7)	P value*
		Membranous staining (positive) (n=38)	Cytoplasmic staining (negative) (n=48)		
Stage II	58 (52.3)	21 (55.3)	25 (52.1)	4 (57.1)	
Stage III	37 (33.3)	13 (34.2)	18 (37.5)	1 (14.3)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	35 (1,92)	40 (10,100)	22 (13,45)	0.282
Positive lymph nodes – no. (%)					0.648
None	46 (41.4)	16 (42.1)	18 (37.5)	4 (57.1)	
≥1	65 (58.6)	22 (57.9)	30 (62.5)	3 (42.9)	
ER – no. (%)					0.187
Positive	90 (81.1)	33 (86.8)	40 (83.3)	4 (57.1)	
Negative	21 (18.9)	5 (13.2)	8 (16.7)	3 (42.9)	
PR – no. (%)					0.099
Positive	84 (75.7)	29 (76.3)	39 (81.2)	3 (42.9)	
Negative	27 (24.3)	9 (23.7)	9 (18.8)	4 (57.1)	
Her2 neu – no. (%)					0.633
Positive	7 (6.3)	1 (2.6)	4 (8.3)	1 (14.3)	
Negative	86 (77.5)	31 (81.6)	36 (75.0)	5 (71.4)	
Equivocal	18 (16.2)	6 (15.8)	8 (16.7)	1 (14.3)	

* P value is calculated by Kruskal-wallis test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

- فيما يتعلق بالTGF-B (جدول رقم ٤): ترافقت الحالات ذات التعبيرية المرتفعة (حدة التلون 1 أو 2) بتواتر أعلى لكل من للأورام ذات الدرجة الثالثة (45.8% vs. 30.8%, p=0.036)، والأورام ذات المرحلة الثالثة AJCC Stage III (37.5% vs. 23.1%, p=0.042) وذلك مقارنة بالحالات ذات التعبيرية المنخفضة (حدة التلون 0). كما ترافقت هذه الحالات ذات التعبيرية المرتفعة مع متوسط أكبر لقياس الورم مقارنة بالحالات ذات التعبيرية المنخفضة (40 vs. 30, p=0.036).

جدول رقم (٤): المعلمات السريرية والباثولوجية					
TGF-B classification					
	TGF-B				
	Intensity of stain is 0 (n=13)	Intensity of stain is 1-2 (n=72)	NT: no tumor (n=7)	Unknown n group (n=19)	P value*
Diagnosis – no. (%)					
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	9 (69.2)	51 (70.8)	3 (42.9)	10 (52.6)
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	2 (15.4)	10 (13.9)	4 (57.1)	6 (31.5)
Ductal + lobular features	15 (13.5)	2 (15.4)	10 (13.9)	0 (0.0)	3 (15.7)
Grade – no. (%)					
1	4 (3.6)	3 (23.1)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
2	60 (54.1)	5 (38.5)	38 (52.8)	5 (71.4)	12 (63.2)
3	46 (41.4)	4 (30.8)	33 (45.8)	2 (28.6)	7 (36.8)
Missing	1 (0.9)	1 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Stage-N – no. (%)					
0	45 (40.5)	7 (53.8)	25 (34.7)	4 (57.1)	9 (47.4)
Stage 1	34 (30.6)	4 (30.8)	22 (30.6)	2 (28.6)	6 (31.5)
Stage 2	14 (12.6)	1 (7.7)	10 (13.9)	1 (14.3)	2 (10.5)
Stage 3	18 (16.2)	1 (7.7)	15 (20.8)	0 (0.0)	2 (10.5)

Table 4. Clinicopathological parameters by TGF-B classification

جدول رقم (٤): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً لـ TGF-B

	TGF-B					P value*
	All (n=111)	Intensity of stain is 0 (n=13)	Intensity of stain is 1-2 (n=72)	NT: no tumor (n=7)	Unknown n group (n=19)	
Stage-T – no. (%)						0.199
Stage 1	27 (24.3)	5 (38.5)	12 (16.7)	4 (57.1)	6 (31.5)	
Stage 2	55 (49.5)	6 (46.2)	39 (54.2)	3 (42.9)	7 (36.8)	
Stage 3	22 (19.8)	2 (15.4)	14 (19.4)	0 (0.0)	6 (31.5)	
Stage 4	7 (6.3)	0 (0.0)	7 (9.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
AJCC stage – no. (%)						0.042
Stage I	16 (14.4)	4 (30.8)	6 (8.3)	3 (42.9)	3 (15.7)	
Stage II	58 (52.3)	6 (46.2)	39 (54.2)	3 (42.9)	10 (52.6)	
Stage III	37 (33.3)	3 (23.1)	27 (37.5)	1 (14.3)	6 (31.5)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	30 (10,92)	40 (1,100)	20 (13,45)		0.036
Positive lymph nodes – no. (%)						0.322
None	46 (41.4)	7 (53.8)	26 (36.1)	4 (57.1)	9 (47.7)	
≥1	65 (58.6)	6 (46.2)	46 (63.9)	3 (42.9)	10 (52.6)	
ER – no. (%)						0.707
Positive	90 (81.1)	10 (76.9)	59 (81.9)	5 (71.4)	16 (84.2)	
Negative	21 (18.9)	3 (23.1)	13 (18.1)	2 (28.6)	3 (15.7)	
PR – no. (%)						0.570
Positive	84 (75.7)	10 (76.9)	54 (75.0)	4 (57.1)	16 (84.2)	
Negative	27 (24.3)	3 (23.1)	18 (25.0)	3 (42.9)	3 (15.7)	
Her2 neu – no. (%)						0.786
Positive	7 (6.3)	0 (0.0)	5 (6.9)	1 (14.3)	1 (5.3)	
Negative	86 (77.5)	11 (84.6)	56 (77.8)	5 (71.4)	14 (73.7)	
Equivocal	18 (16.2)	2 (15.4)	11 (15.3)	1 (14.3)	4 (21.0)	

* P value is calculated by Kruskal-wallis test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

■ الحالات ذات التعبير المنخفضة ل Snail أظهرت تواتراً أعلى للأورام ذات العدد الأكبر من العقد اللمفاوية

المصابة (higher frequency of N Stage 3) مقارنة بالأورام ذات التعبير المرتفعة ل Snail (54.5%)

(الجدول رقم ٥) .(vs. 15.1%, p=0.037

Table 5. Clinicopathological parameters by Snail classification
جدول رقم (٥): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة
تبعاً ل Snail

	Snail				P value*
	All (n=111)	≤4: low expression (n=11)	>4: high snail expression (n=73)	Unknown group (n=27)	
Diagnosis – no. (%)					0.131
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	7 (63.6)	53 (72.6)	13 (48.1)	
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	4 (36.4)	8 (11.0)	10 (37.1)	
Ductal + lobular features	15 (13.5)	0 (0.0)	11 (15.1)	4 (14.8)	
Grade – no. (%)					0.858
1	4 (3.6)	0 (0.0)	4 (5.5)	0 (0.0)	
2	60 (54.1)	7 (63.6)	36 (49.3)	17 (62.3)	
3	46 (41.4)	4 (36.4)	32 (43.8)	10 (37.1)	
Missing	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	
Stage–N – no. (%)					0.037
0	45 (40.5)	3 (27.3)	30 (41.1)	12 (44.4)	
Stage 1	34 (30.6)	2 (18.2)	22 (30.1)	10 (37.1)	
Stage 2	14 (12.6)	0 (0.0)	10 (13.7)	4 (14.8)	
Stage 3	18 (16.2)	6 (54.5)	11 (15.1)	1 (3.7)	
Stage–T – no. (%)					0.051
Stage 1	27 (24.3)	0 (0.0)	16 (21.9)	11 (40.7)	
Stage 2	55 (49.5)	6 (54.5)	38 (52.1)	11 (40.7)	
Stage 3	22 (19.8)	2 (18.2)	15 (20.5)	5 (18.5)	
Stage 4	7 (6.3)	3 (27.3)	4 (5.5)	0 (0.0)	

Table 5. Clinicopathological parameters by snail classification

جدول رقم (٥): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة
تبعاً لـ Snail

	Snail				P value*
	All (n=111)	≤4: low expression (n=11)	>4: high snail expression (n=73)	Unknown group (n=27)	
AJCC stage – no. (%)					0.266
Stage I	16 (14.4)	0 (0.0)	10 (13.7)	6 (22.2)	
Stage II	58 (52.3)	5 (45.5)	39 (53.4)	14 (51.8)	
Stage III	37 (33.3)	6 (54.5)	24 (32.9)	7 (26.0)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	40 (25,90)	35 (1,100)		0.188
Positive lymph nodes – no. (%)					0.513
None	46 (41.4)	3 (27.3)	31 (42.5)	12 (44.4)	
≥1	65 (58.6)	8 (72.7)	42 (57.5)	15 (55.5)	
ER – no. (%)					0.405
Positive	90 (81.1)	8 (72.7)	61 (83.6)	21 (77.8)	
Negative	21 (18.9)	3 (27.3)	12 (16.4)	6 (22.2)	
PR – no. (%)					0.284
Positive	84 (75.7)	7 (63.6)	57 (78.1)	20 (74.0)	
Negative	27 (24.3)	4 (36.4)	16 (21.9)	7 (26.0)	
Her2 neu – no. (%)					0.241
Positive	7 (6.3)	1 (9.1)	4 (5.5)	2 (7.4)	
Negative	86 (77.5)	10 (90.9)	56 (76.7)	20 (74.0)	
Equivocal	18 (16.2)	0 (0.0)	13 (17.8)	5 (18.5)	

* P value is calculated by Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

- أبدت الحالات ذات التعبير الزائدة لـ NF-κB احتمالية أكبر لتشخيص السرطان القنوي الغازي، واحتمالية أكبر لإيجابية مستقبلات الأستروجين والبروجسترون وسلبية مستقبلات الـ Her-2، إلا أن هذه الفروقات لم تكن ذات دلالة هامة إحصائياً. وبالتالي فإننا ضمن هذه الدراسة لم نجد أي ارتباط هام إحصائياً بين تعبيرية NF-κB والعوامل السريرية والباثولوجية المدروسة. (جدول رقم ٦)

Table 6. Clinicopathological parameters by		جدول رقم (٦): المعلمات السريرية والباثولوجية			
NFK classification		المدروسة تبعاً لـ NF-κB			
		NFK			P value*
		The score of the % is 0-1 (n=3)	The score of the % is 2-4 (n=86)	Unknown group (n=22)	
All (n=111)					
Diagnosis – no. (%)					>0.99
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.2)	0 (0.0)	
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	3 (100.0)	58 (67.4)	12 (54.5)	
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	0 (0.0)	14 (16.3)	8 (36.4)	
Ductal + lobular features	15 (13.5)	0 (0.0)	13 (15.1)	2 (9.0)	
Grade – no. (%)					>0.99
1	4 (3.6)	0 (0.0)	4 (4.7)	0 (0.0)	
2	60 (54.1)	2 (66.7)	45 (52.3)	13 (59.1)	
3	46 (41.4)	1 (33.3)	36 (41.9)	9 (40.9)	
Missing	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.2)	0 (0.0)	
Stage-N – no. (%)					0.395
0	45 (40.5)	2 (66.7)	32 (37.2)	11 (50.0)	
Stage 1	34 (30.6)	0 (0.0)	27 (31.4)	7 (31.8)	
Stage 2	14 (12.6)	1 (33.3)	10 (11.6)	3 (13.6)	
Stage 3	18 (16.2)	0 (0.0)	17 (19.8)	1 (4.5)	
Stage-T – no. (%)					0.510
Stage 1	27 (24.3)	1 (33.3)	15 (17.4)	11 (50.0)	
Stage 2	55 (49.5)	1 (33.3)	47 (54.7)	7 (31.8)	

Table 6. Clinicopathological parameters by NFK classification

جدول رقم (٦): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة تبعاً ل NF-κB

	All (n=111)	NFK			P value*
		The score of the % is 0-1 (n=3)	The score of the % is 2-4 (n=86)	Unknown group (n=22)	
Stage 3	22 (19.8)	1 (33.3)	17 (19.8)	4 (18.2)	>0.99
Stage 4	7 (6.3)	0 (0.0)	7 (8.1)	0 (0.0)	
AJCC stage – no. (%)					
Stage I	16 (14.4)	0 (0.0)	10 (11.6)	6 (27.2)	>0.99
Stage II	58 (52.3)	2 (66.7)	45 (52.3)	11 (50.0)	
Stage III	37 (33.3)	1 (33.3)	31 (36.0)	5 (22.7)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	40 (17,92)	36.5 (1,100)		0.741
Positive lymph nodes – no. (%)					0.559
None	46 (41.4)	2 (66.7)	33 (38.4)	11 (50.0)	>0.99
≥1	65 (58.6)	1 (33.3)	53 (61.6)	11 (50.0)	
ER – no. (%)					
Positive	90 (81.1)	3 (100.0)	71 (82.6)	16 (72.7)	>0.99
Negative	21 (18.9)	0 (0.0)	15 (17.4)	6 (27.2)	
PR – no. (%)					
Positive	84 (75.7)	3 (100.0)	65 (75.6)	16 (72.7)	>0.99
Negative	27 (24.3)	0 (0.0)	21 (24.4)	6 (27.2)	
Her2 neu – no. (%)					
Positive	7 (6.3)	0 (0.0)	5 (5.8)	2 (9.1)	>0.99
Negative	86 (77.5)	3 (100.0)	67 (77.9)	16 (72.7)	
Equivocal	18 (16.2)	0 (0.0)	14 (16.3)	4 (18.2)	

* P value is calculated by Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

■ أظهرت الأورام السلبية للـ Vimentin تواتراً أقل للمرحلة الأولى AJCC Stage I (8.6% vs. 30.8%,)

($p=0.030$)، وتواتراً أعلى للحالات سلبية الـ Her-2 ($p=0.049$, 53.8% vs. 82.9%)، وذلك مقارنة

بالأورام الإيجابية للـ Vimentin. (جدول رقم ٧)

Table 7. Clinicopathological parameters by					جدول رقم (٧): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة	
Vimentin					تبعاً لـ Vimentin	
	Vimentin					
	All	Positive	Negative	No tumor	Unknown	P
	(n=111)	(n=13)	(n=70)	(n=4)	n group (n=24)	value*
Diagnosis – no. (%)						0.324
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	11 (84.6)	48 (68.6)	2 (50.0)	12 (50.0)	
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	2 (15.4)	10 (14.3)	2 (50.0)	8 (33.3)	
Ductal + lobular features	15 (13.5)	0 (0.0)	11 (15.7)	0 (0.0)	4 (16.7)	
Grade – no. (%)						0.742
1	4 (3.6)	0 (0.0)	4 (5.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
2	60 (54.1)	6 (46.2)	38 (54.3)	3 (75.0)	13 (54.2)	
3	46 (41.4)	7 (53.8)	28 (40.0)	1 (25.0)	10 (41.6)	
Missing	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.6)	
Stage–N – no. (%)						0.322
0	45 (40.5)	8 (61.5)	24 (34.3)	3 (75.0)	10 (41.6)	
Stage 1	34 (30.6)	3 (23.1)	22 (31.4)	0 (0.0)	9 (37.5)	
Stage 2	14 (12.6)	1 (7.7)	9 (12.9)	1 (25.0)	3 (12.5)	
Stage 3	18 (16.2)	1 (7.7)	15 (21.4)	0 (0.0)	2 (8.3)	
Stage–T – no. (%)						0.315
Stage 1	27 (24.3)	4 (30.8)	12 (17.1)	3 (75.0)	8 (33.3)	
Stage 2	55 (49.5)	6 (46.2)	38 (54.3)	1 (25.0)	10 (41.6)	
Stage 3	22 (19.8)	2 (15.4)	14 (20.0)	0 (0.0)	6 (25.0)	
Stage 4	7 (6.3)	1 (7.7)	6 (8.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	

Table 7. Clinicopathological parameters by **جدول رقم (٧):** المعلومات السريرية والباثولوجية المدروسة
Vimentin تبعاً لـ Vimentin

	Vimentin				Unknown n group (n=24)	P value*
	All (n=111)	Positive (n=13)	Negative (n=70)	No tumor (n=4)		
AJCC stage – no. (%)						0.030
Stage I	16 (14.4)	4 (30.8)	6 (8.6)	2 (50.0)	4 (16.7)	
Stage II	58 (52.3)	7 (53.8)	37 (52.9)	1 (25.0)	13 (54.2)	
Stage III	37 (33.3)	2 (15.4)	27 (38.6)	1 (25.0)	7 (29.1)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	30 (13,92)	36.5 (1,100)	20 (15,30)		0.125
Positive lymph nodes – no. (%)						0.095
None	46 (41.4)	8 (61.5)	25 (35.7)	3 (75.0)	10 (41.6)	
≥1	65 (58.6)	5 (38.5)	45 (64.3)	1 (25.0)	14 (58.4)	
ER – no. (%)						0.522
Positive	90 (81.1)	10 (76.9)	59 (84.3)	3 (75.0)	18 (75.0)	
Negative	21 (18.9)	3 (23.1)	11 (15.7)	1 (25.0)	6 (25.0)	
PR – no. (%)						0.682
Positive	84 (75.7)	9 (69.2)	55 (78.6)	3 (75.0)	17 (70.8)	
Negative	27 (24.3)	4 (30.8)	15 (21.4)	1 (25.0)	7 (29.2)	
Her2 neu – no. (%)						0.049
Positive	7 (6.3)	1 (7.7)	4 (5.7)	1 (25.0)	1 (4.2)	
Negative	86 (77.5)	7 (53.8)	58 (82.9)	3 (75.0)	18 (75.0)	
Equivocal	18 (16.2)	5 (38.5)	8 (11.4)	0 (0.0)	5 (20.8)	

* P value is calculated by Kruskal–wallis for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

■ أبدت الحالات ذات التعبيرية المنخفضة لـ Ki-67 تواتراً أعلى للأورام من المرحلة الثالثة AJCC Stage III

مقارنة بالحالات ذات التعبيرية المرتفعة لـ Ki-67 (43.1% vs. 21.9%, p=0.044)

كما أبدت الحالات ذات التعبيرية المنخفضة لـ Ki-67 متوسطاً أكبر لقياس الورم مقارنة بالحالات ذات

التعبيرية المرتفعة لـ Ki-67 (40 vs. 30, p=0.049). (جدول رقم ٨)

Table 8. Clinicopathological parameters by				جدول رقم (٨): المعلومات السريرية والباثولوجية المدروسة		
Ki67 classification				تبعاً لـ Ki-67		
		Ki67				
	All (n=111)	<20% stain intensity = low Ki- 67 expressio n (n=58)	≥20%: stain intensity = high Ki- 67 expressio n (n=32)	NT: no tumor (n=8)	Unknow n group (n=13)	P value*
Diagnosis – no. (%)						0.088
Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	1 (1.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	40 (69.0)	24 (75.0)	3 (37.5)	6 (46.1)	
Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	9 (15.5)	4 (12.5)	5 (62.5)	4 (30.7)	
Ductal + lobular features	15 (13.5)	8 (13.8)	4 (12.5)	0 (0.0)	3 (23.0)	
Grade – no. (%)						0.541
1	4 (3.6)	4 (6.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
2	60 (54.1)	30 (51.7)	17 (53.1)	6 (75.0)	7 (53.8)	
3	46 (41.4)	24 (41.4)	14 (43.8)	2 (25.0)	6 (46.1)	
Missing	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Stage–N – no. (%)						0.462
0	45 (40.5)	20 (34.5)	14 (43.8)	5 (62.5)	6 (46.1)	
Stage 1	34 (30.6)	17 (29.3)	11 (34.4)	2 (25.0)	4 (30.7)	
Stage 2	14 (12.6)	7 (12.1)	4 (12.5)	1 (12.5)	2 (15.3)	
Stage 3	18 (16.2)	14 (24.1)	3 (9.4)	0 (0.0)	1 (7.6)	
Stage–T – no. (%)						0.148
Stage 1	27 (24.3)	10 (17.2)	8 (25.0)	4 (50.0)	5 (38.4)	
Stage 2	55 (49.5)	27 (46.6)	20 (62.5)	3 (37.5)	5 (38.4)	

Table 8. Clinicopathological parameters by
Ki67 classification

جدول رقم (٨): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة
تبعاً لـ Ki-67

	All (n=111)	Ki67		NT: no tumor (n=8)	Unknown group (n=13)	P value*
		<20% stain intensity = low Ki- 67 expressio n (n=58)	≥20%: stain intensity = high Ki- 67 expressio n (n=32)			
Stage 3	22 (19.8)	15 (25.9)	3 (9.4)	1 (12.5)	3 (23.0)	0.044
Stage 4	7 (6.3)	6 (10.3)	1 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	
AJCC stage – no. (%)						
Stage I	16 (14.4)	7 (12.1)	3 (9.4)	3 (37.5)	3 (23.0)	0.049
Stage II	58 (52.3)	26 (44.8)	22 (68.8)	4 (50.0)	6 (46.1)	
Stage III	37 (33.3)	25 (43.1)	7 (21.9)	1 (12.5)	4 (30.7)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	40 (1,100)	30 (10,80)	21 (13,55)		0.244
Positive lymph nodes – no. (%)						0.250
None	46 (41.4)	20 (34.5)	15 (46.9)	5 (62.5)	6 (46.1)	
≥1	65 (58.6)	38 (65.5)	17 (53.1)	3 (37.5)	7 (53.8)	
ER – no. (%)						0.190
Positive	90 (81.1)	49 (84.5)	25 (78.1)	5 (62.5)	11 (84.6)	
Negative	21 (18.9)	9 (15.5)	7 (21.9)	3 (37.5)	2 (15.3)	
PR – no. (%)						0.551
Positive	84 (75.7)	46 (79.3)	23 (71.9)	4 (50.0)	11 (84.6)	
Negative	27 (24.3)	12 (20.7)	9 (28.1)	4 (50.0)	2 (15.3)	
Her2 neu – no. (%)						0.551
Positive	7 (6.3)	4 (6.9)	2 (6.2)	1 (12.5)	0 (0.0)	
Negative	86 (77.5)	42 (72.4)	27 (84.4)	6 (75.0)	11 (84.6)	
Equivocal	18 (16.2)	12 (20.7)	3 (9.4)	1 (12.5)	2 (15.3)	

* P value is calculated by Kruskal–wallis test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

كما هو متوقع أبدت الحالات الإيجابية لـ E-cadherin تواتراً أعلى للأورام ذات النمط النسيجي القنويوي الغازي

IDC مقارنة بالأورام سلبية الـ E-cadherin (82.4% vs. 31.2%, $p < 0.001$). (جدول رقم ٩)

Table 9. Clinicopathological parameters by				جدول رقم (٩): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة		
E-cadherin				تبعاً لـ E-cadherin		
	E-cad					
	All	Positive	Negative	No tumor	Unknown	P
	(n=111)	(n=68)	(n=16)	(n=7)	group (n=20)	value*
Diagnosis – no. (%)						<0.001
DCIS: Ductal carcinoma in situ	1 (0.9)	1 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.358
IDC: Invasive ductal carcinoma	73 (65.8)	56 (82.4)	5 (31.2)	3 (42.9)	9 (45.0)	
ILC: Invasive lobular carcinoma	22 (19.8)	3 (4.4)	9 (56.2)	3 (42.9)	7 (35.0)	
Ductal + lobular features	15 (13.5)	8 (11.8)	2 (12.5)	1 (14.3)	4 (20.0)	
Grade – no. (%)						0.778
1	4 (3.6)	2 (2.9)	1 (6.2)	0 (0.0)	1 (5.0)	0.463
2	60 (54.1)	34 (50.0)	11 (68.8)	5 (71.4)	10 (50.0)	
3	46 (41.4)	32 (47.1)	4 (25.0)	2 (28.6)	8 (40.0)	
Missing	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	
Stage–N – no. (%)						0.115
0	45 (40.5)	25 (36.8)	7 (43.8)	5 (71.4)	8 (40.0)	0.463
Stage 1	34 (30.6)	21 (30.9)	5 (31.2)	2 (28.6)	6 (30.0)	
Stage 2	14 (12.6)	9 (13.2)	1 (6.2)	0 (0.0)	4 (20.0)	
Stage 3	18 (16.2)	13 (19.1)	3 (18.8)	0 (0.0)	2 (10.0)	
Stage–T – no. (%)						0.463
Stage 1	27 (24.3)	15 (22.1)	1 (6.2)	3 (42.9)	8 (40.0)	0.463
Stage 2	55 (49.5)	34 (50.0)	10 (62.5)	4 (57.1)	7 (35.0)	
Stage 3	22 (19.8)	14 (20.6)	4 (25.0)	0 (0.0)	4 (20.0)	
Stage 4	7 (6.3)	5 (7.4)	1 (6.2)	0 (0.0)	1 (5.0)	
AJCC stage – no. (%)						0.115
Stage I	16 (14.4)	8 (11.8)	1 (6.2)	3 (42.9)	4 (20.0)	

Table 9. Clinicopathological parameters by E-cadherin

جدول رقم (٩): المعلمات السريرية والباثولوجية المدروسة
تبعاً لـ E-cadherin

	E-cad				Unknown group (n=20)	P value*
	All (n=111)	Positive (n=68)	Negative (n=16)	No tumor (n=7)		
Stage II	58 (52.3)	36 (52.9)	9 (56.2)	4 (57.1)	9 (45.0)	
Stage III	37 (33.3)	24 (35.3)	6 (37.5)	0 (0.0)	7 (35.0)	
Exact Size (mm) – median (range)	33 (1,100)	35 (1,100)	40 (11,85)	22 (13,45)		0.079
Positive lymph nodes – no. (%)						0.235
None	46 (41.4)	26 (38.2)	7 (43.8)	5 (71.4)	8 (40.0)	
≥1	65 (58.6)	42 (61.8)	9 (56.2)	2 (28.6)	12 (60.0)	
ER – no. (%)						0.714
Positive	90 (81.1)	56 (82.4)	14 (87.5)	5 (71.4)	15 (75.0)	
Negative	21 (18.9)	12 (17.6)	2 (12.5)	2 (28.6)	5 (25.0)	
PR – no. (%)						0.525
Positive	84 (75.7)	52 (76.5)	13 (81.2)	4 (57.1)	15 (75.0)	
Negative	27 (24.3)	16 (23.5)	3 (18.8)	3 (42.9)	5 (25.0)	
Her2 neu – no. (%)						0.644
Positive	7 (6.3)	3 (4.4)	1 (6.2)	1 (14.3)	2 (10.0)	
Negative	86 (77.5)	51 (75.0)	13 (81.2)	5 (71.4)	17 (85.0)	
Equivocal	18 (16.2)	14 (20.6)	2 (12.5)	1 (14.3)	1 (5.0)	

* P value is calculated by Kruskal–wallis test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

Table 10. Univariable Cox proportional hazard regression with Firth's penalized likelihood of overall survival on markers

جدول رقم (١٠): نسبة البقيا الإجمالية وفق الواسمات المدروسة باستخدام نموذج انحدار الخطر النسبي لكوكس

	OS			RFS		
	Event/n	HR (95% CI)	P	Event/n	HR (95% CI)	P
≤4: low expression	1/11	Ref.		2/11	Ref.	
>4: high snail expression	10/70	1.27 (0.30–11.74)	0.782	13/70	0.92 (0.28–4.69)	0.907
Vimentin e						
Negative	10/67	Ref.		13/67	Ref.	
Positive	1/13	0.75 (0.08–3.18)	0.731	3/13	1.53 (0.39–4.47)	0.499
No tumor	1/4	2.76 (0.30–11.79)	0.305	1/4	2.06 (0.23–8.44)	0.445
E-cad						
Negative	0/16	Ref.		1/16	Ref.	
Positive	11/65	5.97 (0.78–766.84)		14/65	2.51 (0.62–22.87)	0.225
No tumor	2/7	13.50 (1.10–1862.60)	0.042	2/7	4.48 (0.59–48.99)	0.140
B-cat						
Cytoplasmic staining (negative)	3/47	Ref.		7/47	Ref.	
Membranous staining (positive)	8/36	3.90 (1.19–15.93)	0.024	9/36	1.96 (0.75–5.33)	0.168
No tumor	2/7	5.84 (0.97–30.13)	0.053	2/7	2.60 (0.49–9.78)	0.231

Event/n, the number of events and patients; HR, hazard ratio; CI, confidence interval

■ وبدراسة العلاقة بين الواسمات النمط النسيجي للورم وجدنا ارتباطاً بين النمط القنيوي الغازي وزيادة تعبيرية كل

من الواسمات التالية: Ki-67, TGF-B, E-cadherin, B-catenin (جدول رقم ١١)

Table 11. Distribution of markers by diagnosis for IDC and ILC patients only		جدول رقم (١١): توزع الواسمات المدروسة تبعاً للنمطين النسيجين القنيوي والفصيصي فقط		
	All (n=95)	IDC: Invasive ductal carcinoma (n=73)	ILC: Invasive lobular carcinoma (n=22)	P value*
Ki67 – no. (%)				0.018
≥20%: stain intensity = high Ki-67 expression	28 (29.5)	24 (32.9)	4 (18.2)	
<20% stain intensity = low Ki-67 expression	49 (51.6)	40 (54.8)	9 (40.9)	
NT: no tumor	8 (8.4)	3 (4.1)	5 (22.7)	
Missing	10 (10.5)	6 (8.2)	4 (18.2)	
TGF-B classification – no. (%)				0.045
Intensity of stain is 0	11 (11.6)	9 (12.3)	2 (9.1)	
Intensity of stain is 1-2	61 (64.2)	51 (69.9)	10 (45.5)	
NT: no tumor	7 (7.4)	3 (4.1)	4 (18.2)	
Missing	16 (16.8)	10 (13.7)	6 (27.3)	
NFK classification – no. (%)				>0.99
The score of the % is 0-1	3 (3.2)	3 (4.1)	0 (0.0)	
The score of the % is 2-4	72 (75.8)	58 (79.5)	14 (63.6)	
Missing	20 (21.1)	12 (16.4)	8 (36.4)	
Snail classification – no. (%)				0.078
≤4: low expression	11 (11.6)	7 (9.6)	4 (18.2)	
>4: high snail expression	61 (64.2)	53 (72.6)	8 (36.4)	
Missing	23 (24.2)	13 (17.8)	10 (45.5)	
Vimentin e – no. (%)				0.250
Positive	13 (13.7)	11 (15.1)	2 (9.1)	
Negative	58 (61.1)	48 (65.8)	10 (45.5)	
No tumor	4 (4.2)	2 (2.7)	2 (9.1)	
Missing	20 (21.1)	12 (16.4)	8 (36.4)	

Table 11. Distribution of markers by diagnosis for IDC and ILC patients only

جدول رقم (١١): توزيع الواسمات المدروسة تبعاً للنمطين النسيجين القنوي والفصيصي فقط

		IDC: Invasive ductal carcinoma (n=73)	ILC: Invasive lobular carcinoma (n=22)	P value*
	All (n=95)			
E-cad – no. (%)				<0.001
No tumor	6 (6.3)	3 (4.1)	3 (13.6)	
Positive	59 (62.1)	56 (76.7)	3 (13.6)	
Negative	14 (14.7)	5 (6.8)	9 (40.9)	
Missing	16 (16.8)	9 (12.3)	7 (31.8)	
B-cat – no. (%)				<0.001
Cytoplasmic staining (negative)	44 (46.3)	30 (41.1)	14 (63.6)	
Membranous staining (positive)	29 (30.5)	29 (39.7)	0 (0.0)	
No tumor	7 (7.4)	3 (4.1)	4 (18.2)	
Missing	15 (15.8)	11 (15.1)	4 (18.2)	

* P value is calculated by Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables

المناقشة Discussion:

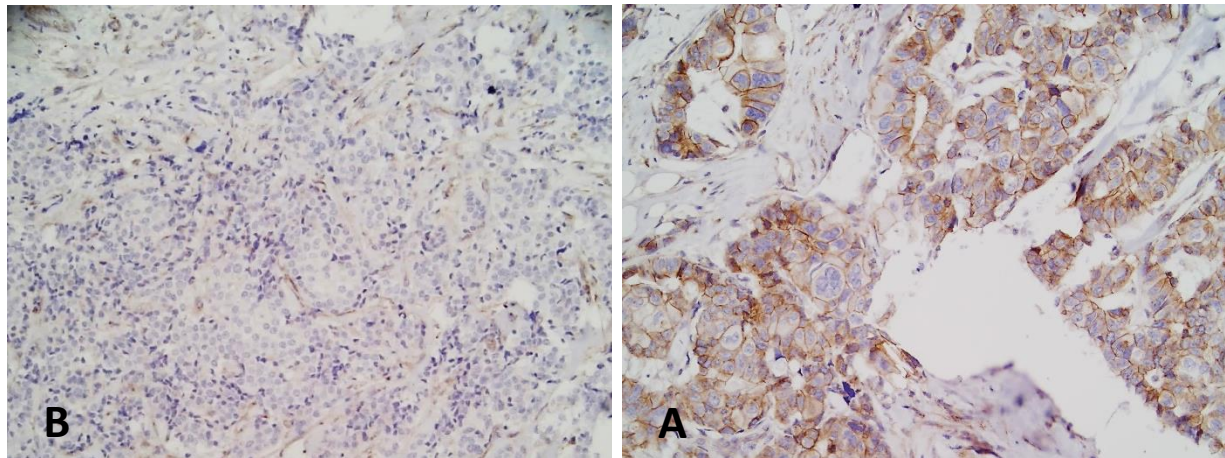
- يشارك β -catenin في حدثية التسرطن من خلال مسار إشارات Wnt. يؤدي تنشيط هذا المسار إلى التعبير النووي والسيتوبلازمي لهذا الواسم. وقد لوحظ التنشيط الشاذ لمسار إشارات β -catenin في العديد من الأورام الخبيثة بما في ذلك سرطان الثدي. ومع ذلك فإن أهميته في سرطان الثدي لا تزال غير مفهومة جيداً. أظهرت الدراسات الحديثة أن تنشيط β -catenin/Wnt والتعبير السيتوبلازمي/النووي غير الطبيعي لـ β -catenin في العديد من سرطانات الإنسان بما في ذلك سرطان الثدي، يرتبط بزيادة الغزو والنقائل وسوء الإنذار [59].

يتواجد β -catenin في الغشاء الخلوي للخلايا الظهارية الطبيعية والخلايا السرطانية غير الغازية، ويتفاعل مع E-cadherin الذي يعتبر منظماً مهماً لالتصاق الخلايا. ويعكس توطين β -catenin في السيتوبلازم انفصاله عن E-cadherin. بعد ذلك ينتقل β -catenin إلى النواة حيث يتحكم في التعبير الجيني من خلال ارتباطه بأعضاء عائلة عوامل الانتساخ (TCF) T-cell factor. بعض الأهداف الانتساخية لـ β -catenin/TCF المتورطة في بدء الورم وتقدمه تشمل منظمات دورة الخلية cyclin D1 و c-Myc. يعد EMT آلية مهمة لتطور السرطان والخطوة الأولى من النقائل. من المحتمل أن يعزز فقدان E-cadherin إطلاق β -catenin ويسهل EMT [24]. أثناء EMT يؤدي انقسام E-cadherin إلى زعزعة استقرار تقاطعات الالتصاق وإطلاق β -catenin ليعمل كمنشط نسخي لتكاثر الخلايا [60].

يتكون سرطان الثدي الفصيصي الغازي كلاسيكياً من خلايا ورمية غير متماسكة ترتشح كخلايا مفردة أو في خيوط خطية. يحدث هذا النمط الظاهري غير المتماسك بسبب تعطيل E-cadherin مما يؤدي إلى انتقال β -catenin إلى السيتوبلازم أو نواة الخلية ويفقد تعبيره الغشائي. وجد جايبير وزملاؤه Geyer et al ارتباطاً قوياً بين نقص التعبير الغشائي لـ β -catenin والنوع النسيجي الفصيصي [60]. كما قدم براساد وزملاؤه Prasad et al أدلة سريرية لدعم زيادة تنظيم إشارات Wnt/ β -catenin في سرطان الثدي القنوي الغازي [1]. وهو ما يتوافق مع

دراستنا حيث كان هناك تواتر أعلى لتشخيص النمط القنويوي الغازي في المرضى الذين لديهم تعبير إيجابي (غشائي) عن β -catenin مقارنة بأولئك الذين لديهم تعبير سلبي عن β -catenin، وارتباط كبير بين تشخيص سرطان القنوات الغازي وتعبير β -catenin. وجدت دراسات متعددة ارتباطاً بين نقص/انخفاض التعبير الغشائي لـ β -catenin وسرطان الثدي الثلاثي السلبي [61][60]. ووجد آخرون علاقة مهمة بين التعبير الشاذ عن β -catenin وسلبيية HER2 [59]. لم تجد هذه الدراسة الحالية مثل هذه الارتباطات.

في العقود الأخيرة، أظهر عدد متزايد من الدراسات أن إشارات Wnt/ β -catenin تتطوي على تكاثر ونقائل خلايا سرطان الثدي وتنظيم البيئة المكروية لها والحفاظ على الخلايا الجذعية ومقاومة العلاج وتشكيل النمط



الشكل رقم (٢٧): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ B-catenin (A) التلون الغشائي الإيجابي للـ B-catenin (B) سلبيية الـ B-catenin

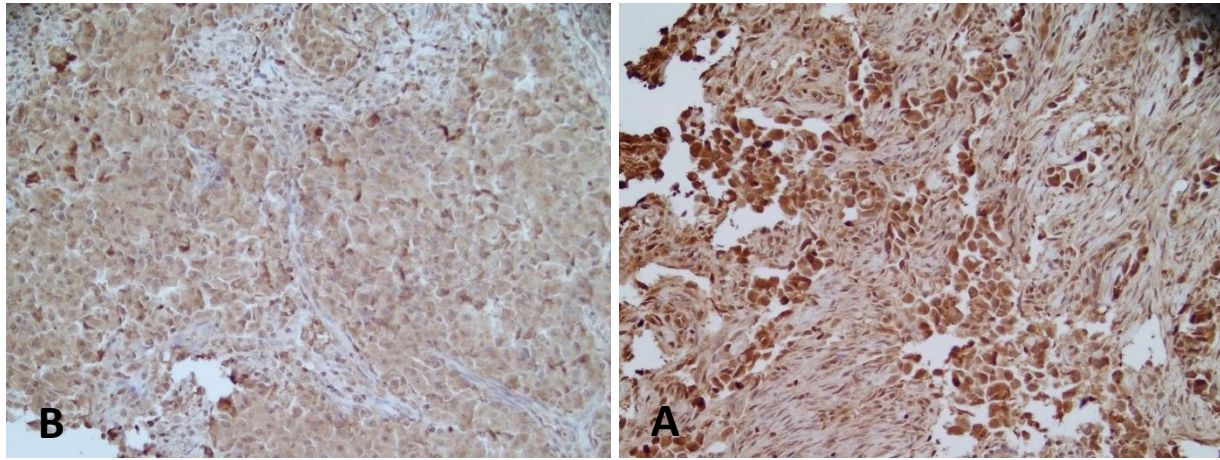
الظاهري لسرطان الثدي [62]. عندما يتم بدء إشارات Wnt يتم بعد ذلك نقل الإشارة إلى β -catenin عبر مكونات التابع السيتوبلازمية المختلفة لتثبيت β -catenin السيتوبلازمي. ثم يتراكم β -catenin ويدخل النواة لتنشيط نسخ جينات هدف Wnt من خلال التفاعل مع بروتينات LEF/TCF. وبالتالي يمكن أن يؤدي تنشيط مسار Wnt إلى تكوّن الورم [27].

أشارت دراسات سابقة متعددة إلى أن التراكم النووي والسيتوبلازمي لـ β -catenin يرتبط بانخفاض معدل البقيا الإجمالي لدى جميع مرضى سرطان الثدي. اقترح شين وزملاؤه Shen et al أن انخفاض معدل β -catenin كان مرتبطاً بشكل كبير بضعف معدل البقيا الإجمالي [33]. وجد وانجون وزملاؤه Wangon et al أن التعبير عن β -catenin ارتبط سلباً بمعدل البقيا في سرطان الثدي [32]. وكشفت نتائج دراستنا أيضاً عن وجود ارتباط بين β -catenin الإيجابي (الغشائي) وارتفاع خطر الوفاة.

في دراسة أجراها لي Lee ارتبط التعبير غير الطبيعي عن β -catenin بشكل كبير بنقائل العقد اللمفاوية وارتبط نقص التعبير الغشائي بدرجة أعلى من الورم. في دراستنا لم نجد أي ارتباط ذي دلالة إحصائية بين التعبير عن β -catenin ونقائل العقد اللمفاوية أو درجة الورم. على الرغم من أن نفس الدراسة تتوافق مع دراستنا حول إيجاد ارتباط مهم بين التعبير عن β -catenin وضعف البقيا الخالي من المرض [63].

- كما ذكرنا سابقاً على الرغم من أن $\text{TGF-}\beta$ يعمل كمضاد للورم أثناء المراحل المبكرة من عملية التسرطن إلا أنه يحفز تعزيز النقائل من خلال تعزيز حركة الخلايا السرطانية وغزوها في المراحل المتأخرة. غالباً ما يُفقد التأثير المضاد للتكاثر لـ $\text{TGF-}\beta$ خلال السرطان، وفي كثير من الحالات يرجع هذا إلى تغير إشارات $\text{TGF-}\beta$ الناجم عن الطفرات الجسدية في مكونات إشارات $\text{TGF-}\beta$ أو عن طريق منع الاستجابات الخلوية لـ $\text{TGF-}\beta$ بشكل انتقائي [64]. تم إثبات كل من أنشطة $\text{TGF-}\beta 1$ المثبطة للورم والمعرزة للورم بوضوح في مجموعة متنوعة من سلالات الفئران المعدلة وراثياً، والتي تم فيها إسكات مسار إشارات $\text{TGF-}\beta 1$ أو تعديله. تدعم هذه الدراسات النموذج القائل أن $\text{TGF-}\beta 1$ يثبط تطور الآفات الحميدة المبكرة، ولكنه يعزز الغزو والنقائل عندما يتم التغلب على فعاليته المثبطة للورم من خلال الطفرات المسببة للسرطان في مسارات أخرى. لقد ثبت أن التعبير المتغير لعوامل النمو ومستقبلاتها يلعب دوراً مهماً في تكوين الأورام وتقدم الورم [17].

ذكر Furler RL et al. أن المستويات المرتفعة من $TGF-\beta 1$ في سرطانات الثدي في المرحلة المتقدمة كانت مرتبطة بحجم الورم وانخفاض تمايز الخلايا السرطانية والتحول الظهاري السدوي (EMT) وزيادة النقائل إلى العقد اللمفاوية الإبطية [65]. في دراستنا على الرغم من أننا لم نجد ارتباطاً مهماً بين $TGF-\beta$ ونقائل العقد اللمفاوية، إلا أننا وجدنا أن ارتفاع التعبير عن $TGF-\beta$ كان مرتبطاً بدرجة أعلى ومرحلة أعلى من AJCC وحجم ورم أكبر. يمكن تفسير ذلك من خلال العديد من الدراسات السابقة التي ذكرت أن $TGF-B$ يعزز تطور الورم في المراحل المتقدمة. أرجعت بعض الدراسات هذا إلى تغيير في استجابة الخلايا السرطانية لـ $TGF-\beta$ ، ونسبت دراسات أخرى ذلك إلى الإفراط في إنتاج $TGF-\beta$ من خلايا الورم نفسها في المراحل المتقدمة [15][66]. عامل مهم آخر



الشكل رقم (٢٨): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ $TGF-B$ (A) فرط تعبيرية الـ $TGF-B$ (B) انخفاض تعبيرية الـ $TGF-B$

في تفسير هذه النتائج هو أن $TGF-\beta$ يلعب دوراً مزدوجاً في التحول الظهاري السدوي (EMT)، ويُعتقد أن هذه العملية خطوة حاسمة في تطور السرطانات من كل من الحالة ما قبل الغزو إلى الحالة الغازية ومن الورم البدئي إلى مرحلة النقائل [9].

كشفت هذه الدراسة أيضاً أن ارتفاع التعبير عن $TGF-B$ يرتبط بدرجة الورم المتقدمة وحجم الورم الأكبر. على الرغم من عدم تركيز الكثير من الدراسات على العلاقة بين $TGF-\beta$ ودرجة الورم أو حجم الورم، إلا أن العديد

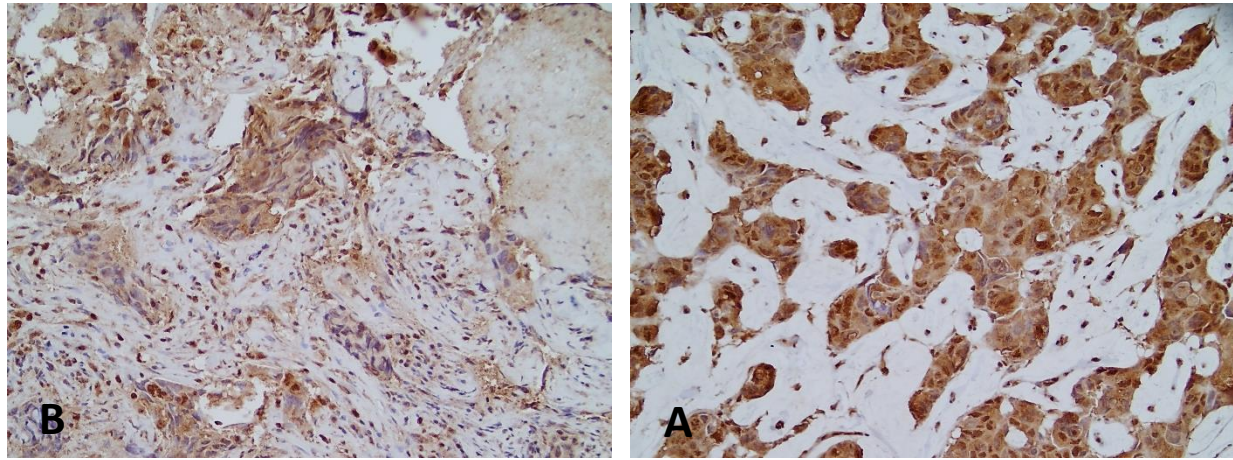
من الدراسات أشارت إلى دور $TGF-\beta$ في تعزيز حركة الخلايا وتعزيز تكاثر الخلايا، مما يؤثر بدوره على حجم الورم ودرجته [15].

Figueroa JD et al اقترح وجود ارتباط بين ارتفاع التعبير عن $TGF-B$ وإيجابية ER [67]. في دراستنا لم يكن هناك ارتباط ذو دلالة إحصائية بين $TGF-B$ والأورام الإيجابية ER. من ناحية أخرى لم تؤكد كلتا الدراستين أي ارتباط بين التعبير عن $TGF-B$ ونقائل العقد اللمفاوية.

- منذ أن تم وصف Snail1 في عام ٢٠٠٠ بأنه مثبط انتساخي لـ CDH1 ومحفز لـ EMT والغزو في الخلايا السرطانية، أصبح موضوع دراسة للعديد من علماء السرطان [35]. Snail1 لا يتواجد في ظاهرة الثدي الطبيعية، ويرتبط تعبيره بنقائل العقد اللمفاوية والدرجات النسيجية العالية، كما ترتبط مستويات التعبير العالية لـ Snail1 بمعدلات بقيا إجمالية أقصر ومعدلات بقيا خالية من المرض أقصر [37]. في سرطان الثدي بحثت العديد من الدراسات المناعية الكيميائية في دور تعبيرية Snail النووية. وجد Geradts et al و Lundgren et al ارتباطاً بين Snail ودرجة الورم الأعلى ومعدل تكاثر أعلى بالإضافة إلى الارتباط بين Snail وسلبية مستقبلات هرمون الاستروجين (ER). وجد ElMoneim و Zaghoul نتائج مماثلة مفادها أن التعبير النووي عن Snail مرتبط بدرجة الورم الأعلى وحجم الورم الأكبر ومرحلة الورم الأعلى بالإضافة إلى حالة العقد اللمفاوية الإيجابية في سرطان الثدي. كما أكد المؤلفون على وجود ارتباط بين التعبير عن Snail وحالات سرطان الثدي السلبي لمستقبلات البروجسترون (PR) وحالات سرطان الثدي السالب لمستقبلات الإستروجين [36]. نتائجن لا تتوافق تماماً مع الدراسات السابقة حيث لم نجد أي ارتباط بين التعبير عن Snail ودرجة الورم ومرحلته وحجمه أو حالة مستقبلات الإستروجين والبروجسترون. على الرغم من أن دراستنا لم تكتشف وجود ارتباط بين التعبير عن Snail ونقائل العقد اللمفاوية الإيجابية، إلا أنها أظهرت أن المرضى الذين يعانون من انخفاض التعبير عن Snail لديهم تواتر أعلى من المرحلة ٣ لإصصابة العقد مقارنة بأولئك الذين يعانون من ارتفاع التعبير عن Snail، أي أنه

ضمن مجموعة المرضى الذين لديهم نقائل للعقد اللمفاوية كانت الحالات ذات التعبير المنخفضة ل Snail تبدي تواتراً أعلى لزيادة عدد العقد المصابة.

أظهرت نتائج دراسة تليب وزملاؤه Teleb et al. أن التعبير المرتفع عن Snail يرتبط بخصائص سريرية وباثولوجية سيئة لسرطان الثدي القنوي الغازي، حيث أظهر التعبير المرتفع عن Snail ١ ارتباطاً مهماً إحصائياً بحجم الورم الأكبر ودرجة الورم الأعلى ومرحلة الورم المتقدمة ومرحلة العقد اللمفاوية الأعلى [68]. يتعارض هذا بوضوح مع



الشكل رقم (٢٩): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية ال Snail (A) فرط تعبيرية Snail (B) انخفاض تعبيرية Snail

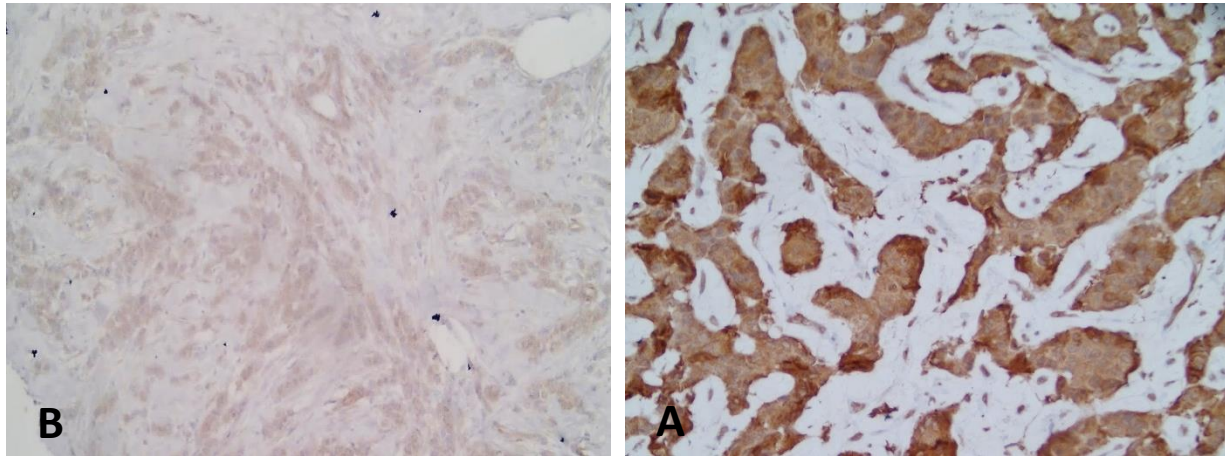
نتائجنا التي أظهرت وجود ارتباط بين التعبير عن Snail المنخفض ومرحلة العقد اللمفاوية الأعلى. قد يكون هذا الاختلاف في النتائج بسبب اختلاف مقياس معايرة تعبيرية ال Snail بين الدراستين أو بسبب الفروقات بين مجموعات المرضى المختلفة.

عند النظر إلى تأثير تعبير Snail على التشخيص في سرطان الثدي البشري، لم تجد بعض الدراسات ارتباطاً هاماً بالبقيا على قيد الحياة - وهو ما يتوافق مع نتائجنا - بينما أفادت دراسات أخرى أن تعبير Snail النووي يتنبأ بشكل كبير بنسبة أقل للبقيا الخالية من المرض في المرضى الذين يعانون من حالة العقدة اللمفاوية الإيجابية، وسرطانات الثدي ER- وكذلك PR- [36].

ذكر Kaufhold S و Bonavida B. أن الإفراط في التعبير عن Snail1 يرتبط عادةً بزيادة الهجرة والغزو والنقائل [35]. وجد C. Come et al. انخفاضًا مثيرًا للاهتمام في تعبير Snail في أورام الثدي غير الغازية عند مقارنتها بالسرطانات الغازية [69]. لم تجد نتائجنا مثل هذا الارتباط.

- ظهر عامل الانتساخ NF- κ B كوسيط رئيسي لمجموعة واسعة من العمليات الخلوية التي تتطوي على النمو والتمايز والموت الخلوي المبرمج. وتدعم الأدلة المتزايدة على المسارات غير المنظمة المرتبطة بـ NF- κ B في مختلف سلالات خلايا سرطان الثدي البشرية دور NF- κ B في الاستحالة الورمية. يرتبط التعبير غير المنضبط عن NF- κ B بسرطان الثدي، وبالتالي فإن تنشيط NF- κ B قد يشبط الموت الخلوي المبرمج ويعزز النقائل وبالتالي يضيف نمطًا ظاهريًا أكثر عدوانية في سرطان الثدي [40].

اكتشفت جانا دي وزملاؤه Jana D et al. وجود ارتباط إيجابي بين NF- κ B وتعبير HER-2/neu. كما استنتجوا أن تثبيط الإفراط في التعبير عن NF- κ B قد يقلل من تطور الورم لدى المرضى وقد يمنع تسرطن الثدي، مما يقلل من حدوث سرطان الثدي لدى المرضى المعرضين لخطر كبير [70].



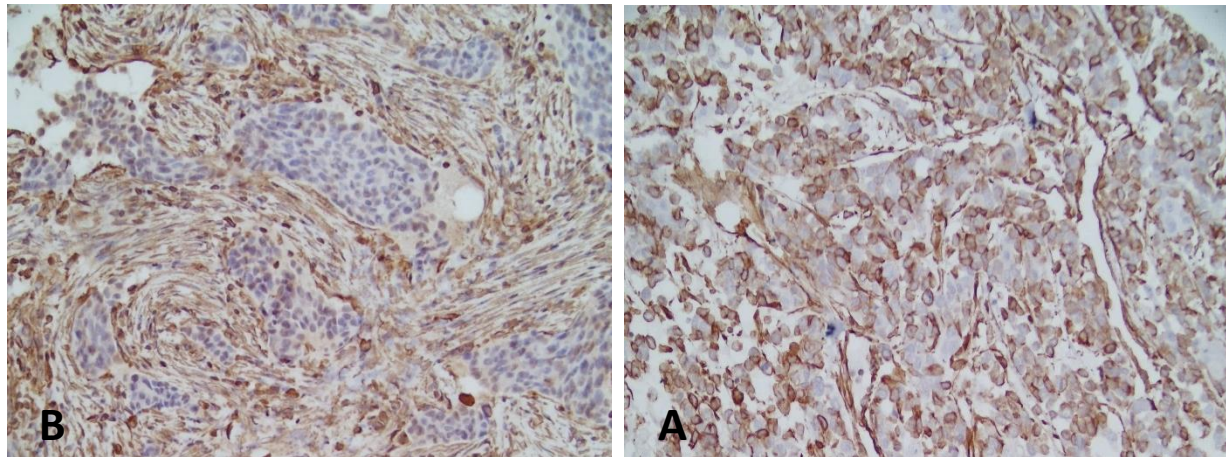
الشكل رقم (٣٠): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية NF- κ B (A) فرط تعبيرية NF- κ B (B) انخفاض تعبيرية NF- κ B

وثق بيسواس وزملاؤه Biswas et al. أن أحد مناهضات NF- κ B منع تنشيط NF- κ B الناجم عن عامل نمو البشرة وتسبب في موت الخلايا المبرمج في خلايا سرطان الثدي الايجابي ER. كما أظهروا أن مناهض NF- κ B يثبط النمو ويسبب تراجعاً واسع النطاق لأورام الظهارة الثديية ايجابية ER لدى الفئران [40].

وبالرغم من أن دراستنا الحالية أبدت احتمالية أكبر لتشخيص السرطان القنوي الغازي، واحتمالية أكبر لإيجابية مستقبلات الأستروجين والبروجسترون وسلبية مستقبلات ال Her-2 في الأورام ذات التعبير الزائدة ل NF- κ B، إلا أن هذه الفروقات لم تكن ذات دلالة هامة إحصائياً. قد يكون سبب ذلك هو أن لدينا ٣ حالات فقط ذات تعبير منخفض عن NF- κ B (الدرجة ٠-١) مقابل ٨٦ حالة ذات تعبير مرتفع عن NF- κ B (الدرجة ٢-٤) مما يعيق بوضوح الحصول على علاقات ذات دلالة إحصائية ضمن العينة المدروسة.

- في أنسجة الثدي لدى البالغين يتم التعبير عن ال Vimentin بشكل أساسي في الخلايا العضلية الظهارية. ويعتبر التعبير عن ال Vimentin مؤشراً على تحول الخلايا الظهاري السدوي، حيث يكشف عن المراحل النهائية لاختلال تمايز الورم واحتمالية عالية لغزو الورم.

باستخدام التلوينات المناعية النسيجية أبلغ فوراً وزملاؤه Vora et al. عن زيادة التعبير عن ال Vimentin في ٥٧% من مرضى سرطان الثدي. ارتبط هذا الارتفاع بإصابة العقدة اللمفاوية ومراحل المرض الأعلى والتعبير عن



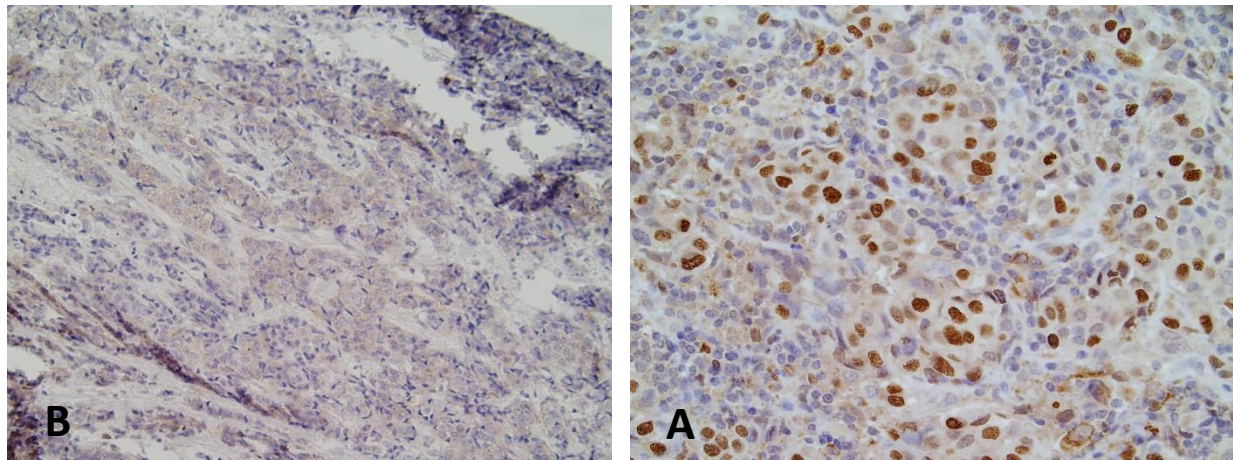
الشكل رقم (٣١): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية ال Vimentin (A) إيجابية ال Vimentin في الخلايا الورمية (B) سلبية ال Vimentin في الخلايا الورمية

HER2 ونكس المرض أو النقائل بالإضافة إلى انخفاض البقيا على قيد الحياة بدون انتكاس [71]. كانت نتائجنا متوافقة مع هذه الدراسة حيث وجدنا أن المرضى الذين لديهم تعبير سلبي للـ Vimentin لديهم تواتر أعلى من الأورام السلبية لمستقبلات HER2 neu. كما وجدنا ارتباطاً بين التعبير السلبي عن الـ Vimentin وانخفاض نسبة السرطانات ذات المرحلة المنخفضة (المرحلة الأولى). من ناحية أخرى أظهرت نفس الدراسة ارتباطاً بين التعبير الشاذ عن الـ Vimentin وارتفاع درجة الورم ومعدل الانقسام العالي وحالة مستقبلات الهرمونات السلبية [71]، بينما لم نجد مثل هذا الارتباط في دراستنا.

وجدت دراسة أجراها تشنغ وزملاؤه Cheng et al على مرضى سرطان الثدي الثلاثي السلبية أن هناك تعبيرية أقوى للـ Vimentin لدى المرضى الذين يعانون من السرطان السيئة التمايز النسيجي. وجد البحث الذي أجراه كوماري وفاني Kumari and Vani أن هناك علاقة قوية بين تعبير الـ Vimentin والدرجات النسيجية، أي أن الدرجة ٣ كان لها تعبير أقوى من الدرجات الأخرى [72]. في الدراسة الحالية كان تعبير الـ Vimentin بشكل أساسي في الأورام ذات الدرجة ٢ والدرجة ٣، على الرغم من أن هذا لم يحدث أي ارتباط ذي دلالة إحصائية. أما بالنسبة لتطور الورم والإنذار، فقد ارتبط التعبير الإيجابي للـ Vimentin في العديد من الدراسات بشكل كبير بانخفاض معدل البقيا على قيد الحياة. أكد Z. Chen وزملاؤه أن زيادة التعبير عن الـ Vimentin أدت إلى ارتفاع معدل الغزو لدى مرضى سرطان الثدي الثلاثي السلبية، وأشارت إلى سوء الإنذار لديهم [50]. أظهر S. Kauppila وزملاؤه أن تعبيرية الـ Vimentin الإيجابية أبدت ميلاً نحو بقيا أضعف [53]. وقد تبين أن التعبير عن الـ Vimentin كان مرتفعاً في العديد من سلالات خلايا سرطان الثدي العدوانية، وكان هذا التعبير المفرط مرتبطاً بشكل وثيق بزيادة الهجرة وغزو خلايا سرطان الثدي [47]. وكما ذكرنا فإن معظم الدراسات تربط إيجابية الـ Vimentin بسلوك الورم العدواني، ولم تكشف نتائجنا عن وجود ارتباط بين الـ Vimentin والبقيا على قيد الحياة بشكل عام ربما لأن معظم الحالات المشمولة كانت سلبية للـ Vimentin.

- وجد أن سرطان الثدي الذي يتميز بارتفاع مستوى التعبير عن Ki67 له حصيلة أسوأ. وجد بعض المؤلفين ارتباطاً إيجابياً بين مستوى التعبير عن Ki67 وخطر النكس الموضعي [73].

أبلغ K. Tawfik وزملاؤه عن وجود ارتباط مباشر بين التعبير عن Ki-67 في خلايا سرطان الثدي وتوقعات البقيا الخالية من المرض والبقيا الإجمالية [74]. وجد Stuart-Harris وزملاؤه في تحليل تلوي واسع النطاق لـ ٤٣ دراسة شملت ١٥٧٩٠ مريضاً ارتباطاً قوياً بين Ki67 والبقيا الإجمالية. خلص مولينو وزملاؤه Molino et al. إلى أن Ki67 كان مرتبطاً بشكل كبير بالبقيا الإجمالية وجزئياً بالبقيا الخالية من المرض [75]. على العكس من ذلك، كشف Pinto وزملاؤه أن مؤشر Ki67 يُظهر ارتباطاً غير مهم فيما يتعلق بالبقيا الخالية من المرض



الشكل رقم (٣٢): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية الـ Ki-67 (A) ارتفاع تعبيرية الـ Ki-67 (B) انخفاض تعبيرية الـ Ki-67

ولا علاقة له بالبقيا الإجمالية [75]. في دراسة أجراها M. Bahaddin وزملاؤه، لم تكن هناك أي علاقة مهمة بين الانتكاس أو النقائل و Ki67 ولم تكن هناك علاقة إحصائية بين Ki67 ومرحلة المرض [76]. وفي دراسة أخرى أجراها H. Kamranzadeh et al. لم تُلاحظ أي فروق كبيرة بين المجموعتين الإيجابية والسلبية لـ Ki67 فيما يتعلق بالبقيا الإجمالية والبقيا الخالية من المرض، ولكن تم إثبات وجود علاقة إيجابية كبيرة بين Ki-67 ومرحلة المرض [77]. وفي نتائجنا كان لدى المرضى الذين يعانون من انخفاض التعبير عن Ki67 تواتر أعلى للمرحلة

الثالثة للورم. ويمكن تفسير هذا الاختلاف بين الدراستين باستخدام معايير قياس مختلفة في تقييم إيجابية ال-Ki-67 (١٠٪ في دراسة Kamranzadeh مقابل ٢٠٪ في دراستنا).

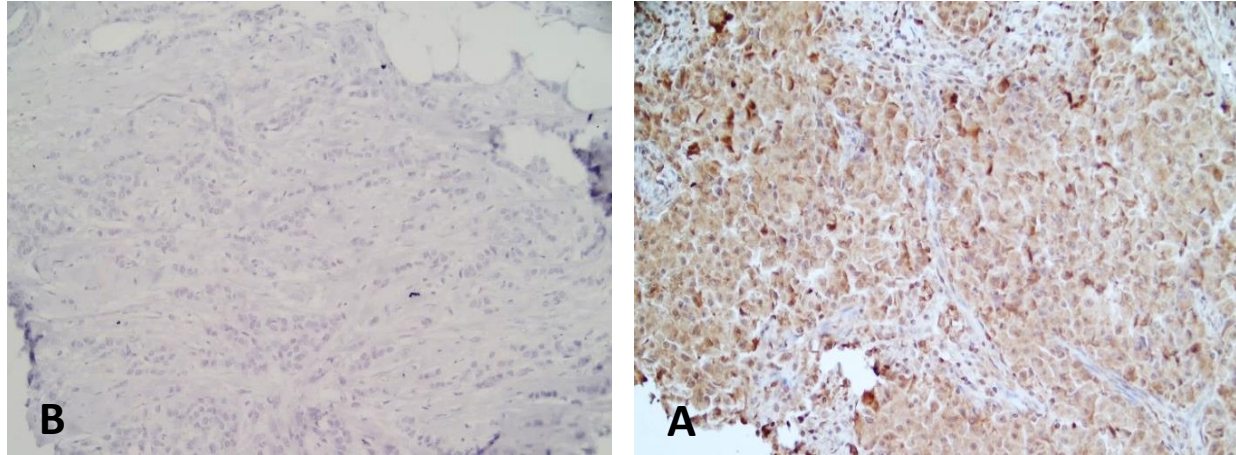
بينما لم يجد A. Mohammed et al. أي ارتباط إحصائي بين Ki67 والعمر وحجم الورم وعدد العقد اللمفاوية الإبطية الإيجابية [73]، في دراسة أجراها E. Yildirim et al. كان لدى المرضى الذين يعانون من ارتفاع التعبير عن Ki-67 حجم ورم أكبر ودرجة نسيجية أعلى. وفي دراسة أخرى لم يتم العثور على علاقة كبيرة بين Ki-67 وحجم الورم وحالة العقدة اللمفاوية [78]. كانت نتائجنا مختلفة عن الدراسات المذكورة سابقاً حيث وجدنا أن المرضى الذين يعانون من انخفاض التعبير عن Ki67 لديهم متوسط حجم ورم أكبر.

على الرغم من أنه من المعروف أن تقييم التعبير عن Ki-67 عن طريق المناعة الكيميائية (IHC) هو أحد أبسط الطرق وأكثرها استخداماً لقياس تكاثر الخلايا بشكل غير مباشر، فليس من غير المألوف وجود اختلافات متعددة في نتائج الدراسات. يمكن تفسير ذلك لسببين رئيسيين: أولاً استخدام معايير قياس مختلفة في تقييم إيجابية ال-Ki-67، والسبب الآخر هو أن Ki-67 يتم التعبير عنه في منتصف مراحل G1 و S و G2 و M للخلايا المتكاثرة، ولكن ليس في الخلايا الساكنة أو الخلايا في مراحل G0 والمرحلة المبكرة ل G1.

- في سرطان الثدي، يرتبط فقدان الجزئي أو الكلي لتعبير E-cadherin بفقدان خصائص التمايز واكتساب القدرة على الغزو وزيادة درجة الورم والسلوك النقيلي وسوء الإنذار [1].

أكد نوريسماه وزملاؤه Nurismah et al. الارتباط القوي بين النمط النسيجي لسرطان الثدي وتعبير الخلايا السرطانية عن E-cadherin. ومن المرجح أن تمثل الأورام التي تظهر غياباً كاملاً للتلون الغشائي ل E-cadherin سرطانات ذات نمط فصيصي، في حين أن معظم السرطانات ذات النمط القنوي ستظهر تعبيراً غشائياً منتشرًا ل E-cadherin [79]. أظهرت دراسة أجريت على سلسلة كبيرة من حالات سرطان الثدي وجود ارتباط إحصائي هام بين فقدان E-cadherin والتشخيص لسرطان الثدي الفصيصي الغازي. بعض الدراسات التي أظهرت انخفاضاً

في تعبير E-cadherin في IDC أوجدت ارتباط هذه الحالات بضعف التمايز ودرجات الورم العالية [80]. مول وزملاؤه وجامالو وزملاؤه Moll et al. and Gamallo et al. أبلغوا عن فقدان كامل لتعبير E-cadherin في غالبية خلايا سرطان الثدي الفصيصي الغازي، في حين احتفظت جميع حالات السرطان القنويوي الغازي ببعض



الشكل رقم (٣٣): صور من حالات الدراسة توضح تعبيرية ال E-cadherin (A) إيجابية ال E-cadherin (B) سلبية ال E-cadherin

التعبير عن E-cadherin على الأقل [81]. كان لدى المرضى في دراستنا الذين لديهم E-cadherin إيجابي معدلاً أعلى من IDC مقارنة بالحالات سلبية ال E-cadherin ، مما يجعل نتائجنا متوافقة مع الدراسات السابقة. كما وجدت دراستنا ارتباطاً مهماً بين IDC وزيادة التعبير عن E-cadherin عند مقارنتها بخلايا ILC. ويمكن تفسير هذه النتائج من خلال الدور المعروف والمدرّوس جيداً لل E-cadherin باعتباره جليكوبروتين عابر للغشاء يتوسط التصاق الخلايا في الأنسجة الظهارية. وبالتالي كان فقدان التعبير عن E-cadherin مرتبطاً دائماً بخلايا أقل تمايزاً مثل الخلايا المعزولة التي تعد سمة مميزة لسرطان الثدي الفصيصي الغازي.

يقترح جولد وزملاؤه Gould et al. أن الأورام التي تعبر عن مستويات منخفضة من E-cadherin، مقارنة بأنسجة الثدي الطبيعية، قد تكون مرتبطة بخطر أعلى للوفاة خلال ٥ سنوات [82]. وجد A. Bankfalvi وزملاؤه أن المستويات المنخفضة من E-cadherin و β -catenin كانت مرتبطة بحالة العقدة اللمفاوية الإيجابية لسرطان

الثدي[83]. لم يجد G. Acs وزملاؤه أي ارتباط بين التعبير عن E-cadherin والمتغيرات التالية: حجم الورم، الدرجة، التمايز، تعدد الأشكال النووية، النشاط الانقسامي، حالة مستقبلات هرمون الاستروجين والبروجسترون، والإفراط في التعبير عن Her-2 في IDCs. وعلى الرغم من أن هذه النتيجة مماثلة لتلك التي توصل إليها Lipponen وزملاؤه، فقد أظهر آخرون وجود علاقة بين انخفاض التعبير عن E-cadherin ودرجة الورم وحالة العقدة اللمفاوية وحالة مستقبلات هرمون الاستروجين والسلبية والنشاط الانقسامي[81]. في هذه الدراسة لم يتم العثور على أي ارتباط بين E-cadherin وأي من هذه السمات السريرية والباثولوجية.

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations:

- أظهرت دراستنا ارتباطاً بين التعبيرية المرتفعة لكل من β -catenin و TGF- β بصفات باثولوجية سيئة وسلوك سريري أكثر عدوانية، مما يقترح إمكانية استخدامهما كواسمات إنذارية في سرطان الثدي.
- TGF- β هو من أهم عوامل الانتساخ التي تلعب دوراً أساسياً في عملية التحول الظهاري السدوي EMT وبالتالي فإن استهدافه في سياق علاج نوعي مستقبلي سوف يحسن من إنذار سرطانت الثدي ويزيد فرص الشفاء، لذا يوصى بمتابعة التجارب السريرية المتعلقة باستخدامه كهدف علاجي ومحاولة إجراء تجارب مماثلة محلياً في حال توفر الإمكانيات اللوجستية.
- ارتبطت سلبية الـ Vimentin ضمن خلايا سرطان الثدي مع صفات باثولوجية وسريرية أقل عدوانية، مما يقترح أن إيجابية الـ Vimentin يمكن أن تعتبر عاملاً إنذارياً سيئاً في سرطانات الثدي.
- لم تبدي دراستنا ارتباطاً ذو أهمية إحصائية بين تعبيرية NF- κ B والعوامل الباثولوجية والإنذارية المدروسة، علماً أن التجارب السريرية العالمية تظهر أن NF- κ B من أكثر الواسمات الواعدة الممكن استهدافها علاجياً. لذلك يوصى بإجراء أبحاث مقبلة تركز على دراسة هذا الواسم النوعي.
- كذلك الأمر كانت نتائج دراستنا غير متوافقة مع الدراسات العالمية المشابهة فيما يتعلق بالـ Snail والذي يعد من الواسمات الأساسية والنوعية المرتبطة بعملية التحول الظهاري السدوي EMT، لذلك يوصى أيضاً بإجراء أبحاث مقبلة تركز على دراسة هذا الواسم النوعي.

- العديد من محدوديات الدراسة ارتبطت بالتشخيص المتأخر لسرطان الثدي، مما يؤكد على ضرورة تكثيف التوعية بفوائد الكشف المبكر.
- ويمكن أن يعزى اختلاف بعض النتائج عن نتائج الدراسات المشابهة _ولو بشكل جزئي_ إلى المراحل المتقدمة للأورام المدروسة، كما هو الحال فيما يتعلق بالواسمين المذكورين أعلاه (NF- κ B و Snail) وأيضاً فيما يتعلق بالKi-67 الذي ارتبط انخفاض تعبيريته لدينا بخائص ذات قيمة إنذارية أسوأ. لذلك يوصى بإجراء دراسات مشابهة تستهدف سرطانات الثدي المشخصة في المراحل المبكرة وذلك بهدف الحصول على نتائج أكثر دقة وأكثر جدوى.

المراجع:

- [1] F. E. I. Liu, L. I. N. A. Gu, B. A. O. E. N. Shan, C. U. I. Z. H. I. Geng, and M. E. I. X. Sang, "Biomarkers for EMT and MET in breast cancer : An update (Review)," pp. 4869–4876, 2016, doi: 10.3892/ol.2016.5369.
- [2] A. J. Gooding and W. P. Schieman, "Epithelial–mesenchymal transition programs and cancer stem cell phenotypes: Mediators of breast cancer therapy resistance," *Mol. Cancer Res.*, vol. 18, no. 9, pp. 1257–1270, 2020, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0067.
- [3] A. (Elsevier 2015)le Kumar, Abbas, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 9e* – Kumar, Abbas, Aster (Elsevier 2017)le. .
- [4] C. Foroni, M. Brogini, D. Generali, and G. Damia, "Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 689–697, 2012, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.001.
- [5] M. Iwatsuki *et al.*, "Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance," *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 293–299, 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01419.x.
- [6] Y. Katsuno and R. Derynck, "Review Epithelial plasticity , epithelial–mesenchymal

- transition , and the TGF- β family,” *Dev. Cell*, vol. 56, no. 6, pp. 726–746, 2021, doi: 10.1016/j.devcel.2021.02.028.
- [7] G. F. Le Bras, K. J. Taubenslag, and C. D. Andl, “The regulation of cell–cell adhesion during epithelial–mesenchymal transition, motility and tumor progression,” *Cell Adhesion and Migration*, vol. 6, no. 4, pp. 365–373, 2012, doi: 10.4161/cam.21326.
- [8] S. M. Nalluri, J. W. O’Connor, and E. W. Gomez, “Cytoskeletal signaling in TGF β –induced epithelial–mesenchymal transition,” *Cytoskeleton*, vol. 72, no. 11, pp. 557–569, 2015, doi: 10.1002/cm.21263.
- [9] J. F. Lima, S. Nofech–Mozes, J. Bayani, and J. M. S. Bartlett, “EMT in breast carcinoma—A review,” *J. Clin. Med.*, vol. 5, no. 7, pp. 1–14, 2016, doi: 10.3390/jcm5070065.
- [10] M. Saitoh, “Epithelial–mesenchymal transition is regulated at post–transcriptional levels by transforming growth factor– β signaling during tumor progression,” vol. 106, no. 5, 2015, doi: 10.1111/cas.12630.
- [11] V. Mittal, “Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 13, pp. 395–412, 2018, doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.

- [12] E. J. Tan, A. K. Olsson, and A. Moustakas, "Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGF β ," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 9, no. 3, pp. 233–246, 2015, doi: 10.4161/19336918.2014.983794.
- [13] A. R. Kwilas, R. N. Donahue, K. Y. Tsang, and J. W. Hodge, "A central role for cadherin signaling in cancer," *Cancer Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 1–17, 2015, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.04.006.A.
- [14] A. Moustakas and P. Heldin, "TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition," *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 8, pp. 2621–2634, 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.004.
- [15] S. Haque and J. C. Morris, "Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer," *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, vol. 13, no. 8, pp. 1741–1750, 2017, doi: 10.1080/21645515.2017.1327107.
- [16] H. Moses and M. H. Barcellos-hoff, "TGF- β Biology in Mammary Development and Breast Cancer," pp. 1–14, 2011.
- [17] J. M. Zarzynska, "Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer," vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/141747.
- [18] X. Liu, F. Yun, L. Shi, Z. Li, N. Luo, and Y. Jia, "MINI-REVIEW Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer," vol. 16,

pp. 6201–6206, 2015.

- [19] Y. Hao, D. Baker, and P. Ten Dijke, “TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 11, 2019, doi: 10.3390/ijms20112767.
- [20] A. R. Tan and M. Reiss, “Transforming growth factor- β signaling: emerging stem cell target in metastatic breast cancer?,” vol. 115, no. 3, pp. 453–495, 2009, doi: 10.1007/s10549-008-0184-1.Transforming.
- [21] and B. A. W. Karin A. Mack*, Ann Dellinger, “Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 12, pp. 139–148, 2017, doi: 10.1126/scisignal.2005189.Signaling.
- [22] C. H. Heldin, M. Vanlandewijck, and A. Moustakas, “Regulation of EMT by TGF β in cancer,” *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 14, pp. 1959–1970, 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.037.
- [23] “TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition,” vol. 19, no. 2, pp. 156–172, 2016, doi: 10.1038/cr.2009.5.TGF-.
- [24] X. Tian *et al.*, “E-Cadherin / β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier,” vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/567305.
- [25] I. Kaszak, O. Witkowska-Piłaszewicz, Z. Niewiadomska, B. Dworecka-Kaszak,

- F. N. Toka, and P. Jurka, "Role of cadherins in cancer—a review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 20, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/ijms21207624.
- [26] G. Corso *et al.*, "E-cadherin deregulation in breast cancer," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 11, pp. 5930–5936, 2020, doi: 10.1111/jcmm.15140.
- [27] C. Y. Loh *et al.*, *The e-cadherin and n-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges*, vol. 8, no. 10. 2019.
- [28] L. Shapiro and W. I. Weis, "Structure and biochemistry of cadherins and catenins.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 1–21, 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a003053.
- [29] S. Elzamly *et al.*, "Epithelial–Mesenchymal Transition Markers in Breast Cancer and Pathological Responseafter Neoadjuvant Chemotherapy," *Breast Cancer Basic Clin. Res.*, vol. 12, 2018, doi: 10.1177/1178223418788074.
- [30] "Dual role of E-cadherin in cancer cells – PMC." .
- [31] S. Howard, T. Deroo, Y. Fujita, and N. Itasaki, "A positive role of cadherin in wnt/ β -catenin signalling during epithelial–mesenchymal transition," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0023899.
- [32] Z. Wang *et al.*, "Clinical implications of β -catenin protein expression in breast

- cancer,” vol. 8, no. 11, pp. 14989–14994, 2015.
- [33] T. Shen, K. Zhang, G. P. Siegal, and C. M. E. Sam, “Prognostic Value of E–Cadherin and β -Catenin in Triple–Negative Breast Cancer,” pp. 603–610, 2016, doi: 10.1093/AJCP/AQW183.
- [34] Y. Wang, J. Shi, K. Chai, X. Ying, and B. Zhou, “The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 13, no. 9, pp. 963–972, 2014, doi: 10.2174/15680096113136660102.
- [35] J. Baulida and M. D., “Snail1 : A Transcriptional Factor Controlled at Multiple Levels,” 2019.
- [36] S. Muenst *et al.*, “Nuclear Expression of Snail Is an Independent Negative Prognostic Factor in Human Breast Cancer,” vol. 35, no. 5, pp. 337–344, 2013.
- [37] S. Kaufhold and B. Bonavida, “Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: A target for therapeutic intervention,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–19, 2014, doi: 10.1186/s13046-014-0062-0.
- [38] C. Dong, “Snail : a target for treating basal–like breast cancer,” vol. 2, pp. 259–262, 2013.
- [39] A. Oh *et al.*, “NF - κ B signaling in neoplastic transition from epithelial to mesenchymal phenotype,” *Cell Commun. Signal.*, pp. 1–17, 2023, doi:

10.1186/s12964-023-01207-z.

- [40] J. T. Wu and J. G. Kral, "The NF- κ B/I κ B signaling system: A molecular target in breast cancer therapy," *J. Surg. Res.*, vol. 123, no. 1, pp. 158–169, 2005, doi: 10.1016/j.jss.2004.06.006.
- [41] E. Pavitra *et al.*, "The role of NF- κ B in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 163, no. January, p. 114822, 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114822.
- [42] M. A. Huber *et al.*, "NF- κ B is essential for epithelial–mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression," vol. 114, no. 4, pp. 569–581, 2004, doi: 10.1172/JCI200421358.The.
- [43] H. O. Habashy, "Nuclear Factor- κ B Clinical Significance in Breast Cancer : An Immunohistochemical Study," pp. 33–39, 2023, doi: 10.1159/000527828.
- [44] E. Sampepajung, W. Hamdani, D. Sampepajung, and P. Prihantono, "Overexpression of NF- κ B as a predictor of neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer," *Breast Dis.*, vol. 40, no. S1, pp. S45–S53, 2021, doi: 10.3233/BD-219007.
- [45] D. Jana, S. Das, D. K. Sarkar, S. Mandal, A. Maji, and M. Mukhopadhyay, "RESEARCH ARTICLE Role of Nuclear Factor- κ B in female Breast Cancer : A

- Study in Indian Patients,” vol. 13, pp. 5511–5515, 2012.
- [46] M. I. Kokkinos, R. Wafai, M. K. Wong, D. F. Newgreen, E. W. Thompson, and M. Waltham, “Vimentin and epithelial–mesenchymal transition in human breast cancer – Observations in vitro and in vivo,” *Cells Tissues Organs*, vol. 185, no. 1–3, pp. 191–203, 2007, doi: 10.1159/000101320.
- [47] A. Satelli and S. Li, “Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 18, pp. 3033–3046, 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0735-1.
- [48] N. A. Kuburich, P. Den Hollander, J. T. Pietz, and S. A. Mani, “Vimentin and cytokeratin: good alone, bad together,” vol. 86, no. Pt 3, pp. 816–826, 2023, doi: 10.1016/j.semcancer.2021.12.006.Vimentin.
- [49] D. Paulin, A. Lilienbaum, S. Kardjian, O. Agbulut, and Z. Li, “Vimentin : Regulation and Pathogenesis,” no. case 256, 2022.
- [50] Z. Chen, Z. Fang, and J. Ma, “Biomedicine & Pharmacotherapy Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer,” vol. 133, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2020.111068.
- [51] P. Sharma, S. Alsharif, A. Fallatah, and B. M. Chung, “Intermediate Filaments as E ff ectors of Cancer Development and Metastasis : A Focus on Keratins ,” pp. 1–

21, 2019.

- [52] G. M. Calaf *et al.*, “Vimentin and Notch as biomarkers for breast cancer progression,” pp. 721–727, 2014, doi: 10.3892/ol.2014.1781.
- [53] S. Kauppila, “Vimentin , zeb1 and Sip1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers : association with an aggressive tumour phenotype,” pp. 81–90, 2013, doi: 10.1007/s10549-013-2442-0.
- [54] S. Romano, M. Tufano, P. D. Arrigo, V. Vigorito, S. Russo, and M. F. Romano, “Seminars in Cancer Biology Cell stemness , epithelial-to-mesenchymal transition , and immunoevasion : Intertwined aspects in cancer metastasis,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 60, no. May 2019, pp. 181–190, 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.015.
- [55] N. Takebe, R. Q. Warren, and S. P. Ivy, “Breast cancer growth and metastasis: Interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition,” *Breast Cancer Res.*, vol. 13, no. 3, 2011, doi: 10.1186/bcr2876.
- [56] A. Manuscript, “Noncanonical TGF- β Signaling During Mammary Tumorigenesis,” no. 6, 2013, doi: 10.1007/s10911-011-9207-3.Noncanonical.
- [57] S. Terry *et al.*, “New insights into the role of EMT in tumor immune escape,” *Mol.*

- Oncol.*, vol. 11, no. 7, pp. 824–846, 2017, doi: 10.1002/1878-0261.12093.
- [58] W. Wang, S. A. Nag, and R. Zhang, “Targeting the NF κ B Signaling Pathways for Breast Cancer Prevention and Therapy,” vol. 22, no. 2, pp. 264–289, 2019.
- [59] S. Sefidbakht, H. Saeedipour, H. Saffar, and E. Mirzaian, “Determination of β -catenin Expression in Breast Cancer and Its Relationship with Clinicopathologic Parameters,” vol. 22, pp. 3493–3498, 2021, doi: 10.31557/APJCP.2021.22.11.3493.
- [60] F. C. Geyer *et al.*, “ β –Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple–negative phenotype but not with CTNNB1 mutation,” pp. 209–231, 2011, doi: 10.1038/modpathol.2010.205.
- [61] J. Xu, J. R. Prosperi, N. Choudhury, and O. I. Olopade, “ β –Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple–Negative Breast Cancer,” pp. 1–11, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0117097.
- [62] X. Xu, M. Zhang, F. Xu, and S. Jiang, “Wnt signaling in breast cancer : biological mechanisms , challenges and opportunities,” pp. 1–35, 2020.
- [63] W. A. Lee, “Prognostic Significance of Abnormal –catenin Expression in Breast Carcinoma,” pp. 114–119, 2005.
- [64] T. Imamura, A. Hikita, and Y. Inoue, “The roles of TGF– β signaling in

- carcinogenesis and breast cancer metastasis,” *Breast Cancer*, vol. 19, no. 2, pp. 118–124, 2012, doi: 10.1007/s12282-011-0321-2.
- [65] R. L. Furler, D. F. Nixon, and C. H. Uittenbogaart, “TGF- β Sustains Tumor Progression through Biochemical and Mechanical Signal Transduction,” pp. 1–18, doi: 10.3390/cancers10060199.
- [66] J. Slingerland, “Transforming growth factor- β and breast cancer: Introduction,” *Breast Cancer Res.*, vol. 2, no. 2, p. 91, 2000, doi: 10.1186/bcr39.
- [67] J. D. Figueroa *et al.*, “Expression of TGF- β signaling factors in invasive breast cancers: Relationships with age at diagnosis and tumor characteristics,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 121, no. 3, pp. 727–735, 2010, doi: 10.1007/s10549-009-0590-z.
- [68] M. A. Mohamed, S. G. Teleb, D. M. A. El-rehim, M. I. Abd-elghany, and M. F. Gayyed, “High Snail 1 Expression is a Poor Prognostic Factor in Patients with Invasive Ductal Carcinoma of the Breast,” vol. 31, no. 4, 2020.
- [69] C. Côme *et al.*, “Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 18, pp. 5395–5402, 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0478.
- [70] D. K. Sarkar, D. Jana, and P. S. Patil, “Role of NF- κ B as a Prognostic Marker

- in Breast Cancer : A Pilot Study in Indian Patients,” vol. 4, no. 208, pp. 242–247, 2013, doi: 10.1007/s13193-013-0234-y.
- [71] M. Mohebi *et al.*, “Expression analysis of vimentin and the related lncRNA network in breast cancer,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 115, no. April, p. 104439, 2020, doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104439.
- [72] F. Lumongga, R. Dharmajaya, and K. B. Siregar, “Correlation Between Intensity of Vimentin Immuno-expression in Young Women with Triple Negative Breast Cancer and Its Clinicopathological Parameters,” vol. 76, no. 6, pp. 454–457, 2022, doi: 10.5455/medarh.2022.76.454-457.
- [73] A. A. Mohammed, “Quantitative assessment of Ki67 expression in correlation with various breast cancer characteristics and survival rate; cross sectional study,” *Ann. Med. Surg.*, vol. 48, no. November, pp. 129–134, 2019, doi: 10.1016/j.amsu.2019.11.005.
- [74] K. Tawfik, B. F. Kimler, M. K. D. Sct, F. Fan, and O. Tawfik, “Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant,” *Hum. Pathol.*, vol. 44, no. 1, pp. 39–46, 2013, doi: 10.1016/j.humpath.2012.05.007.
- [75] K. Kontzoglou *et al.*, “Correlation between Ki67 and Breast Cancer Prognosis,” *Oncol.*, vol. 84, no. 4, pp. 219–225, 2013, doi: 10.1159/000346475.

- [76] M. M. Bahaddin, “A comparative study between Ki67 positive versus Ki67 negative females with breast cancer: Cross sectional study,” *Ann. Med. Surg.*, vol. 60, no. October, pp. 232–235, 2020, doi: 10.1016/j.amsu.2020.10.049.
- [77] “Association between Ki-67 expression and clinicopathological features in prognosis of breast cancer_ A retrospective cohort study – PMC.” .
- [78] E. Yildirim, S. Bektas, O. Gundogar, and D. Findik, “The Relationship of GATA3 and Ki-67 With Histopathological Prognostic Parameters , Locoregional Recurrence and Disease-free Survival in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast,” vol. 5657, pp. 5649–5657, 2020, doi: 10.21873/anticancerres.14578.
- [79] I. Nurismah, O. Noriah, M. Y. Suryati, and N. A. Sharifah, “E-Cadherin Expression Correlates With Histologic Type But Not Tumour Grade in Invasive Breast Cancer,” vol. 9, pp. 699–702, 2008.
- [80] O. Article, K. Pai, P. Baliga, and B. L. Shrestha, “E-Cadherin Expression : A Diagnostic Utility for Differentiating Breast Carcinomas with Ductal and Lobular Morphologies,” vol. 38, no. 5, pp. 840–844, 2013, doi: 10.7860/JCDR/2013/5755.2954.
- [81] G. Acs, T. J. Lawton, T. R. Rebbeck, V. A. Livolsi, and P. J. Zhang, “Differential Expression of E-Cadherin in Lobular and Ductal Neoplasms of the Breast and Its Biologic and Diagnostic Implications,” pp. 85–98, 2001.

- [82] B. E. Gould, R. A. Michael, and E. A. I. A. Meta-analysis, "E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast : a systematic review and meta-analysis," pp. 139–148, 2006, doi: 10.1007/s10549-006-9248-2.
- [83] H. Pang *et al.*, "Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and β -catenin in breast cancer," *Cancer Epidemiol.*, 2013, doi: 10.1016/j.canep.2013.08.005.

Abstract

Background: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is the process wherein polarized and cohesive epithelial cells lose their epithelial characteristics and acquire a mesenchymal phenotype and proceed to the invasive form of the tumor. Numerous regulators play a role in the complex signaling pathways that mediate the EMT process. This study aims to investigate the immunohistochemical (IHC) expression of several EMT-related markers and their implications on the diagnosis and prognosis of breast cancer in a cohort of Arab descent women.

Methods: Patients of Arab descent treated surgically for invasive and in-situ breast cancer between 2017-2020 were included in the study. Expressions of Ki-67, Transforming growth factor- β (TGF- β), NF-kappaB (NF- κ B), Snail, Vimentin, E-cadherin (E-Cad), and B-catenin (B-Cat) were evaluated by IHC in tissue microarray slides, as per guidelines in the literature. We examined the association between the tumor markers and other clinicopathological variables and prognosis. Fisher's exact tests were utilized to compare categorical variables between groups.

Results: One hundred eleven patients were included, 65.8% had invasive ductal carcinoma (IDC); 19.8% had invasive lobular carcinoma (ILC); 13.5% had both ductal and lobular features, and 0.9% had ductal carcinoma in situ. 91 (54.1%) were grade 2 and 303 (41.4%) were grade 3 tumors. Most tumors were ER positive (81.8%), PR positive (75.7%), and HER-2 negative (77.5%). The median age at diagnosis was 52 years. High TGF- β expression was associated with higher frequency of grade 3 tumors ($p=0.036$), AJCC stage III ($p=0.042$), and larger tumor size ($p=0.036$) compared to those with low TGF-B expression. Patients with positive B-Cat expression had a higher risk of death compared to those with negative B-Cat expression (HR, 3.90; 95% CI, 1.19 to 15.93; $p=0.024$). IDC had a statistically significant increased expression of TGF-B (69.9% vs. 45.5%, $p=0.045$), E-Cad (76.7% vs. 13.6%, $p<0.001$), and B-Cat (39.7% vs. 0%, $p<0.001$) when compared to ILC. The overall survival at 1 and 5 years were 96.3% (95% CI, 92.7-99.9) and 81.7% (95% CI, 73.8-90.3), respectively.

Conclusion: Tumors with high expression for TGF- β and B-Cat exhibit more aggressive clinical behavior, suggesting the potential prognostic and therapeutic value of these markers.

Key words: EMT, Breast Cancer, TGF- β , β -catenin



**Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Medicine
Department of Pathology
and Cytopathology**

EMT Expression in Invasive and DCIS Breast Cancer – A Syrian Cohort

**A dissertation submitted in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Ph.D. in pathology and
cytopathology**

By

Mais Wathek Saleh

Supervisors

Prof Eyad Chatty

Dr. Rouba Ali – Fehmi

2025