الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية طب الأسنان

قسم النسج والتشريح المرضي

تحري تعبيريّة واسم التحول الظهاري الميزانشيمي β-Catenin في سوء التصنّع البشروي في المخاطيّة الفمويّة.

Investigation the expression of the Epithelial-mesenchymal Transition marker β-catenin in oral epithelial dysplasia

أطروحة قدّمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في علوم طب الأسنان باختصاص النسج والتشريح المرضي الفموي

إعداد الباحث

علاء جمال نصر

إشراف
الأستاذ الدكتور شريف بركات
أستاذ مساعد رئيس قسم النسج والتشريح المرضي
كلية طب الأسنان- جامعة دمشق

المشرف المشارك
الاستاذ الدكتور علي أبو سليمان
استاذ مساعد في قسم النسج حول السنية
كلية طب الأسنان – جامعة دمشق

١٤٣٦هـ ـ ٢٠١٥م

تصريح

" لا يوجدُ أيّ جزء من هذهِ الأطروحة تمّ أخذهُ بالكامل من عملٍ آخر، أو أُنجز للحصول على شهادةٍ أخرى في هذه الجامعة أو في أيّة جامعة أخرى أو أيّ معهد تعليميّ "

كلمة شكر

أتقدم بجزيل الشكر والعرفان، وكل الاحترام لأستاذي المشرف **الأستاذ الدكتور شريف بركات** الذي لم يبخل عليّ بوقتٍ أو جهد، وكان عوناً لي حتى إتمام هذا البحث، وقدَّم لي الكثير... فجزاه الله عني كل خير.

كما أشكر **الأستاذ المساعد الدكتور علي أبو سليمان** لتقديمه المشورات العلمية ومساعدته في جمع العينة، ولمشاركته في الإشراف على البحث.

كما أتقدم بالشكر الجزيل **للأستاذ الدكتور أحمد المنديلي نقيب معلمي جامعة دمشق،** الأبّ الراقي .. الذي نمّا فينا روح الطّبيب، وكان له الدورُ الأكبر في تسليط الضوء على اختصاص النسج والتشريح المرضي الفموي، ولتفضّله بتحكيم هذه الأطروحة.

وأتوجَّهُ بفائق الشكر والتقدير **للمدرسة الدكتورة ريم ندرة،** فلا أنسى فضلها فيما قدّمته من مشورات علمية وملاحظات أغنت البحث، وكان لي الشرف بقبولها المشاركه في تحكيم هذا البحث، فلها مني كل الاحترام والتقدير.

كما أشكر **الأستاذ الدكتور نبيل قوشجي** الذي لم يبخل عنا يوماً بمعلومة أو نصيحة، والشكر موصول **للمدّرس الدكتور ممدوح المحارب.**

كما أتوجه بالشكر والامتنان لإدارة كلية طب الأسنان ممثلة **بالأستاذ الدكتور سالم ركاب** عميد كلية طب الأسنان، **والأستاذ الدكتور عمار مشلح** نائب عميد كلية طب الأسنان للشؤون العلمية، **والأستاذ الدكتور إياد الحفار** نائب عميد كلية طب الأسنان للشؤون الإدارية.

ولن أنسى من الشّكر والاعتراف بالفضل للسيد **ناصر كتابي** (العم أبو جمال) الناصح والموجّه والأب لطلاب قسم النسج والتشريح المرضي ولمساعدته القيّمة في تحضير العينة وتلوينها.

كما أشكر زميلاتي وزملائي في كلية طب الأسنان وقسم النسج والتشريح المرضي والذين كانوا عوناً لي في إنجاز هذا البحث.

قائمة المحتويات

قائمة المحتويات ١

قائمة الجداول ٤

قائمة الأشكال التوضيحية ٥

قائمة المخطّطات البيانيّة ٧

قائمة الاختصارات ٨

المقدّمة ١١

أهداف البحث ١٣

الباب الأول: المُراجَعة النَظَريَّة ١٤

١-١ سوء التصنّع البشروي الفموي ١٥

١-١-١ تعريف سوء التصنّع البشروي الفموي (OED) ١٥

١-١-٢ المظهر السريري لسوء التصنّع البشروي الفموي ١٦

١-١-٢-١ الطلاوة البيضاء الفمويّة (Oral Leukoplakia) ١٦

١-١-٢-٢ التشخيص التفريقي للطلاوة البيضاء الفموية ١٧

١-١-٢-٣ الوبائيّات ١٨

١-١-٢-٤ الوقاية من التحول السرطاني للطلاوة ١٩

١-١-٢-٥ الأنماط السريريّة للطلاوة الفمويّة ٢٠

١-١-٢-٦ الأسباب والمؤهِّبات ٢١

١-١-٣ المظهر النسيجي لسوء التصنّع البشروي الفموي ٢٣

١-١-٤ المتغيّرات التي تؤثّر في تشخيص سوء التصنّع البشروي الفموي ٢٤

١-١-٥ تصنيف آفات سوء التصنّع البشروي الفمويّة ٢٦

١-١-٥-١ تصنيف منظّمة الصحة العالميّة WHO ٢٠٠٥ ..... ٢٧

١-١-٥-١ فرط التقرُّن (التقران) (keratosis or hyperkeratosis) ٢٧

١-١-٥-٢ فرط التصنّع (Hyperplasia) ٢٨

١-١-٥-٣ سوء التصنّع البسيط (Mild dysplasia) ٢٨

١-١-٥-٤ سوء التصنّع المتوسّط (Moderate dysplasia) ٢٩

١-١-٥-٥ سوء التصنّع الشديد (Severe dysplasia) ٢٩

١-١-٥-٦ السرطان البشروي الموضَّع (Carcinoma in situ) ٣٠

١-١-٥-٢ مساوئ نظام التصنيف WHO ٣١

١-١-٥-٣ طريقة التصنيف بالنظام الثنائي (binary system) ٣٢

١-١-٦ سوء التقرن والتقرن المفرد (Dyskeratosis) ٣٣

١-١-٧ الغزو النسيجي المبكّر (Early invasion) ٣٣
١-٢ التحوّل الظّهاري الميزانشيمي ٣٥
١-٢-١ تعريف التحوّل الظهاري الميزانشيمي ٣٥
١-٢-٢ تصنيف التحوّل الظهاري الميزانشيمي ٣٦
١-٢-٢-١ النمط الأوّل للتحوّل الظهاري الميزانشيمي (Type 1 EMT) ٣٨
١-٢-٢-٢ النمط الثاني للتحوّل الظهاري الميزانشيمي (Type 2 EMT) ٣٩
١-٢-٢-٣ النمط الثالث للتحوّل الظهاري الميزانشيمي (Type 3 EMT) ٤٢
١-٢-٣ محرّضات التحوّل الظهاري الميزانشيمي ٤٥
١-٢-٤ واسمات التحوّل الظهاري الميزانشيمي ٤٨
١-٢-٥ واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β-catenin ٥٠
١-٢-٥-١ وظيفة بروتين الـβ-catenin ٥٠
١-٢-٥-٢ بنية بروتين الـβ-catenin ٥١
١-٣ الالتصاق الخلوي ٥٣
١-٣-١ الموصلات الملتصقة (adherens junctions) ٥٣
١-٣-٢ بروتين الـ E-Cadherin ٥٥
١-٣-٣ التنظيم الخلوي للمعقد Cadherin\ catenin ٥٦
١-٤ محرض التحول الظهاري الميزانشيمي مسلك إشارات Wnt/β- catenin ٥٧
١-٤-١ موجز عن مسلك إشارات Wnt ٥٨
١-٤-٢ تعديلات مسلك إشارات Wnt ٦٠
١-٤-٢-١ طفرات الـβ-catenin ٦٠
١-٤-٢-٢ ضبط مستويات الـβ-catenin بواسطة كابح الورم الكولوني APC ٦١
١-٤-٢-٣ ضبط مستويات الـβ-catenin بواسطة الـAxin ٦١
١-٤-٣ المعقّد β-catenin-TCF/LEF داخل النواة ٦٢
الباب الثاني : مَواد البَحث وطَرائِقه ٦٤
٢-١ تصميم الدراسة ٦٥
٢-٢ عيّنة البحث ٦٥
٢-٢-١ حجم العيّنة ٦٥
٢-٢-٢ العيّنة الشاهدة ٦٦
٢-٣ المواد ٦٧
٢-٣-١ مواد البحث ٦٧
٢-٣-٢ الأجهزة المستخدمة ٧١
٢-٤ الطرائق ٧٣
٢-٤-١ طريقة تحضير الخزعات النسيجيّة الشاهدة ٧٣
٢-٤-٢ التلوين التقليدي ٧٤
٢-٤-٢-١ طريقة التلوين بالهيماتوكسيلين وأيوزين ٧٤
٢-٤-٢-٢ التقييم النسيجي للعينة الشاهدة الملونة H&E ٧٥

٢-٤-٢-٣ طريقة التقييم النسيجي للشرائح الملونة H&E ٧٦
٢-٤-٣ التلوين الكيميائي النسيجي المناعي (IHC) ٧٧
٢-٤-٣-١ طريقة التلوين بالملوّن β-Catenin ٧٧
٢-٤-٣-٢ التقييم النسيجي للعيّنة الشاهدة الملوّنة IHC ٨٢
٢-٤-٣-٣ طريقة التقييم النسيجي للعيّنات الملوّنة IHC ٨٢
٢-٥ الاختبارات الإحصائية المستخدمة ٨٤
٢-٥-١ تحليل التباين ٨٤
٢-٥-٢ تحليل ارتباط بيرسون ٨٥
٢-٥-٣ منحني ROC (Receiver Operating Characteristic) ٨٦
٢-٥-٤ اختبار ستيودنت لعينتين مستقلتين ٨٧
الباب الثالث: النتائج والدراسة الإحصائية ٨٨
٣-١ وصف العينة ٨٩
٣-٢ النتائج ٩٤
٣-٢-١ نتائج دراسة المجموعة الأولى ٩٤
٣-٢-٢ نتائج دراسة المجموعة الثانية ٩٧
٣-٢-٣ نتائج دراسة المجموعة الثالثة ١٠٠
٣-٢-٤ نتائج دراسة المجموعة الشاهدة ١٠٣
٣-٣ الدراسة الإحصائية ١٠٦
٣-٣-١ دراسة نسبة الخلايا في طور التحول الظهاري الميزانشيمي ١٠٦
٣-٣-٢ دراسة نسبة الخلايا ذات التعبيرية النووية ١٠٨
٣-٣-٣ دراسة علاقة التعبيرية النووية بالتعبيرية الغشائية للملون β-Catenin ١١٠
٣-٣-٤ دراسة إمكانيّة التّنبّؤ بالتّحوّل نحو الخباثة اعتماداً على الـβ-Catenin : ١١٢
٣-٣-٥ دراسة تأثير جنس المريض في الـEMT ١١٥
الباب الرابع: المناقشة ١١٧
٤-١ التحوّل الظهاري الميزانشيمي في سوء التصنّع البشروي الفموي ١٢٢
٤-٢ التعبيرية النووية للـ β-Catenin في سوء التصنع البشروي الفموي ١٢٥
٤-٣ العلاقة بين التعبيرية الغشائية و التعبيرية النووية للـ β-Catenin ١٢٨
٤-٤ إمكانيّة التّنبّؤ بالتّحوّل نحو الخباثة اعتماداً على الـβ-Catenin ١٣١
٤-٥ تأثير جنس المريض في التحول الظهاري الميزانشيمي ١٣٢
الباب الخامس: الاستنتاجات ١٣٤
الباب السادس: المقترحات والتوصيات ١٣٦
الباب السابع: المَراجع ١٣٨
الملخص ١٤٧
Abstract ١٤٨

قائمة الجداول

جدول (١-١) تعرّيف الطلاوة البيضاء الفموية ١٦
جدول (١-٢) الأمراض الواجب استبعادها عند تشخيص الطلاوة البيضاء الفموية ١٧
جدول (١-٣) المعايير المستخدمة في تشخيص سوء التصنّع الفموي ٢٣
جدول (١-٤) تصنيفات سوء التصنع البشروي المتبعة ٢٧
جدول (١-٥) تصنيف WHO لسوء التصنع البشروي الفموي ٣٠
جدول (١-٦) محرضات التحول الظهاري الميزانشيمي ٤٥
جدول (١-٧) واسمات التحول الظهاري الميزانشيمي الأكثر شيوعاً ٤٩
جدول (١-٨) التصنيف الوظيفي للارتباطات الخلوية ٥٣
جدول (٢-١) تصنيف سوء التصنع البشروي الفموي المعتمد في الدراسة ٧٦
جدول (٢-٢) دلالة قيمة معامل ارتباط بيرسون r ٨٥
جدول (٢-٣) دلالة المساحة تحت منحني ROC ٨٦
جدول (٣-١) توزع العينة حسب درجة سوء التصنع ٨٩
جدول (٣-٢) توزع الذكور والإناث في العينة ٩٠
جدول (٣-٣) توزع المدخنين و غير المدخنن في عينة البحث ٩١
جدول (٣-٤) توزع مواقع الإصابة في عينة البحث ٩٢
جدول (٣-٥) توزع أعمار المرضى في العيّنة ٩٣
جدول (٣-٦) نتائج المجموعة الأولى ٩٦
جدول (٣-٧) نتائج المجموعة الثانية ٩٩
جدول (٣-٨) نتائج المجموعة الثالثة ١٠٢
جدول (٣-٩) نتائج المجموعة الشاهدة ١٠٥
جدول (٣-١٠) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا EMT ١٠٦
جدول (٣-١١) نتيجة اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA لمتوسّط نسب الخلايا EMT ١٠٧
جدول (٣-١٢) نتائج اختبار Tukey لدراسة فروق نسب الخلايا EMT بين المجموعات ١٠٧
جدول (٣-١٣) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا ذات التعبيرية النووية ١٠٨
جدول (٣-١٤) نتيجة اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA لمتوسّط نسب التعبيرية النووية ١٠٩
جدول (٣-١٥) نتائج اختبار Tukey لدراسة فروق نسب خلايا التعبيرية النووية بين المجموعات ١٠٩
جدول (٣-١٦) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا ذات التعبيرية الغشائية ١١٠
جدول (٣-١٧) نتائج اختبار معامل ارتباط بيرسون بين التعبيرية الغشائية والنووية ١١١
جدول (٣-١٨) حساب المساحة تحت منحنيي ROC ١١٢
جدول (٣-١٩) نتائج حساب الحساسية والنوعية لنسبة التعبيريّة النووية للـβ-Catenin ١١٣
جدول (٣-٢٠) نتائج حساب الحساسية والنوعية لنسبة الخلايا EMT ١١٤
جدول (٣-٢١) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا EMT لدى كلا الجنسين ١١٥
جدول (٣-٢٢) نتائج اختبار ستيودنت بين الإناث والذكور ١١٦

قائمة الأشكال التوضيحية

شكل (١-١) طريقة تشخيص الـLeukoplakia ١٧
شكل (١-٢) أعشاب سان جون اريا ومنتجات تحوي مستخلص تلك الأعشاب ٢٢
شكل (١-٣) فرط التقرن في الطبقة الشائكة دون علامات سوء التصنع ٢٧
شكل (١-٤) فرط تصنع الخلايا القاعدية ٢٨
شكل (١-٥) سوء تصنع بسيط ٢٨
شكل (١-٦) سوء تصنع متوسط ٢٩
شكل (١-٧) سوء تصنع شديد ٢٩
شكل (١-٨) السرطان البشروي الموضّع ٣٠
شكل (١-٩) التقرن المفرد أو اللآلئ الكيراتينية (REGEZI, 2008) ٣٣
شكل (١-٩) الغزو النسيجي المبكر ٣٣
شكل (١-١٠) التحول الظهاري الميزانشيمي ٣٦
شكل (١-١١) أنماط التحول الظهاري الميزانشيمي ٣٨
شكل (١-١٢) Type 2 EMT ٤٠
شكل (١-١٣) مصادر خلايا مصورات الليف أثناء تليف الكلية ٤١
شكل (١-١٤) Type 3 EMT ٤٤
شكل (١-١٥) مخطط لمسالك الإشارة ٤٦
شكل (١-١٦) دور الـ β-catenin في التحول الظهاري الميزانشيمي ٥١
شكل (١-١٧) مخطط ترسيمي يبين بنية بروتين الـβ-catenin ٥٢
شكل (١-١٨) البنية الفراغية لمنطقة مكررات armadillo من بروتين الـβ-catenin ٥٢
شكل (١-١٩) الموصلات الملتصقة بالمجهر الإلكتروني، ورسم يبين الكادهرين ٥٤
شكل (١-٢٠) أشكال الكادهرين وعلاقته بالكالسيوم ٥٥
شكل (١-٢١) معقد E-Cadherin\ β-catenin ٥٦
شكل (١-٢٢) التنظيم الخلوي للمعقد Cadherin\ catenin ٥٦
شكل (١-٢٣) آلية تفكيك الـβ-catenin ٥٨
شكل (١-٢٤) مسلك الإشارات Wnt/β- catenin في حالتي التحريض والتثبيط ٥٩
شكل (٢-١) الخزعات المحفوظة بشمع البرافين ٦٥
شكل (٢-٢) العيّنة الشاهدة محفوظة بالفورمالين ٦٦
شكل (٢-٣) الكزيلول ٦٧
شكل (٢-٤) الكحول ٦٧
شكل (٢-٥) الملوّنات التقليدية الهيماتوكسيلين والأيوزين ٦٧
شكل (٢-٦) الشرائح الزجاجية والسواتر ٦٨
شكل (٢-٧) ضد وحيد النسيلة لـ β-catenin ٦٩
شكل (٢-٨) ظروف المحلول الدارئ منDako ٦٩
شكل (٢-٩) محلول استرجاع المستضد Dako ٦٩
شكل (٢-١٠) الكيت المناعي المفرد من Bio-SB ٦٩

شكل (٢-١١) Peroxidase Blocker ٧٠
شكل (٢-١٢) Poly Detector DAB Buffer ٧٠
شكل (٢-١٣) HRP Label ٧٠
شكل (٢-١٤) DAB Chromogen ٧٠
شكل (٢-١٥) الشرائح الزجاجية الخاصَّة بالتلوين المناعي الكيميانسيجي ٧٠
شكل (٢-١٦) المبشَرة النسيجيّة ٧١
شكل (٢-١٧) المحمّ المائي ٧١
شكل (٢-١٨) السخّان ٧٢
شكل (٢-١٩) المايكرويف ٧٢
شكل (٢-٢٠) المجهر الضوئي ٧٢
شكل (٢-٢١) الممص ٧٢
شكل (٢-٢٢) قلم التحديد ٧٢
شكل (٢-٢٣) بعض الشرائح الملونة بالـ H&E ٧٧
شكل (٢-٢٤) الشرائح مغمورة في محلول استرجاع المستضد ٧٨
شكل (٢-٢٥) تطبيق الـPeroxidase Blocker ٧٩
شكل (٢-٢٦) الغسل بالمحلول الدارئ PBS ٧٩
شكل (٢-٢٧) تطبيق الـβ-Catenin ٨٠
شكل (٢-٢٨) تطبيق الـ Poly Detector HRP Label ٨٠
شكل (٢-٢٩) تطبيق الكروموجين ٨١
شكل (٢-٣٠) تحضير الكروموجين ٨١
شكل (٢-٣١) تطبيق الهيماتوكسيلين على النسيج ٨١
شكل (٢-٣٢) طريقة العد اليدويّة ٨٣
شكل (٢-٣٣) جدول Microsoft Excel 2010 المستخدم لوضع النتائج ٨٣
شكل (٣-١) سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط H&E تكبير X10 ..... ٩٤
شكل (٣-٢) سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط H&E تكبير X40 ..... ٩٤
شكل (٣-٣) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط تكبير X10 ..... ٩٥
شكل (٣-٤) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط تكبير X40 ..... ٩٥
شكل (٣-٥) سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسط H&E تكبير X10 ..... ٩٧
شكل (٣-٦) سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسط H&E تكبير X40 ..... ٩٧
شكل (٣-٧) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسّط تكبير X10 ..... ٩٨
شكل (٣-٨) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسّط تكبير X40 ..... ٩٨
شكل (٣-٩) سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد H&E تكبير X10 ..... ١٠٠
شكل (٣-١٠) سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد H&E تكبير X40 ..... ١٠٠
شكل (٣-١١) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد تكبير X10 ..... ١٠١
شكل (٣-١٢) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد تكبير X40 ..... ١٠١
شكل (٣-١٣) إحدى خزعات العينة الشاهدة H&E تكبير X10 ..... ١٠٣
شكل (٣-١٤) إحدى خزعات العينة الشاهدة H&E تكبير X40 ..... ١٠٣

شكل (٣-١٥) تعبيرية الـ β-Catenin في إحدى خزعات العينة الشاهدة تكبير X10 ..... ١٠٤
شكل (٣-١٦) تعبيرية الـ β-Catenin في إحدى خزعات العينة الشاهدة تكبير X40 ..... ١٠٤

قائمة المخطّطات البيانيّة

مخطط (٣-١) تقسيم العينة حسب درجة الإصابة ٨٩
مخطط (٣-٢) توزع الذكور والإناث في عينة البحث ٩٠
مخطط (٣-٣) توزيع المدخنين وغير المدخنين في عينة البحث ٩١
مخطط (٣-٤) توزع مواقع الإصابة في عينة البحث ٩٢
مخطّط (٣-٥) متوسّط العمر لدى كل من مجموعات العيّنة ٩٣
مخطط (٣-٦) نسبة الخلايا EMT في كل من درجات الإصابة..... ١٠٦
مخطط (٣-٧) نسبة التعبيرية النووية في كل من درجات الإصابة..... ١٠٨
مخطط (٣-٨) نسبة التعبيرية الغشائية في كل من درجات الإصابة..... ١١٠
مخطط (٣-٩) العلاقة ما بين التعبيرية النووية و التعبيرية الغشائية ١١١
مخطط (٣-١٠) منحنيي ROC ١١٢
مخطط (٣-١١) مقارنة نسب الخلايا EMT في كل من درجات الإصابة بين الذكور والإناث ١١٥

قائمة الاختصارات

الاختصار	المصطلح باللغة الإنكليزية	المصطلح باللغة العربية
ALK-5	Activator type 5 like kinase (TGF-β receptor)	المفعِّل شبيه الكيناز ٥ (مستقبل TGF-β)
AMF	Autocrine Motility Factor	عامل الحركة الذاتي
APC	Adenomatous Polyposis Coli	داءُ السَّلاَئِلِ القُولُونِي الوَرَمِي الغُدِّيّ كابح الورم الكولوني
a-SMA	a Smooth Muscle Actin	أكتين العضلات الملساء a
BMP	Bone Morphogenetic Protein	البروتين المخلّق للعظم
c-MYC	Myelocytomatosis oncogene cellular homolog type C	
COX2	Cyclooxygenase-2	السايكلوأوكسجيناز ٢
DDR2	Discoidin domain-containing receptor 2	
ECM	Extra Cellular Matrix	المادة خارج الخلوية
EGF	Epidermal Growth Factor	عامل النمو البشروي
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition	التحول الظهاري الميزانشيمي
EndMT	Endothelial-Mesenchymal Transition	التحول البطاني الميزانشيمي
ERK	Extracellular signal-regulated kinases	الكيناز المنظِّم للإشارات خارج الخلوي
FGF	Fibroblast Growth Factor	عامل نمو مصوّرات الليف
FOXC2	Forkhead box protein C2	عامل انتساخ
FSP1	Fibroblast-Specific Protein-1	البروتين الخاص بمصوّرات الليف
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3beta	أنزيم الغليكوجين كيناز 3β
HGF	Hepatocyte Growth Factor	عامل نمو الخلايا الكبديَّة

HPV	Human Papillomavirus	فيروس الورم الحليمي البشري
HSP47	Heat shock protein 47	
IGF	Insulin-Like Growth Factor	عامل النمو الشبيه بالأنسولين
IL-6	Interleukin-6	الانترلوكين ٦
ILEI	Interleukin-Related Protein	البروتين المرتبط بالإنترلوكين
ILK	Integrin-Linked Kinase	الكيناز الرابط للانتغرين
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding Factor	عامل الارتباط المعزّز للمفاويات
LRP-5/6	Lipoprotein Receptor-related Proteins 5/6	مستقبل للWnts
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	
MET	Mesenchymal Epithelial Transition	التحول الميزانشيمي الظهاري
OED	Oral Epithelial Dysplasia	سوء التصنع البشروي الفموي
PDGF	Platelet Derived Growth Factor	عامل النمو المُشتَق من الصفيحات
Pge2	Prostaglandin E(2)	البروستغلاندين E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	
PTH(Rp)R	Parathyroid Hormone Related Peptide Receptor	المستقبل الببتيدي لهرمون جارات الدرق
PVL	Proliferative Verrucous Leukoplakia	الطلاوة الثؤلولية المتكاثرة
SCF	Stem Cell Factor	عامل الخلايا الجذعيّة
Shh	Sonic Hedghog	محرض للEMT
SMAD	Contraction of Sma and Mad	ناقل إشارة داخل خلوي
TCF	T-Cell-Specific Transcription Factor	عامل الانتساخ الخاص بالخلايا التائيّة
TGF- β	Transforming Growth Factor	عامل النمو المحوّل بيتا

UV	Ultraviolet Light	الأشعّة فوق البنفسجيّة
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	عامل النمو الوعائي البطاني
Wnt	Wingless Signaling Transduction Pathway	مسلك إشارات تبادل المادة الوراثية
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	كابح عامل انتساخ

المقدّمة

إنّ السرطانات بشكل عام هي معضلة الطب عبر التاريخ ودائماً كان سعيّ الأطباء والعلماء والباحثين إلى إيجاد حلٍّ لهذه المعضلة. وقد توصلت الأبحاث إلى الأهميّة الفائقة للكشف المبكر عن الآفات السرطانيّة مما يسهّل علاجها بطرق مختلفة. لذلك أخذت الأبحاث التي تتناول الأمراض والآفات ما قبل السرطانيّة حيّزا من الأهميّة.

تعتبر آفات سوء التصنّع الفمويّة في كثير من حالاتها آفات ما قبل سرطانيّة وعادة ما تتظاهر سريرياً على شكل طلاوات فمويّة بيضاء وهي من الآفات ذات الانتشار الواسع حيث إنّها تصيب ٣% من الأشخاص البالغين البيض (Neville and Day, 2002)، وتشير الدراسات إلى قدرة بعضها العالية على التّحوّل السّرطانيّ فإنَ أكثر من ٥٠% من السرطانات شائكة الخلايا الفمويّة تحوّلت عن آفات سوء تصَنع بشرويَة قبيل سرطانيَة (Speight, 2007).

وإنَ العمليّات التي تجتازها تلك الآفات في طريقها نحو التحوّل غير واضحة إلى الآن، لكن مفهوم التَحول الظّهاري الميزانشيمي الذي ظهر مؤخّراً يمكنه أن يطلق آفاق جديدة في تفسير تلك الظّاهرة. فقد دلّت الأبحاث على أهميّة هذه الآليّة في الغزو والاستعمار السرطانيّ، كما فسّرت مصدر الخلايا الميزانشيميّة التي تشارك في شفاء وتندب الجّروح وتليف الأعضاء، إضافة إلى دورها في التّخلق الجنينيّ وتطور الأعضاء (Kalluri and Weinberg, 2009). لكن دور التّحوّل الظّهاريّ الميزانشيميّ في تحوّل الخلايا البشرويّة سيّئة التصنّع إلى خلايا سرطانيّة غير معروف.

يمتلك التحوّل الظهاري الميزانشيمي العديد من المحرِّضات (**Thiery et al., 2009**)، منها ما تحرّضه في التّخلُّق الجنيني أو في التجدّد النسيجي وأخرى تحرّضه في الخلايا السرطانيّة

وتُكسبها القدرة على الغزو والاستعمار، كما يمكن تحرّيه نسيجياً عبر طيف واسع من الواسمات المناعيّة التي تلوّن بروتينات خاصّة يزداد نشاطها أثناء إنجازه وذلك في مستويات عدّة في الخليّة الآخذة بالتحوُّل فقد تكون بروتينات غشائيّة أو هيوليّة أو نوويّة وقد تكون بروتينات خارج خلويّة (Zeisberg and Neilson, 2009).

يعتبر سبيل إشارات Wnt من أهمِّ محرِّضات التحوّل الظهاري الميزانشيمي في الأورام، والذي يعتمد بشكل أساسي على بروتين الـ β-catinin والذي يمكن اعتماده كواسم للخلايا الآخذة بالتحوّل (Brabletz et al., 1998).

أهداف البحث

يهدُف البحث إلى:

١. تحرِّي تعبيريّة واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β–catinin في المخاطيّة الفمويّة الطبيعية.

٢. تحرِّي تعبيريّة واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β-catinin في الدرجات المختلفة من سوء التصنّع البشروي في المخاطيّة الفمويّة.

٣. تحرّي وجود علاقة بين التحوّل الظهاري الميزانشيمي والدرجات المختلفة لسوء التصنّع البشروي في المخاطيّة الفمويّة.

٤. تحرّي وجود علاقة بين مسلك إشارات Wnt/β- catenin والدرجات المختلفة لسوء التصنّع البشروي في المخاطيّة الفمويّة.

الباب الأول: المُراجَعة النَظَرِيَّة

Literature Review

١-١ سوء التصنّع البشروي الفموي
Oral Epithelial Dysplasia (OED)

١-١-١ تعريف سوء التصنّع البشروي الفموي (OED)

Dysplasia هو مصطلح من مقطعين dsy- وتعني سيّئ أو غير طبيعي وplasia وتعني النمو أو التصنّع.

وُضِع مصطلح الـDysplasia من قِبَل Reagon في عام ١٩٥٨ للدلالة على الخلايا التي تتوسَّف من آفات عنق الرحم والتي تنذر بالتغيُّرات ماقبل السرطانيّة، وقام بتعريفه على أنّه آفة ماقبل سرطانية في البشرات الشائكة المطبّقة تتظاهر بالشذوذات الخلويّة وفقدان النضج والتطبّق الطبيعيَّين.(Pindborg et al., 1997)

واستخدمت سابقاً المصطلحات (سوء التصنّع البشروي Epithelial Dysplasia) و(الشذوذ الظهاري Epithelial Atypia) و (سوء التقرن Dyskeratosis) كمرادفات لسوء التصنّع Dysplasia.

وعرَّف Pindborg (١٩٧٧) سوء التصنّع البشروي على أنّه مصطلح يستخدم للدلالة على الآفات التي تُستبدل فيها الخلايا الظهاريّة في أيٍّ جزء من ثخانة الظهارة بخلايا تبدي درجات مختلفة من اللانمطيّة الخلويّة. (Pindborg et al., 1977)

وعرَّف Lumermann وزملاؤه (١٩٩٥) سوء التصنّع البشروي الفموي على أنّه مصطلح تشخيصي يصف التغيّرات النسيجيّة التي تحدث في الاضطرابات ماقبل السرطانيّة المزمنة والمترقِّية للمخاطيّة الفمويّة (Lumerman et al., 1995).

١-١-٢ المظهر السريري لسوء التصنّع البشروي الفموي

لايرتبط مصطلح سوء التصنّع البشروي الفموي بمظهر سريري محدّد، لكن غالباً ما يعتبره الباحثون أنّه الانعكاس النسيجي لكلٍّ من الطلاوة البيضاء (leukoplakia) والطلاوة الحمراء (erythroplakia)، كما أنّه يُشاهد دائماً في المخاطيّة الفمويّة المجاورة للسرطان شائك الخلايا الفموي. وكما هي الحال في معظم الآفات البيضاء ينتج اللون السريري عن طبقة الكيراتين السطحيّة المُتَسمِّكة والتي تبدو باللون الأبيض. (Jaber et al., 2003)

١-١-٢-١ الطلاوة البيضاء الفمويّة (Oral Leukoplakia)

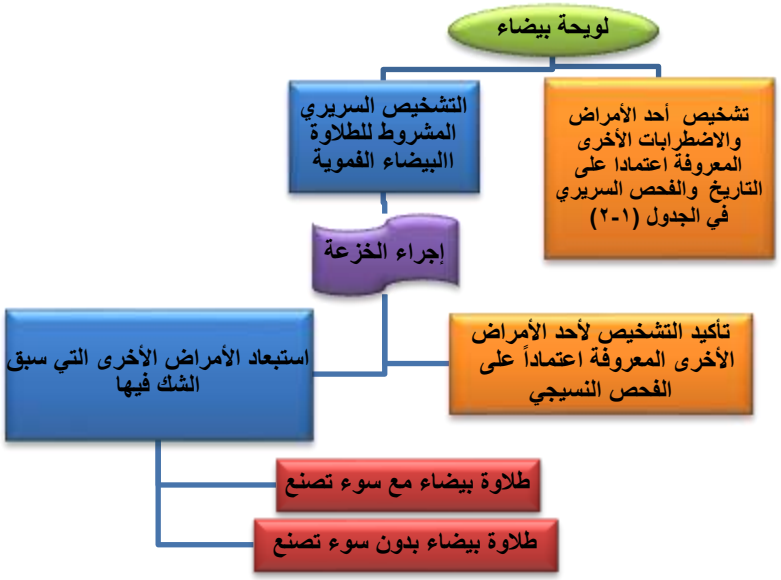
تعرَّف الطلاوة الفمويّة حسب منظّمة الصحة العالميّة ١٩٧٨على أنَّها لويحة (Plaque) أو لطاخة (Patch) بيضاء اللون لايمكن وصفها سريريّاً أو نسيجيّاً كأيّ من الأمراض الأخرى. وإنّ هذا المصطلح هو مصطلح سريري بحت ولا يعبِّر عن أيِّ شكل نسيجي محدّد.

وتمّ تعديل هذا التعريف بالعام ٢٠٠٥ وأضيفت له كلمة آفة (Lesion). كما في الجدول (١-١)

جدول (١-١) تعرّيف الطلاوة البيضاء الفموية (Warnakulasuriya et al., 2007)

المؤتمر العلمي	التعرّيف	العام
WHO	لويحة أو لطاخة بيضاء لايمكن وصفها سريريّاً أو نسيجياً كأيّ من الأمراض الأخرى	١٩٧٨
المؤتمر الدولي الأوّل حول الطلاوة الفمويّة- السويد	لويحة أو لطاخة بيضاء لايمكن وصفها سريريّاً أو نسيجيّاً كأيّ من الأمراض الأخرى وغير مقترنة مع أيّ عامل فيزيائي أو كيميائي مسبّب باستثناء التّدخين	١٩٨٤
الندوة الدولية – السويد	آفة بيضاء شائعة تظهر على المخاطية الفموية لا يمكن وصفها كأيّ من الأمراض الأخرى المعروفة	١٩٩٦
WHO	آفة بيضاء شائعة تظهر على المخاطية الفموية لا يمكن وصفها كأيّ من الآفات البيضاء الأخرى المعروفة	٢٠٠٥
Warnakulasuriya et al.	آفة بيضاء فمويّة مشكوك بخطورة تحوّلها السرطاني استبعدت عن باقي الأمراض والاضطرابات المعروفة التي لا تحمل خطورة التسرطن	٢٠٠٧

١-١-٢-٢ التشخيص التفريقي للطلاوة البيضاء الفموية



شكل (١-١) طريقة تشخيص الـLeukoplakia

لا يطلق التشخيص السريري Leukoplakia عادة بالاعتماد على المظاهر التي يعرف بها، بل بالاعتماد على استبعاد الأمراض الأخرى التي تظهر على أنَّها لويحات فمويّة بيضاء. شكل(١-١)

جدول (١-٢) الأمراض الواجب استبعادها عند تشخيص الطلاوة البيضاء الفموية (Yang et al., 2012)

المرض أو الآفة	المظاهر السريرية	الخزعة النسيجيّة
الوحمة الإسفنجيّة البيضاء	تصيب الأعمار الصغيرة، التاريخ العائلي، تصيب منطقة كبيرة، يمكن إصابة المخاطيّة التناسليّة.	غير مطلوبة
التقرُّن الاحتكاكي	قصة رضٍ سابق، عادةً بمستوى الإطباق، وجود مسبِّب للتخريش، عادة تشفى بعد إزالة المسبِّب.	تطلب بعد بقاء الآفة رغم إزالة المسبّب خاصّة عند المدخِّنين
الأذيّة الكيميائيّة	قصة مرضيّة، موقع الإصابة، زوالها سريع تلقائيا.	غير مطلوبة
الكانديدا	زوال الغشاء الكاذب بالكشط وتترك سطح أحمر	لطاخة للزرع
الوذمة البيضاء	ثنائية الجانب على المخاطية الخدية تختفي أو تتكمش بتمديد الخد	غير مطلوبة
الحزاز المنبسط(النمط اللويحي)	تترافق مع أشكال أخرى شبكية، احتمال إصابة مناطق من جلد الجسم	مطلوبة
الذئبة الحماميّة القرصيّة	آفة حماميّة المركز ويشع منه خطوط بيضاء	مطلوبة
الطعم الجلدي	تاريخ سابق	غير مطلوبة
الطلاوة البيضاءالمشعَّرة	تقرن ثنائي الجانب للسان	مطلوبة
الطلوان النيكوتيني	تاريخ التدخين لفترات طويلة، الحنك ذو لون أبيض مائل للرمادي	غير مطلوبة

١-١-٢-٣ الوبائيّات

تعتبر الطلاوة الآفة ما قبل السرطانيّة الفمويّة الأكثر شيوعاً وتمثّل ٨٥% منها، ودلّت الدراسات أنّها تصيب ٣% من الأشخاص البالغين البيض.(Neville and Day, 2002)

تصيب الطلاوة عادةً الأعمار المتوسِّطة والكبيرة ويزداد احتمال الإصابة مع التقدّم بالعمر، وتظهر الإصابة لدى ٨% من الرجال فوق عمر الـ ٧٠ ومتوسّط عمر الإصابة بالطلاوة ٦٠سنة.(van der Waal, 2015)

هناك ميل كبير لإصابة الذكور تصل إلى نسبة ٧٠% أكثر من الإناث، قد يعود ذلك إلى أنّ نسبة التدخين عند الذكور أكبر، لذلك تكون نسبة إصابة الذكور إلى الإناث بالطلاوة البيضاء أقل في المناطق التي تزيد فيها نسبة الإناث المدخِّنات.

تقريباً ٧٠% من الطلاوات الفمويّة تظهر في الناحية الحمراء من الشفَة والمخاطيّة الخديّة واللثّة. و يشاهد سوء التصنع البشروي في ٩٠% من الآفات التي تظهر على الشفّة واللسان وقاع الفم. (Neville et al., 2009a)

تكمن أهميّة الطلاوة البيضاء الفمويّة بخطورة تحوّلها العالية لسرطان شائك الخلايا ويعتقد أن ١٨% إلى ٣٣% منها يتحوّل لسرطان شائك الخلايا (Martorell-Calatayud et al., 2009)

٨% من الطلاوات تُبدي التحوّل الخبيث خلال السنوات الخمس الأولى من متابعة المريض. وكلّ طلاوة تكون موضع الشك في التحوّل للسرطان حتّى تلك التي لا تبدي أيّاً من علامات سوء التصنّع، وتكمن المشكلة في عدم القدرة على التنبُّؤ الدقيق بالتحوُّل الخبيث للطلاوة.

ولكن بعض البيانات قد تفيد في تحرّي الآفات ذات الخطورة العالية للتسرطن، حيث تزداد الخطورة في:

١. المرضى الإناث.
٢. بقاء الآفة لفترات طويلة.
٣. المرضى غير المدخِّنين.
٤. موقع الإصابة في قاع الفم أو اللسان.
٥. المرضى ذوي التاريخ الطبّي الحاوي على إصابة سرطانية سابقة.
٦. الآفة غير متجانسة بالمظهر السريري.
٧. الإنتان الثانوي بالمبيضات البيض.
٨. ظهور سوء التصنع البشروي ضمن الخزعة.

ومن كل هذه العوامل يبقى ظهور سوء التصنّع هو الدليل الأقوى على احتمالية التحوّل السرطاني ولكنّه غير كافٍ فقد سُجِّلت حالات عديدة لآفات تحوّلت لسرطان شائك الخلايا دون وجود علائم سوء التصنّع مسبقاَ.(Reibel, 2003)

١-١-٢-٤ الوقاية من التحول السرطاني للطلاوة

لا يوجد عوامل محدّدة تمكِّننا من اتقاء الإصابة بالطلاوة، كما لايوجد حتى الآن علاج وقائي يمنع تطوّر الطلاوة الفموية إلى سرطان، لكن اتباع أساليب الحياة الصحيّة والابتعاد عن مناطق التلوّث والإقلاع عن التدخين والكحول قد تقلّل من احتمال الإصابة. إضافة للعادات الغذائيّة الصحيّة وتناول الوجبات الصحيّة والغنيّة بالفواكه والخضار والفيتامينات ومضادات التأكسد.

ويشكل التشخيص المبكر للطلاوة العامل الأهم في خفض خطورة تحوّلها للخباثة .(Lodi et al., 2006)

١-١-٢-٥ الأنماط السريريّة للطلاوة الفمويّة

يوجد نمطان أساسيّان للطلاوة هما الطلاوة المتجانسة (Homogeneous) والطلاوة غير المتجانسة (Non Homogeneous) والتمييز بينهما سريريٌّ فقط يعتمد على لون السطح وثخانة الآفة وصفاتها الشكليّة والبنيويّة. ويضاف لهما الطلاوة الحمراء. (van der Waal and Axell, 2002)

١. الطلاوة المتجانسة: مسطّحة ورقيقة وتبدي شقوقاً ضحلة وخطورة التحوّل السرطاني لها تكون منخفضة نسبياً

٢. الطلاوة غير المتجانسة: والتي تحمل خطورة أعلى بكثير للتحوّل السرطاني، وتُعرَف بالطلاوة البيضاء الحمراء (Erythroleukoplakia) وتظاهرتها تتضمّن:

- الطلاوة المرقطة (Speckled) بالأبيض والأحمر ولكن معظمها يميل للون الأبيض.
- الطلاوة العقديّة (Nodular) تكون على شكل اندفاعات صغيرة محاطة بزوائد بيضاء أو حمراء.
- الطلاوة الثؤلوليّة (Verrucous) ذات سطح مُجعَّد أو مُموَّج
- الطلاوة الثؤلوليّة المتكاثرة (proliferative verrucous leukoplakia) وتتظاهر على شكل طلاوات متعدّدة في وقت واحد أي إنَّها آفة متعدِّدة البؤر عادة تغطي منطقة واسعة.(Neville et al., 2009a)

٣. الطلاوة الفمويّة الحمراء (Erythroplakia): اعتبرت الطلاوة الحمراء لفترة طويلة أهم آفات المخاطية الفموية ماقبل السرطانية وذات الاحتماليّة الأعظم للتحوّل الخبيث، ولم يتغيّر تعريفها منذ عام ١٩٧٨ حيث وضع التعريف من قبل منظّمة الصحة الفمويّة

ومازال يستخدم حتى الآن وهو " لطاخة حمراء اللون لا يمكن وصفها سريريّاً أو نسيجيّاً كأيّ من الآفات الحمراء الأخرى المعروفة " ، وعادة ما تكون لاطئة مسطَّحة وذات سطح أملس أو حُبيبي. وأثناء التشخيص يجب استبعاد كل الأمراض والاضطرابات الفموية الأخرى المشابهة، والخزعة أساسيّة في تشخيص الطلاوة الحمراء. وفي معظم من آفات الطلاوة الحمراء وجد سوء التصنّع. (Lucio et al., 2013)

١-١-٢-٦ الأسباب والمؤهِّبات

إلى الآن لم يعرف السبب الرئيسي وراء الطلاوة على الرغم من كثرة الفرضيّات، وهي:

١- التدخين: إن عادة التدخين ذات صلة وثيقة بتطوّر الطلاوة، أكثر من ٨٠% من المصابين مدخِّنين، كما لوحظ تعدُّد الإصابة وزيادة حجمها عند المدخِّنين بكثرة (Heavy Smokers) ولسنوات عدّة مقارنة بالأقل تدخيناً (Light Smokers)، وإنَّ إيقاف التدخين قد يشفي من الإصابة أو ينقص حجمها خاصّة في السنة الأولى من الإقلاع عن التدخين. (Neville et al., 2009a)

٢- الكحول: للكحول تأثير مؤازر للتدخين لإحداث السرطان الفموي ولا علاقة له بالطلاوة والذين يستخدمون الغسولات الفمويّة بشكل مفرط مع الكحول يمكن إصابتهم بأكثر من ٢٥% بلويحات رمادية اللون على المخاطيّة الفمويّة للخد ولكنَّها لا تعتبر طلاوات حقيقيّة. (Sujatha et al., 2012)

٣- الأشعة فوق البنفسجيّة : لقد تمَّ التوافق على أنَّ الأشعة فوق البنفسجيّة UV هي عامل مسبِّب للطلاوة على الناحية الحمراء من الشفّة السفليّة بسبب تشقُّق الشفّة الشعاعي (Actinic Cheilosis)

٤- Sanguinaria الأشخاص الذين يستخدمون معاجين أسنان أو غسولات فمويّة (شكل ١-٢) حاوية على مستخلص الأعشاب (سان جون اريا) يمكن أن تتطور لديهم طلاوة حقيقيّة عادة ما تظهر في دهليز الفم العلوي أو على مخاطيّة السنخ العلوي، ورغم أن خطورتها بالتحوّل للسرطان غير مؤكَّدة لكن قد لا تزول الآفة بعد التوقّف عن استعمال تلك المنتجات.
(Neville et al., 2009a)

شكل (١-٢) أعشاب سان جون اريا ومنتجات تحوي مستخلص تلك الأعشاب

٥- العضيّات الدقيقة: تتورَّط عدّة عضيّات دقيقة بإحداث الطلاوة

- اللولبية الشاحبة (Treponema Pallidum): تؤدِّي إلى حدوث التهاب اللسان في المراحل المتأخّرة من السفلس مع المعالجة الشائعة سابقا بالزرنيخ أو بدونها قبل ظهور الصادات الحيويّة الحديثة، فيصبح اللسان صلباً مع ظهور طلاوة بيضاء حقيقيّة على سطحه. لكن مع وجود المعالجة الحديثة أصبح السفلس الثالثي نادر الحدوث. (Neville et al., 2009a)
- المبيضات البيض (Candida Albicans): إصابة فطريّة شائعة تستعمر الطبقة السطحيّة من الظهارة وتحدث لويحة ثخينة حقيقيّة وتلوّن مختلط باللونين الأبيض والأحمر وتمّ استخدام مصطلحي طلاوة المبيضّات (Candidal Leukoplakia) وفرط التصنّع الناتج عن المبيضّات (Candida Hyperplasia) للدلالة على هذه الآفات. ولكن من غير المعروف أن هذه الفطريّات تتسبّب بإحداث سوء التصنّع أو أنّها إنتان ثانوي يصيب الظهارة المتغيرة مسبقاً. ولكن بعض هذه الآفات اختفت كلّيا

أو أصبحت أقل امتدادا أو حتى أقل شدّة في سوء التصنّع بعد المعالجة بالمضادات الفطريّة.(Sanjaya et al., 2011)

- الفايروس الحليمي البشري HPV: وجد في بعض الإصابات بأنواع محدّدة من HPV تطوّر طلاوات فمويّة حيث وجد الفايروس في خلايا المخاطيّة الفمويّة المصابة.(Neville et al., 2009a)

٦- الرض: تمّ تشخيص عدّة طلاوات فمويّة وجد في تاريخها الطبيّ رض سابق أو تخريش مستمر بعوامل مختلفة فيزيائيّة أو كيميائيّة.

١-١-٣ المظهر النسيجي لسوء التصنّع البشروي الفموي

يطلق مصطلح سوء التصنّع على الحالة التي تظهر فيها اضطرابات البنية النسيجيّة للظهارة مترافقة مع لا نمطية خلويّة. وقد أدرجت المعايير المستخدمة لتشخيص سوء التصنّع البشروي الفموي في الجدول (١-٣) حيث قسمت هذه المعايير إلى تغيّرات بنيويّة في الظهارة (التطبق) وتغيّرات خلويّة (اللا نمطيّة).

جدول (١-٣) المعايير المستخدمة في تشخيص سوء التصنّع الفموي (Barnes et al., 2005)

تغيّرات بنيويّة	تغيّرات خلويّة
التطبُّق الظهاري غير المنتظم	تغيّرات شاذة في حجوم النوى (anisonucleosis)
فقدان قطبيّة الخلايا القاعديّة	تعدّد أشكال النوى (nuclear pleomorphism)
فرط تصنّع الخلايا القاعديّة	تغيّرات شاذة في حجوم الخلايا (anisocytosis)
امتدادات إصبعيّة ذات شكل مغزلي	تعدّد أشكال الخلايا (cellular pleomorphism)
زيادة أعداد المغازل الفتيليّة	زيادة نسبة النواة إلى السيتوبلاسما
انقسامات فتيليّة سطحيّة غير طبيعيّة	أشكال فتيليّة لا نموذجيّة
تقرّن غير ناضج في خلايا مفردة (سوء تقرّن)	زيادة أعداد النويّات وحجومها
لآلئ كيراتينيّة ضمن الحليمات البشرويّة	زيادة كثافة النوى (Hyperchromasia)

١-١-٤ المتغيّرات التي تؤثّر في تشخيص سوء التصنّع البشروي الفموي

إنّ رد الفعل الذي يقوم به النسيج الظهاري المتجدِّد والقابل للترميم تجاه المؤثِّرات الخارجية يمكن أن يؤدي إلى اضطرابات بنيويّة وخلويّة شبيهة إلى حد ما بإضطرابات سوء التصنّع، ومن الطبيعي أن يكون للتاريخ الطبّي والقصّة المرضيّة والتحاليل الطبّيّة دوراً في الحكم على آفات عن سوء التصنّع، حيث تكون التغيّرات المورفولوجيّة الحادثة هي ردّ فعل تجاه العامل المنبِّه، وقد تشمل هذه التغيّرات التقرّح أو الالتهاب أو النزف، فهناك عوامل متعدّدة تؤثر في تقييم درجة سوء التصنّع البشروي الفموي (Dost et al., 2014) وتتضمن:

١- عمر الآفة: حيث إنّ طول عمر الآفة يؤدي إلى زيادة احتمال تعرّضها لمؤثّرات خارجية بيولوجيّة أوكيمائيّة أوفيزيائيّة، تؤثّر سلباً في تشخيص الآفة وتحديد درجتها بدقة (Abbey et al., 1998). ودلّت بعض الدراسات على إمكانيّة حدوث إنتان لاحق للآفة بإحدى جراثيم الفم أو الفطريّات كالمبيضات البيض أو الفيروسات كالـ HPV (Naidu et al., 2013).

٢- عمر المريض وحالته الصحيّة: قد يحرض نقص التغذية كنقص الحديد أو حمض الفوليك أو بعض الفيتامينات كالفيتامين B12 ويسبّب اضطرابات تشبه سوء التصنّع، فإنّه من الممكن أن تؤثر الحالة الصحية وسوء التغذية سلباً على تشخيص الآفة ويؤدّي إلى صعوبة تقدير درجتها. ولكن آفات كهذه لا تعتبر آفات ذات إنذار سيّئ. (MacDonald and Rennie, 1975)

٣- صحة الناحية الفموية: فالصحة الفمويّة السيّئة تزيد من احتمال تعرّض الآفة للإنتان.

٤- العادات السيّئة كالتدخين وتناول الكحول وغيرها: يعتبر التدخين من أهم المؤهّبات لحدوث سوء التصنّع البشروي الفموي وبالتالي فإن وجود الآفة عند مدخّن أو مدمن على الكحول يزيد من سوء تصنعها.(Warnakulasuriya et al., 2008)

٥- الموقع التشريحي للآفة: وذلك يؤثّر في تقرير التشريح المرضي فعلى سبيل المثال الآفات في المناطق التي تكون ظهارتها رقيقة في الحالة الطبيعيّة كقاع الفم أو باطن اللسان يمكن وفق نظام التصنيف تخفيف درجة خطورتها خطأً إذا لم يعرف مكان الآفة، ففي مناطق كهذه يكون سوء التصنّع بسيطاً رغم خطورته العالية، وهذا ما يدعو المشرح المرضي إذا ماعلم موقع الإصابة إلى معاوضة الخطأ ورفع درجة خطورة الآفة. لذلك يجب أخذ موقع الآفة التشريحي بعين الاعتبار.(Abbey et al., 1998)

٦- الإنتان الفطري للآفة كالمبيضات: إن وجود المبيضات في الفم يساعد على ظهور فرط التصنّع وبالتشارك مع الالتهاب ضمن الظهارة ينتج سوء التصنّع البشروي، وقد سَجّلت إحدى الدراسات مؤخّراً أن نسبة ٤٥% من الطلاوات المأخوذة من الفم المصاب بالمبيضات البيض تحتوي على سوء تصنّع بدرجات مختلفة. (McCullough et al., 2002)

٧- الأذيّات النسيجية: حيث يجب الأخذ بعين الاعتبار الأذيات الفيزيائيّة التي تسببها الرضوض والعادات السيّئة عند المريض والحروق والتيارات الغلفانية والتعوّيضات أو الترميمات السنيّة سيئة الصنع. والأذيات الكيميائية كتأثير الحموض والأطعمة الحارة والمخرّشة، وحموض المعدة عند مرضى القلس. وفي في حالة تعرّض المريض للأشعة يلاحظ وجود مصوّرات الليف المحرّضة بالأشعة وزيادة حجم نوى الخلايا الظهاريّة وفرط تصبّغها (hyperchromatism) وتكون التغيّرات النسيجيّة الأخرى أقل وضوحا مما هي عليه في آفات سوء التصنّع خارج حقل الأشعة. (MacDonald and Rennie, 1975)

١-١-٥ تصنيف آفات سوء التصنّع البشروي الفمويّة

يفيد تصنيف الأمراض بشكل عام في تسهيل تشخيصها وتحديد إنذارها وبالتالي تَبنّي الطريقة المثلى للعلاج، وإنّ طريقة تصنيف آفات الحفرة الفمويّة تعتمد على المَظهرين السريري والنسيجي.

ورد سابقاً التصنيف السريري للآفات الحاوية على سوء التصنّع اعتماداً على تجانسها وشكلها. أما فيما يخص تصنيف سوء التصنّع البشروي الفموي نسيجياً فتصنّف حسب شدّة الإصابة إلى خفيفة ومتوسّطة وشديدة وذلك تبعاً لتعدّد وبروز معايير سوء التصنّع في الصورة النسيجيّة للآفة، وتوصف ملامح سوء التصنّع البشروي في البشرات المطبّقة بأنّها لا نمطيّة خلويّة وفقدان النضج والتطبّق الطبيعيّين، ومع زيادة شدّة هذه الملامح تزداد شدته كما تزداد أرجحية التحوّل الخبيث، ولكن هذا لا ينفي إمكانيّة التحول الخبيث لبعض الآفات التي لاتحوي علامات سوء تصنّع (Pindborg et al., 1997).

لكن سوء التصنّع كمصطلح يعكس طيفاً من التغيّرات وليس مراحل منفردة قابلة للتمييز. (Barnes et al., 2005) لذا فمن المؤسف الاعتراف أنّ نظام التصنيف النسيجي للآفات ماقبل سرطانيّة غير مكتمل حتى الآن ولا يمكن الجزم من خلاله في إمكانيّة التحوّل السرطاني للآفات الفمويّة المختلفة، ولكن في الوقت نفسه لا يمكن الاستغناء عنه خلال التشخيص الذي يعتبر شرطاً أساسياً في التوجّه نحو العلاج ذي الإنذار الأفضل. وبالتالي يكون نظام التصنيف لآفات سوء التصنّع البشرويّة الفمويّة هو نظام للتنبؤ بالتحوّل فقط وليس للبتِّ فيه (Warnakulasuriya et al., 2008).

قُدِّمت الكثير من أنظمة التصنيف لجعل تقييم شدّة سوء التصنّع ذا قيمة بيولوجيّة وذا معايير قياسيّة تغني عن التناقض بين الباحثين والمؤلفين وتجعل التنبّؤ بالاحتماليّة السرطانيّة أكثر دقّة (الجدول ١-٤)

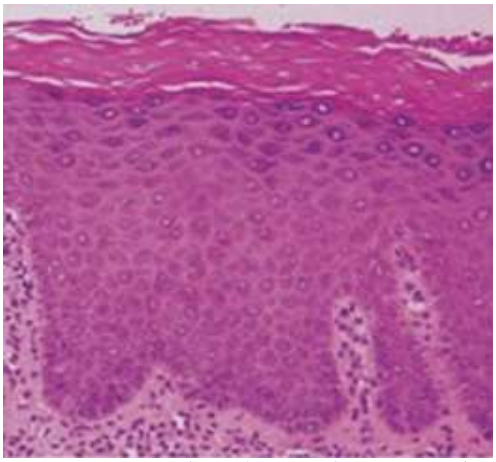
جدول (١-٤) تصنيفات سوء التصنع البشروي المتبعة (Rastogi et al., 2013)

Smith and Pindborg	1971	Neville et al	1995
Mehta et al	1976	Speight PM et al	1996
Bancozy and Csiba	1978	Kuffer and Lombardi	2002
WHO	1978	Ljubljana	2003
Kramer	1980	Brothwell DJ	2003
Burkhardt and Maerkar	1981	Binary System	2005
Shafer	1983	WHO System	2005
Lumermann H et al	1995		

١-١-٥-١ تصنيف منظّمة الصحة العالميّة WHO ٢٠٠٥

وفقاً للنسخة الأخيرة من تصنيف منظّمة الصحة العالمية WHO لأورام الفم والبلعوم الفموي لعام ٢٠٠٥ فإنّ مصطلح سوء التصنّع البشروي هو تشخيص يطلق على وجود علامات نسيجيّة وخلويّة محدّدة وهذا التشخيص يعكس طبيعة الآفة من حيث أرجحية تحولها للخباثة. (Barnes et al., 2005)

١-١-٥-١-١ فرط التقرُّن (التقران) (keratosis or hyperkeratosis)



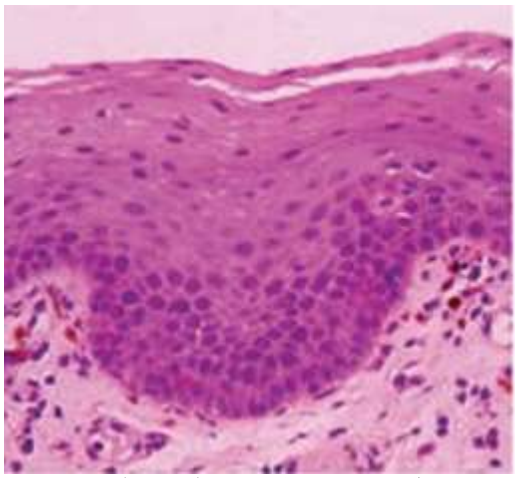
شكل (١-٣) فرط التقرن في الطبقة الشائكة دون علامات سوء التصنع (Warnakulasuriya et al., 2008)

فرط التقرّن هو عبارة عن زيادة في ثخانة الطبقة المتقرّنة أو نظيرة التقرّن في الظهارة، وإنّ معظم آفات سوء التصنّع الظهاري تبدي ميلاً لتشكل نظير القرنين (parakeratinization) والذي بدوره يعكس الشذوذ في نضج الخلايا، وليس مستبعداً في الحفرة الفموية أن تُشاهد نسيجياً (شكل ١-٣) بؤراً من سوء التصنّع تفصل بينها مساحات من الخلايا الطبيعية.(Barnes et al., 2005)

ولكن لا يؤخذ التقرّن المتزايد على محمل الأهميّة في التنبّؤ بإنذار سوء التصنّع، لكنّها تؤخذ بعين الاعتبار في كل التصنيفات المتّبعة لسوء التصنّع من حيث البنية النسيجيّة والبنية الخلويّة.(Krutchkoff et al., 1991)

١-١-٥-١-٢ فرط التصنّع (Hyperplasia)

هو زيادة أعداد الخلايا في الطبقة الشائكة مما يؤدّي إلى حدوث الشواك، أما في طبقة الخلايا القاعديّة أو المجاورة لها يسمّى فرط تصنّع الخلايا القاعديّة. (شكل ١-٤) يكون تطبّق الخلايا بالشكل الطبيعي ولا وجود للا نمطيّة الخلويّة. (Barnes et al., 2005)

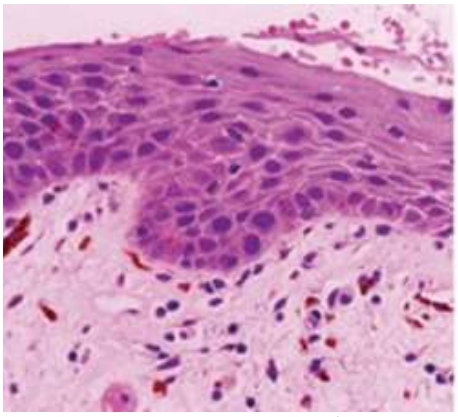


شكل (١-٤) فرط تصنع الخلايا القاعدية
(Warnakulasuriya et al., 2008)

درجات سوء التصنّع البشروي (Grades of dysplasia)

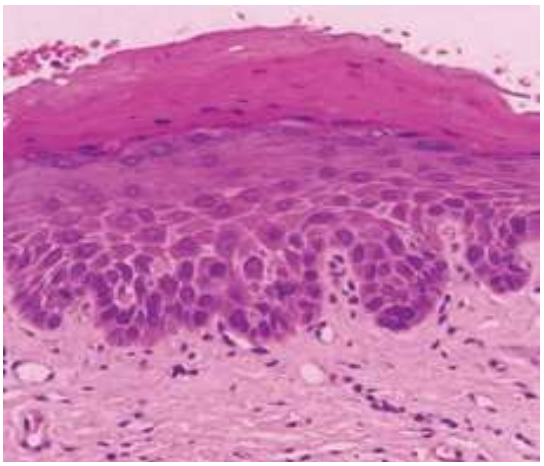
١-١-٥-١-٣ سوء التصنّع البسيط (Mild dysplasia)

تبدو فيه الاضطرابات البنيويّة محدودة بالجزء القاعدي من الظهارة مترافقة مع الحد الأدنى من اللانمطيّة الخلويّة، أي تبدو فيه علائم سوء التصنّع بالحدود الدنيا.(Barnes et al., 2005) حيث يمكن ملاحظة القليل من الشذوذات النوويّة قرب الطبقة القاعديّة في حين باقي الخلايا تكون طبيعيّة ناضجة وتبدي تطبّقاً طبيعيّاً، ويلاحظ وجود بعض الانقسامات قرب الطبقة القاعدية أيضاً ولكنّها غير شاذة(شكل١-٥).(Rastogi et al., 2013)



شكل (١-٥) سوء تصنع بسيط
(Warnakulasuriya et al., 2008)

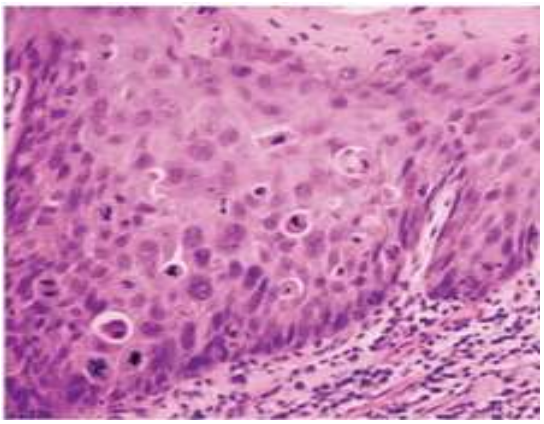
١-١-٥-١-٤ سوء التصنّع المتوسّط (Moderate dysplasia)



شكل (١-٦) سوء تصنع متوسط
(Warnakulasuriya et al., 2008)

يمتدّ فيه الاضطراب البنيوي إلى الثلث المتوسّط من الظهارة وهذا المعيار الأساسي في تميز هذا المستوى من سوء التصنّع، ثمّ تؤخذ اللانمطيّة الخلويّة بعين الاعتبار (Barnes et al., 2005) حيث يشاهد شذوذات نوويّة أكثر تعدّداً ووضوحاً في الثلثين القاعديِّين من الظهارة وتكون الخلايا ناضجة وذات تطبّق طبيعي في الثلث السطحي منها، كما يلاحظ وجود بعض الانقسامات قرب الطبقة القاعديّة، وتقل باتجاه الطبقة المتوسطة، ولكنّها انقسامات غير شاذة (شكل١-٦). (Rastogi et al., 2013)

١-١-٥-١-٥ سوء التصنّع الشديد (Severe dysplasia)

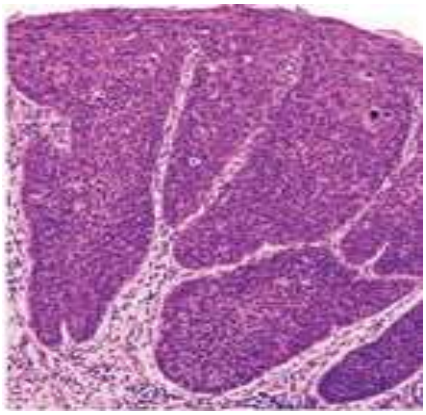


شكل (١-٧) سوء تصنع شديد (Warnakulasuriya
(et al., 2008

تكون فيه الاضطرابات البنيويّة ممتدّة لأكثر من ثلثي الظهارة، مترافقة مع اللانمطّية الخلويّة واضحة (شكل ١-٧). (Barnes et al., 2005) حيث تشاهد الشذوذات النوويّة ممتدّة لتشمل كامل طبقات الظهارة، ويلاحظ زيادة الانقسامات الفتيليّة منها الطبيعيّة ومنها الشاذّة وقد تصل هذه الانقسامات إلى الطبقات السطحيّة. وتعدّد أشكال الخلايا وفقدان القطبيّة في الطبقة القاعديّة، وبالإضافة لذلك يمكن أيضاً مشاهدة الخلايا الناضجة وذات التطبّق الطبيعي في الأجزاء السطحيّة من طبقات الظهارة. (Rastogi et al., 2013)

١-١-٥-١-٦ السرطان البشروي الموضَّع (Carcinoma in situ)

تتشابه الكارسينوما الموضَّعة في المظهر مع سوء التصنّع الظهاري الشديد وبعض المراجع لا تحاول حتى التمييز بين الحالتين. حيث تمتد فيه علائم سوء التصنّع البشروي على كلّ الظهارة من الاضطرابات البنيويّة التي تتجلى بالتطبّق الشاذ، وعدم القدرة على تمييز الطبقات.(Barnes et al., 2005)



شكل (١-٨) السرطان البشروي الموضّع(Warnakulasuriya et al.,)

وتبدي الخلايا علائم الكشم الخلوي كما في السرطان شائك الخلايا لكن دون غزو فهي خلايا بدئية غير متمايزة (شكل ١-٨). (Rastogi et al., 2013)

نظرياً إن السرطان البشروي الموضّع هو بداية التحوّل نحو الخباثة ونهاية طيف العلامات الفارقة لسوء التصنّع (Fischer et al., 2004).

جدول (١-٥) تصنيف WHO لسوء التصنع البشروي الفموي (Barnes et al., 2005)

الدرجة	مستوى التغيّر	التغيّرات الخلويّة	التغيّرات البنيويّة
فرط التقرّن	الطبقة السطحيّة	لا يوجد	زيادة القرنين والخلايا الناضجة الطبيعيّة
فرط التصنّع	الطبقة القاعديّة	لايوجد	ظهارة متسمّكة فرط تقرّن والنضج طبيعي
سوء التصنّع البسيط	الثلث القاعدي	تعدد الأشكال الخلويّة والنووّة زيادة اصطباغ النوى	فرط تصنّع الطبقة القاعديّة
سوء التصنّع المتوسّط	حتى الثلث المتوسّط	تعدد الأشكال الخلويّة والنوويّة تفاوت حجوم النوى والخلايا زيادة اصطباغ النوى زياد الأشكال الفتيليّة غير الطبيعيّة	فقدان القطبيّة اضطراب في نضج الخلايا من الطبقة القاعديّة حتى الشائكة امتدادات إصبعيّة مغزليّة الشكل فرط تصنع الطبقة القاعديّة زيادة كثافة الخلايا
سوء التصنّع الشديد	حتى الثلث السطحي	تعدد الأشكال الخلويّة والنوويّة تفاوت حجوم النوى والخلايا زيادة اصطباغ النوى زياد الأشكال الفتيليّة غير الطبيعيّة زيادة حجوم النوى والخلايا زيادة أعداد وحجوم النويات	اضطرابات النضج من الطبقة القاعدية إلى الشائكة فرط تصنّع الطبقة القاعديّة زيادة كثافة الخلايا سوء تقرّن (تقرّن غير ناضج) لآلئ كيراتينيّة في عمق الظهارة انحلال الأشواك
السرطان الموضّع	كامل سماكة الظهارة	كل التغيّرات ممكنة	تغيّرات من الطبقة القاعديّة إلى السطحيّة فقدان التطبّق

١-١-٥-٢ مساوئ نظام التصنيف WHO

على الرغم من قبول معظم المشرّحين المرضيّين بنظام التصنيف WHO وإبداء ثقتهم به، إلا أنّه وجد الكثير من التفاوت في تقييمهم وتفسّيرهم لوجود كلّ من المعايير التي يبنى عليها نظام WHO ودرجتها وأهميّتها. (Abbey et al., 1995) فقد بيّنت بعض الدراسات الفروق والمتغيّرات العديدة في تقييم وجود سوء التصنّع البشروي الفموي أو غيابه وفي تقدير درجته، وهذه الفروق سواء بين مشرّح مرضي وآخر أو لدى المشرّح المرضي نفسه من مرة لأخرى (Inter- and intra-examiner variability)، قد يعود ذلك لأسباب متنوعة منها الأجهزة والمواد المستخدمة أو الحالة الجسديّة والنفسيّة للمشرّح المرضي.(Fischer et al., 2004) فقد قامت بعض الدراسات بتحرّي التوافق بين المشرّحين المرضين في تقييم درجة سوء التصنّع البشروي الفموي عبر اختبارات إحصائيّة مختلفة، وتوصّلت إلى وجود توافق ضعيف إلى متوسط بينهم، وبيّنت أيضاً أنّ نسبة التوافق لم ترتفع بمعرفة كل منهم بالمعلومات السريريّة. وأنّ وجود الالتهاب في الآفات خفّضت نسبة التوافق على درجتها(Fischer et al., 2004).

حاولت الدراسات مؤخّراً اختبار مصدر الاختلافات التي تنشأ بين المشرّحين المرضيّين فيما يتعلّق بتشخيص معايير سوء التصنّع التي أدرجت في الجدول (١-٤)، وقد وجدت أعلى درجات التوافق في تمييز كل من : - تزايد المغازل الفتيليّة - زيادة حجم النواة - التعدّد الشاذ في أشكال الخلايا. وفي المقابل وجدت أعلى درجات الاختلاف في تمييز كل من : - التطبّق الظهاري الشاذ - فقدان قطبيّة خلايا الطبقة القاعديّة - المغازل الفتيليّة الشاذة - فرط التصبّغ. (Kujan et al., 2007)

١-١-٥-٣ طريقة التصنيف بالنظام الثنائي (binary system)

ونظراً لهذه المشاكل في اتخاذ قرارات جازمة موثوقة بشأن الدرجات المختلفة لسوء التصنّع لجأ بعض الباحين إلى إيجاد تصنيف أخر لا يعتمد على أربع درجات من سوء التصنّع البشروي الفموي وإنّما على درجتين فقط أو بالأحرى وجود سوء التصنّع البشروي أو عدم وجوده، وبطريقة أخرى صنفت الآفات وفق مجموعتين:

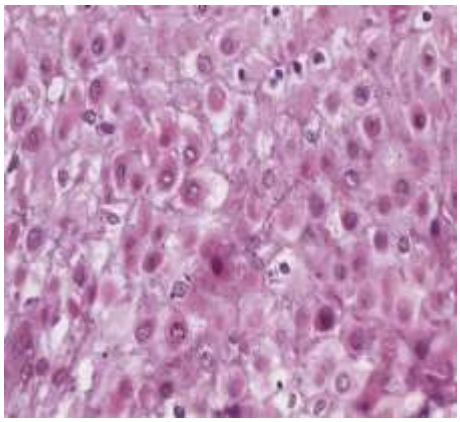
- مجموعة منخفضة الخطورة وهي الآفات بدون سوء تصنّع أو الآفات المشكوك في سوء تصنّعها بين وجوده أو عدمه أو الآفات ذات سوء التصنّع البسيط.

- مجموعة عالية الخطورة وهي الآفات ذات سوء التصنّع المتوسّط أوالشديد أوالسرطان البشروي الموضّع.

بما أن سوء التصنع البسيط يعتبر نقطة الفصل في اتخاذ قرار التدبير الجراحي للآفة، فإن إصابة التقييم الدقيق لدرجة الآفة ليس ذا أهميّة كبيرة – ذلك حسب رأي مناصري النظام الثنائي– وإن تخفيض الخيارات المتاحة للتقييم من أربعة خيارات إلى اثنين يقلل الخلاف بين المشرّحين المرضيّين بشكل كافٍ ويزيد من إمكانيّة التوافق بشكل ملحوظ (Kujan et al., 2006)

١-١-٦ سوء التقرن والتقرن المفرد (Dyskeratosis)

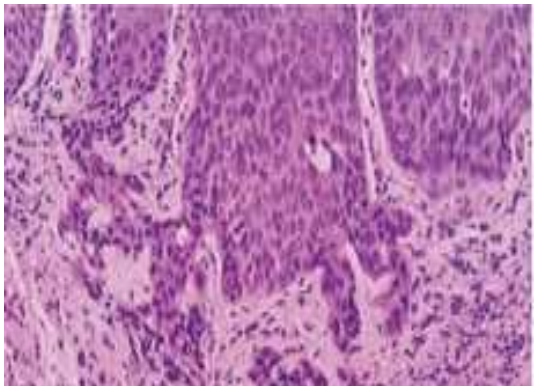
إن أحد أهم المظاهر الخلوية لسوء التصنع هو ظهور خلايا كيراتينية ذات تراكم هيالييني وهذا ما يعكس اضطراب نضج هذه الخلايا، وتسمى بالخلايا ذات التقرن المفرد أو اللآلئ الكيراتينية (الشكل ١-٩) (Keratino Pearls). وتكثر هذه الخلايا في الطبقة السطحية من الظهارة وتقل في الطبقات المتوسطة القاعدية ما يوحي باضطراب التطبق أيضاً (Regezi et al., 2008)



شكل (١-٩) التقرن المفرد أو اللآلئ الكيراتينية (Regezi et al., 2008)

١-١-٧ الغزو النسيجي المبكّر (Early invasion)

المعيار النسيجي الذي يفرّق بين الآفات السرطانيّة والآفات ماقبل السرطانيّة هو الغزو النسجي، ويعني الغزو لغويا التعدّي أو التجاوز غير المشروع. وفي السرطان شائك الخلايا يميز مباشرة امتداد النمو السريع للظهارة الشاذّة خلويا للنسيج المجاور، ولكن رغم ذلك لا تعتبر هذه الدلائل ثابتة وفاصلة في وجود الخباثة. (Speight, 2007)



شكل (١-١٠) الغزو النسيجي المبكر (Warnakulasuriya et al., 2008)

حيث تكون المشكلة الأكثر تواتراً أثناء عمليّة التشخيص هي الحكم في وجود غزو في مراحله المبكرة باتجاه الصفيحة الخاصة (lamina propria) المجاورة للظهارة. لقد تحدثت الكثير من المنشورات عن أشكال متعدّدة للغزو، لكن قرار المشرّح المرضي في وجود الغزو النسيجي يتضمّن حكماً شخصياً.

ولكن يجب الأخذ بعين الإعتبار التقاء الظهارة بالنسيج المجاور أو الصفيحة الخاصة التقاءً شاذاً بواسطة بروزات سيتوبلاسميّة ناتئة (pointed cytoplasmic projections) حيث يوحي ذلك

بالخباثة. فقدان وضوح الطبقة الظهاريّة القاعديّة في منطقة التقاء الظهارة بالصفيحة الخاصّة يعتبر أيضاً من المعايير الهامّة جداً، حيث يمكن مشاهدة خلايا توحي بأنها خلايا شائكة أو حتى مشاهدة خلايا مفردة متقرّنة. (Speight, 2007)

عندما لايستطيع المشرّح المرضي أن يصل إلى قرار فيما يخص حدوث الغزو من عدمه فغالباً ما يكون التواصل مع الطبيب السريري كافياً للبتّ بالتشخيص، خاصّة إذا كانت الموجودات السريرية تسوغ تشخيصها بسرطان بشروي موضّع. ولكن التحدي الأكبر يكمن في تمييز الغزو المبكّر الذي قد يترافق مع دراجات أقل من سوء التصنّع في الظهارة السطحيّة. (Abbey et al., 1998)

لقد تبيّن أنّ التغيّرات الجينيّة والانقساميّة تأخذ الدور الأهم في التحوّل الخبيث للآفات الظهاريّة الفمويّة والتي تنعكس بسلسلة من التغيّرات النسيجيّة والسريريّة التي تمثل سوء التصنع البشروي وهي ما يمكن تحرّيها. على عكس التغيّرات الجينيّة المبكّرة التي لا يمكن لمسها أو اكتشافها مبكّراً، رغم أنّ ذلك يشكّل الأهميّة الكبرى في إنذار تلك الآفات.

حيث تم رصد بعض الخلايا الطافرة بالجين P53 ، في الأورام ذات الطفرات في الجين P53، مرتشحة في بشرة سيّئة التصنّع النسيجي ضمن حواف الورم مما يوحي بفكرة وجود علاقة بين الطفرات في سوء التصنّع النسيجي – أو الآفات ماقبل السرطانيّة – والطفرات في الأورام المتطورة عن هذه الآفات.

وإن التزايد المستمر في عدد المنشورات التي تعالج موضوع التغيّرات البيولوجيّة الجزيئيّة ماقبل السرطانيّة يعد بتأمين قاعدة بيانات كبيرة ومعلومات متعددة للحصول على تنبؤات أكثر دقة حول إنذار الآفات الفموية المختلفة. (Tabor et al., 2004)

١-٢ التحوّل الظّهاري الميزانشيمي
Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)

ظهر مفهوم الانقسام الخلوي منذ ١٥٠ عام مضت كطريقة لتوليد خلايا جديدة وزيادة امتداد النسيج وحجمه. وهذا المفهوم يطرح فكرة أنّ كلّ خلايا جسم الكائن الحي تُشتقُّ من خلايا أم وأنّ مجمل الخلايا تشتقُّ من خلية واحدة هي البيضة الملقّحة. ثمّ يأتي المستوى الأعلى من التعقيد حيث تنتج الخلية أنماطاً خلويّة مختلفة أثناء تطوّرها مايطلق عليه عملية التمايز. ولكن اكتشف مؤخّراً في مراحل معيّنة من التخلُّق الجنيني والتطوّر العضوي وجود خلايا ضمن الظهارات الصرفة تتمتّع بمرونة تمكّنها من الانتقال بين الحالتين الظهاريّة والميزانشيميّة عبر آليّتي التحوّل الظهاري الميزانشيمي (EMT) والتحوّل الميزانشيمي الظهاري (MET).(Lee et al., 2006)

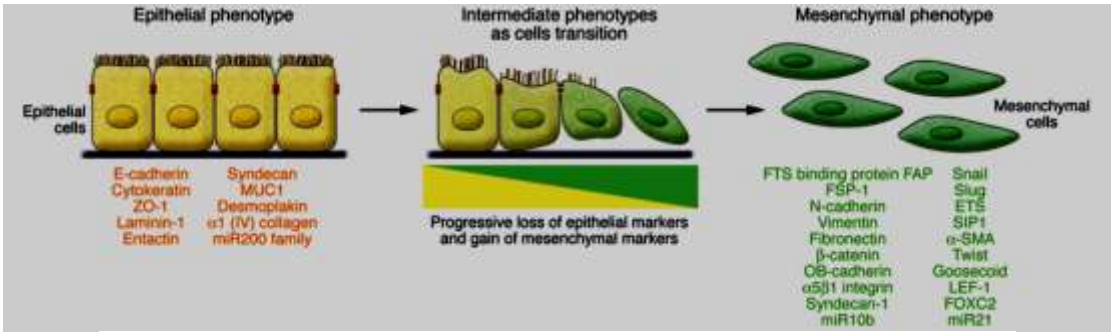
إنّ منشأ الخلايا الميزانشيميّة المشاركة في عمليّات ترميم وإصلاح النسج والتليُّف والتشكّل الجنيني والتطوّر العضوي والعمليّات الإمراضيّة وفي آليّات التنشؤ الورمي والغزو والاستعمار للأورام أخذ حيزاً كبيراً من الأبحاث والدراسات(Zaid, 2014). وتشير الدلائل إلى أنّ التحوّلات الظهاريّة الميزانشيميّة (EMTs) تمثّل أحد أهمّ المصادر لهذه الخلايا. وقد كشف التعرّف على مسالك الإشارة التي تفعّل آليّات (EMT) خلال تلك العمليّات عن رؤى جديدة في التداخلات العلاجيّة الممكنة.(Mani et al., 2008)

١-٢-١ تعريف التحوّل الظهاري الميزانشيمي

التحوّل الظهاري الميزانشيمي هو عمليّة بيولوجيّة تطوّريّة تسمح للخلية الظهاريّة المستقطبة والمتوضّعة على الغشاء القاعدي بالمضي قدماً في تغيّرات كيميائيّة حيويّة تمكّنها من اتخاذ نمط

الخلية الميزانشيميّة والذي يشمل تعزيز القدرة على الهجرة والغزو ومقاومة التموّت الذاتي، وزيادة منتجاتها من مكونات المادة خارج الخلويّة ECM(Steinestel et al., 2014).

ويلاحظ عند إتمام عمليّة EMT انحلال الغشاء القاعدي المجاور للخلية وتشكل خلية ميزانشيميّة يمكنها الهجرة بعيداً عن الطبقة الظهاريّة التي نتجت عنها. وتشترك مجموعة من التفاعلات الجزيئيّة بشكل منتظم وبترتيب معيّن لبدء عمليّة EMT حتى اكتمالها. وتتضمّن هذه التفاعلات عوامل الانتساخ وظهور بروتينات معيّنة على سطح الخلية وإعادة تنظيم بروتينات هيكل الخلية وإنتاج أنزيمات حالَّة للمادة خارج الخلويّة وحدوث تغيّرات في تعبيريّة جزيئات محدّدة من الـ RNA. وتستخدم العوامل المعنيّة بالتحوّل الظهاري الميزانشيمي كواسمات حيويّة لكشف الخلية الآخذة بالتحوّل عبر الـEMT. (Zeisberg and Neilson, 2009) الشكل (١-١١).



شكل (١-١١) التحول الظهاري الميزانشيمي يظهر تحول خلية ظهارية مستقطبة إلى خلية ميزانشيمية متحركة ومفرزة لمواد القالب خارج الخلوي، والواسمات المستخدمة في أبحاث التحول الظهاري الميزانشيمي.(Kalluri and Neilson, 2003)

١-٢-٢ تصنيف التحوّل الظهاري الميزانشيمي

تصنَّف عمليّات الـ EMTs ضمن ثلاثة أصناف حيويّة واضحة، يؤدّي كل صنف منها إلى نتائج وظيفيّة مختلفة. في حين أنّ الإشارات الخلويّة الخاصّة التي تنظم الـ EMT في كلّ صنف من الأصناف الثلاثة بشكل مفرد غير مفهومة بشكل جيّد حتى الآن، وقد نوقش مشروع لتصنيف الـ EMTs وفق ثلاثة أنماط مختلفة اعتماداً على الحالة البيولوجيّة التي تنتج عن كلّ منها وذلك

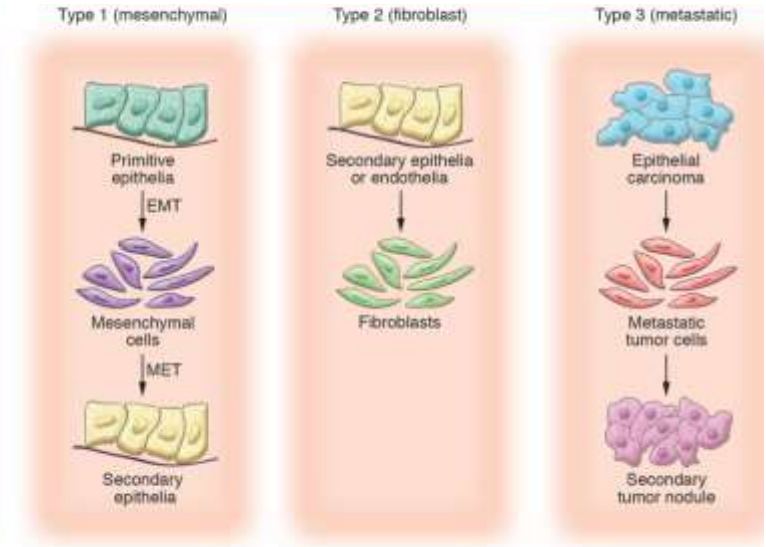
في لقاء حول الـ EMT عقد في بولاندا عام ٢٠٠٧ ثمّ في اجتماع لاحق في آذار ٢٠٠٨في مخابر Cold Spring Harbor. (Kalluri and Weinberg, 2009)

وقد تمّ الاتفاق على أنّ عمليّات الـ EMT المتعلّقة بانغراس البيضة الملقّحة والتخلُّق الجنيني والتطوّر العضوي تولّد أنماطاً خلويّة متعدِّدة تشترك في ملامحها مع الخلايا الميزانشيميّة المعتادة، وأطلق على هذه العمليّات من الـ EMT اسم النمط الأوّل، وهذه الخلايا هي خلايا ميزانشيميّة (ميزانشيم بدئي) تمتلك القدرة على إنجاز عمليّة التحوّل المزانشيمي الظهاري MET ومن المحتمل أن تحدث هذه العمليّة لتوليد نسيج ظهاري(ظهارة ثانويّة). وهذا النمط لا يرتبط بأي آلية إمراضية. الشكل (١-١٢)

واعتبرت عمليات EMT المتعلّقة بشفاء الجروح وتجدّد النسج والتليُّف، النمط الثاني من التحوّل الظهاري الميزانشيمي، وفيه تبدأ عمليّة الـEMT كجزء من الأحداث المتعلّقة بالإصلاح والترميم والتي عادة ما تولّد خلايا مولِّدة لليف (Fibroblasts) وخلايا أخرى بهدف إعادة بناء النسج بعد الأذيّات الالتهابيّة أو الرضيّة، الشكل (١-١٢). وعلى عكس النمط الأول فإنّ النمط الثاني مرتبط بالالتهاب حيث يتوقّف عندما يخّف الالتهاب وذلك في التئام الجروح وتجدّد النسج و في حالة تليُّف الأعضاء فإنّه يستمر كاستجابة للالتهاب الجاري مؤدّيا في النهاية إلى تدمير العضو.

أمّا النمط الثالث من الـEMT فهو يظهر في الخلايا الورميّة الخاضعة مسبقاً لتحوّلات جينيّة (genetic and epigenetic changes). هذه التحوّلات تؤثّر في الجينات الورميّة(oncogenes) والجينات الكابحة للأورام (tumor suppressor genes) وبالتآزر مع آليّة الـEMT المنتظة تؤدّي إلى منتجات تختلف كثيراً عن منتجات الـ EMT في كلا النمطين السابقين. يمكن للخلايا السرطانيّة الظهاريّة الخاضعة لعمليّة تحوّل ظهاري ميزانشيمي من النمط الثالث أن تغزو النسج المجاورة أو تستعمر نسجاً بعيدة، الشكل (١-١٢). ويمكن للخلايا

السرطانيّة أن تجتاز عمليّة الـEMT بمقاييس مختلفة، فبعض الخلايا تحتفظ بسماتها الظهارية في حين تكتسب بعض السمات الميزانشيميّة، بالمقابل يوجد خلايا أخرى تتخلَّى تماماً عن صفاتها الظهاريّة الأصليّة وتصبح خلايا ميزانشيميّة كلّياً. ولاتزال الإشارات التي تحرّض الـ EMTs من النمط الثالث غير واضحة في كثير من السرطانات الظهاريّة. (Kalluri and Weinberg, 2009)



شكل (١-١٢) أنماط التحول الظهاري الميزانشيمي.(Zeisberg and Neilson, 2009)

١-٢-٢-١ النمط الأوّل للتحوّل الظهاري الميزانشيمي (Type 1 EMT)

وهو التحوّل الظهاري الميزانشيمي المرافق لانغراس البويضة الملقّحة والتخلُّق الجنيني وتطوّر الأعضاء، حيث يشاهد الـ EMT أثناء تشكُّل المشيمة و غزو بطانة الرحم وفي تشكّل الوريقة المتوسِّطة الميزانشيميّة (Bischof et al., 2006, Hay, 1995)

وتتدخل آليات EMT في هجرة خلايا العرف العصبي خلال التطوّر الجنيني حيث تقوم الخلايا في الوريقة الخارجيّة العصبيّة بعمليّة الـEMT مما يؤدّي إلى هجرتها. وبالتالي تنفصل عن

الطيّات العصبيّة وتصبح قابلة للحركة وتنتشر في أجزاء مختلفة من الجنين حيث تتمايز بشكل أكبر من باقي الخلايا المحيطة وتعطي أنواعاً مختلفة من الخلايا. (Duband and Thiery, 1982)

وتتدخل الكثير من عمليّات الـEMT والعمليّات المعاكسة MET في تطوّر الأعضاء المختلفة من جسم الجنين كتطور الكلى والقلب والأوعية الدموية وتطوّر الأنابيب التنفسيّة والهضميّة. وهناك بعض التوقّعات حول ظهور الـ EMT في العديد من المراحل اللاحقة من التطوّر الجنيني وتشير إلى استمرار تدخّل تلك الآليّة في التطوّر في مراحله المتأخِّرة. (Lim and Thiery, 2012)

في مراحل متقدّمة من التطوّر يلاحظ حدوث ما يدعى بالتحوّل البطاني الميزانشيمي (the endothelial–mesenchymal transition) وذلك أثناء تعضّي وسادة شغاف القلب (endocardial cushion) و الدسّامات القلبيّة. (Zeisberg et al., 2007)

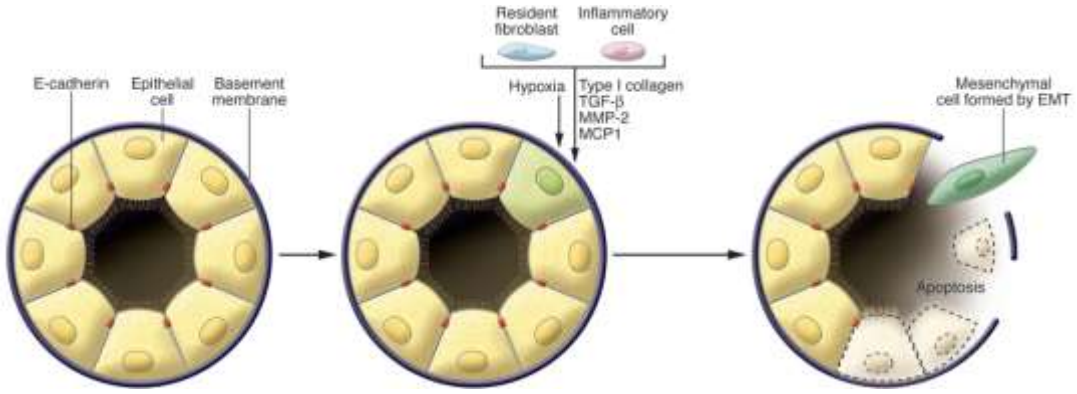
١-٢-٢-٢ النمط الثاني للتحوّل الظهاري الميزانشيمي (Type 2 EMT)

وهو التحوّل الظهاري الميزانشيمي المرافق لعمليّات التجدّد النسيجي وتليُّف الأعضاء، يتوسَّط التليُّف العضوي الذي يحدث في عدد من النسج الظهاريّة كلّاً من الخلايا الالتهابيّة والخلايا المولِّدة لليف التي تطلق إشارات التهابيّة متنوعة كما تحرّر مكوِّنات المادة الخارج خلويّة (ECM) بما فيها الكولاجين واللامينين والإلستين والتيناسين. وقد تمّ العثور على EMTs في عمليّة التليُّف التي تحدث في الكلى، الكبد، الرئة، والأمعاء(Kim et al., 2006).

وفي دراسة أجريت على التحوّل الظهاري الميزانشيمي من النمط الثاني وضمن وجود حالة التهابيّة تبيَّن وجود أربع مجموعات من الخلايا:

- بعض الخلايا تحتفظ بالشكل المميّز للخلية الظهاريّة وواسماتها الجزيئيّة كالسيتوكيراتين والكادهرين (Cytokeratin and E-cadherin)
- وخلايا أخرى تظهر تعبيريّة للـFSP1 و α-SMA والتي هي واسمات ميزانشيميّة.
- وبعض الخلايا تمثّل المراحل المتوسّطة من EMT، حيث لا تزال تظهر تعبيريّة الواسمات الظهاريّة وقد اكتسبت واسمات ميزانشيميّة. ويعتبر سلوك هذه الخلايا أول الدلائل على قدرة الخلية الظهاريّة المضي في اتجاهات متعدِّدة عبر الـ EMT وذلك تحت التأثيرات الالتهابيّة وتوحي لنا بمفهوم التحوّل الظهاري الميزانشيمي الجزئي (partial EMTs) (الشكل١-١٣).
- والجزء الأكبر من الخلايا تتعرض للتموت الذاتي.

في النهاية تهاجر هذه الخلايا من الطبقة الظهاريّة واجدة طريقها عبر الغشاء القاعدي للتتكدّس في النسيج المحيط حيث تفقد كلّ واسماتها الظهاريّة نهائيا وتكتسب شكل الخلية المصورة لليف.(Strutz et al., 1995)

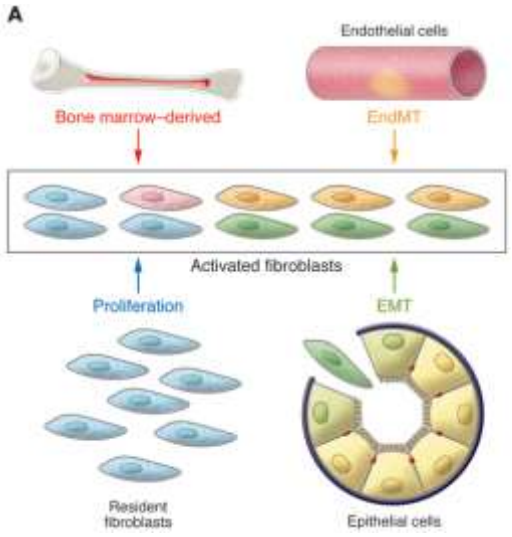


شكل (١-١٣) Type 2 EMT المرافق لتليف الكلية تحت تأثير آلية التهابية، حيث تفقد الخلايا الظهارية قطبيتها والجزء الأكبر منها يتعرض للتموت والجزء المتبقي يكتسب الصفات الميزانشيمية عبر الـ EMT. ونلاحظ فقدان الغشاء القاعدي. (Strutz et al., 1995)

وبرهنت تجارب أجريت مؤخراً على الفئران أنّ الخلايا البطانيّة في الجملة الوعائيّة المجهريّة (microvasculature) يمكن أن تتحوّل إلى خلايا ميزانشيميّة خلال عمليّة التليُّف عبر آليّة تدعى التحوّل البطاني الميزانشيمي (EndMT). وهذه الآليّة المرضيّة تشبه إلى حدٍّ ما آليّة

طبيعية تحدث أثناء التطور، حيث تشاهد عمليّة EndMT في التخلُّق الجنيني أثناء تعضّي شغاف القلب و الدسّامات القلبيّة. وفي حالة تليُّف العضلة القلبية الذي يحدث بعد أذيّة إقفارية للقلب تلعب عمليّة الـ EndMT الدور الأساسي في توفير الخلايا المولِّدة لليف حديثة التشكُّل، وتشترك بهذه العمليّة كلٌّ من خلايا شغاف القلب وبطانة الأوعية الدمويّة المجهريّة. (Zeisberg et al., 2007)

وفي دراسة أجريت على الفئران لمعرفة مصدر الخلايا المصوّرة لليف خلال تليُّف الكلى تبيّن أن:



شكل (١-١٤) مصادر خلايا مصورات الليف أثناء تليف الكلية(Okada et al., 1996)

- ١٢% من الخلايا المصوّرة لليف تشتقّ من نقي العظم
- ٣٠% منها تشتقّ بواسطة EMT من خلايا الأنابيب الكلويّة الظهاريّة
- ٣٥% تشتق عبر EndMT من الخلايا البطانية الموجودة في الكلى
- جزء من مصوّرات الليف يعتقد أن مصدرها تنشيط خلايا مصوّرات الليف الموجودة أصلاً في النسيج
- جزء من مصوّرات الليف يشتق من الخلايا الميزانشيميّة الأخرى كالخلايا العضليّة الملساء للأوعية الدمويّة (perivascular smooth muscle cells) والخلايا المحيطيّة (pericytes) والخلايا الليفيّة (fibrocytes) من الدوران الدموي. (Okada et al., 1996) (الشكل١-١٤).

وهذه العمليّة المرضيّة المعقّدة قد تكون انعكاساً لتطوّر الكلية، حيث إنّ جميع الظهارات في الكلية بما فيها الخلايا الظهاريّة الأنبوبيّة تشتق من الطبقة المتوسّطة (intermediate mesoderm) خلال تطوّر الجهاز البولي التناسلي، حيث يتكثّف النسيج

الميزانشيمي فوق البرعم الحالبي (المشتق من الطبقة الداخليّة endoderm) ويؤدّي لتشكُّل الظهارة الكبيبيّة والأنبوبيّة في الكلية، ويحدث ذلك عبر آليّة التحوّل الميزانشيمي الظهاريMET (Ekblom, 1996). وإن هذه الحالة المميّزة في بيولوجيا الكلية توحي بإمكانيّة احتفاظ الخلايا الظهاريّة الكلويّة ببعض الملامح والانطباعات من أصلها الميزانشيمي مما يجعلها ميّالة لتعود إلى حالتها الميزانشيميّة عبر الـEMT في ظروف معيّنة كردّ فعل تجاه التأثيرات الالتهابيّة مما يؤدّي للتليُّف المرضي في الكلية (Ivanova et al., 2008).

١-٢-٢-٣ النمط الثالث للتحوّل الظهاري الميزانشيمي (Type 3 EMT)

وهو التحوّل الظهاري الميزانشيمي المرافق للغزو والاستعمار السرطاني، خاصّة في السرطانات البشرويّة إن لم يكن المسؤول المباشر عن ذلك، ويعتبر فرط تكاثر الخلايا البشرويّة والتولد الوعائي العلامات المميِّزة للنمو المبكّر والبدئي للسرطان البشروي الأوّلي (Thiery, 2002). ويعتقد أنّ الاكتساب اللاحق لصفة الغزو والتي تظهر بوضوح عبر اجتياز السرطان للغشاء القاعدي هو إنذار ببداية المراحل الأخيرة من عمليّة متعددة المراحل تقود في النهاية لانتثار النقائل السرطانيّة (metastatic dissemination) وبالتالي لعواقب مهدّدة للحياة.

وقد حازت الظوابط الجينيّة والآليّات البيوكيميائيّة التي تتحكّم بعمليّة اكتساب الخلية السرطانيّة لصفة الغزو وانتشارها الجهازي اللاحق على حصّة كبيرة من الأبحاث. وفي كثير من هذه الدراسات قُدِم تفعيل برنامج الـ EMT على أنَّه حجر الأساس في اكتساب الخلية الظهاريّة السرطانيّة صفات الغزو والاستعمار (Thiery, 2002).

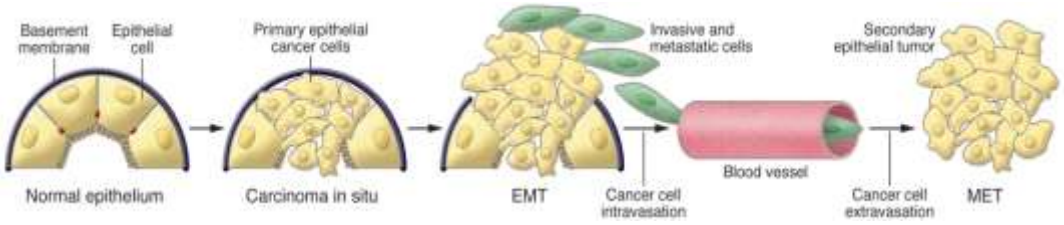
بيَّنت العديد من الدراسات التي أجريت على الفئران وفي تجارب الزراعة الخلويّة أنه يمكن للخلية السرطانيّة البشرويّة الحصول على صفات ميزانشيميّة والتعبير عن ذاتها بواسمات ميزانشيميّة كالـ α-SMA و FSP1 و Vimentin و Desmin (Yang and Weinberg, 2008)

وتبدو هذه الخلايا بشكل نموذجي في منطقة الغزو للأورام الأوّلية وتعتبر أنّها الخلايا التي دخلت بالمراحل الأولى من مراحل الغزو والانتشار الورمي والتي قد تحاول مستقبلاً الدخول إلى الأوعية الدمويّة والانتقال مع الدوران ثمّ الخروج من الأوعية إلى العضو المستهدف وتشكل نقائل صغيرة وفي النهاية إنشاء المستعمرة (نمو مستعمرات صغيرة لتصبح مستعمرات كبيرة مرئيّة بالعين المجرّدة)(Brabletz et al., 2001).

ويظهر هنا جانب من التناقض من خلال مراقبة الخلايا السرطانية المهاجرة المشتقّة عبر الـ EMT والتي تقوم بإنشاء مستعمرات ثانويّة في مناطق بعيدة تشبه إلى حدّ ما خلايا الورم الأوّلي حيث نشأت وذلك من الناحية النسيجيّة، وهذه الخلايا لم تعد تبدي أي صفات ميزانشيمية وتوصف بأنّها خلايا بشرويّة سرطانيّة مستَعمِرة. لذلك تتطلب مقاربة هذا السلوك مع الدور المطروح لـ EMT كمُيَسِّر لانتثار النقائل أفكاراً ومفاهيمَ إضافيّةً حول حتميّة إسقاط الصفات الميزانشيميّة عن الخلايا السرطانيّة البشرويّة المستعمِرة عبر الآليّة العكسيّة الـMET خلال سير التشكّل الورمي الثانوي(Zeisberg et al., 2005).

إنّ ميل الخلايا السرطانيّة المنتشرة للقيام بعمليّة MET يعكس إلى حدّ ما البيئة المجهريّة التي تواجهها الخلايا بعد خروجها من الأوعية الدمويّة واستقرارها في برانشيم العضو البعيد عن منطقة الإصابة الأوّلية، حيث أنّ غياب الإشارات الغريبة التي تعرضّت لها تلك الخلايا في الورم الأولي والتي تعد مسؤولة بشكل مباشر عن بدء الـ EMT، يؤدّي إلى انعكاس الآليّة وعودة هذه الخلايا إلى أصلها الظهاري عبر MET(Jechlinger et al., 2002).

وهذا يدل على أن إحداث الـ EMT يعتبر الآليّة الأساسيّة لتطوّر السرطانات البشرويّة ووصولها لمرحلة النقائل البعيدة، وبمساعدة الآليّة العكسيّة MET يتم استكمال الاستعمار(الشكل١-١٥).



شكل (١-١٥) Type 3 EMT المرافق للغزو والاستعمار السرطاني(Brabletz et al., 2001)

لكن الكثير من مراحل هذه الحادثة بحاجة إلى دراسات وأبحاث أكثر تعمقاً ومزيدٍ من التجارب، ولايزال من غير الواضح حتى الآن علاقة تلك الظاهرة وتلك الآليّات الجزيئيّة بالنقائل التي تحدثها خلايا سرطانيّة غير ظهاريّة.

وتبيّن إحدى الاقتراحات أنّ الطفرة الوراثية الحاصلة في الخلايا السرطانيّة خلال مرحلة التشكّل الورمي البدئي يمنحها استجابة خاصّة للـEMT المفعّل بواسطة الإشارات اللانمطيّة والتي تنشأ في اللحمة التابعة للورم ومن الخلايا الورمية.

تقوم الجينات الكابحة للورم بتحفيز نضج الخلية وهرمها، وقد تبين في دراسات أجريت حديثاً أنّه من الممكن أن يكون للـEMT المتعلّق بالخلايا السرطانية دور في كبح نضج الخلايا الذي تحرّضه تلك المورثات وبالتالي مساعدة هذه الخلايا على الانتشار العدواني لاحقاً (Weinberg, 2008)

١-٢-٣ محرّضات التحوّل الظهاري الميزانشيمي

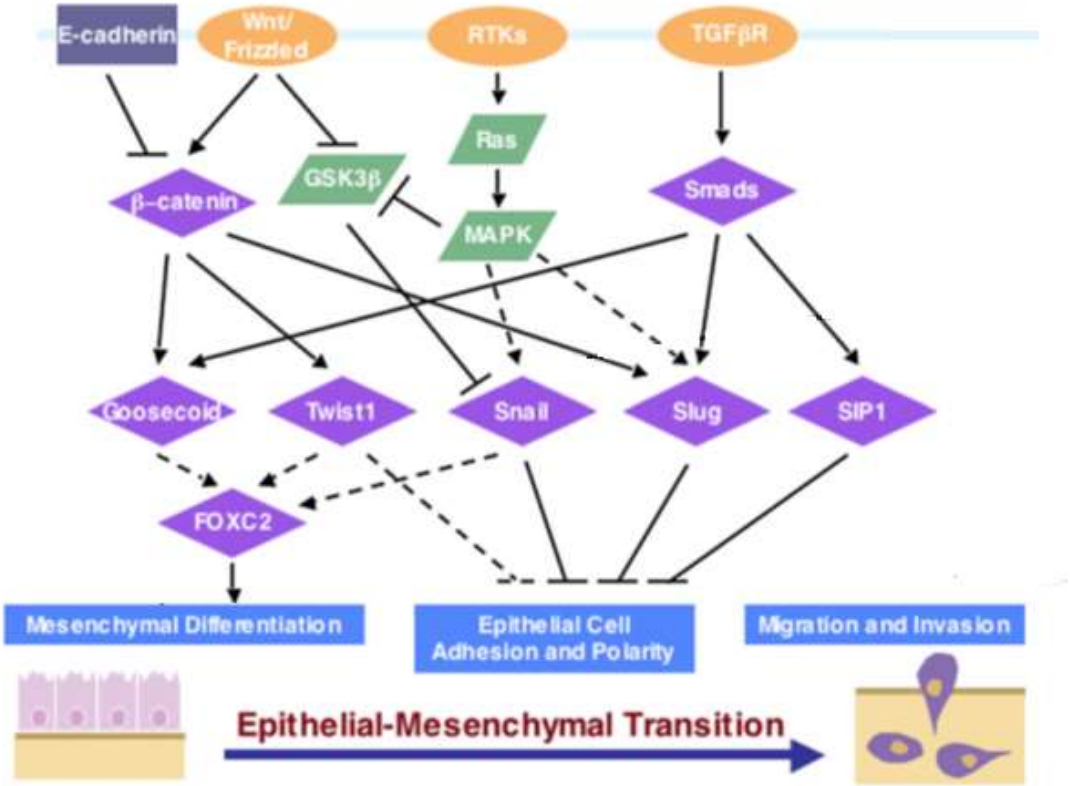
قد تختلف المحرّضات المولّدة لسلسلة التفاعلات المعقدة في التحوّل الظهاري الميزانشيمي من نمط إلى آخر في عدة جوانب سواء في أماكن تأثيرها في الخلية أومستقبلاتها أوالعوامل المساعدة لإتمام عمليّة الـEMT والآليّات المعقدة الحادثة داخل النوى وانتهاءً بنتيجة هذا التحرّيض. وهذه المحرّضات هي عبارة عن عوامل نمو أو بروتينات من القالب خارج الخلوي أو عوامل أخرى كالالتهاب ونقص الأكسجة، وتثير هذه المحرّضات مسالك إشارة (signaling pathways) متنوّعة تؤثّر في مختلف النسج سواء أثناء التطوّر الجنيني أو في الآليّات الإمراضيّة التي تصيب الإنسان أو في الغزو والاستعمار السرطاني. (Gonzalez and Medici, 2014) الجدول(١-٦)

جدول (١-٦) محرضات التحول الظهاري الميزانشيمي (Thiery et al., 2009)

المحرض	Type 1 EMT	Type 2 EMT	Type 3 EMT
FGF	العرف العصبي الانغراس تطور الأطراف	-----	الخلايا الورمية
Wnt	العرف العصبي تطور القلب	-----	الخلايا الورمية التقدم الورمي (الغزو والاستعمار)
TGF-β	تطور القلب التحام قبة الحنك تطور الجلد تطور الخلايا الكبدية	التليف المتوسطي التليف الكلوي	التقدم الورمي (الغزو والاستعمار)
ILEI , IL-6	-----	-----	الخلايا الورمية
HGF	تطور الكبد	-----	الخلايا الورمية
PDGF	-----	-----	سرطان الكبد سرطان الكولون
IGF	الخلايا الظهارية للثدي	-----	-----
PGE(2)/COX2	-----	-----	سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة
Shh	-----	-----	الخلايا الورمية
BMP	العرف العصبي	-----	الخلايا الورمية
VEGF	-----	التليف الصفاقي	الخلايا الورمية
Estrogens	-----	-----	سرطان الثدي
SCF	تكون الميلانين تكون الأعراس تكون الدم	-----	ابيضاض الدم الاورام المتوسطة الخبيثة
Hypoxia/AMF	-----	-----	سرطان المبيض سرطان البنكرياس
EGF	غدة الثدي الانغراس	-----	الخلايا الورمية
Bile acids	-----	-----	الخلايا السرطانية الكبدية الصفراوية
PTH(rP)R	الأديم الباطن الجداري	-----	-----
Nicotine/UV	-----	-----	الخلايا الورمية
Integrins	-----	-----	الخلايا الورمية

يبدو أنّه في كثير من السرطانات البشروية يتمّ تحريض أو التفعيل الوظيفي للـEMT عبر الإشارات المنبعثة من لحمة الورم خاصة HGF وEGF وWnt وTGF-β وRTK وتعدّ بدورها مسؤولة عن تفعيل سلسلة من آليّات الـ EMT المحرَّضة بواسطة عوامل الانتساخ ضمن الخلايا السرطانيّة خاصة Snail و Slug و ZEB1 و Twist و FOXC2. الشكل (١-١٦)

وعندما يتمّ تنشيط أو تفعيل إحدى هذه العوامل تتمكن من إطلاق برنامج الـEMT المعقّد وعادة ما يتمّ التآزر بين عناصر تلك المجموعة من عوامل الانتساخ.(Thiery, 2002)



شكل (١-١٦) مخطط لمسالك الإشارة ومستقبلاتها وعوامل الانتساخ وبروتينات نقل الإشارة والأنزيمات التي تحرض وتنظم آلية التحول الظهاري الميزانشيمي في الخلايا السرطانية
(Yang and Weinberg, 2008)

وإنّ إنجاز برنامج الـEMT ضمن هذه الخلايا يعتمد على:

- مشاركة بروتينات السطح بتلك العمليّة كـ β4 integrins و a5β1 integrin و a5β6 integrin. وإنّ تخرُّب مناطق الاتصال بين الخلايا المتجاورة والالتصاقات المتعلّقة بالـ Integrins والـ E-cadherin يسهّل عمليّة التحوّل EMT
- سلسلة من الإشارات داخل الخلوية بالإضافة لمشاركة مجموعة كبيرة من بروتينات نقل الإشارات كـ Smads و β-catenin
- عوامل الانتساخ ضمن الأنوية و التي تؤثّر في الجينات وتفعّلها وبالتالي يتمّ اصطناع مجموعة جديدة من البروتينات التي بدورها تغيِّر نمط الخلية وتكسبها صفات جديدة.(Tse and Kalluri, 2007)

ويعتبر الـ TGF-β (Transforming Growth Factor) محرضاً مهماً لتكاثر الخلايا الظهاريّة وتشكل الورم البدئي وفي بعض الحالات يكون له دور أساسي في تفاقم الورم واستعماره. وذلك في بعض الدراسات المخبريّة التي تبيِّن قدرة الـTGF-β على إطلاق الـ EMT في بعض الخلايا السرطانيّة(Song, 2007)

هنالك عدة مسالك للإشارة يمكن أن تتوسَّط عمليّة الـ EMT شكل(١-١٧)

إحداها يثار بواسطة الـ TGF-β عبر مستقبل الـALK-5 وتشارك فيه بروتينات Smad والتي تتوسّط تفعيل بعض عوامل الانتساخ كالـ Slug وتؤدي لإطلاق عمليّة الـEMT. والإشارات المحرّضة بواسطة بروتينات الـSmad تمنح الخلية القدرة على الحركة لأنها تؤثر على الالتصاق الخلوي فهي تكبح انتساخ الـ E-Cadherin.(Miyazono, 2000)

وإنّ كبح مستقبلات الـ TGF-β في سرطان الكولون عند البشر وفي كارسينوما الجلد لدى الفئران يعطي إنذاراً أفضل (Cui et al., 1996).

ومسلك Wnt الذي يرتكز على الـ β-catenin والـ TCF ويتآزر مع مسلك الـSmads في إطلاق الـ EMT. (Kim et al., 2002) وسيرد لاحقاً بشكل مفصل.

وأيضاً تفعيل المستقبلات RTK وتسمى مستقبلات التيروزين كيناز إلى مجموعة من الأنزيمات تعمل على تفكيك الـ E-Cadherin، والتي يمكن تحريضها أيضاً ببعض بروتينات الـWnt. (Nelson and Nusse, 2004)

١-٢-٤ واسمات التحوّل الظهاري الميزانشيمي

تُحدِث آليات التحوّل الظهاري الميزانشيمي في أنماطه الثلاث الكثير من التغيّرات في الخلية وعلى مستويات عدّة، منها تغيّرات خلويّة كالتغيّر في غشائها السيتوبلاسمي وارتباطها وغياب صفاتها الظهاريّة واكتسابها لصفات أخرى ميزانشيميّة، ومنها تغيّرات جزيئيّة متعدّدة كالتغيّرات بالبروتينات الغشائيّة ومستقبلات سطح الخلية والأنزيمات وبروتينات السيتوبلازما وعوامل الانتساخ وغيرها(Zeisberg and Neilson, 2009).

وبالاعتماد على أبحاث ودراسات متعدّدة اعتُبرت بعض هذه التغيّرات دليلاً على حدوث الـEMT وهي بحسب: (Zeisberg and Neilson, 2009)

- ظهور تعبيريّة جديدة للـ FSP1 والـ DDR2
- زيادة تعبيريّة كل من HSP47، collagen I، collagen 2، vimentin
- انخفاض تعبيريّة الـ Cadherin
- إعادة تموضع ضمن النواة لكل من CBF-A، β-catenin
- تعبيريّة لعوامل انتساخ جديدة Snail ، Slug ، Twist
- غياب الواسمات الظهاريّة وفقدان السيتوكيراتين والـZO-1
- الشكل المغزلي للخلية وفقدان القطبيّة

- مقاومة التموت الذاتي
- اكتساب القدرة على الهجرة
- استقرار النمط الجديد بعد إزالة المحرّض

ومن خلال هذه التغيّرات تمَّ اللجوء إلى العديد من الواسمات التي يمكن من خلالها تحرّي وجود التحوّل الظهاري الميزانشيمي، إمّا بزيادة تعبيريّة هذه الواسمات أو بانخفاضها خلال التحوّل، وتَرِد بعض هذه الواسمات في الجدول (١-٧) حسب أماكن تواجدها في الخلية

جدول (١-٧) واسمات التحول الظهاري الميزانشيمي الأكثر شيوعاً (Zeisberg and Neilson, 2009)

واسمات تكتسب		واسمات تضعف	
اسم الواسم	نمط التحوّل	اسم الواسم	نمط التحوّل
١: بروتينات سطح الخليّة			
N-cadherin	١,٢	E-cadherin	١,٢,٣
OB-cadherin	٣	ZO-1	١,٢,٣
α5β1 integrin	١,٣		
αVβ6 integrin	١,٣		
Syndecan-1	١,٣		
٢: واسمات الهيكل الخلوي			
β-Catenin	١,٢,٣	Cytokeratin	١,٢,٣
FSP1	١,٢,٣		
α-SMA	٢,٣		
Vimentin	١,٢		
٣: بروتينات القالب خارج الخلوي			
α1(I) collagen	١,٣	α1(IV) collagen	١,٢,٣
α1(III) collagen	١,٣	Laminin 1	١,٢,٣
Fibronectin	١,٢		
Laminin 5	١,٢		
٤: عوامل الانتساخ			
Snail1 (Snail)	١,٢,٣		
Snail2 (Slug)	١,٢,٣		
ZEB1	١,٢,٣		
CBF-A/KAP-1 complex	٢,٣		
Twist	١,٢,٣		
LEF-1	١,٢,٣		

Ets-1	١,٢,٣		
FOXC2	١,٢		
Goosecoid	١,٢		
٥: MicroRNAs			
miR10b	٢	miR-200 family	٢
miR-21	٢,٣		

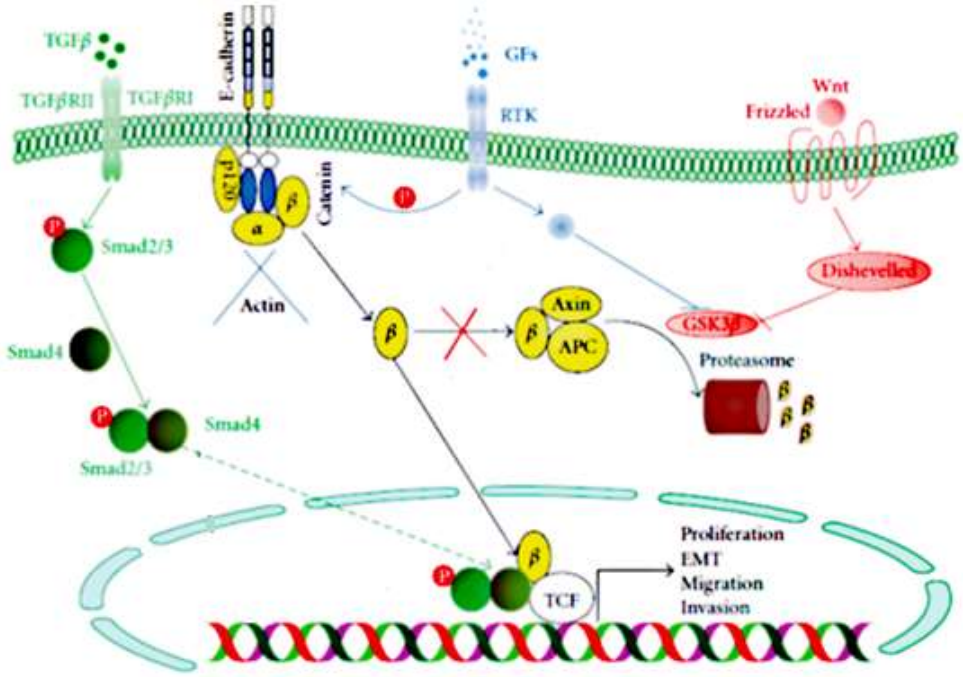
١-٢-٥ واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β-catenin

استخدم الـβ-catenin كواسم للتحوّل الظهاري الميزانشيمي في دراسات عديدة حول التطوّر الجنيني والسرطان والتليّف، فهو واسم يمكنه الكشف عن الأنماط الثلاثة للـEMT (Brabletz et al., 1998)

١-٢-٥-١ وظيفة بروتين الـβ-catenin

بروتين الـβ-catenin هو بروتين سيتوبلازمي يلعب دوراً مضاعفاً فهو بالإضافة لدوره الأساسي في مسلك إشارات Wnt التي تؤدي لعمليّة التحوّل الظهاري الميزانشيمي عُرف بروتين الـβ-catenin بعلاقته بالكادهرينات ضمن نطاق السيتوبلاسما فله دور هام في تنظيم الالتصاق الخلوي فهو يربط الـE-Cadherin إلى خيوط الأكتين في الهيكل الخلوي. الشكل (١-١٦) (Qualtrough et al., 2015)

وله دور هام في التطوّر حيث يؤدي تعطيل الجينات متماثلة اللواقح (Homozygous) للـβ-catenin في الحياة الجنينيّة إلى موت الجنين في اليوم السابع بعد الإلقاح .(Haegel et al., 1995)



شكل (١-١٧) دور الـ β-catenin في التحول الظهاري الميزانشيمي (Kim et al., 2002)

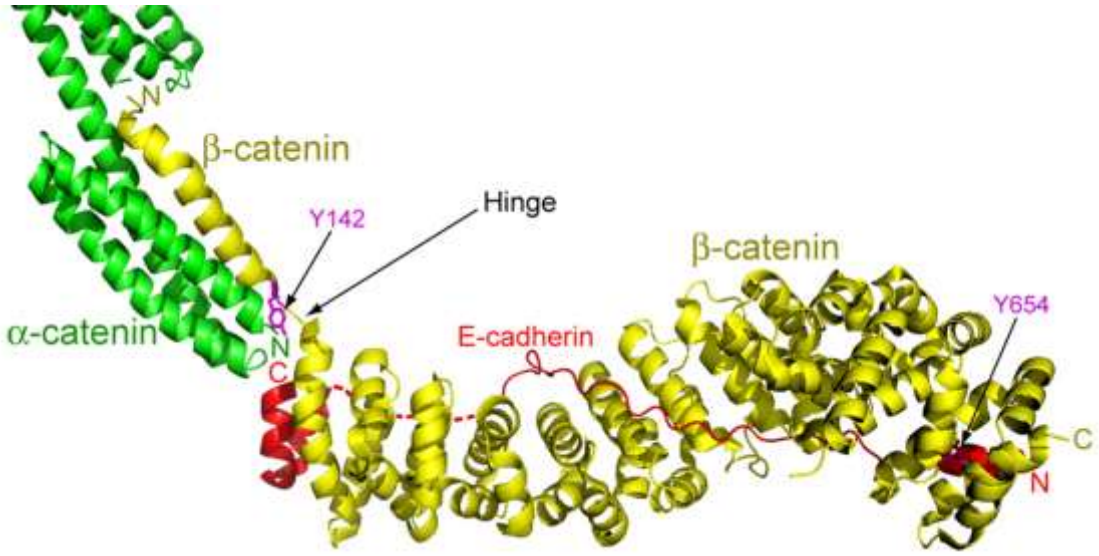
يتميّز واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي الـβ–catenin بـ:

- ✓ ظهور تعبيريّته على مستوى الغشاء السيتوبلاسمي للخلايا الظهاريّة الطبيعيّة.
- ✓ ظهور تعبيريّته في السيتوبلاسما الذي يعكس انفصاله عن الـE–cadherin
- ✓ ظهور تعبيريّته في النواة الذي يعكس دوره كمفعل للانتساخ في الخلايا الآخذة بالتحوّل الظهاري الميزانشيمي.(Zeisberg and Neilson, 2009)

١–٢–٥–٢ بنية بروتين الـβ–catenin

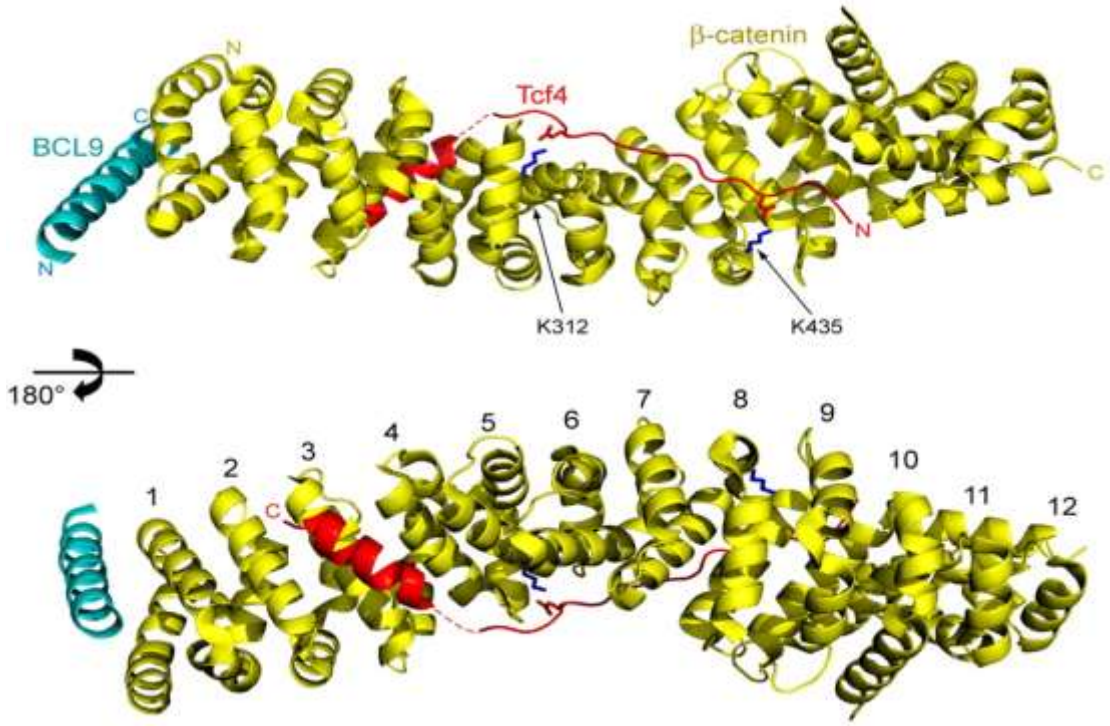
يتألّف الـβ–catenin من سلاسل طويلة من الحموض الأمينيّة تقسم إلى ثلاث مناطق، منطقة نتروجينيّة متطرفة (N–terminal region) تتألّف من ١٣٠ حمض أميني، منطقة متوسّطة (central region) تتألّف من ٥٥٠ حمض أميني، ومنطقة متطرفة كربونية (C–terminal region) تتألّف من ١٠٠ حمض أميني. (Miller and Moon, 1996)

تحتوي المنطقة المتطرفة النتروجينية على ناحية للفسفرة بواسطة الـ GSK–3b، في حين تمتلك المنطقة المتوسّطة الوظيفة المفعلة للنسخ (transactivator function) المطلوبة أثناء تفعيل الجين الهدف. (الشكل ١–١٨) (Behrens et al., 1996)



شكل (١-١٨) مخطط ترسيمي يبين بنية بروتين الـβ-catenin (Behrens et al., 1996)

كما تحتوي على ١٢ متوالية متكررة من ٤٢ حمض أميني تعرف باسم (armadillo repeats) أي مكرّرات المدرّع (وهو حيوان من الثديات). الشكل (١-١٩) وتكون هذه المنطقة (مكرّرات الأرمديلو) شديدة التحلزن وذات شحنة موجبة تشكل الأثلام الأساسية في ارتباط الـβ-catenin ببروتينات متعددة أهمها الكادهرينات والـ APC وعوامل الأنتساخ كالـ TCF/LEF. (Huber et al., 1997)



شكل (١-١٩) البنية الفراغية لمنطقة مكررات armadillo من بروتين الـβ-catenin

(Huber et al., 1997)

١-٣ الالتصاق الخلوي
Cell–Cell Adhesion

تكتسب جميع الأنسجة بنيتها وتماسكها من خلال ارتباط خلاياها مع بعضها البعض ومع القالب خارج الخلوي عبر وصلات متخصّصة تتواجد بوفرة في الظهارات. تُشاهد هذه الوصلات من خلال المجهر الإلكتروني، حيث تبدو الأغشية الخلويّة المتداخلة عالية التخصّص في هذه المواقع.(Shapiro et al., 1995)

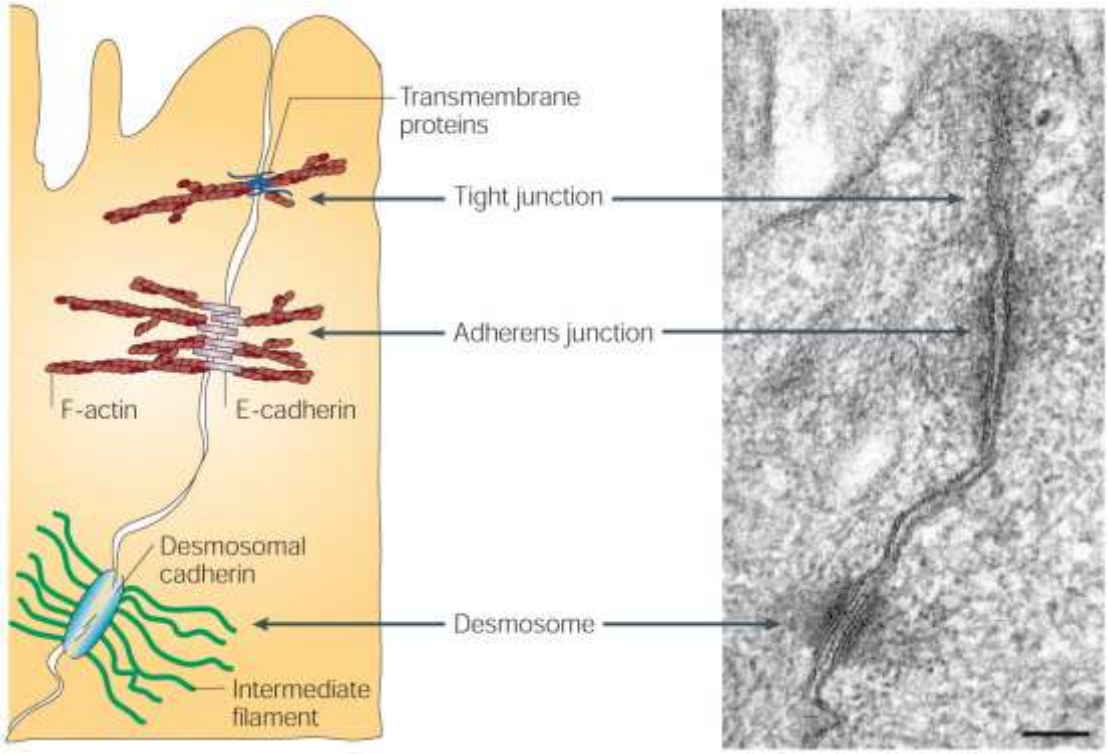
يمكن تصنيف الروابط الخلويّة في ثلاث مجموعات وظيفيّة كما في الجدول (١-٨)

جدول (١-٨) التصنيف الوظيفي للارتباطات الخلوية (Shapiro et al., 1995)	
موصِلات الختم OCCLUDING JUNCTIONS	١. الوصلات المحكمة Tight junction : عند الفقاريات فقط
	٢. الوصلات المحوجَزة septate junctions: عند اللافقاريات غالباً
موصلات الدعم ANCHORING JUNCTIONS	I : تحوي مواقع ارتباط مع خيوط الأكتين
	موصلات خليّة–خليّة : الموصلات الملتصقة adherens junctions
	موصلات خليّة–قالب : الموصلات البؤريّة focal adhesions
	II : تحوي مواقع ارتباط مع الخيوط المتوسّطة
	موصلات خليّة–خليّة : جسيمات الوصل desmosomes
	موصلات خليّة–قالب : انصاف جسيمات الوصل hemidesmosomes
موصلات الإتصال COMMUNICATING JUNCTIONS	الموصلات الفضويّة gap junctions
	المشابك الكيميائيّة chemical synapses
	الرابطات الهيوليّة plasmodesmata: في النباتات فقط

١-٣-١ الموصلات الملتصقة (adherens junctions)

تتوسّط بعض الجزيئات الخلوية الغشائية وتدعى بجزيئات الالتصاق الموصلي (Junctional Adhesion Molecules JAMs) التصاق الخلايا فيما بينها من جهة وبين

الخلايا والمادة خارج الخلوية من جهة أخرى، وتشكل هذه الجزيئات مايدعى بمعقدات الالتصاق الموصلي (Junctional Adhesion Complexes) تتشارك هذه المعقدات في إعطاء النسج قوامها وتماسكها، وهذا النوع من الالتصاق مرتبط بشكل وثيق بالهيكل الخلوي.الشكل(١-٢٠) (Nelson et al., 2013)



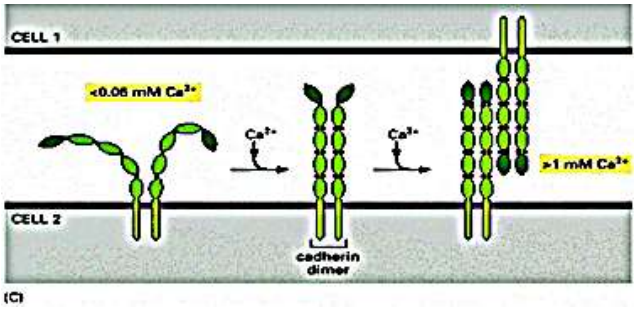
شكل (١-٢٠) الموصلات الملتصقة بالمجهر الإلكتروني، ورسم يبين الكادهرين والأكتين والخيوط المتوسطة.

(Nelson et al., 2013)

تربط موصلات الالتصاق الخلايا المتجاورة عبر تآثرات متجانسة لبروتينات الكادهرين المعتمدة على الكالسيوم، وتقوم بروتينات داخل خلوية أهمها الـβ-catenin والـα-catenin بربطها بخيوط الأكتين المشكّلة للهيكل الخلوي، وتتحكم الخلايا بقوة ارتباط بعضها ببعض عبر تغيير عدد بروتينات الكاهرين الغشائية المتجمعة على أغشيتها.(Shapiro et al., 1995)

١-٣-٢ بروتين الـ E-Cadherin

تضم عائلة الكادهرينات أكثر من ١٠٠ نوع من البروتينات المختلفة. وهي جميعا معتمدة على الكالسيوم، ومن هنا جاء الإسم Ca الكالسيوم و adherin من الالتصاق، إذ يؤمن الكالسيوم الشكل المنتصب من الكادهرين بحيث يتمكن من الارتباط مع الكادهرين المقابل في الخلية المجاورة. بينما يكون الكادهرين بالشكل المنحني غير الفعال في حال وجود تراكيز ضعيفة من الكالسيوم. أكثر الكادهرينات وفرة هي E-Cadherin الذي يتواجد في الخلايا الظهارية.



شكل (١-٢١) أشكال الكادهرين وعلاقته بالكالسيوم (Shashikanth et al., 2015)

يتمز الكادهرين بالتآثر المتجانس حيث أنه لا يرتبط إلا مع النمط نفسه من الكادهرين، وهذه الخاصة تلعب دورا هاما خلال تمايز النسج.(Shashikanth et al., 2015)

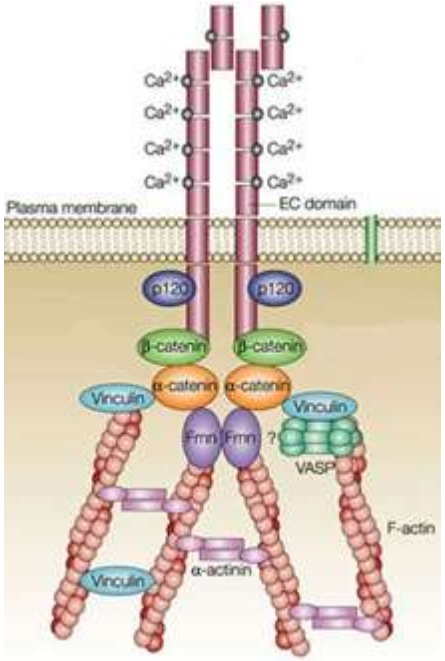
لقد تم إثبات العلاقة بين انخفاض تعبيريّة الـ E-cadherin في الخلايا السرطانيّة ودخولها في عمليّة التحوّل الظهاري الميزانشيمي عبر الكثير من الدراسات، بالإضافة لذلك يتمّ إعادة ترتيب معقّدات التصاق الخلايا الظهاريّة فيما بينها، وعندما يصبح الـE-cadherin شاذّاً بمجمله أو بالجزء السيتوبلازمي منه (بما في ذالك ناحية الارتباط β-catenin) تكون الخلية قد أتمّت عمليّة الـ EMT وتنشأ خلية فاقدة لصفاتها الظهاريّة.(Eger et al., 2000)

إنّ بقاء الـβ-catenin مرتبط بالـE-cadherin في الغشاء السيتوبلازمي وضمن السيتوبلازما ضروري للحفاظ على الصفات الظهاريّة للخلايا، حيث يتعلق ظهور الصفات الميزانشيميّة على انتقال الـβ-catenin إلى النواة وتراكمه فيها بالتزامن مع انخفاض الـE-cadherin وبالتالي فقدان الاتصال مع غشاء الخلايا المجاورة وتصبح الخلية أكثر تأثراً بمحرضات التحول الظهاري الميزانشيمي الأخرى مما يعطيها المزيد من الحريّة حتى تصبح قادرة على الغزو و الهجرة من الظهارة. (Thiery, 2002)

١-٣-٣ التنظيم الخلوي للمعقد Cadherin\ catenin

يقسم معقد الالتصاق الخلوي المعتمد على الكادهرين إلى:

قسم خارج خلوي هو جزيئين من E-Cadherin يتألف كل منهما من خمسة وحدات بروتينية، تتحوي كل منها على موقع أو أكثر لربط شوارد الكالسيوم، وهو يأخذ الشكل المنتصب عند إشباع هذه المواقع والشكل المنحني عند انخفاض مستويات شوارد الكالسيوم. (Nelson et al., 2013)

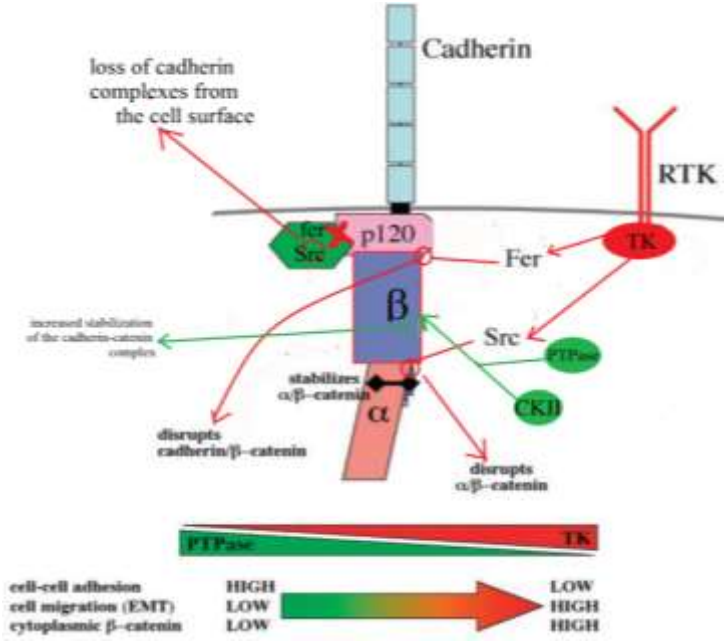


شكل (١-٢٢) معقد E-Cadherin\ β-catenin

(Nelson et al., 2013)

قسم داخل خلوي يتألف من عدة وحدات من الكاتينين وهي الكاتينين P120 وβ-catenin و α-catenin وتعمل هذه الوحدات على ربط معقد الالتصاق بخيوط الأكتين التي تشكل الهيكل الخلوي. شكل (١-٢٢)

ويتم تنظيم المعقّد Cadherin\ catenin بواسطة آلية أنزيمية معقدة أساسها التوازن بين الـtyrosine kinase (TK) والـtyrosine phosphatases (PTPase). حيث يعمل TK على تفكيك معقد الالتصاق الخلوي وبالتالي زيادة مستويات الـβ-catenin في الخلية وزيادة قدرة الخلية الظهارية على الهجرة وإحداث EMT. ويعمل PTPase على تعزيز الارتباط الخلوي وربط مكونات المعقد ببعضها.



شكل (١-٢٣) التنظيم الخلوي للمعقد Cadherin\ catenin (Nelson and Nusse, 2004)

١-٤ محرض التحول الظهاري الميزانشيمي مسلك إشارات Wnt/ β – catenin

لقد تمَ مؤخراً تسليط الضوء على مسلك إشارات تبادل المادة الوراثيّة Wnt (Wnt signaling transduction pathway). فهو منظّم لعمليات الانقسام والتمايز الخلوي وفي مكوناته مجموعة من البروتينات ذات التأثير المباشر على الانتساخ الجيني والالتصاق الخلوي (Nelson and Nusse, 2004)، كما يتدخل في عمليّات تطوريّة مهمّة كتشكّل محور الجسم الجنيني (body axis formation) وتطوّر الجهاز العصبي المركزي، وهو ذو أهميّة في تصحيح الأنماط التي تتّخذها الخلايا الجنينيّة، كما أكدّت عدّة دراسات على دور مسلك إشارات الـ Wnt في عمليّة التشكّل الورمي (Qualtrough et al., 2015).

ويُحدث غياب إشارات Wnt عند الفقاريات مجموعة من الاضطرابات تتفاوت في شدتها من شذوذات جنينية قاتلة وشذوذات في الجهاز العصبي المركزي إلى عيوب في الكليتين والأطراف (Logan and Nusse, 2004).

ويلعب مسلك إشارات Wnt دوراً في تنظيم الالتصاق الخلوي (cell–cell adhesion) في الظهارات المختلفة من خلال تأثيره على انتساخ بروتينات الـ E–cadherin، ويساهم في تطور البراعم الظهارية أثناء تطور أجربة الأشعار في الجلد و يوثّر أيضاً في تشكّل الأسنان وغدة الثدي. (van Genderen et al., 1994) (Jamora et al., 2003)

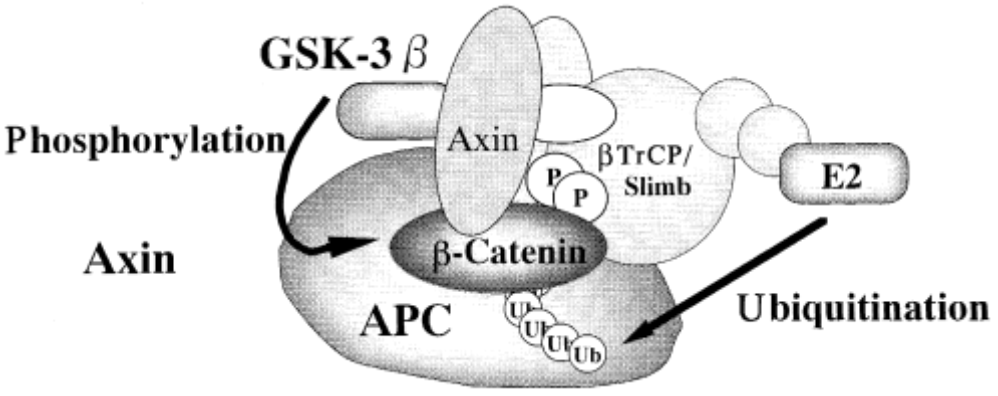
ويرتكز مسلك إشارات Wnt بشكل أساسي على بروتين الـβ–catenin كمفعل لعوامل الانتساخ (Transcription Cofactor) داخل النواة. (Miller and Moon, 1996)

١-٤-١ موجز عن مسلك إشارات Wnt

أجريت سلسلة من الدراسات الجينيّة والبيولوجيّة والبيوجزيئيّة لمعرفة طبيعة مكوّنات مسلك الإشارة Wnt وعلاقة هذه المكوّنات فيما بينها، وقد عُرف حتى الآن ١٩ جيناً يخص الـ Wnt في جينوم الثديّات. تتألف عائلة بروتينات الـ Wnt من أكثر من ١٥ من الليبوبروتينات المفرزة، ومستقبلاتها هي مجموعة من البروتينات الناقلة العابرة للغشاء من بروتينات الـ frizzled و LRP-5/6. (Klezovitch and Vasioukhin, 2015)

- في حالة عدم التفعيل (Wnt Off State):

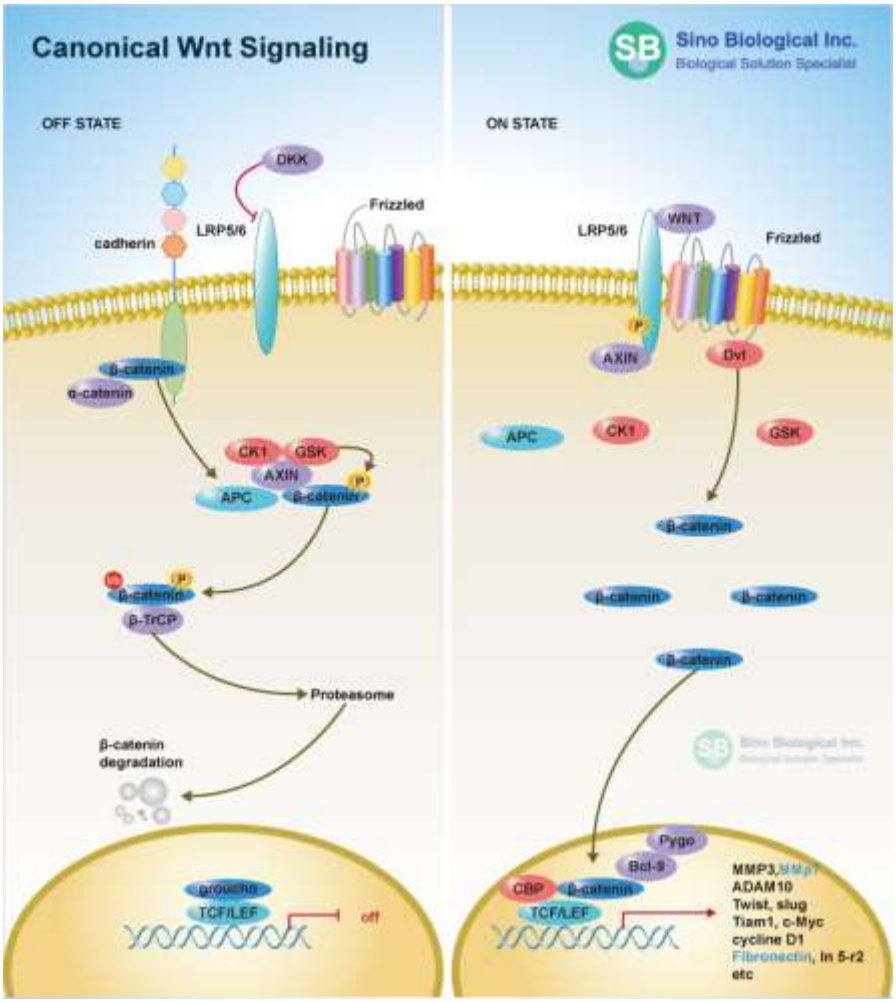
وهي حالة عدم وجود بروتينات الـWnt أو في حالة وجود كوابحها ذات الارتباط المباشر بها أو كوابح مستقبلاتها، عندها يتم دائماً ضبط مستويات الـβ-catenin ضمن سيتوبلازم الخلايا بشكل محكم ودقيق عبر انتساخ الجين الخاص به من جهة و تفكيك الفائض منه من جهة أخرى. حيث تتم آلية التفكيك ضمن السيتوبلازما بواسطة معقد التفكيك والذي يتكون من عدة مكوّنات بروتينية وأنزيمية (الشكل ١-٢٤) حيث يرتبط الـβ-catenin بالـ APC والـ Axin ثم يتم فسفرته بأنزيم الغليكوجين كيناز3β (GSK-3β) بعدها يتم التعرف عليه من قبل βTrCP. ما يمهد تجزئته بواسطة البروتيازومات (Proteasomes) السيتوبلازمية.



شكل (١-٢٤) آلية تفكيك الـβ-catenin (Hart et al., 1998)

- في حالة التفعيل (Wnt On State):

عندما ترتبط بروتينات الـWnt بمستقبلاتها الـ frizzled و LRP-5/6 تنتقل إشاراتها عبر السيتوبلاسما بواسطة البروتين السيتوبلازمي (Dvl) Dishevelled. الذي بدوره يكبح أنزيم الغليكوجين كيناز3β (glycogen synthase kinase-3β)، وهو الأنزيم المسؤول عن فسفرة الـβ-catenin وتفكيكه (Bienz, 2005). وتعمل إشارات Wnt على تحييد الـ Axin من معقد تفكيك الـβ-catenin أيضاً. (Tamai et al., 2004)



شكل (١-٢٥) مسلك الإشارات Wnt/ β - catenin في حالتي التحريض والتثبيط

وبناءً على ذلك فإنّ تفعيل سبيل إشارات Wnt يزيد تراكم الـ β–catenin في السيتوبلازما الذي يعبر إلى النواة ويتكدّس فيها ثمّ يرتبط بعوامل الانتساخ الـ TCF/LEF، ويؤدّي بالنهاية لتنشيط تعبيريّة الجينات الهدف لإشارات Wnt. (الشكل ١–٢٥)(Behrens et al., 1996).

١–٤–٢ تعديلات مسلك إشارات Wnt

١–٤–٢–١ طفرات الـβ–catenin

وجد الـβ–catenin طافراً في عدد من الأورام منها الميلانوما وسرطان البروستات وسرطان الخلايا الكبدية وسرطانات بطانة الرحم (endometrial carcinomas) وسرطان المبيض (ovarian cancer) وغيرها.

ودلّت الدراسات على أن الطفرة تكون على حساب الجزء الأميني الطرفي من الـβ–catenin الحاوي على أربعة مواقع محفّزة للفسفرة بواسطة الـ GSK–3β مما يحول دون تفكيكه، ووجد في بعض أورام الكولون والمستقيم إمكانية تطفّر هذه المواقع، ويشكل الـβ–catenin الطافر في ذلك الموقع معقّداً نشطاً مع عامل الانتساخ TCF مما يؤدي لتزايده وتراكمه في الخلايا رغم وجود الـAPC الطبيعي (Morin, 1999).

واعتماداً على ذلك وجد في الفئران المحوَّرة وراثياً تعبيريّة واضحة لكميات كبيرة من الـβ–catenin النشط، وتظاهر فيها العديد من آفات سوء التصنع البشروي في عدّة بؤر من الأمعاء الدقيقة. كما وجد وونغ وزملاؤه بنى شاذّة متفرعة من الزغابات المعوية في الفئران المحورة وراثياً وتكاثراً متزايداً للخلايا الجذعية دون تأثر الجينات الورمية. (Wong et al., 1998)

وفي دراسة أخرى أيضاً على الفئران المحورة وراثيا وجد تعبيريّة واضحة للـβ-catenin الطافر النشط في بشرة الجلد وتظاهر فيها تخلّق متزايد للجريبات الشعرية وتأهب لحدوث الأورام وآفات سوء التصنع الجلديّة. (Gat et al., 1998)

١-٤-٢-٢ ضبط مستويات الـβ-catenin بواسطة كابح الورم الكولوني APC

يرتبط الـAPC بالـ β-catenin بهدف تهيئته للتفكيك وبالتالي خفض مستوياته في الخلية. لذلك يلاحظ وجود الـ APCs الطافرة في معظم الأورام الكولونيّة المستقيميّة، والمعرف أنّها المسؤولة عن إحداث داء السلائل الكولوني الورمي الغدي العائلي (familial adenomatous polyposis) وهو مرض وراثي ذو مورثة جسميّة قاهرة مما يؤهب لإحداث سلائل (بوليبات) متعدّدة كولونيّة مستقيميّة أو حتى سرطانات (Polakis, 1997).

إنّ ما ينتج عن قراءة المورثة APC هو بروتينها ذو الكتلة 300 kDa والذي يوجد في كل من النواة والسيتوبلاسما (Senda et al., 1996). وحدوث الطفرة في بروتين الـAPC يؤدي في معظم الحالات لتشكّل منطقة مشوهة وذلك في الناحية ذات الأهمّيّة الكبرى في تفكيك الـβ-catenin. مما يؤدّي لتعطيل هذه الوظيفة وتزايد وتراكم الـβ-catenin وتشكّل معقّدات بنيويّة نشطة مع عامل الانتساخ TCF والتي بدورها تفعّل الجين الهدف للـWnt. (Rubinfeld et al., 1997)

١-٤-٢-٣ ضبط مستويات الـβ-catenin بواسطة الـAxin

تبين مؤخراً وجود دور هام لبروتين الـAxin في تفكيك الـβ-catenin، وتدل بعض الدراسات على أن الـAxin يسهل عملية ارتباط الـβ-catenin بالـ GSK-3b ويطلق عملية الفسفرة. وعند حدوث طفرة في جين الـAxin في الأجنة يؤدي إلى التشكل المعيب للمحور الجنيني. (Hart et al., 1998)

حيث يمكن أن يكون العيب الناتج عن الطفرة إمّا في موقع ارتباط الـ GSK-3b، أو في موقع ارتباط الـβ-catenin أو في الموقع الكربوني الطرفي من الـAxin ، في جميع الحالات يؤدي الـ Axin الطافر لتراكم الـβ-catenin في الخلية. (Hart et al., 1998)

يتمّ فسفرة الـAxin بواسطة الـ GSK-3b أيضاً، ويرتبط الـAxin المفسفر بالـβ-catenin بشكل أكبر من غير المفسفر ويكون أكثر ثباتاً واستقراراً، وتعمل إشارات الـ Wnt على الحدّ من هذه الفسفرة لذا يكون تأثيرها هو الإقلال من تفكيك الـ β-catenin وزيادة مستوياته. ويعتقد أنّ الآلية تتمّ عبر تأثير البروتين الناقل للإشارة Dishevelled (Dvl) يعمل على كبح عمليّة الفسفرة للـ Axin أيضاً (Yamamoto et al., 1999).

١-٤-٣ المعقّد β-catenin-TCF/LEF داخل النواة

يستقر الـβ-catenin من خلال سبيل إشارات Wnt عبر ارتباطه بعائلة عوامل الانتساخ الـTCF/LEF مما يفعل الجين الهدف لمسلك الإشارة Wnt. يعرف كل من عامل الخلايا التائية (T-cell factor (TCF)) وعامل الربط المعزّز للمفاويات (lymphoid enhancer factor) (LEF) أنّها عوامل انتساخ بنيويّة ترتبط بحلزون الـ DNA في منطقة الجين الهدف، ولكن تعتبر عوامل الانتساخ هذه ضعيفة جداً بغياب الـβ-catenin لذلك تسعى دائماً لتشكيل المعقد β-catenin-TCF/LEF لتصبح أكثر فاعليّة وتأثيراً في عمليّة نسخ الجين الهدف لمسلك الإشارة Wnt. (Qualtrough et al., 2015)

واكتشف أنّه في غياب الـβ-catenin يرتبط الـTCF بعائلة من البروتينات تدعى الـ Groucho (Groucho family of proteins) تعمل على كبح عمليّة انتساخ الجين الهدف للـWnt وهذا يفسر المشاهدات المسجّلة مسبقاً، حيث يلاحظ أنّ الـTCF إمّا أن يكون منشطاً أو كابحاً لعمليّة الانتساخ وذلك تبعاً لحالة مسلك الإشارة Wnt أو ربما اعتماداً على كمّيات الـ-β

catenin المتوفرة، وبصيغة أخرى ينظّم عمل الـ TCF بواسطة التوازن بين بروتينات الـGroucho والـβ-catenin. (Cavallo et al., 1998)

يؤثر معقد الانتساخ β-catenin-TCF في الخلايا الظهارية بجوانب متعددة منها:

- كبح المورثة المسؤولة عن انتساخ الكادهرين الظهاري E-Cadherin، حيث يعمل β-catenin-TCF على تفعيل بروتينات الـ Slug و الـSnail وزيادة تعبيريتها وهذه البروتينات تعتبر كوابح لتلك المورثة، وبالتالي يتم خفض نسبة الـE-Cadherin على سطح الخلايا وتقويض الالتصاق الخلوي وزيادة قدرة الخلية على الهجرة. (Nelson and Nusse, 2004)
- زيادة تعبيرية ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) وهي أنزيمات تقوم بتحطيم العديد من البروتينات بما فيها الإنتغرينات المتوضعة على سطح الخلية وبالنظر إلى الدور المهم للإنتغرينات في الارتباط الخلوي بإن نقصها يؤدي إلى خفض هذا الارتباط. (Nelson and Nusse, 2004)
- زيادة تعبيرية MMP (Matrix Metalloproteinase) وهي أنزيمات تقوم بتفكيك بروتينات المادة خارج الخلوية. (Nelson and Nusse, 2004)
- زيادة تعبيرية الـ c-MYC وهي عوامل انتساخ تتدخل بدورة حياة الخلية، وزيادة الانقسام والتكاثر الخلوي (Hyperprolifration)، وتزيد النشاط الانتساخي للجينات. (He et al., 1998) كما أنّها تنقص مقاومة الخلية لاستقبال الـTGFβ.
- زيادة تعبيرية Cyclin D1 وهو المنظم الأساسي لانتقال الخلية إلى مرحلة التكاثر في الدورة الخلوية.(Sherr, 1996)

الباب الثاني : مَواد البَحث وطَرائِقه

Materials and Methods

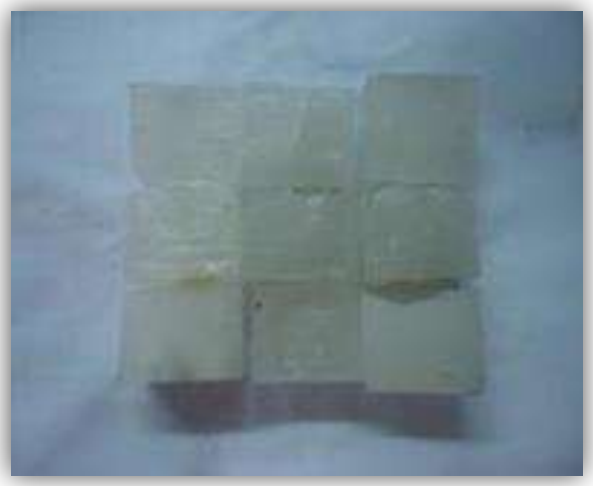
٢-١ تصميم الدراسة

دراسة نسيجية كيميامناعية راجعة استعاديّة أجريت اعتماداً على أرشيف قسم النسج والتشريح المرضي الفموي في كليّة طبّ الأسنان بجامعة دمشق.

٢-٢ عيّنة البحث

٢-٢-١ حجم العيّنة

حُدِّدَ حجم العيّنة بالاستناد إلى دراسات مُشابهة و دراسة مبدئيّة للعيّنة ، و تمَّ حساب حجم العيّنة عند حجم الخطأ من النوع الأول $\alpha=0.05$ ، و قوة الاختبار $P=0.95$ ، و ذلك باستخدام برنامج G*power.



شكل (٢-١) الخزعات المحفوظة بشمع البرافين

يبلغ حجم العيّنة ٤٥ خزعة نسيجيّة مثبّتة بالفورمالين ومدمجة بشمع البارافين ومحفوظة في أرشيف قسم النسج والتشريح المرضي الفموي في كليّة طب الأسنان جامعة دمشق بين عامي ٢٠٠٨ و٢٠١٣. وبعد الحصول على الموافقة القانونيّة والأخلاقيّة للدراسة تمّ أخذ العيّنة اعتماداً على التشخيص المسبق لها على أنّها خزعات من آفات حاوية على سوء التصنّع البشروي الفموي بدرجات مختلفة.

وقد تمّ الحصول على مقاطع نسيجيّة بثخانة ٤ ميكرونات من كلّ خزعة من خزعات العيّنة بقطعها بواسطة المبشرة النسيجيّة بهدف الحصول على محضّرات نسيجيّة قابلة للفحص

المجهري. حيث تمّ تحضير محضّرين نسيجيّين لكل خزعة أحدهما للتلوين التقليدي بالهيماتوكسيلين وأيوزين والآخر للتلوين بالملون الكيميامناعي النسيجي β-catenin.

٢-٢-٢ العيّنة الشاهدة

شكل (٢-٢) العيّنة الشاهدة محفوظة بالفورمالين

تتكون العيّنة الشاهدة من ١٥ خزعة نسيجيّة من نسج فمويّة سليمة أُخِذَت حديثاً من المُخاطيّة المغطيّة للأرحاء الثالثِة خلال قلع الأرحاء المُنطمِرة، تمّ الحصول عليها عن طريق مشفى جراحة الفم والفكين، وقسم النسج حول السنيّة في كليّة طب الأسنان – جامعة دمشق بعد الحصول على موافقة المريض والموافقات القانونيّة والأخلاقيّة. وقد ثُبّتت خزعات العيّنة الشاهدة بالفورمالين ١٠% بهدف حفظها ونقلها إلى مكان إجراء الدراسة. وقمنا خلال العمل باستراجع للمستضدات لتصبح جميع الخزعات قابلة لاستقبال التملون المناعي.

٢-٣ المواد

٢-٣-١ مواد البحث

١- الفورمالين ١٠%

٢- الكحول والكزيلول

٣- شمع البرافين

٤- ملوّنات الهيماتوكسيلين والأيوزين التقليديّة

شكل (٢-٤) الكحول

شكل (٢-٣) الكزيلول

شكل (٢-٥) الملوّنات التقليدية الهيماتوكسيلين والأيوزين

٥- بلسم كندا

٦- الشرائح الزجاجيّة

٧- السواتر

شكل (٢-٦) الشرائح الزجاجية والسواتر

٨- مواد الملوّنات المناعيّة:

- Primary Antibody ضد فأري وحيد النسيلة لـβ-catenin من شركة Bio SB الأمريكية.
- مجموعة التلوين المناعي المفرد من شركة Bio SB الأمريكية وتحوي:
  - Poly Detector Peroxidase Blocker
  - Poly Detector DAB Buffer
  - Poly Detector HRP Label
  - Poly Detector DAB Chromogen
- محلول استرجاع المستضد Antigen Retrieval Solution
- المحلول الدارئ IHC Wash Buffer
- الشرائح الزجاجية الخاصَّة بالتلوين المناعي الكيميانسيجي

شكل (٢-٧) ضد وحيد النسيلة لـ β-catenin

شكل (٢-٨) ظروف المحلول الدارئ منDako

شكل (٢-٩) محلول استرجاع المستضد Dako

شكل (٢-١٠) الكيت المناعي المفرد من Bio-SB

شكل (٢-١١) Peroxidase Blocker

شكل (٢-١٢) Poly Detector DAB Buffer

شكل (٢-١٣) HRP Label

شكل (٢-١٤) DAB Chromogen

شكل (٢-١٥) الشرائح الزجاجية الخاصَّة بالتلوين المناعي الكيميانسيجي

٢-٣-٢ الأجهزة المستخدمة

١- المِبشَرة النسيجيّة (microtome) نوع leica -ألمانيا

٢- المِحمّ المائي

٣- سخّان نوع Leica- ألمانيا

٤- المايكرويف

٥- قلم التحديد من شركة Dako

٦- الممص Pipette

٧- المجهر الضوئي نوع Nikon OLYMPUS-CX21 – اليابان

شكل (٢-١٦) المبشَرة النسيجيّة

شكل (٢-١٧) المحمّ المائي

شكل (٢-١٨) السخّان

شكل (٢-١٩) المايكروويف

شكل (٢-٢٠) المجهر الضوئي

شكل (٢-٢١) الممص

شكل (٢-٢٢) قلم التحديد

٢-٤ الطرائق

٢-٤-١ طريقة تحضير الخزعات النسيجيّة الشاهدة

يمرّ تحضير العيّنة الشاهدة بالمراحل نفسها التي مرّت بها الخزعات النسيجيّة الأخرى سابقاً حتى وصلت إلى وضعها الحالي أي مدمجة بشمع البارافين وجاهزة للتقطيع النسيجي ليتمّ فيما بعد إجراء التلوينين التقليدي والمناعي. وهذه المراحل هي:

١- مرحلة التثبيت:

بعد استئصال العيّنة الشاهدة تمّ وضعها في الفورمول الممدد ١٠% لمدة ٢٤ ساعة وذلك لتثبيت العيّنة ومنع التحلّل للأنسجة.

٢- مرحلة التجفيف:

هدفها إزالة الماء من العيّنة واستخدم لذلك ثلاثة حمّامات من الكحول يزداد تركيزها تدريجياً:

- الحمّام الأوّل ذو تركيز ٧٠% وتوضع العيّنة فيه لمدة ساعة.
- الحمّام الثاني ذو تركيز ٨٥% كذلك لمدة ساعة.
- الحمّام الثالث ويحوي الكحول المطلق وتوضع فيه العيّنة لمدة ساعة.

٣- مرحلة التشفيف:

هي مرحلة هامّة لطرد الكحول من العيّنة وجعلها شافّة وقد استخدم لذلك ثلاثة حمّامات من الكزيلول وضعت العيّنة في كل منها لمدّة ساعة

٤ – مرحلة إدماج شمع البارافين:

حيث توضع العيّنة في حمّام من البارافين المنصهر بدرجة حرارة ٥٥ درجة مئويّة لمدّة (١ –٢) ساعة ثمّ توضع ضمن قالب ويُصبّ شمع البارافين فوقها، بحيث نتأكّد من توجيه العيّنة بشكل مناسب، يترك القالب ليبرد ويتصلّب وعندها يصبح جاهزاً للقطع حيث تحفظ القوالب في البرّاد. بذلك تكون العيّنات جميعها (الشاهدة والمرضيّة) ضمن قوالب شمعيّة وجاهزة لإجراء التلوين (الهيماتوكسيلين وأيوزين) والتلوين المناعي.

٢-٤-٢ التلوين التقليدي

٢-٤-٢-١ طريقة التلوين بالهيماتوكسيلين وأيوزين

١. يتم الحصول على المقاطع النسيجيّة من الخزعات المثبتة بالفورمالين ومدمجة بالبارافين عبر تثبيت المكعّب الشمعي على المِبشرة النسيجيّة Microtome وتحديد ثخانة المقطع بـ ٤ ميكرونات.
٢. تعطي المبشرة النسيجيّة مقاطع نسيجيّة بارافينيّة متلاحقة ومجعّدة لذلك تُفرش هذه المقاطع البارافينيّة في مِحم مائي يحتوي ماءً مقطراً بدرجة حرارة حوالي ٤٠ – ٤٥ درجة مئويّة لإزالة التجاعيد والفصل بين المقاطع المتصلة ثم تحميلها على الشرائح الزجاجيّة.
٣. توضع الشرائح الزجاجيّة على السخان بدرجة حرارة ٤٥ – ٥٠ درجة مئويّة لتجفيفها من الماء لمدّة ١٠ دقائق.

٤. يتمّ تمرير الشرائح في ٣ حمّامات من الكزيلول، حوالي ١٥ دقيقة لكلّ حمّام، لإزالة شمع البارافين.

٥. تمرّر الشرائح في الكحول المطلق ثمّ كحول بنسبة ٩٥% يليها ٧٠% ثمّ ٥٠% لمدّة ١٥ دقيقة لكل حمّام لتتم إزالة الكزيلول.

٦. تُغسل الشرائح بالماء وتُوضع في الهيماتوكسيلين لدقيقتين ثمّ تغسل بالماء عدّة مرّات لإزالة الهيماتوكسيلين الزائد.

٧. تُوضع بعد ذلك في الأيوزين لمدّة تتراوح بين دقيقة ودقيقة ونصف وتغسل بالماء لإزالة الأيوزين الزائد.

٨. توضع في حمّام كحول ٧٠% لمدة دقيقة ثمّ ٩٥% لمدّة دقيقة ثمّ في حمّامين من الكحول المطلق كل حمّام دقيقة واحدة ليتم طرد الماء من النسيج.

٩. تجفّف الشرائح وتوضع في الكزيلول لمرّتين متتاليتين لمدة ٣ دقائق في كل مرّة لطرد الكحول.

١٠. أخيرا تُستَر السلايدات الزجاجيّة بالسواتر باستخدام بلسم كندا.

٢-٤-٢-٢ التقييم النسيجي للعينة الشاهدة الملونة H&E

باستخدام المجهر الضوئي تمّ فحص شرائح العيّنة الشاهدة بهدف التأكد من سلامتها وخلوها من أيّ علامات التهابيّة أو فرط تقرن أو فرط تصنّع أو سوء تصنّع.

بالإضافة إلى التأكد من جودة الملونات هيماتوكسلين أيوزين المستخدمة وجودة الأجهزة المستخدمة وسلامة الطريقة التي اتُبعت في تلوين الشرائح.

٢-٤-٢-٣ طريقة التقييم النسيجي للشرائح الملونة H&E

باستخدام المجهر الضوئي تمّ فحص الشرائح الملونة بالهيماتوكسلين وأيوزين بهدف تحديد درجة سوء التصنّع البشروي في كلّ خزعة نسيجيّة من العيّنة.

اختيرت الساحات الثلاثة الممثلة لأشدّ حالات سوء التصنّع في المحضّر الواحد، ووصفت التغيّرات النسيجيّة الحاصلة في كلّ محضّر وصنِّفت إلى تغيّرات بنيويّة وتغيّرات خلوية وذلك حسب الجدول (١-٣).

واعتماداً على تلك التغيّرات تمّ تصنيف الخزعات النسيجيّة في العيّنة إلى مجموعات تبعاً لدرجة سوء التصنّع البشروي الفموي الموجود فيها وذلك حسب نظام تصنيف منظّمة الصحة العالميّة ٢٠٠٥(Barnes et al., 2005) وفق الجدول (٢-١) التالي والمجتزأ من الجدول (١-٥)

جدول (٢-١) تصنيف سوء التصنع البشروي الفموي المعتمد في الدراسة

الدرجة	مستوى التغير	التغيرات الخلوية	التغيرات البنيوية
سوء التصنع البسيط	الثلث القاعدي	تعدد الأشكال الخلوية والنووية زيادة اصطباغ النوى	فرط تصنع الطبقة القاعدية
سوء التصنع المتوسط	حتى الثلث المتوسط	تعدد الأشكال الخلوية والنووية تفاوت حجوم النوى والخلايا زيادة اصطباغ النوى زياد الأشكال الفتيلية غير الطبيعية	فقدان القطبية اضطراب في نضج الخلايا من الطبقة القاعدية حتى الشائكة امتدادات اصبعية مغزلية الشكل فرط تصنع الطبقة القاعدية زيادة كثافة الخلايا
سوء التصنع الشديد	حتى الثلث السطحي	تعدد الأشكال الخلوية والنووية تفاوت حجوم النوى والخلايا زيادة اصطباغ النوى زياد الأشكال الفتيلية غير الطبيعية زيادة حجوم النوى والخلايا زيادة أعداد وحجوم النويات	اضطرابات النضج من الطبقة القاعدية إلى الشائكة فرط تصنع الطبقة القاعدية زيادة كثافة الخلايا سوء تقرن (تقرن غير ناضج) لآلئ كيراتينية في عمق الظهارة انحلال الأشواك

وبالتالي صنفت جميع الخزعات النسيجيّة في العيّنة إلى ثلاث مجموعات:

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

شكل (٢-٢٣) بعض الشرائح الملونة بالـ H&E

٢-٤-٣ التلوين الكيميائي النسيجي المناعي (IHC)

٢-٤-٣-١ طريقة التلوين بالملوّن β-Catenin

تم إجراء التلوين IHC حسب البروتوكول الموصى باتباعه من قبل شركة Bio SB:

١. يتم الحصول على المقاطع النسيجيّة من الخزعات المثبتة بالفورمالين ومدمجة بالبارافين بواسطة المِبشرة النسيجيّة وتحديد سماكة المقطع بـ ٤ ميكرونات.

٢. تُفرش هذه المقاطع البارافينيّة في مِحم مائي يحتوي ماءً مقطراً بدرجة حرارة حوالي ٤٠ – ٤٥ درجة مئويّة.

٣. تحميل المقاطع النسيجيّة على الشرائح الزجاجيّة الخاصة بالتلوين IHC التي تكون مجهزة لالتصاق المقطع النسيجي بالشريحة.

٤. تُسخَّن الشرائح على السخان بدرجة حرارة 58 درجة مئويّة لمدّة ساعتين.

٥. إزالة شمع البارافين: تُمرّر الشرائح في حمّامين من الكزيلول (٣-٥ دقائق لكلٍ منهما).

٦. التجفيف: تمرّر الشرائح بثلاثة حمّامات من الكحول تبدأ بالكحول المطلق ثمّ الكحول ٩٥% ثمّ الكحول٧٠% (٣ دقائق لكل حمام).

٧. إعادة الإماهة: تُغسل الشرائح بالماء الجاري بلطف.

٨. عمليّة استرجاع المُستضد:

تفقد الخلايا في نسج الخزعات فاعلية المستقبلات البروتينيّة والمستضدات المجودة فيها بسبب إجراءات تثبيت العيّنة بالفورمول ثم دمجها بالبارافين، لذا يتمّ استعادة فاعليّة هذه المستضدات لتصبح قابلة لجذب الأضداد المختلفة بما فيها الضدّ الملوّن المستخدم في هذه الدراسة وهو β-Catenin. وذلك بواسطة محلول استرجاع المستضد مناسب (Solution Antigen Retrieval) والذي تمّ تحضيره مسبقاً حسب تعليمات شركة المصنّعة Dako. وذلك بتمديده بالماء المقطَّر بنسبة (١/١٠٠).

- وُضعت الشرائح ضمن وعاء يحوي كميّة كافية من محلول استرجاع المُستضد بحيث غُمرت بشكلٍ كامل.
- وُضع الوعاء في الميكروويف لمدة ١٥ دقيقة (حوالي ١٠ دقائق بعد الغليان) ثمّ تُرك بعدها لحوالي (١٥ – ٢٠ دقيقة) ليبرد في درجة حرارة الغرفة.
- وضعت الشرائح في حوض يحوي السائل الدارئ PBS لمدّة ٥ دقائق ثمّ نقلت إلى حوض آخر يحوي PBS لمدّة ٣ دقائق مع الانتباه لعدم جفاف المقاطع النسيجيّة خلال مراحل التلوين كافّة بالغسل المستمر بالـPBS .

شكل (٢-٢٤) الشرائح مغمورة في محلول استرجاع المستضد

٩. تطبيق Peroxidase Blocker:

- تمّت إزالة المحلول الدارئ الزائد والمسح حول العيّنة بلطف.
- حُدّد حول المقاطع النسيجيّة بقلم التحديد (Dako Pen) لمنع تسرّب المواد المطبّقة على النسيج.
- يطبّق الـ Poly Detector Peroxidase Blocker بواسطة الممص (Eppendorf) بحيث غُطيت كامل العيّنة وتُركت ٥ دقائق.
- غُسلت الشرائح بعدها بالمحلول الدارئ PBS، مع تجنّب الغسل المباشر للعيّنة النسيجيّة ثمّ وُضعت في حمّام جديد من السائل الدارئ لمدة ٥ دقائق.

شكل (٢-٢٥) تطبيق الـPeroxidase Blocker

شكل (٢-٢٦) الغسل بالمحلول الدارئ PBS

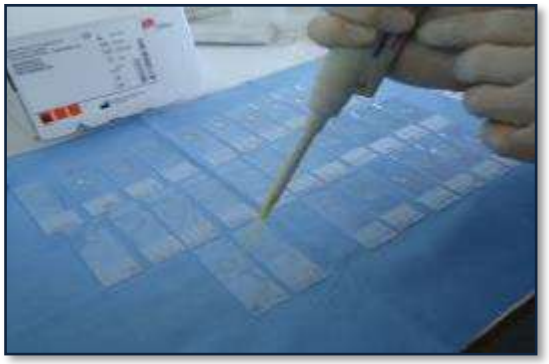
١٠. تطبيق الضدّ الأوّلي الـ β-Catenin:

- أزيل المحلول الدارئ الزائد مع المسح حول العيّنة بلطف.
- طُبّق الضدّ الأولي بواسطة الممص بحيث غطّى كامل النسيج. و كان زمن التطبيق ٤٥ دقيقة.
- غُسلت بعدها الشرائح بالمحلول الدارئ ووُضعت في حوض من السائل الدارئ لمدة ٥ دقائق.

شكل (٢-٢٧) تطبيق الـβ-Catenin

١١. تطبيق الـ Poly Detector HRP Label :

- يغطى كامل النسيج بالـ HRP Label بواسطة الممص ويحضن لمدة ٤٥ دقيقة.
- غُسلت بعدها الشرائح بالمحلول الدارئ ووُضعت في حوض من السائل الدارئ لمدة ٥ دقائق.



شكل (٢-٢٨) تطبيق الـ Poly Detector HRP Label

١٢. تطبيق محلول DAB Substrate-Chromogen:

تمّ تحضيره حسب توصيات الشركة المنتجة: (قطرة واحدة من Poly Detector DAB Chromogen لكل ١مل من Poly Detector DAB Buffer) مع المزج الجَيِّد ضمن عبوة مناسبة.

- تمّت إزالة المحلول الدارئ الزائد من حول العيّنة

- طبّق المحلول بواسطة قطّارة خاصّة بحيث تغطي كامل النسيج وتُركت هكذا لمدّة ١٠ دقائق.
- غسلت الشرائح بالماء المقطر بلطف ٥ مرات.

شكل (٢-٢٩) تطبيق الكروموجين

شكل (٢-٣٠) تحضير الكروموجين

١٣. تطبيق الهيماتوكسيلين: يطبّق الهيماتوكسلين على المقاطع النسيجيّة بشكل كامل لمدّة ٣٠ ثانية فقط ثمّ غسلت بالماء.

١٤. سحب الماء من النسج حيث تمرر الشرائح بحمّامات متتالية من الكحول ٧٠% و٩٥% ثمّ كحول مطلق (كل حمّام لمدة ٣ دقائق)

١٥. سُترت العيّنات ببلسم كندا وأصبحت جاهزة للدراسة المناعيّة.

شكل (٢-٣١) تطبيق الهيماتوكسيلين على النسيج

٢-٤-٣-٢ التقييم النسيجي للعيّنة الشاهدة الملوّنة IHC

تم فحص شرائح العيّنة الشاهدة الملونة بالـβ-Catenin بالمجهر الضوئي بهدف التأكد من جودة الملوّنات المناعيّة الكيميانسيجية المستخدمة وسلامة الطريقة التي اتُبعت في تلوين الشرائح.

بالإضافة إلى التّعرف على كيفيّة ظهور تعبيريّة الملون في الخلايا الطبيعيّة. ووجد أن معظم هذه الخلايا تبدي تعبيريّة غشائيّة مستمرة للملوّن، لذا وبالاستناد إلى دراسات سابقة اعتبرت كل خلية أبدت تلك التعبيريّة طبيعيّة، وكل خلية تبدي عكس ذلك اعتبرت خلية شاذة. (Hajra and Fearon, 2002)

بما أنّ الملون المناعي β-Catenin هو واسم للتحوّل الظهاري الميزانشيمي إذا ما ظهرت تعبيريّته في غير مكانه الطبيعي أي غشاء الخلية، اعتبرت كل خلية شاذة هي خلية في طور التحوّل الظهاري الميزانشيمي.(Kaur et al., 2013)

٢-٤-٣-٣ طريقة التقييم النسيجي للعيّنات الملوّنة IHC

تمّ فحص الشرائح الملوّنة بالـβ-Catenin بالمجهر الضوئي وفق المجموعات الثلاثة المقسّمة مسبقاً اعتماداً على التلوين بالهيماتوكسلين أيوزين.

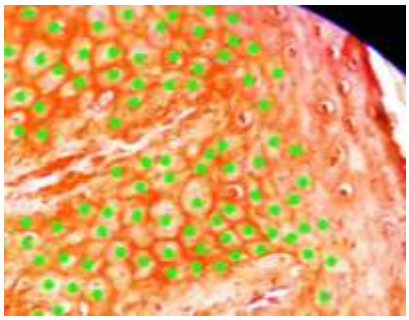
دُرست خمس ساحات نسيجيّة من كل محضّر على العدسة X40.

تمّ التقاط صور رقميّة للساحات المجهريّة المدروسة من كلّ محضّر على التكبير X40 وصورة لساحة مجهريّة واحدة على التكبير X10.

نُقلت الصور جميعها إلى الحاسوب للمباشرة بإحصاء عدد الخلايا الشاذة والطبيعيّة في كل صورة. حيث تم إحصاء ما بين ٢٥٠ إلى ٤٠٠ خلية في كل ساحة. شكل (٢-٣٢)

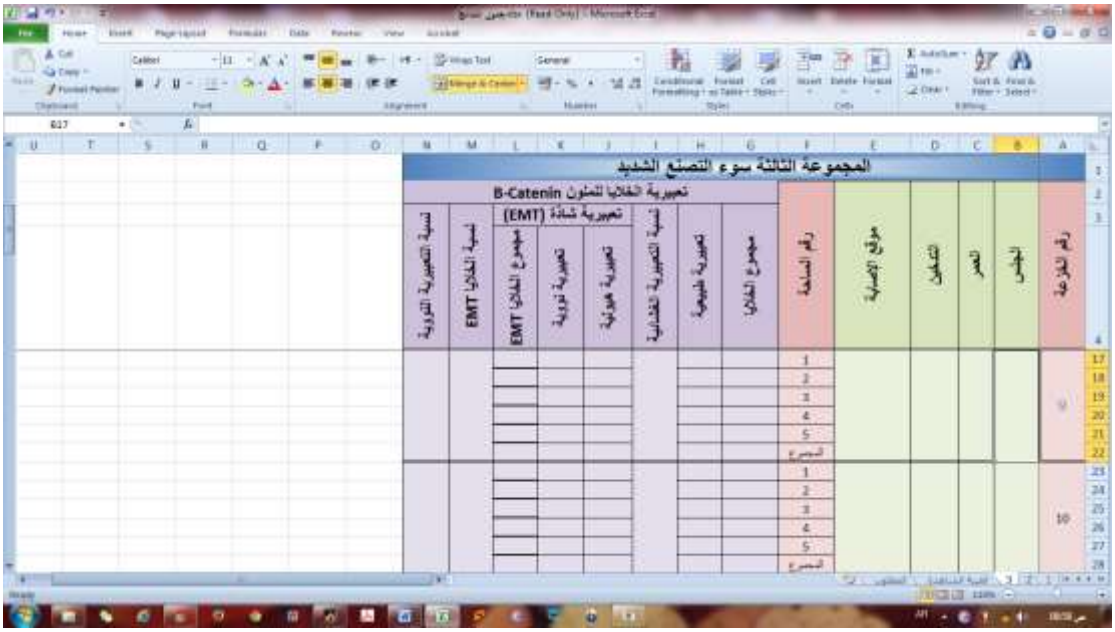
تمّ إحصاء عدد الخلايا يدوياً والخلايا المعدودة في كل صورة هي:

- الخلايا ذات التعبيريّة الغشائيّة المستمرة للملوّن β–Catenin وحسبت نسبتها.
- الخلايا ذات التعبيريّة الهيولية أو التعبيرية الغشائية المتقطعة للملوّن β–Catenin وحسبت نسبتها.
- الخلايا ذات التعبيريّة النوويّة للملوّن β–Catenin وحسبت نسبتها.



شكل (٢-٣٢) طريقة العد اليدويّة

و بعد الإنتهاء من عدّ الخلايا في صورة من الصور الرقمية الملتقطة للساحات الخمس المدروسة من كل محضّر يتمّ وضع الأعداد الناتجة ضمن الحقل المناسب لها في جدول النتائج المصمّم على برنامج Microsoft Excel 2010. الشكل(٢-٣٣)



شكل (٢-٣٣) جدول Microsoft Excel 2010 المستخدم لوضع النتائج

فكانت وحدة الدراسة هي الخلية من ناحية التقييم ولإجراء الدراسات الإحصائية حسبت نسب الخلايا المحصية في كل ساحة ثم حسب متوسط هذه النسب في المحضر الواحد.

أي اعتُبر أنّ نسبة الخلايا في كلّ محضّر هي متوسّط نسبها في السّاحات الخمس المدروسة.

٢-٥ الاختبارات الإحصائية المستخدمة

تمّ استخدام برنامج SPSS v.19 لتحليل البيانات التي حصلنا عليها إحصائيّاً ، كما استعنا ببرنامج (MS Excel 2010) لإنجاز الرسوم البيانيّة ، واستُخدِمت التحاليل التالية:

٢-٥-١ تحليل التباين

لتحرّي وجود فروق في تعبيريّة β-catenin بين الدرجات النسيجيّة الثلاث لسوء التصنّع البشروي الفموي.

اختبار تحليل التباين One-way ANOVA هو اختبار إحصائي يستخدم لدراسة الفروق بين متوسّطات عدّة عينات مستقلّة، أي مُقارنة معيار معين بين عدّة مجموعات منفصلة، حيث تُحسب قيمة المعنويّة (P-value) من إحصاء الاختبار (F) ثمّ نقارنها بالقيمة (α=0.05)، فإذا كانت (P-value < 0.05) فإنّ الاختبار معنوي و نقبل الفرضيّة البديلة H1 بثقة 95 % . ويمكن صياغة الفرضيّات التي يختبرها بالشكل التالي:

فرضيّة العدم H0 : العيّنات المدروسة تعود إلى المجتمع نفسه، أي لا يوجد فرق معنوي بين العيّنات أو لا توجد فروق معنويّة بين متوسّطات المجموعات.

الفرضيّة البديلة H1 : العيّنات المدروسة تعود إلى مجتمعات مختلفة، أي يوجد فرق معنوي بين العيّنات أو توجد فروق معنويّة بين متوسّطات المجموعات.

و في حال وجود فروق، نجري اختبار توكي Tukey لدراسة الفروق بين كل مجموعتين مثنى مثنى.

٢-٥-٢ تحليل ارتباط بيرسون

لتحرّي وجود علاقة بين التعبيرية الغشائية الطبيعية والتعبيريّة النووية للـβ-catenin في الدرجات المختلفة لسوء التصنّع البشروي الفموي.

معامل ارتباط بيرسون R (Pearson Correlation Coefficient R) هو اختبار إحصائي يستخدم لمعرفة إذا ما كان هناك تأثير مشترك للمتغيّرات المدروسة ومن ثمّ وَصف هذا التأثير في حال وجود علاقة ارتباط.

ومن أجل معرفة شكل علاقة الارتباط إن وجدت يحسب معامل الارتباط ، حيث تكون قيمته محدودة بالمجال {-١،١} ، حيث تدل القيم الموجبة على علاقة طرديّة (إيجابيّة) بين المتغيّرين المدروسين والقيم السالبة تشير إلى علاقة عكسيّة بينهما، كما يدل اقتراب قيمة معامل الارتباط من الصفر إلى ضعف العلاقة ويدل اقتراب القيمة من الواحد إلى قوّة هذه العلاقة.

نقوم بحساب مستوى المعنويّة (P-value) من معامل الارتباط ونقارنها بالقيمة (α=0.05)، فإذا كانت (P-value < 0.05) فإننا نقبل الفرضيّة البديلة H1 بثقة 95 % . حيث نختبر الفرضيات التالية:

فرضيّة العدم H0: لا يوجد ارتباط.

الفرضيّة البديلة H1: يوجد ارتباط.

نستدل على مدى قوّة ارتباط متغيّرين حسب قيمة معامل الارتباط من خلال الجدول(٢-٢)

جدول (٢-٢) دلالة قيمة معامل ارتباط بيرسون r

دلالة قوّة الارتباط	مجال قيمة معامل ارتباط بيرسون r
ارتباط ضعيف	r < 0.30
ارتباط متوسّط القوة	0.30 < r < 0.70
ارتباط قوي	0.70 < r

٢-٥-٣ منحني ROC (Receiver Operating Characteristic)

لدراسة إمكانية التّنبّؤ بالتّحوّل نحو الخباثة اعتماداً على الـ β-Catenin في سوء التصنع البشروي الفموي.

وهو عبارة عن منحنٍ يتمّ رسمه بناءً على احتمال تمثيل قيم كمّيّة (مستوى نسبة تعبيرية البروتين المدروس مثلاً) ومتغيّر اسمي بفئتين اثنتين. ويفيد هذا المنحني عند حساب المساحة الواقعة تحته لدراسة احتمال أن تعبّر القيم المدروسة عن المتغيّر الاسميّ المدروس، ويفيد أيضاً في تحديد النّقطة الفاصلة المثلى (القيمة المعيارية) الّتي يمكن عدّ القيم عندها ممثّلة أم لا.

مساحة المنطقة الواقعة تحت منحني ROC عبارة عن قيمة تتراوح بين 1 - 0.5، وتدل المساحة تحت منحنى ROC (Area Under Curve (AUC)) على أنّ القيم تمثّل المتغيّر التّابع تمثيلاً صحيحاً، وتميّز بين فئتي المتغيّر الاسميّ. جدول (٢-٣)

يتم حساب مستوى المعنويّة (P-value) ونقارنها بالقيمة (α=0.05)، فإذا كانت (P-value < 0.05) فإنّه يمكن عدّ القيم تميِّز تمييزاً جيّداً بين فئتي المتغيّر الاسمي.

ويتبَع هذا المنحني عادةً قيم محسوبة للحساسيّة والنّوعيّة لاختيار القيمة المعياريّة المثلى الّتي تحقّق الحساسيّة العالية و النّوعيّة العالية معاً.

جدول (٢-٣) دلالة المساحة تحت منحني ROC

دلالة المساحة		مجال قيمة المساحة تحت منحنى ROC
ممتاز	Excellent	0.90 – 1.00
جيد	Good	0.80 – 0.90
مقبول	Fair	0.70 – 0.80
ضعيف	Poor	0.60 – 0.70
فشل	Fail	0.50 – 0.60

٢-٥-٤ اختبار ستيودنت لعينتين مستقلتين

اختبار يستخدم لدراسة الفروق بين عينتين مستقلتين، أي مقارنة معيار معين بين مجموعتين منفصلتين، حيث تحسب قيمة المعنوية (P-value) من إحصاء الاختبار ونقارنها بالقيمة (α=0.05)، فإذا كانت (P-value < 0.05) فإننا نقبل الفرضية البديلة H1 بثقة ٩٥% .

ويمكن صياغة الفرضيات التي يختبرها بالشكل التالي:

فرضية العدم H0: العينتان المدروستان تعودان إلى المجتمع نفسه، أي لا يوجد فرق معنوي بين العينتين أو لا توجد فروق معنوية بين متوسطي المجموعتين.

الفرضية البديلة H1: العينتان المدروستان تعودان إلى مجتمعين مختلفين، أي يوجد فرق معنوي بين العينتين أو توجد فروق معنوية بين متوسطي المجموعتين.

و يشترط هذا الاختبار قبل إجرائه كون القياسات خاضعة للتوزيع الطبيعي و تجانس التباينات بين العينات.

اعتبرت التحاليل الإحصائية ذات دلالة عند P<0.05

الباب الثالث: النتائج والدراسة الإحصائية

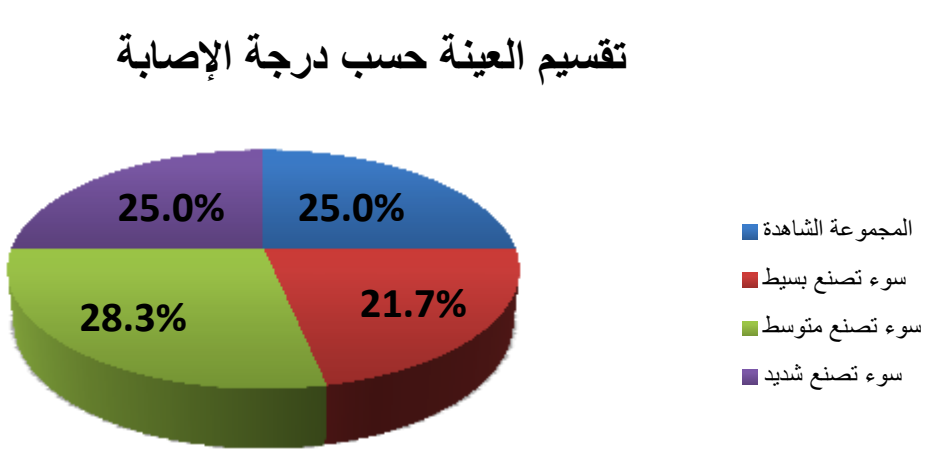
Results and Statistical Study

٣-١ وصف العينة

تألفت عينة الدراسة من ٦٠ خزعة، مقسمة حسب درجة سوء التصنع كما يلي :

جدول (٣-١) توزع العينة حسب درجة سوء التصنع

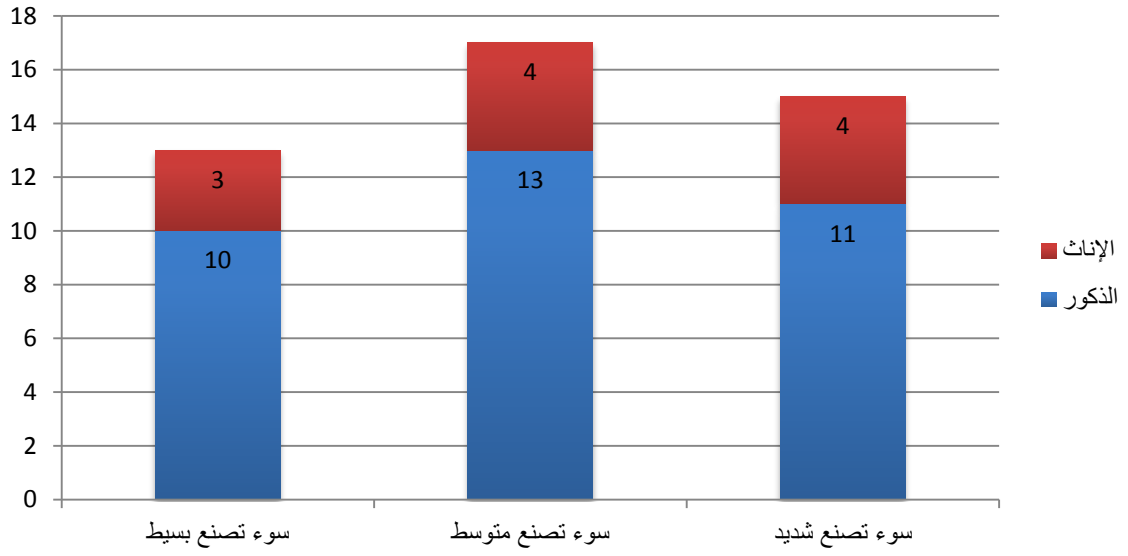
المجموعة	العدد	النسبة المئوية
المجموعة الشاهدة	15	25.0 %
سوء تصنع بسيط	13	21.7 %
سوء تصنع متوسط	17	28.3 %
سوء تصنع شديد	15	25.0 %



مخطط (٣-١) تقسيم العينة حسب درجة الإصابة

وكان توزّع عدد الذكور و الإناث في عيّنة البحث و في كل من درجات سوء التصنّع كما يلي :

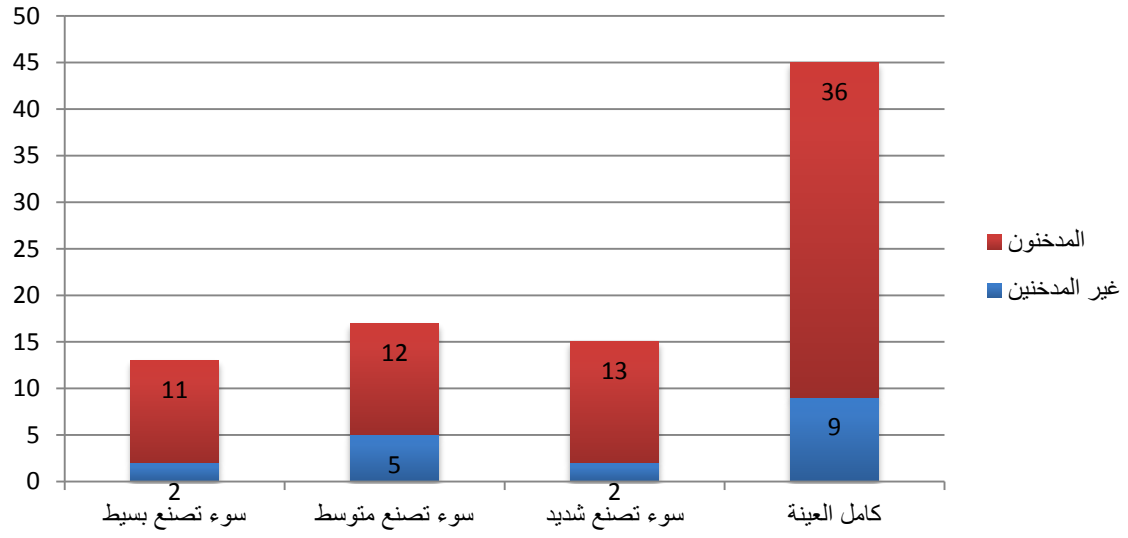
جدول (٣-٢) توزع الذكور والإناث في العينة				
المجموعة	الذكور		الإناث	
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
سوء تصنع بسيط	10	76.9 %	3	23.1 %
سوء تصنع متوسط	13	76.5 %	4	23.5 %
سوء تصنع شديد	11	73.3 %	4	26.7 %
كامل العينة	34	75.6 %	11	24.4 %



مخطط (٣-٢) توزع الذكور والإناث في عينة البحث

كما كان توزع المدخنين وغير المدخنين في عينة البحث و في كل من درجات سوء التصنّع كما يلي :

جدول (٣-٣) توزع المدخنين و غير المدخنين في عينة البحث				
المجموعة	غير المدخنين		المدخنون	
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
سوء تصنع بسيط	2	15.4 %	11	84.6 %
سوء تصنع متوسط	5	29.4 %	12	70.6 %
سوء تصنع شديد	2	13.3 %	13	86.7 %
كامل العينة	9	20.0 %	36	80.0 %

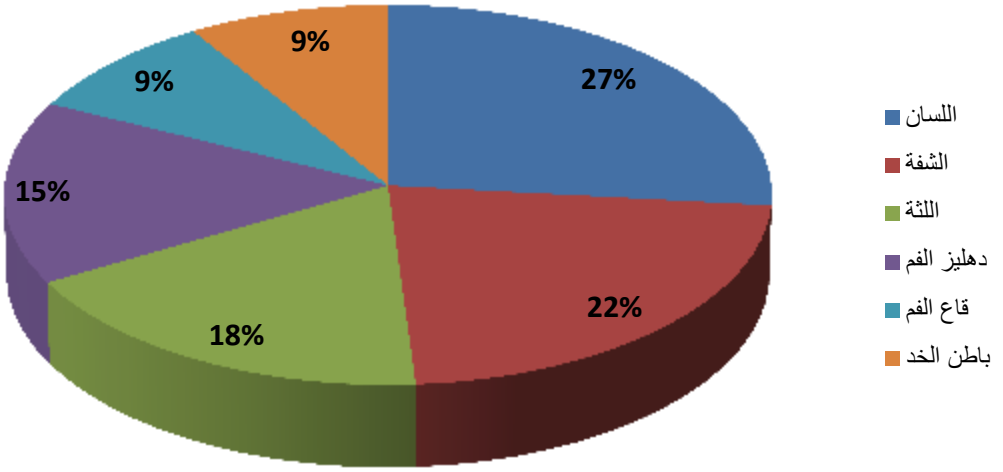


مخطط (٣-٣) توزيع المدخنين وغير المدخنين في عينة البحث

و كان توزع مكان الإصابة في عينة البحث كما يلي :

جدول (٣-٤) توزع مواقع الإصابة في عينة البحث

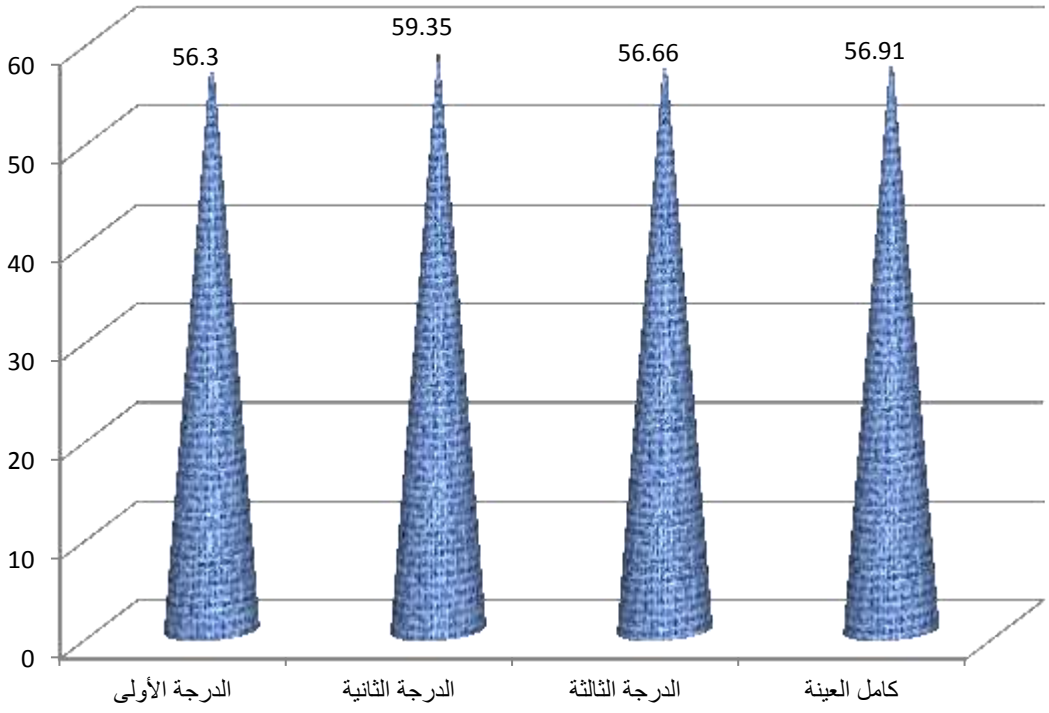
الموقع	العدد	النسبة المئوية
الشفة	10	22.2%
دهليز الفم	7	15.5%
اللسان	12	26.7%
اللثة	8	17.8%
قاع الفم	4	8.9%
باطن الخد	4	8.9%



مخطط (٣-٤) توزع مواقع الإصابة في عينة البحث

وتوزّعت أعمار المرضى في عيّنة البحث كما يلي:

جدول (٣-٥) توزع أعمار المرضى في العيّنة				
المجموعة	المتوسّط	الانحراف المعياري	أدنى قيمة	أكبر قيمة
سوء تصنع بسيط	٥٦,٣٠	١٥,١٩	٣٣	٧٧
سوء تصنع متوسط	٥٩,٣٥	١٤,٧٣	٤٠	٧١
سوء تصنع شديد	٥٦,٦٦	١٩,٥٥	٣٤	٦٩
كامل العينة	٥٦,٩١	١٦,١٧	٣٣	٧٧

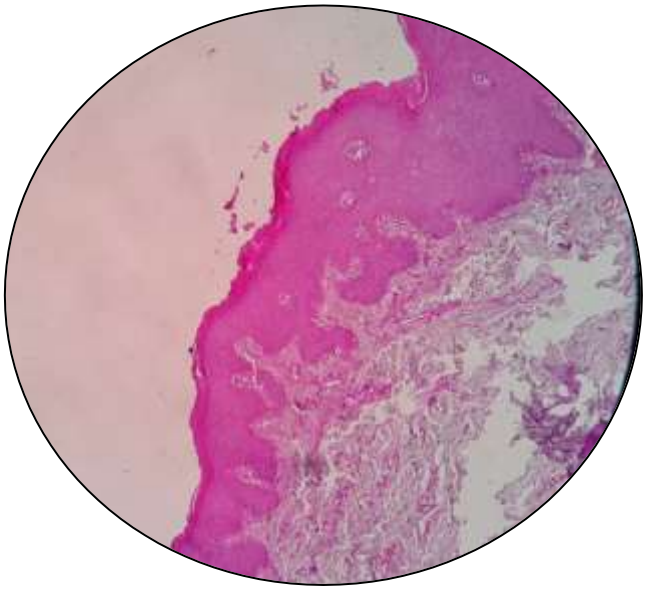


مخطّط (٣-٥) متوسّط العمر لدى كل من مجموعات العيّنة

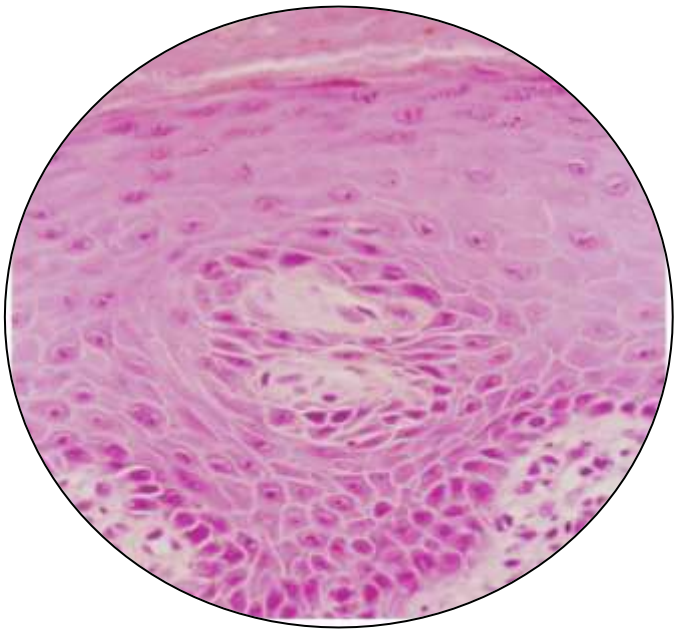
٣-٢ النتائج

٣-٢-١ نتائج دراسة المجموعة الأولى

تألّفت المجموعة الأولى من ١٣ خزعة لسوء التصنّع البشروي الفموي البسيط شكل (٣-٢،١)



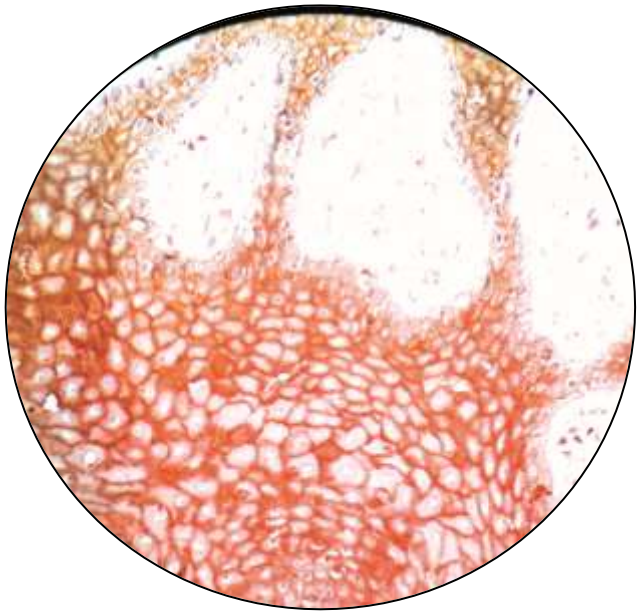
شكل (٣-١) سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط H&E تكبير X10



شكل (٣-٢) سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط H&E تكبير X40

يلاحظ في هذه المجموعة تعبيرية واضحة للواسم β-Catenin معظمها تعبيرية غشائية طبيعية وكانت نسبة التعبيرية النووية معدومة تقريباً وكانت نسبة الخلايا في طور التحول قليلة تراوحت بين ١% -٣% من الخلايا، شكل (٣-٣،٤) وأبدت إحدى خزعات هذه المجموعة نسبة عالية للخلايا في طور التحول وصلت حتى ٩%.

شكل (٣-٣) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط تكبير X10



شكل (٣-٤) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي البسيط تكبير X40

وكانت النتائج في المجموعة الأولى كما يلي:

جدول (٣-٦) نتائج المجموعة الأولى			
رقم الحالة	نسبة التعبيرية الغشائية	نسبة الخلايا EMT	نسبة التعبيرية النووية
1	97%	2%	0%
2	98%	1%	0%
3	99%	1%	0%
4	97%	3%	1%
5	99%	1%	0%
6	97%	2%	1%
7	99%	1%	0%
8	99%	1%	0%
9	90%	9%	1%
10	99%	1%	0%
11	98%	1%	1%
12	95%	4%	1%
13	99%	1%	0%

٣-٢-٢ نتائج دراسة المجموعة الثانية

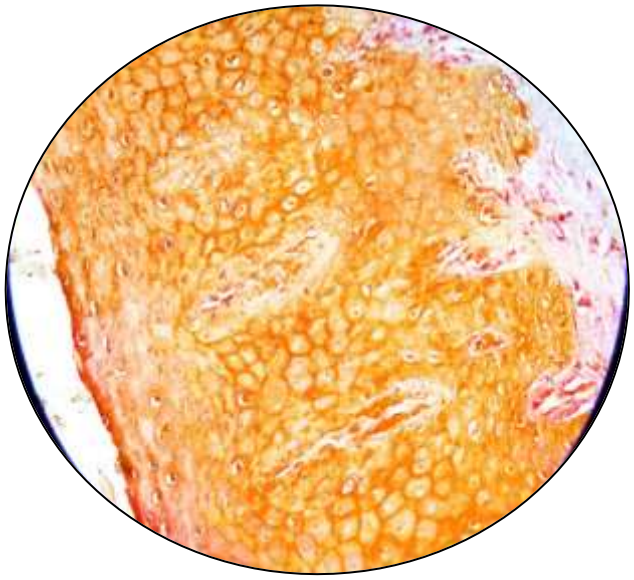
تألّفت المجموعة الثانية من ١٧ خزعة لسوء التصنّع البشروي الفموي المتوسّط شكل (٣-٥،٦)

شكل (٣-٥) سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسط H&E تكبير X10

شكل (٣-٦) سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسط H&E تكبير X40

يلاحظ في هذه المجموعة تعبيرية واضحة للواسم β–Catenin معظمها تعبيرية غشائية طبيعية ولكن بنسب أقل من نسب المجموعة الأولى وكانت نسبة التعبيرية النووية قليلة تراوحت بين ١% – ٣% ، في حين تراوحت نسبة الخلايا في طور التحول بين ٥% –٩% من الخلايا شكل (٣–٧،٨)، وأبدت ثلاث خزعات في هذه المجموعة نسبة عالية للخلايا في طور التحول بين ١٠% و١٣% وإحداها أبدت نسبة تعبيرية نووية وصلت حتى ٥%.

شكل (٣-٧) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسّط تكبير X10



شكل (٣-٨) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي المتوسّط تكبير X40

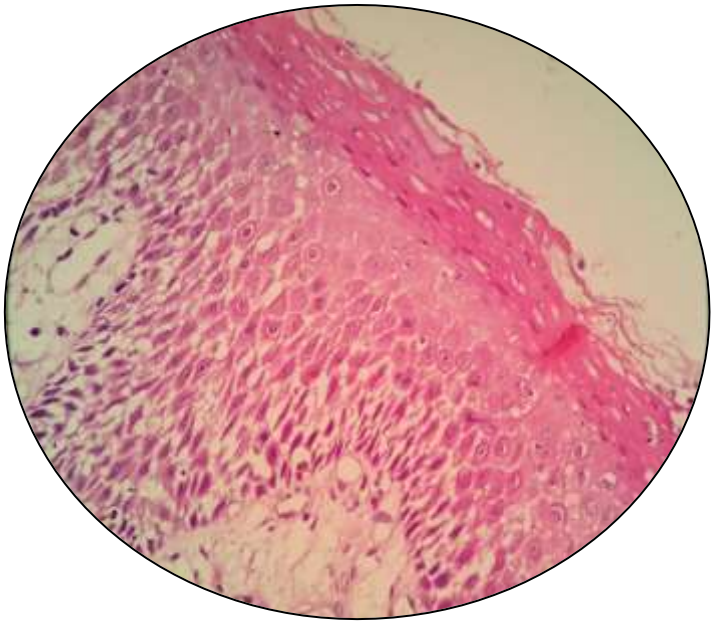
وكانت النتائج في المجموعة الثانية كما يلي:

جدول (٣-٧) نتائج المجموعة الثانية			
رقم الحالة	نسبة التعبيرية الغشائية	نسبة الخلايا EMT	نسبة التعبيرية النووية
1	93%	6%	3%
2	88%	11%	5%
3	91%	9%	2%
4	94%	6%	2%
5	90%	10%	2%
6	94%	5%	1%
7	87%	13%	2%
8	95%	5%	1%
9	91%	8%	1%
10	90%	10%	2%
11	90%	9%	3%
12	91%	8%	1%
13	91%	7%	2%
14	92%	8%	2%
15	90%	9%	3%
16	90%	9%	3%
17	91%	9%	1%

٣-٢-٣ نتائج دراسة المجموعة الثالثة

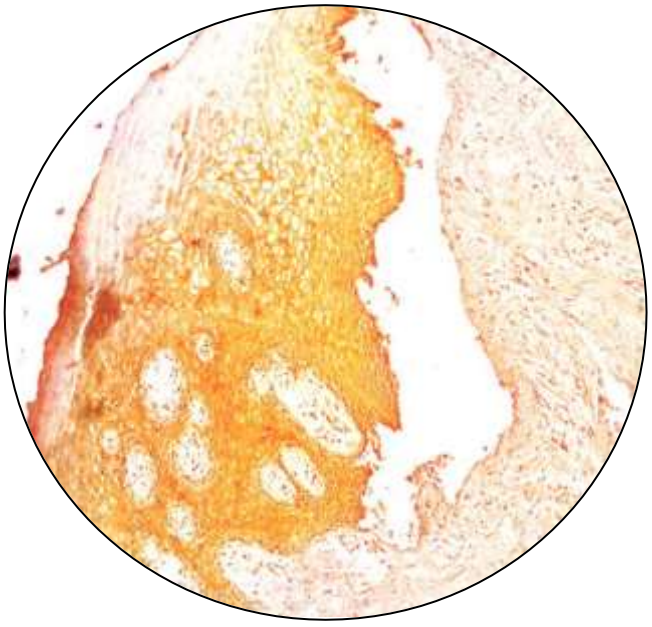
تألّفت المجموعة الثالثة من ١٥ خزعة لسوء التصنّع البشروي الفموي الشديد شكل (٣-١٠،٩)

شكل (٣-٩) سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد H&E تكبير X10

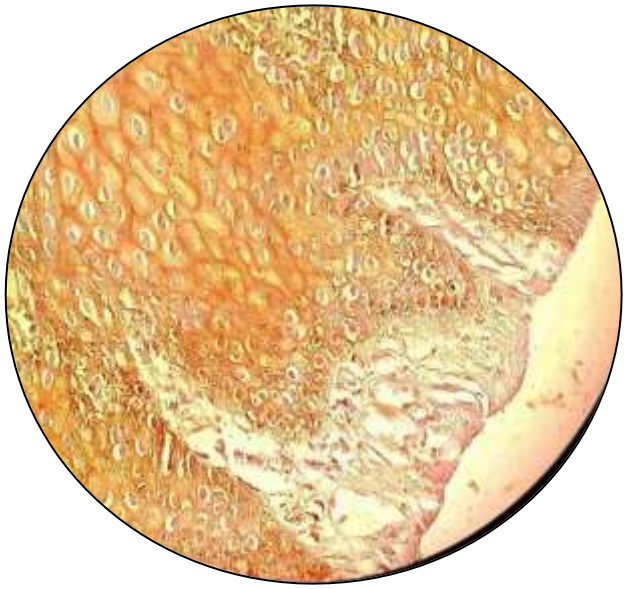


شكل (٣-١٠) سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد H&E تكبير X40

يلاحظ في هذه المجموعة تعبيرية واضحة للواسم β-Catenin معظمها تعبيرية غشائية طبيعية ولكن بنسب أقل من نسب المجموعة الثانية وتراوحت نسبة التعبيرية النووية بين ٣% – ٧%، في حين تراوحت نسبة الخلايا في طور التحول بين ١٢% –١٥% من الخلايا شكل (٣-١١،١٢) ، وأبدت خزعتان في هذه المجموعة نسبة منخفضة للخلايا في طور التحول بين ٥% و٦% ولكن يلاحظ وجود خزعات أبدت نسبة تعبيرية نووية قليلة نسبياً وصلت إحداها حتى ١% وأخرى كانت نسبة التعبيرية النووية فيها ٠% .



شكل (٣-١١) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد تكبير X10



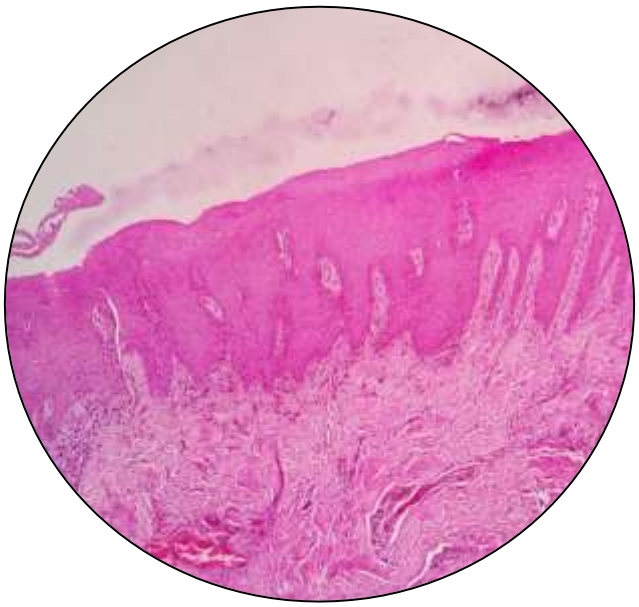
شكل (٣-١٢) تعبيرية الـβ-Catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي الشديد تكبير X40

وكانت النتائج في المجموعة الثالثة كما يلي:

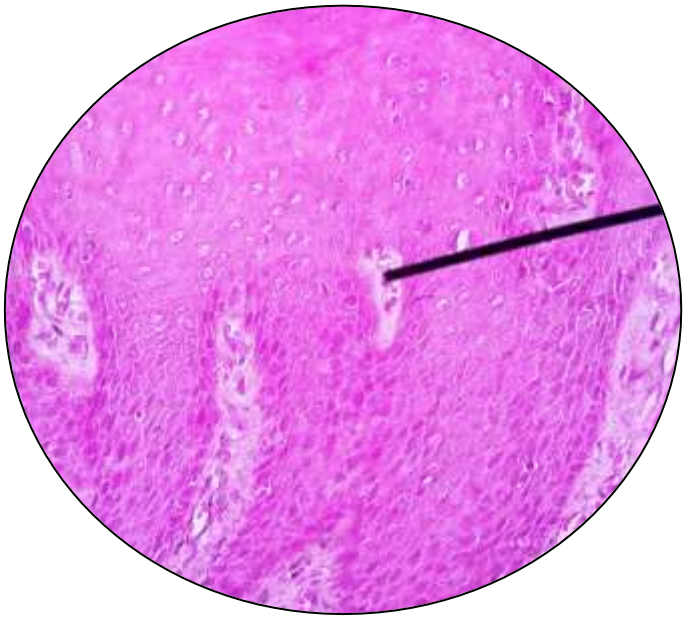
جدول (٣-٨) نتائج المجموعة الثالثة			
رقم الحالة	نسبة التعبيرية الغشائية	نسبة الخلايا EMT	نسبة التعبيرية النووية
1	80%	19%	7%
2	84%	15%	5%
3	93%	6%	0%
4	85%	14%	4%
5	87%	12%	5%
6	81%	18%	7%
7	88%	10%	2%
8	87%	12%	4%
9	88%	12%	3%
10	87%	12%	1%
11	87%	13%	3%
12	88%	12%	3%
13	86%	13%	4%
14	94%	5%	2%
15	86%	13%	6%

٣-٢-٤ نتائج دراسة المجموعة الشاهدة

تألّفت المجموعة الشاهدة من ١٥ خزعة لنسج سليمة من المخاطيّة الفموية شكل (٣-١٣،١٤)



شكل (٣-١٣) إحدى خزعات العينة الشاهدة H&E تكبير X10



شكل (٣-١٤) إحدى خزعات العينة الشاهدة H&E تكبير X40

يلاحظ في المجموعة الشاهدة تعبيرية غشائية للـβ-Catenin فقط ولم تشكّل التعبيرية الهيولية أو النووية أي نسبة حيث تناهت إلى ٠%. شكل (٣-١٥،١٦)

شكل (٣-١٥) تعبيرية الـ β-Catenin في إحدى خزعات العينة الشاهدة تكبير X10

شكل (٣-١٦) تعبيرية الـ β-Catenin في إحدى خزعات العينة الشاهدة تكبير X40

وكانت النتائج في المجموعة الشاهدة كما يلي:

جدول (٣-٩) نتائج المجموعة الشاهدة			
رقم الحالة	نسبة التعبيرية الغشائية	نسبة الخلايا EMT	نسبة التعبيرية النووية
1	100%	0%	0%
2	99%	1%	0%
3	100%	0%	0%
4	100%	0%	0%
5	100%	1%	0%
6	100%	0%	0%
7	100%	0%	0%
8	100%	0%	0%
9	99%	1%	0%
10	100%	0%	0%
11	100%	0%	0%
12	100%	0%	0%
13	100%	0%	0%
14	100%	1%	0%
15	100%	0%	0%

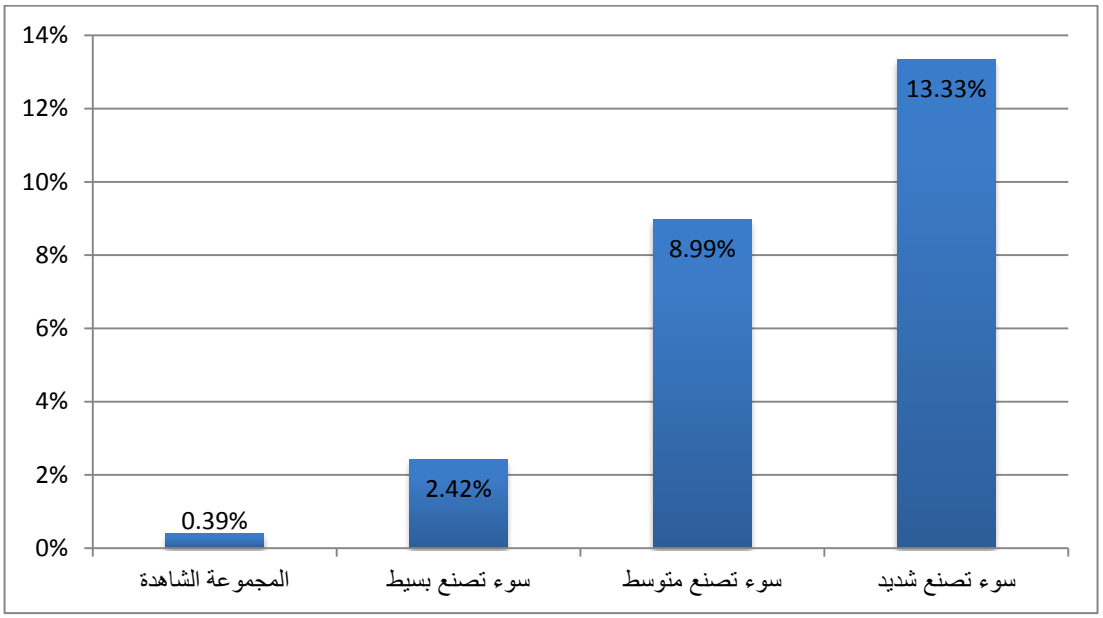
٣-٣ الدراسة الإحصائية

٣-٣-١ دراسة نسبة الخلايا في طور التحول الظهاري الميزانشيمي

يوضح الجدول التالي أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بمتغير نسبة الخلايا EMT في كل من درجات الإصابة :

جدول (٣-١٠) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا EMT

درجة الإصابة	المتوسط	الانحراف المعياري	أدنى قيمة	أعلى قيمة
المجموعة الشاهدة	0.394 %	0.138 %	0.17 %	0.62 %
المجموعة الأولى	2.418 %	2.497 %	0.71 %	9.57 %
المجموعة الثانية	8.985 %	2.089 %	5.28 %	13.29 %
المجموعة الثالثة	13.333 %	3.659 %	6.50 %	20.10 %



مخطط (٣-٦) نسبة الخلايا EMT في كل من درجات الإصابة

وللتحقق من وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة الخلايا EMT ما بين مجموعات درجات الإصابة، نجري اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA ونحصل على النتائج التالية:

جدول (٣-١١) نتيجة اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA لمتوسّط نسب الخلايا EMT

إحصاء الاختبار F	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
88.786	0.000 *	توجد فروق دالة

نجد من نتائج الاختبار فروقا ذات دلالة إحصائية في نسبة الخلايا EMT ما بين مجموعات درجات الإصابة، وبدراسة هذه الفروق بمزيد من التفصيل، نقارن بين كل مجموعتين باستخدام اختبار توكي كما يلي:

جدول (٣-١٢) نتائج اختبار Tukey لدراسة فروق نسب الخلايا EMT بين المجموعات

المجموعتان المقارنتان		متوسط الفرق	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
الشاهدة	1	2.024 %	0.138	لا توجد فروق دالة
الشاهدة	2	8.591 %	0.000 *	توجد فروق دالة
الشاهدة	3	12.939 %	0.000 *	توجد فروق دالة
1	2	6.566 %	0.000 *	توجد فروق دالة
1	3	10.914 %	0.000 *	توجد فروق دالة
2	3	4.348 %	0.000 *	توجد فروق دالة

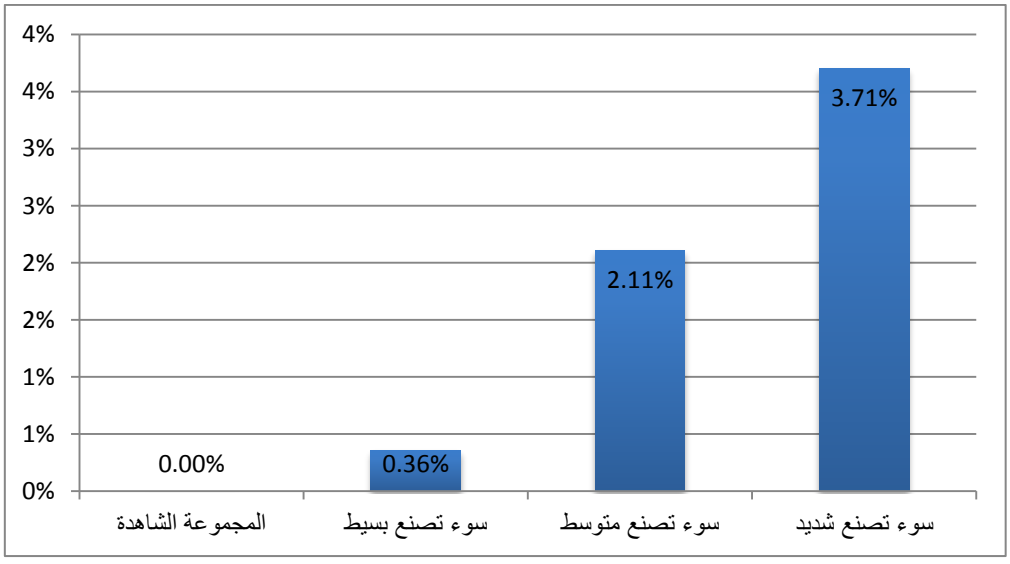
يتضح من نتائج الاختبار وبثقة ٩٥%، وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة الخلايا EMT ما بين كل من درجات الإصابة مثنى مثنى، فيما عدا المجموعتين الشاهدة و الدرجة الأولى من الإصابة حيث لم توجد فروق ذات دلالة إحصائية.

٣-٣-٢ دراسة نسبة الخلايا ذات التعبيرية النووية

يوضح الجدول التالي أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بمتغير نسبة التعبيرية النووية في كل من درجات الإصابة:

جدول (٣-١٣) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا ذات التعبيرية النووية

درجة الإصابة	المتوسط	الانحراف المعياري	أدنى قيمة	أعلى قيمة
المجموعة الشاهدة	0.000 %	0.000 %	0.00 %	0.00 %
المجموعة الأولى	0.358 %	0.425 %	0.00 %	1.30 %
المجموعة الثانية	2.108 %	0.878 %	0.97 %	4.74 %
المجموعة الثالثة	3.705 %	1.844 %	0.45 %	6.58 %



مخطط (٣-٧) نسبة التعبيرية النووية في كل من درجات الإصابة

وللتحقق من وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيرية النووية ما بين مجموعات درجات الإصابة، نجري اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA ونحصل على النتائج التالية:

جدول (٣-١٤) نتيجة اختبار تحليل التباين One-Way ANOVA لمتوسّط نسب التعبيرية النووية

إحصاء الاختبار F	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
38.88	0.000 *	توجد فروق دالة

نجد من نتائج الاختبار فروقا ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيرية النووية ما بين مجموعات درجات الإصابة، و بدراسة هذه الفروق بمزيد من التفصيل، نقارن بين كل مجموعتين باستخدام اختبار توكي كما يلي:

جدول (٣-١٥) نتائج اختبار Tukey لدراسة فروق نسب خلايا التعبيرية النووية بين المجموعات

المجموعتان المقارنتان		متوسط الفرق	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
الشاهدة	1	0.358 %	0.806	لا توجد فروق دالة
الشاهدة	2	2.108 %	0.000 *	توجد فروق دالة
الشاهدة	3	3.705 %	0.000 *	توجد فروق دالة
1	2	1.750 %	0.000 *	توجد فروق دالة
1	3	3.346 %	0.000 *	توجد فروق دالة
2	3	1.596 %	0.000 *	توجد فروق دالة

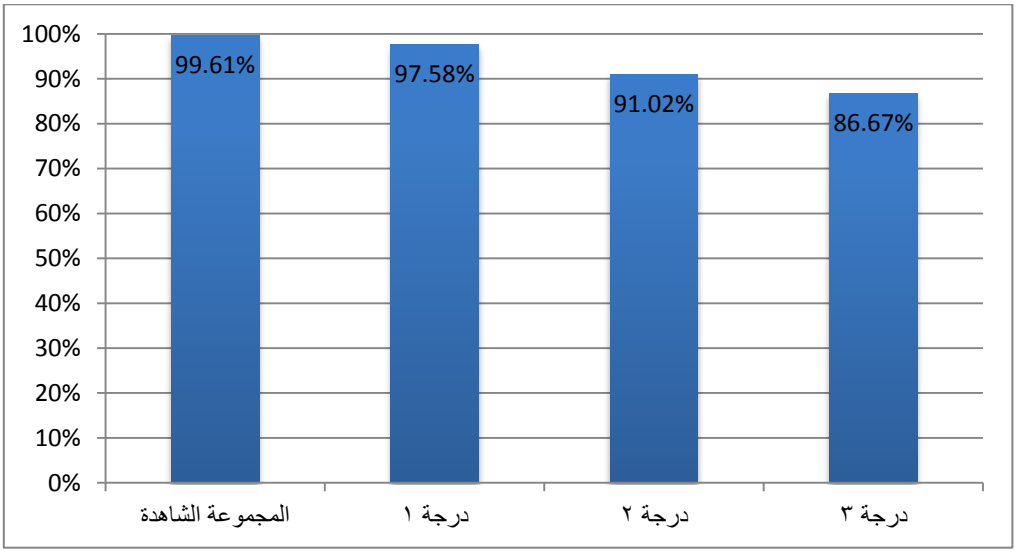
يتضح من نتائج الاختبار وبثقة ٩٥%، وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيرية النووية ما بين كل من درجات الإصابة مثنى مثنى، فيما عدا المجموعتين الشاهدة والدرجة الأولى من الإصابة حيث لم توجد فروق ذات دلالة إحصائية.

٣-٣-٣ دراسة علاقة التعبيرية النووية بالتعبيرية الغشائية للملون β-Catenin

يوضح الجدول التالي أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بمتغير نسبة التعبيرية الغشائية في كل من درجات الإصابة:

جدول (٣-١٦) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا ذات التعبيرية الغشائية

درجة الإصابة	المتوسط	الانحراف المعياري	أدنى قيمة	أعلى قيمة
المجموعة الشاهدة	99.607 %	0.138 %	99.38 %	99.83 %
المجموعة الأولى	97.582 %	2.495 %	90.43 %	99.29 %
المجموعة الثانية	91.016 %	2.090 %	86.71 %	94.72 %
المجموعة الثالثة	86.669 %	3.660 %	79.90 %	93.50 %

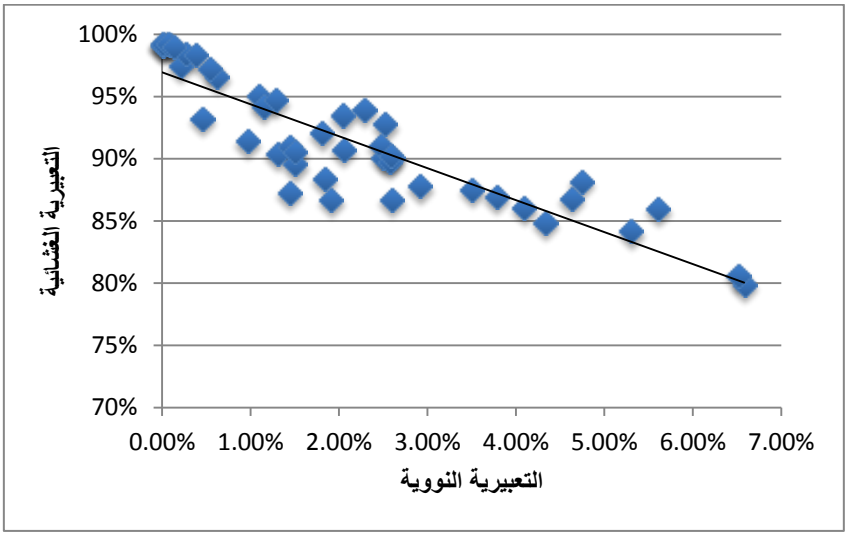


مخطط (٣-٨) نسبة التعبيرية الغشائية في كل من درجات الإصابة

لدراسة العلاقة ما بين كل من التعبيرية النووية و التعبيرية الغشائية نحسب معامل ارتباط بيرسون

وتكون النتائج كما يلي:

جدول (٣-١٧) نتائج اختبار معامل ارتباط بيرسون بين التعبيرية الغشائية والنووية			
المجموعة	معامل الارتباط r	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
المجموعة الأولى	-0.938	0.000 *	علاقة عكسية قوية
المجموعة الثانية	-0.435	0.081	لا توجد علاقة دالة
المجموعة الثالثة	-0.861	0.000 *	علاقة عكسية قوية
كامل العينة	-0.918	0.000 *	علاقة عكسية قوية



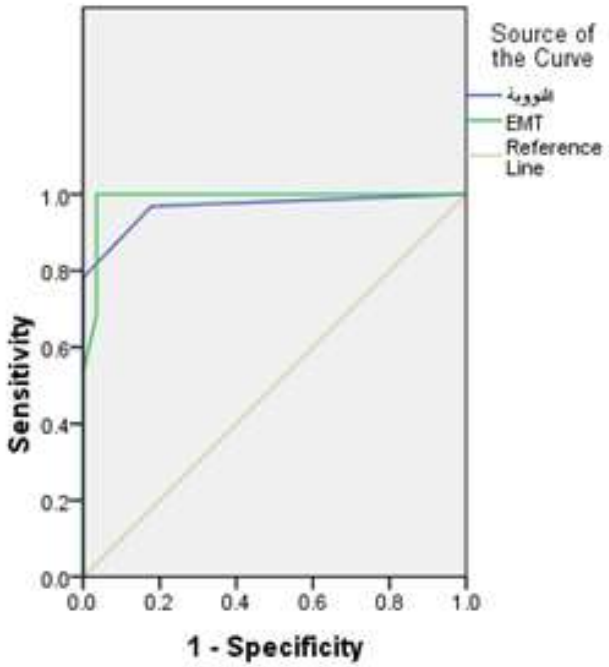
مخطط (٣-٩) العلاقة ما بين التعبيرية النووية و التعبيرية الغشائية

نلاحظ من النتائج وجود علاقة عكسية قوية ما بين التعبيرية الغشائية والتعبيرية النووية، وذلك بثقة ٩٥%. وذلك في العينة كاملة. أما في المجموعة الثانية لم نجد علاقة ذات دلالة إحصائية.

٣-٣-٤ دراسة إمكانيّة التّنبّؤ بالتّحوّل نحو الخباثة اعتماداً على الـβ-Catenin :

اعتماداً على اختباري تحليل التباين One-Way ANOVA السابقين تم تقسيم العينة إلى مجموعتين جديدتين بهدف رسم منحنىROC وهما مجموعة الاحتمالية المنخفضة للتحول الخبيث ومجموعة الاحتمالية العالية للتحول الخبيث.

ثم رُسم منحنيي ROC أحدهما لدراسة العلاقة بين قيم نسبة التعبيريّة النووية للβ-Catenin والتحول نحو الخباثة، والثاني لدراسة العلاقة بين قيم نسبة الخلايا EMT والتحول نحو الخباثة (مخطط ٣-١٠)، ثمّ تمّ حساب المساحة تحت المنحنيين (AUC)(الجدول ٣-١٨).



مخطط (٣-١٠) منحنيي ROC
اللون الأزرق لنسبة التعبيرية النووية
اللون الأخضر لنسبة الخلايا EMT

حيث يلاحظ من الجدول أن المساحتين المحسوبتين تحت منحنيي ROC تقع في المجال [0.9-1] ومستوى الدلالة P.value أصغر من 0.05 مما يدل على قوة التوافق في الاختبارين المدروسين وذلك عند مستوى ثقة 95%. وبالتالي يمكن اعتبار كلٍّ من نسبة التعبيرية النووية للβ-Catenin ونسبة الخلايا EMT اختبارين جيدين للتنبؤ بالتحول نحو الخباثة في عينة البحث.

جدول (٣-١٨) حساب المساحة تحت منحنيي ROC

المتغيّر المدروس	المساحة تحت منحنيي ROC	الخطأ المعياري	مستوى الدلالة P.value	شدّة التّوافق
نسبة التعبيرية النووية	0.965	0.023	0.000	ممتاز
نسبة الخلاياEMT	0.968	0.014	0.000	ممتاز

وتمّ حساب الحساسيّة والنّوعيّة لعدّة مقادير من نسبة التعبيريّة النووية للـβ–Catenin، وكذلك خلايا EMT وذلك اعتماداً على قيمها في المجموعتين الجديدتين في عيّنة البحث (الجدولين ٣–١٩، ٢٠). وذلك لتحديد القيمة المعيارية للملون المناعي β–Catenin للتّنبّؤ بالتّحوّل نحو الخباثة في سوء التصنع البشروي الفموي.

جدول (٣–١٩) نتائج حساب الحساسية والنوعية لنسبة التعبيريّة النووية للـβ–Catenin

احتمال التحول الخبيث عندما تكون نسبة التعبيرية النووية للـβ–Catenin تساوي أو أكبر من:	الحساسية المحسوبة	النوعية المحسوبة
0.5%	1	0.821
1%	1	0.891
1.5%	**0.981**	**1**
2.5%	0.500	1
3.5%	0.281	1
4.5%	0.188	1
5.5%	0.094	1
6.5%	0.063	1
8%	0.000	1

يلاحظ في الجدول السّابق أنّ أفضل تناسب بين الحساسيّة والنّوعيّة كان عند القيمة 1.5%، حيث كانت قيمة الحساسيّة تساوي **0.981**، وكانت قيمة النّوعيّة تساوي الواحد الصحيح، وبالتّالي نستنتج أنّه يمكن تحديد القيمة 1.5% قيمةً معياريّةً لنسبة التعبيريّة النووية للـβ–Catenin كإنذار للتّحوّل نحو الخباثة في عيّنة البحث.

جدول (٣-٢٠) نتائج حساب الحساسية والنوعية لنسبة الخلايا EMT		
احتمال التحول الخبيث عندما تكون نسبة الخلايا EMT تساوي أو أكبر من:	الحساسية المحسوبة	النوعية المحسوبة
0.5%	1	0.393
1.5%	1	0.446
2.5%	1	0.543
3.5%	1	0.609
4.5%	1	0.821
5.5%	1	0.893
6.5%	1	0.929
7.5%	**1**	**0.964**
8.5%	0.906	0.964
9.5%	0.813	0.964
10.5%	0.781	0.964
11.5%	0.688	0.964
12.5%	0.531	1
13.5%	0.438	1
14.5%	0.406	1
16.5%	0.250	1
17.5%	0.125	1
18.5%	0.094	1
19.5%	0.063	1
20%	0.000	1

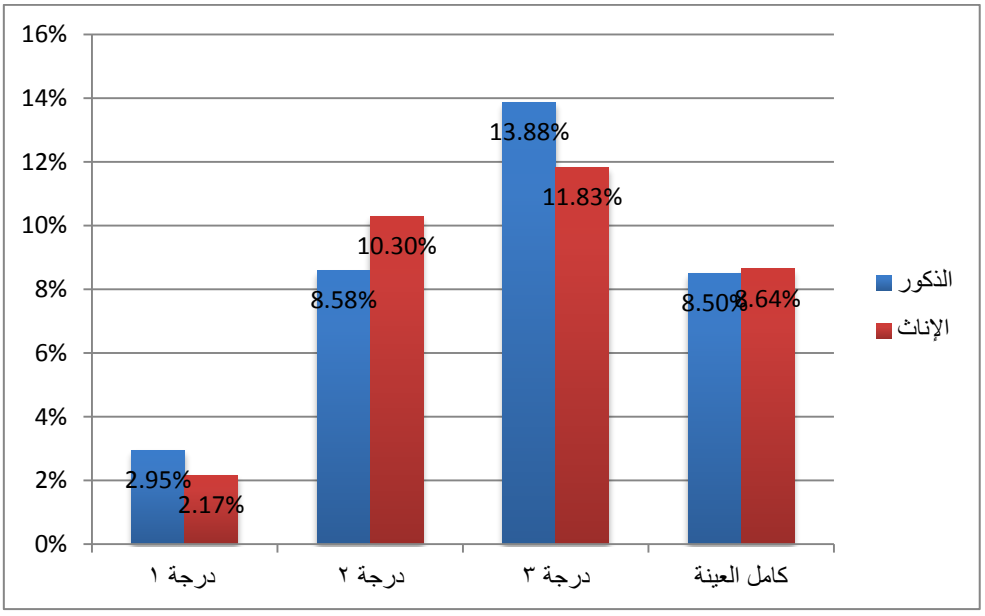
يلاحظ في الجدول السّابق أنّ أفضل تناسب بين الحساسيّة والنّوعيّة كان عند القيمة 7.5%، حيث كانت قيمة الحساسيّة تساوي الواحد الصحيح، وكانت قيمة النّوعيّة تساوي 0.964، وبالتّالي نستنتج أنّه يمكن تحديد القيمة 7.5% قيمةً معياريّةً لنسبة الخلايا EMT كإنذار للتّحوّل نحو الخباثة في عيّنة البحث.

٣-٣-٥ دراسة تأثير جنس المريض في الـEMT

لدراسة تأثير جنس المريض في نسبة الخلايا EMT، ندرس نسبة الخلايا EMT لدى كل من الذكور والإناث، و تتلخص النتائج في الجدول التالي:

جدول (٣-٢١) الإحصاءات الوصفية لنسبة الخلايا EMT لدى كلا الجنسين

درجة الإصابة	الذكور		الإناث	
	المتوسط	الانحراف المعياري	المتوسط	الانحراف المعياري
المجموعة الأولى	2.949 %	2.650 %	2.167 %	2.385 %
المجموعة الثانية	8.580 %	1.977 %	10.300 %	2.151 %
المجموعة الثالثة	13.878 %	3.655 %	11.833 %	3.724 %
كامل العينة	8.504 %	5.288 %	8.639 %	4.943 %



مخطط (٣-١١) مقارنة نسب الخلايا EMT في كل من درجات الإصابة بين الذكور والإناث

نقارن نسبة الخلايا EMT بين الذكور والإناث في كل من مجموعات درجة الإصابة وفي كامل العينة وذلك باستخدام اختبار ستيودنت لعينتين مستقلتين، ونحصل على النتائج التالية:

جدول (٣-٢٢) نتائج اختبار ستيودنت بين الإناث والذكور

درجة الإصابة	متوسط الفرق	إحصاء الاختبار t	مستوى الدلالة P.value	الاستنتاج
المجموعة الأولى	0.327 %	0.191	0.852	لا توجد فروق دالة
المجموعة الثانية	-1.720 %	-1.494	0.156	لا توجد فروق دالة
المجموعة الثالثة	2.046 %	0.954	0.357	لا توجد فروق دالة
كامل العينة	-0.135 %	-0.075	0.941	لا توجد فروق دالة

نلاحظ من نتائج الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة الخلايا EMT ما بين الذكور والإناث، ما يعني عدم وجود تأثير لجنس المريض في نسبة الخلايا EMT.

الباب الرابع: المناقشة

Discussion

إنّ سرطان الفم شائك الخلايا هو السرطان الأكثر شيوعاً من سرطانات الرأس والعنق ويسجَّل ما يفوق ٣٠٠٠٠٠ حالة سنويّاً حول العالم، ويعتبر من أهمّ مسبّبات الموت حيث معدّل بقاء المصاب لمدّة خمس سنوات أقل من ٥٠% (Greenlee et al., 2000). وإنّ التشخيص المبكِّر للسرطانات بشكل عام هو أهمّ العوامل التي تحسّن من إنذارها. وإنّ معظم سرطانات الفم شائكة الخلايا تنشأ عن آفات ما قبل سرطانية (Thompson, 2006)، والتي يأتي على رأسها الطلاوات الفموية (Mithani et al., 2007) (Neville et al., 2009b) حيث أنَ أكثر من ٥٠% من السرطانات شائكة الخلايا الفمويّة تحوّلت عن آفات سوء تصَنع بشرويَة قبيل سرطانيَة (Speight, 2007).

لذلك يقترح (Neville et al., 2009b) معالجة الطلاوات التي تبدي سوء تصنّع متوسط إلى شديد بإزالتها بشكل كامل سواء بالاستئصال الجراحي أو التجريف الكهربائي أو بتطبيق الليزر خوفاً من تحوّلها الخبيث مع مراقبة طويلة الأمد للمريض للتأكد من عدم ظهور آفات أخرى. أما الطلاوات التي لا تبدي علائم سوء التصنّع أو تبدي سوء تصنّع بسيط فتستطب فيها المعالجة المحافظة والإقلاع عن التدخين والكحول بالإضافة للمراقبة كل ٦ أشهر للتأكد من عدم تقدّم الآفة وزيادة سوء التصنّع فيها، عندها لابد من استئصالها كليّاً. وفي الوقت نفسه يطرح (Neville et al., 2009b) تساؤلاً حول ماتشير إليه الدراسات التي يتمّ فيها متابعة المرضى (Follow up-Studies) حيث بيّنت تلك الدراسات بقاء العديد من الآفات الفموية الطلاوية لمدة تزيد عن عشر سنوات وقد تصل إلى ٢٠ سنة دون أن يطرأ عليها أي تقدم يذكر رغم احتواء بعضها على علائم مختلفة من سوء التصنّع، وإحدى هذه الدراسات بقيت فيها بعض الآفات ما يفوق نصف قرن (Neville et al., 2009b).

كذلك تحدث (Martorell-Calatayud et al., 2009) عن معالجة الطلاوة الفموية حيث قسّمها إلى طلاوات عالية الخطورة تشمل الطلاوات غير المتجانسة سريرياً إضافة إلى الطلاوات الحاوية على سوء التصنّع البشروي بمختلف درجاته، وطلاوات منخفضة الخطورة وتشمل الطلاوات دون سوء التصنّع أو مع سوء تصنع بسيط شرط أن تكون متجانسة سريرياً وصغيرة الحجم أصغر من ٢ ملم ولا تشغل مناطق تشريحية خطرة (قاع الفم وباطن ووحشي اللسان). وقد أكّد على ضرورة الاستئصال الجراحي الكامل للطلاوات عالية الخطورة.

في حين اكتفى بالمعالجة المحافظة للطلاوات منخفضة الخطورة فكانت بإيقاف التدخين وشرب الكحول، وتطبيق الوقاية الكيميائية (chemoprevention) كالـ Retinoids والفيتامينات A, C, E سواء موضعياً أو جهازياً أو بالمضادات الفطرية في الطلاوات المرتبطة بالكانديدا ومراقبة المريض، فإذا لم يحدث تراجع للآفة خلال ثلاثة أشهر نلجأ إلى المعالجة بالتبريد (Cryosurgery) أو بتطبيق الليزر (Carbon dioxide laser)، ثم نتوجه إلى الإستئصال الجراحي الكامل ما لم تحدث استجابة للعلاج المحافظ حتى ولو صُنِّفت الآفة على أنّها منخفضة الخطورة في البداية.

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

وهذا ما أشار إليه أيضاً (Mehta et al., 1969) في دراسة سريرية شملت ٥٠٩١٥ حالة حيث ذكر أن هناك ميلاً بنسبة ١٥% للتحوّل الخبيث في الآفات الخالية من علائم سوء التصنّع.

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

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

لذلك يمكن أن يكون مفهوم التحول الظهاري الميزانشيمي وتحري واسماته المختلفة أحد الحلول الممكنة لهذا التساؤل.

وقد تم إجراء هذا البحث بهدف التحقق من التحول الذي يطرأ على الخلايا الظهارية في مثل هذه الآفات ويجعلها قادرة على الهجرة وانتقالها من مكانها الأصلي إلى النسيج الميزانشيمي المجاور، وكان ذلك عبر تحري التغيرات التي تطرأ على البروتين الغشائي β–Catenin والذي هو جزء من المعقد E–cadherin/catenin والذي يمثل أحد بروتينات اللصق الخلوي (Wijnhoven et al., 2000)

ولما كان تقرير المعالجة للآفات الطلاوية الفموية يعتمد بشكل أساسي على تقدير درجة سوء تصنّعها كان لابد من إيجاد وسيلة لتقييم تلك الدرجة وهذا ما حاولت أنظمة التصنيف المختلفة فعله منذ عام ١٩٧١م حتى اعتماد تصنيف منظمة الصحة العالمية (WHO System) عام ٢٠٠٥م (Barnes et al., 2005) وهو ما اعتُمِد في بحثنا هذا، ثم ظهر في نفس العام نظام التصنيف الثنائي (Binary System) والذي يراعي تقرير المعالجة بين المعالجة الجراحيّة والمعالجة المحافظة (Rastogi et al., 2013).

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

وقد لمسنا ذلك في بحثنا عند تقييم الدرجة النسيجية لسوء التصنع الفموي البشروي للخزعات المأخوذة من آفات فموية بعدما قمنا بتلوينها بالهيماتوكسلين أيوزين. فكان من الصعب أحياناً تقييم هذه الدرجة بدقة رغم اعتمادنا على معايير نظام التصنيف WHO 2005 . وكان يتطلب التقييم إعادة التشخيص مراراً وتكراراً بهدف التوصل لقرار سليم فيما يخص درجة سوء التصنّع ووضعها في المجموعة المناسبة.

وبالتالي قد يكون استخدام واسمات التحوّل الظهاري الميزانشيمي المختلفة أحد الحلول المقترحة لتلافي تلك المشكلة ولاعتماد القرار الصائب في معالجة الآفات الفمويّة البشرويّة. فاستخدام الملون المناعي الـβ–Catenin قد يوجّه المشرح المرضي لتقييم درجة سوء التصنّع وتقدير احتماليّة التحوّل الخبيث للآفة وبالتالي اتخاذ التدابير العلاجيّة اللازمة بثقة أكبر.

٤-١ التحوّل الظهاري الميزانشيمي في سوء التصنّع البشروي الفموي

تم وصف مفهومي التحوّل الظهاري الميزانشيميEMT ونقيضه التحوّل الميزانشيمي الظهاري MET لأول مرّة من قبل Elizabeth Hay في ستينيّات القرن الماضي (Hay et al., 1967) (Thiery et al., 2009)

تمر عمليّة التحوّل عبر مجموعة من المراحل المتلاحقة، فعندما تصبح الخلايا الظهاريّة مؤهّهبة للاستجابة إلى إشارات التحريض فإنّ هذِه الإشارات تقود عمليّة تفكيك معقدات الاتصال الخلوي وتُفقد الخليّة استقطَابَها. تُعتبر هذه التبدّلات على الغشاء الخلوي حاسِمة كي تُغادر الخلايا الظهارة وتبدأ بالهجرة الفردية (Moreno-Bueno et al., 2008). تَحدُث هذه التبدّلات أولاً عن طريق تشكيل التضيُّق الذروي و زوال انتظام القالب الهيكلي للخليّة (Martin et al., 2009). يقود ماسبق بالتزامن مع نشاط البروتياز إلى تحطيم الغشاء القاعدي و عبور الخلايا إلى النسيج الضام (Haraguchi et al., 2008).

تكتمل عمليّة التحوّل الظهاري الميزانشيمي بتخرُّب الغشاء القاعدي الواقع أسفل الخليّة المتحوِّلة ثمّ تشكّل الخليّة الميزانشيميّة القادرة على الهجرة بعيداً عن الطبقة الظهاريّة التي نشأت عنها.

تَشتَرِكُ العديد من العملياتِ الجُزيئيّةِ المنفصِلة بهدف بَدْء عمليّة التحوّل الظهاري الميزانشيمي وتمكِينِها من الاكتِمال. تَشتَمِل هذه العمليَّات على تفعيل عوامل الانتساخ و تعبيريّة بروتينات سطحيّة معيّنة وإعادة تنظيم تعبيريّة بروتينات هيكليّة وإنتاج أنزيمات مخرِّبة للمادة خارج الخلوية إضافةً إلى تبدّلات في تعبيريّة بعض سلاسل الـ RNA. وفي العديد من الحالات يمكن أن تستخدم هذه العوامل المشاركة كواسمات حيويّة لتوضيح المسار الذي تسلكه الخليّة أثناء حدوث التحوّل الظهاري الميزانشيمي(Zeisberg and Neilson, 2009) .

وقد تبيّن من خلال بحثنا وجود علاقة بين التحوّل الظهاري الميزانشيمي ودرجة سوء التصنّع البشروي الفموي، حيث وضّح اختبار ANOVA وجود فروق دالة إحصائياً في نسبة الخلايا الآخذة بالتحوّل بين المجموعات الثلاث أي بين درجات سوء التصنّع المختلفة. فقد كانت نسبة هذه الخلايا تزداد مع زيادة درجة سوء التصنّع فكانت متوسّطاتها 0.394 % للمجموعة الشاهدة و2.418 % في درجة سوء التصنّع البسيط و8.985 % في درجة سوء التصنّع المتوسط و13.333 % في درجة سوء التصنّع الشديد. ووجد فروق دالة إحصائياّ بين كل مجموعتين ما عدا المجموعة الشاهدة والمجموعة الأولى مما يدلّ على انخفاض احتماليّة الـEMT في آفات سوء التصنّع البسيط. لكن وجود فروق دالة إحصائياً بين العيّنة الشاهدة والمجموعتين الثانية والثالثة يدل على الاحتماليّة العالية للـ EMT لآفات سوء التصنّع من الدرجة المتوسّطة والشديدة.

وقد اتفقنا في دراستنا مع (Ishida et al., 2007) من حيث زيادة التحوّل الظهاري الميزانشيمي مع زيادة الدرجة النسيجية لسوء التصنّع، لكنّه قسَّم عيّنته إلى مجموعة الطلاوات الخالية من سوء التصنّع أو الحاوية على سوء تصنّع بسيط ومجموعة أخرى تحوي الطلاوات ذات سوء التصنّع المتوسّط والشديد. بمعنى آخر اعتمد التصنيف الثنائي لآفات سوء التصنّع. كما أنّه أضاف عينة من السرطان شائك الخلايا.

واتفقنا مع (Chaw et al., 2012) من حيث زيادة التحوّل الظهاري الميزانشيمي مع زيادة الدرجة النسيجية لسوء التصنّع. لكنّه وجد علاقة بين المجموعة الطبيعية والمجموعة ذات سوء التصنّع البسيط. واستخدم واسمات أخرى للـEMT وهي الـE-Cadherin والـ APC والـ Vimentin.

وتقاطعت دراستنا مع (Miyazaki et al., 2013) حيث استخدم الـ activation-induced cytidine deaminase (AID) والمعروف عن هذا الأنزيم دوره في إحداث وغزو السرطانات البشروية. فقد وجد Miyazaki علاقة طردية بين تعبيرية كل من الـAID والـSnail (أحد واسمات الـEMT). وورد في نتائجه زيادة تعبيرية الـAID والـEMT مع زيادة الدرجة النسيجية لسوء التصنّع البشروي الفموي.

كما اتفقنا مع (Kaur et al., 2013) من ناحية وجود التحول الظهاري الميزانشيمي في سوء التصنّع البشروي الفموي، ولكنه لم يدرس العلاقة بين الدرجات المختلفة من سوء التصنّع.

وكذلك اتفقنا مع (Peng et al., 2009) فقد وجد علاقة للـEMT لتطور سوء التصنع إلى كارسينوما في المري. وفي زيادة تعبيرية واسمات الـEMT مع زيادة درجة سوء التصنع.

اختلفنا مع (Lo Muzio et al., 2009) فهو لم يجد فرقاً دالاً إحصائياً بين الدرجات المختلفة من سوء التصنّع ووصف الواسم β-Catenin بأنّه محدود القدرة على التنبّؤ بالتحوّل الخبيث للآفات، قد يكون السبب لأنه لم يأخذ بعين الإعتبار سوى التعبيرية الغشائية الطبيعية للملون حيث اعتبرها إيجابية كما أنه استخدم إضافة للـ β-Catenin الملون الواسم الـgamma-catenin أيضاً. وذلك ممكن حيث أننا واجهنا بعض الخلايا التي وجد فيها تعبيرية β-Catenin في النواة والغشاء معاً.

وقد تقاطعت دراستنا مع دراسة (Zaid, 2014) من حيث زيادة EMT كلما ازدادت درجات الخباثة النسيجية، لكن دراسته كانت في السرطان شائك الخلايا الفموي وليس سوء التصنّع البشروي الفموي.

وذلك ينطبق على دراسة (Ibraheem, 2015) حيث قامت بتحري التعبيرية الغشائية للـCadherins في الدرجات الثلاثة للسرطان شائك الخلايا، وهذه البروتينات تعتبر واسمات

للتحول الظهاري الميزانشيمي، وكانت نتائج دراستها انخفاض تعبيرية الـE- Cadherin وزيادة تعبيرية الـN- Cadherin كلما ازدادت درجات الخباثة النسيجية، وهذا ما يحدث لتعبيرية تلك الكادهرينات مع تقدم الـEMT.

٤-٢ التعبيرية النووية لـ **β-Catenin** في سوء التصنع البشروي الفموي

تم اكتشاف بروتين β-catenin في أوائِل التسعينات من القرن الماضي كجزء من معقّد الارتباط الخلوي لدى الثديّات، وكبروتين مسؤول عن الإرساء الهيولي للكادهيرينات (McCrea et al., 1991)، لكن بعد فترة وجيزة تم التعرُّف على دورِه في تفعيل عوامِل الانتساخ (Kemler, 1993)، في الظروف الطبيعيّة يتفَسفَر β-catenin الحر بسرعة عن طريق GSK3β في المعقّد الحاوي على بروتين داء السلائل القولوني الورمي الغدي (APC) وهوaxin/GSK3β/APC ويتحطَّم لاحقاً في البروتيازومات (Clevers, 2006). لكن وُجِد بشكل شائع في العديد من الحالات السَرَطانيّة أنّ الكابح الورمي APC لم يكن وظيفيّاً أو أنّ نشاط GSK3β كان مُنخفِضاً بسبب تفعيل سبيل اشارات Wnt، فوجدت كميّة كبيرة من β-catenin في الهيولى تمكّنت بدورها من الهجرة إلى النواة، حيث تعمل كعامل مساعد لعامل الانتساخ الورمي TCF وتعطيه القدرة الانتساخيّة (Nawshad et al., 2005). يؤدّي هذا الارتباط إلى زيادة تعبيريّة عدد من الجينات والعناصِر المُستهدَفة التي تحتاجها عمليّة التكاثر الورمي والهجرة والغزو إضافةً إلى عمليّة التحوّل، مثل c-Myc، cyclin D1، Slug، Vimentin (Polakis, 2007). و قد لوحظت هذه الحركة للـβ-catenin من الغشاء السيتوبلاسمي إلى النواة في العديد من الأورام الظهارية والنسائل الخلويّة السَرَطانيّة، ما يُشير إلى كون β-catenin يلعب دوراً جوهريّاً في العمليّات الورميّة.

وقد تبيّن من خلال بحثنا عدم ظهور أي تعبيريّة نوويّة في المجموعة الشاهدة وذلك منطقي لأنّ العينة الشاهدة تمثّل المخاطيّة الفمويّة السليمة، في حين كانت التعبيريّة النوويّة شبه معدومة في المجموعة الأولى حيث كان متوسّط النسبة 0.358% من مجموع الخلايا، وفي المجموعة الثانية 2.108% وفي المجموعة الثالثة 3.705%.

ويتبيّن وجود زيادة في نسبة التعبيريّة النوويّة لـ β–Catenin مع زيادة درجة سوء التصنّع من خلال ما أوجده تحليل ANOVA حيث نجد فروقاً ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيريّة النوويّة ما بين مجموعات درجات الإصابة، كما نلاحظ وجود فروق ذات دلالة إحصائية في نسبة التعبيريّة النوويّة ما بين كل من درجات الإصابة عدا الفرق بين المجموعة الأولى والمجموعة الشاهدة لم يكن ذا دلالة إحصائية.

وذلك يدلّ على زيادة تكدس بروتين الـβ–Catenin في النواة مع زيادة الدرجة النسيجية لسوء التصنع البشروي الفموي. والأسباب الممكنة لذلك كثيرة، فإما لتورط مسلك إشارات Wnt في ذلك أو لشذوذ في الـβ–Catenin نفسه أو في أحد البروتينات أو الأنزيمات التي تشارك في ضبط مستوياته ضمن الخلية، مما يزيد قدرة الخلية على التحوّل الظهاري الميزانشيمي. وذلك يزداد في المجموعتين الثانية والثالثة في حين يفتقد تقريباً في المجموعة الأولى حيث لم يوجد فرقاً ذو دلالة إحصائية بينها وبين المجموعة الشاهدة ذات التعبيرية النووية المعدومة للـβ–Catenin.

اتفقنا مع (Ishida et al., 2007) لكن كان الخلاف في نسبة الخلايا ذات التعبيريّة النوويّة حيث كانت أعلى في دراسته قد يعود السبب، لاعتماده الخزعة أو الحالة (Sample) كوحدة لدراسته بينما كانت وحدة دراستنا هي الخلية، فكانت النسب في دراسته 0.0% للتعبيرية النووية في المجموعة الشاهدة الطبيعية، و 29% في الطلاوة الخالية من سوء التصنّع وذات سوء التصنع البسيط، و92% في سوء التصنع المتوسط والشديد. كما أنه وجد فرقاً دالاً إحصائيّاً بين

المجموعة الشاهدة الطبيعيّة ومجموعة الطلاوة الخاليّة من سوء التصنّع وذات سوء التصنّع البسيط أمّا نحن فلا ربما لأنه تحرى أيضا تعبيرية كل من الـ c-MYC والـCyclin D1 ووجد علاقة في زيادة تعبيرية كل منهما مع زيادة التعبيرية النووية للـβ-Catenin. وأشار إلى احتمال تورط مسلك Wnt في التحوّل السرطاني للآفات الطلاوية.

واتفقنا مع (Chaw et al., 2012) حيث وجد زيادة واضحة لتعبيرية الـβ-catenin النووية مع زيادة الدرجة النسيجية لسوء التصنّع البشروي الفموي لكنه وجد فرقاً دالاً إحصائياً بين المجموعة الشاهدة ومجموعة سوء التصنّع البسيط.

واتفقنا مع (Sato et al., 2002) الذي أجرى دراسته على سوء التصنّع البشروي الفموي المستحدث لدى الجرذان. وتوصل إلى إمكانية اعتماد تعبيرية الـβ-catenin النووية للتنبؤ باحتمالية التحول الخبيث لآفات سوء التصنع شرط أن يكون هذا التراكم غير ناتج عن طفرة بالبروتين الـβ-catenin .

واتفقنا مع (Kaur et al., 2013) من حيث وجود تعبيرية نووية واضحة للـβ-catenin في سوء التصنّع البشروي الفموي، ولكنه لم يدرس العلاقة بين الدرجات المختلفة من سوء التصنّع.

واتفقنا مع (Peng et al., 2009) من حيث زيادة التعبيرية النووية للـβ-catenin مع زيادة الدرجة النسيجية لسوء التصنّع البشروي في المري.

اختلفنا مع (Lo Muzio et al., 2009) فهو لم يجد فرقاً دالاً إحصائياً لتعبيرية الـ β-catenin في الدرجات المختلفة لسوء التصنّع. لأنه لم تشمل دراسته التعبيرية النووية كمتغير.

وكذلك تقاطعت دراستنا مع دراسة (Alfakeer, 2015) حيث قامت بدراسة تعبيرية Cyclin D1 وهو أحد نواتج مسلك Wnt فوجدت زيادة في تعبيريته النووية مع زيادة الدرجة

النسيجية لسوء التصنّع البشروي الفموي، مما يدل على زيادة التعبيرية النووية للـβ-Catenin أيضاً وتورّط مسلك Wnt في تلك التعبيرية وهذا يدعم دراستنا.

ونتائجنا تتوافق أيضاً مع الدراسات التي تمّ فيها تحرّي تعبيرية الـβ-Catenin النووية في السرطانات في مواقع مختلفة من الجسم، حيث تزداد التعبيريّة النوويّة للـ β-catenin مع زيادة الدرجة النسيجية للخباثة في كل من تلك السرطانات.

وذلك عند (Zaid, 2014) (Laxmidevi et al., 2010) في سرطان الفم شائك الخلايا.

وعند (Pukkila et al., 2001) في سرطانات البلعوم.

وعند (Fadare et al., 2005) في سرطان عنق الرحم.

وعند (Kaler et al., 2012) في سرطانات الكولون.

وهذا يوحي بفكرة الاعتماد على التعبيرية النووية للـ β-catenin للتنبؤ باحتمالية التحوّل الخبيث للآفات الحاوية على سوء التصنّع البشروي الفموي.

٤-٣ العلاقة بين التعبيرية الغشائية و التعبيرية النووية للـ **β-Catenin**

إنّ بروتين الـ β-catenin هو جزء (Subunit) من بروتين اللصق الخلوي الـ E-cadherin لذا فإنّ الشذوذات في هذه البروتينات تؤثر في الارتباط بين الخلايا الظهاريّة. وعندما لا يعمل مكوِّن واحد من مكوِّنات المعقّد β-catenin / E-cadherin بالشكل المناسب تتأثر وظائف المعقّد بشكل كبير وتؤثر في التصاق الخلية الظهارية بجاراتها (Van Aken et al., 1993).

وبالتالي فقدان الخلية لاستقطابها، وهنا يأتي دور بروتين الـβ-catenin ذي الوظيفة المزدوجة، حيث إنّه يقوم بدور أساسي في ارتباط الموصلات الملتصقة داخل الخلية مع خيوط الأكتين

داخل الخلوية، كما يلعب دوراً رئيسياً في سبيل إشارات Wnt حيث إنّه سوف يتحرّر ويتراكم في النواة.

تبيّن في بحثنا أنّ التعبيرية الغشائية للـ β-catenin تنخفض مع زيادة الدرجات النسيجية لسوء التصنّع البشروي الفموي حيث كانت متوسطات النسب 99.6% للمجموعة الشاهدة و97.5% للمجموعة الأولى و91% للمجموعة الثانية و86.7% للمجموعة الثالثة.

من خلال إجراء معامل ارتباط بيرسون تبيّن لنا وجود علاقة عكسية قوية بين التعبيرية الغشائية للملون وتعبيريته النووية حيث نلاحظ أنّ انخفاض نسبة التعبيرية الغشائية للـ β-catenin مع زيادة الدرجات النسيجية لسوء التصنّع البشروي الفموي ترافقه زيادة في تعبيريته النووية.

وذلك في مجمل العينة من جهة وفي المجموعتين الأولى والثالثة من جهة أخرى، حيث كانت قيمة معامل ارتباط بيرسون ($r > 0.70$) فالعلاقة قوية وذات قيمة سالبة فالعلاقة عكسية وكانت قيمة P ($P\text{-value} < 0.05$) فالعلاقة ذات دلالة إحصائية.

مما يدل على أنّ الخلايا مع زيادة سوء تصنّعها تنخفض فيها التعبيرية الغشائية للـ β-catenin، أي ينفصل الـ β-catenin عن الـ E-Cadherin تدريجياً في معقّدات الالتصاق الخلوي المتوزعة على غشاء الخلية وبالتالي تفقد قدرتها على الالتصاق بالخلايا المجاورة مما يكسبها بعض صفات الخلايا الميزانشيمية وهي حرية الحركة. وفي المقابل يزداد تواجد بروتينات الـ β-catenin في النواة لعدم قدرة الخلية على تفكيكه في السيتوبلازما، وقد يكون مسلك Wnt متورطاً في كبح تفكيكه وبالتالي تكدسه في النواة لانتساخ الجينات التي تعطي الخلية صفات ميزانشيمية أخرى كقدرتها على انتاج الأنزيمات الحالة للمادة خارج الخلوية. وذلك يشبه التحوّل الذي يطرأ على الخلايا السرطانية في السرطانات البشروية عموما (Thiery, 2002)

في حين كانت قيمة معامل الارتباط في المجموعة الثانية –سوء التصنع المتوسط– (r=0.435<0.70) وقيمة P (P–value=0.081 > 0.05) فبالتالي العلاقة ضعيفة وليس لها دلالة إحصائية. وذلك بسبب تشتت نسب الخلايا ذات التعبيرية الغشائية ونسب الخلايا ذات التعبيرية النووية، وبمعنى أوضح وجد في نتائج المجموعة الثانية بعض الخزعات تبدي تعبيرية غشائية عالية في حين تبدي تعبيرية نووية عالية أيضاً. وبعضها الآخر على العكس يكون فيها كلا التعبيرين منخفضاً. قد يعود سبب هذا إلى صعوبة تشخيص سوء التصنّع من الدرجة المتوسطة أساساً بالاعتماد على الملونات التقليدية. فبعضها يمكن أن تكون أقرب إلى سوء التصنع الشديد وبعضها الآخر قد تكون أقرب إلى سوء التصنع البسيط.

ولكن عند إجراء معامل الارتباط بيرسون r على مجمل العينة كانت النتيجة وجود علاقة عكسية قوية بين التعبيرين الغشائي والنووي للـβ–Catenin.

نتفق بتلك النتيجة مع (Ishida et al., 2007) الذي اعتمد أيضاً على تحري تعبيرية كل من cyclin D1 و c–myc للتأكد من النشاط النووي لـ β–catenin في عملية الانتساخ.

واتفقنا كذلك مع كل من

(Sato et al., 2002)

(Chaw et al., 2012)

(Lo Muzio et al., 2009)

(Kaur et al., 2013)

ومع (Ibraheem, 2015) حيث وجدت انخفاضاً في التعبيرية الغشائية الـE–Cadherin وذلك يدل على انخفاض التعبيرية الغشائية لـ β–catenin.

٤-٤ إمكانيّة التّنبّؤ بالتّحوّل نحو الخباثة اعتماداً على الـ**β-Catenin**

اعتماداً على نتائجنا السابقة من اختباري تحليل التباين One-Way ANOVA تم تقسيم العينة إلى مجموعتين جديدتين بهدف رسم منحنىROC وهما:

- المجموعة الأولى: ذات الاحتمالية المنخفضة للتحول نحو الخباثة وتشمل المجموعتين الشاهدة وذات سوء التصنّع البسيط، فنظراً لنتائج سابقة في بحثنا تبين أن هاتين المجموعتين لايوجد فرقاً دالاً أحصائياً بينهما وكانت احتمالية تحولهما الخبيث منخفضة.
- المجموعة الثانية: ذات الاحتمالية العالية للتحول نحو الخباثة وتشمل المجموعتين ذات سوء التصنّع المتوسط وذات سوء التصنّع الشديد، فحسب نتائجنا السابقة تبين وجود احتمالية عالية لتحول هاتين المجموعتين نحو الخباثة.

ثم رُسم منحنيي ROC لكل من نسبة التعبيرية النووية للـβ-Catenin ونسبة الخلايا الآخذة بالتحول وحُسبت المساحة تحتهما (AUC) فتبين أنّ كلا المساحتين تقع ضمن المجال [1 - 0.9] وهذا يدل على أن المُشعِر المدروس ذو قدرة ممتازة (حسب الجدول ٢-٣) على التمييز بين فئتي المتغير أي بين المجموعة الأولى والمجموعة الثانية الجديدتين.

حيث كانت AUC لمشعر نسبة التعبيرية النووية للـβ-Catenin = [1 > 0.965 > 0.9]

مما يدل على أنّ هذا المشعر ذو دقة جيدة في التنبؤ بالتحول نحو الخباثة. ولدى حساب القيمة المعيارية لهذا المشعر تبين احتمال التحول الخبيث عندما تظهر التعبيرية النووية للـβ-Catenin في 1.5% أو أكثر من الخلايا.

وكانت AUC لمشعر نسبة الخلايا EMT = [1 > 0.968 > 0.9] مما يدل على أنّ هذا المشعر ذو دقة جيدة في التنبؤ بالتحول نحو الخباثة. ولدى حساب القيمة المعيارية لهذا المشعر تبين احتمال التحول الخبيث عندما تكون نسبة الخلايا الآخذة بالتحول 7.5% أو أكثر.

والخلاصة يمكن التنبؤ بالتحول نحو الخباثة في آفات سوء التصنع البشروي الفموي اعتماداً على الملون الكيميانسيجي المناعي β-Catenin.

اتفقت الدراسة مع (Sato et al., 2002) الذي توصل إلى إمكانية اعتماد تعبيرية الـβ-catenin النووية للتنبؤ باحتمالية التحول الخبيث لآفات سوء التصنع شرط أن يكون هذا التراكم غير ناتج عن طفرة بالبروتين β-catenin. لكنه لم يحدد القيمة المعيارية لأن دراسته كانت على الجرذان.

اختلفنا مع (Lo Muzio et al., 2009) الذي وصف الواسم β-Catenin بأنّه محدود القدرة على التنبّؤ بالتحوّل الخبيث للآفات قبيل السرطانية وقد يعود السبب إلى اعتماده مشعر انخفاض التعبيرية الغشائية للملون β-Catenin ومقارنتها بالـy-Catenin .

٤-٥ تأثير جنس المريض في التحول الظهاري الميزانشيمي

لدى إجراء اختبار ستيودنت لاستقلال العينات تبيّن عدم وجود علاقة ذات دلالة إحصائيّة بين الذكور والإناث مما يدلّ على عدم وجود تأثير لجنس المريض في إمكانيّة أو احتماليّة التحوّل الخبيث. وذلك ينافي ماهو متوقَّع حيث إنّ من المعروف أنّ نسبة إصابة الذكور بالآفات الطلاويّة أعلى من الإناث وتصل النسبة إلى ٧٠% (Neville and Day, 2002) أي لا تأثير للهرمونات الأنثوية أو الذكرية على التحوّل الخبيث للآفات الفموية قبيل السرطانيّة سيئة التصنع البشروي.

وقد ظهر في بحثنا هذا بعض النتائج المختلفة عن غيرها لكنها لندرتها لا يمكن اعتمادها لبناء استنتاجات تدعم فكرة عدم وجود علاقة بين التحول الخبيث للآفات ودرجة سوء تصنّعها، حيث كان لدينا إحدى حالات المجموعة الأولى والتي تضم آفات حاوية على سوء تصنع بسيط ظهرت فيها تعبيرية الملون β-Catenin الشاذة بنسبة عالية وصلت لـ ٩% من مجموع الخلايا وذلك مقارنةً بباقي حالات المجموعة التي لم تتجاوز فيها الخلايا ذات التعبيرية الشاذة نسبة الـ ٣% ما قد يدل على أنّ احتماليّة تحوّل تلك الآفة للخباثة عالية رغم سوء تصنّعها البسيط ما يدعم فكرة كل من (Martorell-Calatayud et al., 2009) و (Mehta et al., 1969) و (Cowan et al., 2001)، كما وجد حالتان من المجموعة الثالثة والتي تضم آفات حاوية على سوء تصنّع شديد ظهرت فيها تعبيرية الملون β-Catenin الشاذة بنسبة منخفضة لم تتجاوز الـ ٦% من مجموع الخلايا وذلك مقارنة بباقي حالات المجموعة التي وصلت فيها الخلايا ذات التعبيريّة الشاذة إلى الـ ١٥% ما قد يدل على أنّ احتمالية تحول تلك الآفة للخباثة منخفضة رغم سوء تصنّعها الشديد، وبذلك يمكن لهذه الآفة أن تبقى لفترة طويلة دون أن تتحول وهذا يشابه ماذكره (Neville et al., 2009b).

ولكن تلك هي عبارة عن افتراضات لا يمكن التأكد من صحتها من خلال بحثنا هذا بل هي بحاجة لدراسات سريريّة أوسع وبحجوم عينات أكبر ومتابعة للمرضى على سنوات.

الباب الخامس: الاستنتاجات

Conclusions

ضمن حدود هذا البحث نستنتج ما يلي:

١. يزداد معدّل التحوّل الظهاري الميزانشيمي مع زيادة درجات سوء التصنّع.

٢. يزداد احتمال تورط مسلك إشارات Wnt في زيادة قدرة الخلية الظهارية الفموية على التحوّل الظهاري الميزانشيمي مع زيادة درجات سوء التصنّع.

٣. وجود علاقة عكسيّة بين التعبيريّة الغشائيّة لـ β–Catenin وتعبيريّته النوويّة في آفات سوء التصنّع البشروية الفموية، حيث تنخفض تعبيريّته الغشائيّة وتزداد تعبيريّته النوويّة والسيتوبلازميّة مع زيادة درجات سوء التصنّع البشروي الفموي.

٤. يمكن استخدام واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي الـ β–Catenin للتنبّؤ باحتماليّة التحوّل الخبيث للآفات الفمويّة البشرويّة.

٥. لا يتأثر التحوّل الظهاري الميزانشيمي بجنس المريض فاحتماليّة التحوّل الخبيث عند كلا الجنسين متقاربة.

الباب السادس: المقترحات والتوصيات

Suggestions and Recommendations

المقترحات:

١. نقترح إجراء دراسات سريرية أوسع على التحول الظهاري الميزانشيمي ودراسات على حيوانات التجربة.

٢. نقترح إجراء الدراسة نفسها ولكن بحجم عينة أكبر تمكن الباحث من دراسة علاقة التحول الظهاري الميزانشيمي بموقع الآفة والشكل السريري لها.

٣. نقترح دراسة التحول الظهاري الميزانشيمي بواسم بروتين الـβ-Catenin وواسمات بروتينات SMAD لتشمل الدراسة كل سبل الإشارة المسؤولة عن التحول.

٤. نقترح إجراء دراسات على التحول الظهاري الميزانشيمي في آفات سوء التصنّع البشروي الفموي بواسمات أخرى.

التوصيات:

١. نوصي باستخدام واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β-Catenin في التنبّؤ باحتماليّة التحوّل الخبيث لآفات سوء التصنّع وتقدير إنذارها وتقرير المعالجة المناسبة.

٢. نوصي بإنشاء نظام تصنيف لآفات سوء التصنّع الفمويّة البشرويّة بالاعتماد على تعبيريّة واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β-Catenin.

الباب السابع: المَراجع

References

المراجع:

ABBEY, L. M., KAUGARS, G. E., GUNSOLLEY, J. C., BURNS, J. C., PAGE, D. G., SVIRSKY, J. A., EISENBERG, E. & KRUTCHKOFF, D. J. 1998. The effect of clinical information on the histopathologic diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* 85**,** 74-7.

ABBEY, L. M., KAUGARS, G. E., GUNSOLLEY, J. C., BURNS, J. C., PAGE, D. G., SVIRSKY, J. A., EISENBERG, E., KRUTCHKOFF, D. J. & CUSHING, M. 1995. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* 80**,** 188-91.

ALFAKEER, O. 2015. Using some Cell Cycele Regulators in Investigation the Degree of Malignancy in Oral Premalignant Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Master Resarch in Oral Histology and Pathology Department, Facuality of Dentistry, Damscus University.*

BARNES, L., EVESON, J., REICHART, P. & SIDRANSKY, D. 2005. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & genetics. *International Agency for Research on Cancer (IARC).*

BEHRENS, J., VON KRIES, J. P., KUHL, M., BRUHN, L., WEDLICH, D., GROSSCHEDL, R. & BIRCHMEIER, W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature,* 382**,** 638-42.

BIENZ, M. 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol,* 15**,** R64-7.

BISCHOF, P., APLIN, J. D., BENTIN-LEY, U., BRANNSTROM, M., CASSLEN, B., CASTRILLO, J. L., CLASSEN-LINKE, I., CRITCHLEY, H. O., DEVOTO, L., D'HOOGHE, T., HORCAJADAS, J. A., GROOTHUIS, P., IVELL, R., PONGRANTZ, I., MACKLON, N. S., SHARKEY, A., VICOVAC, L., WHITE, J. O., WINTERHAGER, E., VON WOLFF, M., SIMON, C. & STAVREUS-EVERS, A. 2006. Implantation of the human embryo: research lines and models. From the implantation research network 'Fruitful'. *Gynecol Obstet Invest,* 62**,** 206-16.

BRABLETZ, T., JUNG, A., HERMANN, K., GUNTHER, K., HOHENBERGER, W. & KIRCHNER, T. 1998. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract,* 194**,** 701-4.

BRABLETZ, T., JUNG, A., REU, S., PORZNER, M., HLUBEK, F., KUNZ-SCHUGHART, L. A., KNUECHEL, R. & KIRCHNER, T. 2001. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98**,** 10356-61.

CAVALLO, R. A., COX, R. T., MOLINE, M. M., ROOSE, J., POLEVOY, G. A., CLEVERS, H., PEIFER, M. & BEJSOVEC, A. 1998. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature,* 395**,** 604-8.

CHAW, S. Y., MAJEED, A. A., DALLEY, A. J., CHAN, A., STEIN, S. & FARAH, C. S. 2012. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol,* 48**,** 997-1006.

CLEVERS, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell,* 127**,** 469-80.

COWAN, C. G., GREGG, T. A., NAPIER, S. S., MCKENNA, S. M. & KEE, F. 2001. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis,* 7**,** 18-24.

CUI, W., FOWLIS, D. J., BRYSON, S., DUFFIE, E., IRELAND, H., BALMAIN, A. & AKHURST, R. J. 1996. TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell,* 86**,** 531-42.

DOST, F., LE CAO, K., FORD, P., ADES, C. & FARAH, C. 2014. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology,* 117**,** 343-352.

DUBAND, J. L. & THIERY, J. P. 1982. Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev Biol,* 94**,** 337-50.

EGER, A., STOCKINGER, A., SCHAFFHAUSER, B., BEUG, H. & FOISNER, R. 2000. Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol,* 148**,** 173-88.

EKBLOM, P. 1996. Genetics of kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens,* 5**,** 282-7.

FADARE, O., REDDY, H., WANG, J., HILEETO, D., SCHWARTZ, P. E. & ZHENG, W. 2005. E-Cadherin and beta-Catenin expression in early stage cervical carcinoma: a tissue microarray study of 147 cases. *World J Surg Oncol,* 3**,** 38.

FISCHER, D. J., EPSTEIN, J. B., MORTON, T. H. & SCHWARTZ, S. M. 2004. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Pathol Med,* 33**,** 65-70.

GAT, U., DASGUPTA, R., DEGENSTEIN, L. & FUCHS, E. 1998. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell,* 95**,** 605-14.

GONZALEZ, D. M. & MEDICI, D. 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling,* 7**,** re8.

GREENLEE, R. T., MURRAY, T., BOLDEN, S. & WINGO, P. A. 2000. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin,* 50**,** 7-33.

HAEGEL, H., LARUE, L., OHSUGI, M., FEDOROV, L., HERRENKNECHT, K. & KEMLER, R. 1995. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development,* 121**,** 3529-37.

HAJRA, K. M. & FEARON, E. R. 2002. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer,* 34**,** 255-68.

HARAGUCHI, M., OKUBO, T., MIYASHITA, Y., MIYAMOTO, Y., HAYASHI, M., CROTTI, T. N., MCHUGH, K. P. & OZAWA, M. 2008. Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. *J Biol Chem,* 283**,** 23514-23.

HART, M. J., DE LOS SANTOS, R., ALBERT, I. N., RUBINFELD, B. & POLAKIS, P. 1998. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol,* 8**,** 573-81.

HAY, E. D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel),* 154**,** 8-20.

HAY, E. D., TRELSTAD, R. L. & REVEL, J. D. 1967. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev Biol,* 16**,** 78-106.

HE, T. C., SPARKS, A. B., RAGO, C., HERMEKING, H., ZAWEL, L., DA COSTA, L. T., MORIN, P. J., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science,* 281**,** 1509-12.

HUBER, A. H., NELSON, W. J. & WEIS, W. I. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell,* 90**,** 871-82.

IBRAHEEM, R. 2015. The Correlation Between Intercellular Adhesion Proteins and the Malignancy of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Master Resarch in Oral Histology and Pathology Department, Facuality of Dentistry, Damscus University.*

ISHIDA, K., ITO, S., WADA, N., DEGUCHI, H., HATA, T., HOSODA, M. & NOHNO, T. 2007. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer,* 6**,** 62.

IVANOVA, L., BUTT, M. J. & MATSELL, D. G. 2008. Mesenchymal transition in kidney collecting duct epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol,* 294**,** F1238-48.

JABER, M. A., PORTER, S. R., SPEIGHT, P., EVESON, J. W. & SCULLY, C. 2003. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. *Oral Oncol,* 39**,** 589-96.

JAMORA, C., DASGUPTA, R., KOCIENIEWSKI, P. & FUCHS, E. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature,* 422**,** 317-322.

JECHLINGER, M., GRUNERT, S. & BEUG, H. 2002. Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia,* 7**,** 415-32.

KALER, P., AUGENLICHT, L. & KLAMPFER, L. 2012. Activating mutations in beta-catenin in colon cancer cells alter their interaction with macrophages; the role of snail. *PLoS One,* 7**,** e45462.

KALLURI, R. & NEILSON, E. G. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest,* 112**,** 1776-84.

KALLURI, R. & WEINBERG, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest,* 119**,** 1420-8.

KAUR, J., SAWHNEY, M., DATTAGUPTA, S., SHUKLA, N. K., SRIVASTAVA, A., WALFISH, P. G. & RALHAN, R. 2013. Clinical significance of altered expression of beta-catenin and E-cadherin in oral dysplasia and cancer: potential link with ALCAM expression. *PLoS One,* 8**,** e67361.

KEMLER, R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet,* 9**,** 317-21.

KIM, K., LU, Z. & HAY, E. D. 2002. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int,* 26**,** 463-76.

KIM, K. K., KUGLER, M. C., WOLTERS, P. J., ROBILLARD, L., GALVEZ, M. G., BRUMWELL, A. N., SHEPPARD, D. & CHAPMAN, H. A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103**,** 13180-5.

KLEZOVITCH, O. & VASIOUKHIN, V. 2015. Cadherin signaling: keeping cells in touch. *F1000Research,* 4.

KRUTCHKOFF, D. J., EISENBERG, E. & ANDERSON, C. 1991. Dysplasia of oral mucosa: a unified approach to proper evaluation. *Mod Pathol,* 4**,** 113-9.

KUJAN, O., KHATTAB, A., OLIVER, R. J., ROBERTS, S. A., THAKKER, N. & SLOAN, P. 2007. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol,* 43**,** 224-31.

KUJAN, O., OLIVER, R. J., KHATTAB, A., ROBERTS, S. A., THAKKER, N. & SLOAN, P. 2006. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol,* 42**,** 987-93.

LAXMIDEVI, L. B., ANGADI, P. V., PILLAI, R. K. & CHANDRESHEKAR, C. 2010. Aberrant beta-catenin expression in the histologic differentiation of oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Sci,* 52**,** 633-40.

LEE, J. M., DEDHAR, S., KALLURI, R. & THOMPSON, E. W. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol,* 172**,** 973-81.

LIM, J. & THIERY, J. P. 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development,* 139**,** 3471-3486.

LO MUZIO, L., LO RUSSO, L., FALASCHINI, S., CIAVARELLA, D., PENTENERO, M., ARDUINO, P., FAVIA, G., MAIORANO, E., RUBINI, C., PIERAMICI, T. & GANDOLFO, S. 2009. beta- and gamma-catenin expression in oral dysplasia. *Oral Oncol,* 45**,** 501-4.

LODI, G., SARDELLA, A., BEZ, C., DEMAROSI, F. & CARRASSI, A. 2006. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev***,** CD001829.

LOGAN, C. Y. & NUSSE, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,* 20**,** 781-810.

LUCIO, M., ANDREA, G., BARTOLOMEO, G. D., FABIO, C. & DORA, S. 2013. Between-lesion discrepancies in terms of dysplasia, cell turnover and diagnosis in patients with multiple potentially malignant oral lesions. *The open dentistry journal,* 7**,** 169.

LUMERMAN, H., FREEDMAN, P. & KERPEL, S. 1995. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* 79**,** 321-9.

MACDONALD, D. & RENNIE, J. 1975. Oral epithelial atypia in denture induced hyperplasia, Nutritional deficiencies, trauma, inflammation, irradiation. *Int J Oral Surg,* 4.

MANI, S. A., GUO, W., LIAO, M. J., EATON, E. N., AYYANAN, A., ZHOU, A. Y., BROOKS, M., REINHARD, F., ZHANG, C. C., SHIPITSIN, M., CAMPBELL, L. L., POLYAK, K., BRISKEN, C., YANG, J. & WEINBERG, R. A. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell,* 133**,** 704-15.

MARTIN, A. C., KASCHUBE, M. & WIESCHAUS, E. F. 2009. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature,* 457**,** 495-9.

MARTORELL-CALATAYUD, A., BOTELLA-ESTRADA, R., BAGAN-SEBASTIAN, J. V., SANMARTIN-JIMENEZ, O. & GUILLEN-BARONA, C. 2009. [Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach]. *Actas Dermosifiliogr,* 100**,** 669-84.

MCCREA, P. D., TURCK, C. W. & GUMBINER, B. 1991. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science,* 254**,** 1359-61.

MCCULLOUGH, M., JABER, M., BARRETT, A. W., BAIN, L., SPEIGHT, P. M. & PORTER, S. R. 2002. Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol,* 38**,** 391-3.

MEHTA, F. S., PINDBORG, J. J., GUPTA, P. C. & DAFTARY, D. K. 1969. Epidemiologic and histologic study of oral cancer and leukoplakia among 50,915 villagers in India. *Cancer,* 24**,** 832-49.

MILLER, J. R. & MOON, R. T. 1996. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev,* 10**,** 2527-39.

MITHANI, S. K., MYDLARZ, W. K., GRUMBINE, F. L., SMITH, I. M. & CALIFANO, J. A. 2007. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis,* 13**,** 126-33.

MIYAZAKI, Y., FUJINAMI, M., INOUE, H., KIKUCHI, K., IDE, F. & KUSAMA, K. 2013. Expression of activation-induced cytidine deaminase in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci,* 55**,** 293-9.

MIYAZONO, K. 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev,* 11**,** 15-22.

MORENO-BUENO, G., PORTILLO, F. & CANO, A. 2008. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene,* 27**,** 6958-69.

MORIN, P. J. 1999. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays,* 21**,** 1021-30.

NAIDU, G. S., THAKUR, R., SINGH, A. K., RAJBHANDARY, S., MISHRA, R. K. & SAGTANI, A. 2013. Oral lesions and immune status of HIV infected adults from eastern Nepal. *Journal of clinical and experimental dentistry,* 5**,** e1.

NAWSHAD, A., LAGAMBA, D., POLAD, A. & HAY, E. D. 2005. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs,* 179**,** 11-23.

NELSON, W. J., DICKINSON, D. J. & WEIS, W. I. 2013. Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity. *Prog Mol Biol Transl Sci,* 116**,** 3-23.

NELSON, W. J. & NUSSE, R. 2004. Convergence of Wnt, ß-catenin, and cadherin pathways. *Science,* 303**,** 1483-1487.

NEVILLE, B., DOUGLAS, D., CARL, M. & BOUQUOT, J. 2009a. Oral and Maxillofacial Pathology.

NEVILLE, B., DOUGLAS, D., CARL, M. & BOUQUOT, J. 2009b. *Oral and Maxillofacial Pathology,* St. Louis, Mo., Saunders Elsevier.

NEVILLE, B. W. & DAY, T. A. 2002. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin,* 52**,** 195-215.

OKADA, H., STRUTZ, F., DANOFF, T. M., KALLURI, R. & NEILSON, E. G. 1996. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol,* 118**,** 147-54.

PENG, H., ZHONG, X. Y., LIU, K. P. & LI, S. M. 2009. Expression and significance of adenomatous polyposis coli, beta-catenin, E-cadherin and cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma assessed by tissue microarray. *Ai Zheng,* 28**,** 38-41.

PINDBORG, J. J., DAFTARY, D. K. & MEHTA, F. S. 1977. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* 43**,** 383-90.

PINDBORG, J. J., P, R., CJ, S. & I, V. D. W. 1997. World Health Organization: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. *Br J Oral Maxillofac Surg,* 35.

POLAKIS, P. 1997. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta,* 1332**,** F127-47.

POLAKIS, P. 2007. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev,* 17**,** 45-51.

PUKKILA, M. J., VIRTANIEMI, J. A., KUMPULAINEN, E. J., PIRINEN, R. T., JOHANSSON, R. T., VALTONEN, H. J., JUHOLA, M. T. & KOSMA, V. M. 2001. Nuclear beta catenin expression is related to unfavourable outcome in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol,* 54**,** 42-7.

QUALTROUGH, D., REES, P., SPEIGHT, B., WILLIAMS, A. C. & PARASKEVA, C. 2015. The Hedgehog inhibitor cyclopamine reduces β-catenin-Tcf transcriptional activity, induces E-cadherin expression, and reduces invasion in colorectal cancer cells. *Cancers,* 7**,** 1885-1899.

RASTOGI, V., PURI, N., MISHRA, S. & ARORA, S. 2013. An Insight to Oral Epithelial Dysplasia.

REGEZI, J., A., SCIUBBA, J. & JORDAN, R. C. K. 2008. Odontogenic Tumors. *Oral pathology :clinical pathologic correlations.* . 5th ed. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier.

REIBEL, J. 2003. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med,* 14**,** 47-62.

RUBINFELD, B., ALBERT, I., PORFIRI, E., MUNEMITSU, S. & POLAKIS, P. 1997. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res,* 57**,** 4624-30.

SANJAYA, P., GOKUL, S., PATIL, B. G. & RAJU, R. 2011. Candida in oral pre-cancer and oral cancer. *Medical hypotheses,* 77**,** 1125-1128.

SATO, K., OKAZAKI, Y., TONOGI, M., TANAKA, Y. & YAMANE, G. Y. 2002. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol,* 38**,** 772-8.

SENDA, T., MIYASHIRO, I., MATSUMINE, A., BAEG, G. H., MONDEN, T., KOBAYASHIL, S., MONDEN, M., TOYOSHIMA, K. & AKIYAMA, T. 1996. The tumor suppressor protein APC colocalizes with beta-catenin in the colon epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun,* 223**,** 329-34.

SHAPIRO, L., FANNON, A. M., KWONG, P. D., THOMPSON, A., LEHMANN, M. S., GRUBEL, G., LEGRAND, J.-F., ALS-NIELSEN, J., COLMAN, D. R. & HENDRICKSON, W. A. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature,* 374**,** 327-337.

SHASHIKANTH, N., PETROVA, Y. I., PARK, S., CHEKAN, J., MAIDEN, S., SPANO, M., HA, T., GUMBINER, B. M. & LECKBAND, D. E. 2015. Allosteric regulation of E-cadherin adhesion. *Journal of Biological Chemistry,* 290**,** 21749-21761.

SHERR, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science,* 274**,** 1672-7.

SONG, J. 2007. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell Res,* 17**,** 289-90.

SPEIGHT, P. M. 2007. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol,* 1**,** 61-6.

STEINESTEL, K., EDER, S., SCHRADER, A. J. & STEINESTEL, J. 2014. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and translational medicine,* 3**,** 1-13.

STRUTZ, F., OKADA, H., LO, C. W., DANOFF, T., CARONE, R. L., TOMASZEWSKI, J. E. & NEILSON, E. G. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol,* 130**,** 393-405.

SUJATHA, D., HEBBAR, P. B. & PAI, A. 2012. Prevalence and correlation of oral lesions among tobacco smokers, tobacco chewers, areca nut and alcohol users. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 13**,** 1633-1637.

TABOR, M., BRAKENHOFFM, R., HENRIQUE, J. & AL., E. 2004. Genetically altered fields as origins of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study.

TAMAI, K., ZENG, X., LIU, C., ZHANG, X., HARADA, Y., CHANG, Z. & HE, X. 2004. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular cell,* 13**,** 149-156.

THIERY, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer,* 2**,** 442-54.

THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell,* 139**,** 871-90.

THOMPSON, L. D. R. 2006. *Head and neck pathology,* Edinburgh, Elsevier/ Churchill Livingstone.

TSE, J. C. & KALLURI, R. 2007. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem,* 101**,** 816-29.

VAN AKEN, J., CUVELIER, C. A., DE WEVER, N., ROELS, J., GAO, Y. & MAREEL, M. M. 1993. Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in human colorectal tumours. *Pathol Res Pract,* 189**,** 975-8.

VAN DER WAAL, I. 2015. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal***,** 0-0.

VAN DER WAAL, I. & AXELL, T. 2002. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol,* 38**,** 521-6.

VAN GENDEREN, C., OKAMURA, R. M., FARINAS, I., QUO, R.-G., PARSLOW, T. G., BRUHN, L. & GROSSCHEDL, R. 1994. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & development,* 8**,** 2691-2703.

WARNAKULASURIYA, S., JOHNSON, N. W. & VAN DER WAAL, I. 2007. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med,* 36**,** 575-80.

WARNAKULASURIYA, S., REIBEL, J., BOUQUOT, J. & DABELSTEEN, E. 2008. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med,* 37**,** 127-33.

WEINBERG, R. A. 2008. Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat Cell Biol,* 10**,** 1021-3.

WIJNHOVEN, B. P., DINJENS, W. N. & PIGNATELLI, M. 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg,* 87**,** 992-1005.

WONG, M. H., RUBINFELD, B. & GORDON, J. I. 1998. Effects of forced expression of an NH2-terminal truncated beta-Catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *J Cell Biol,* 141**,** 765-77.

YAMAMOTO, H., KISHIDA, S., KISHIDA, M., IKEDA, S., TAKADA, S. & KIKUCHI, A. 1999. Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J Biol Chem,* 274**,** 10681-4.

YANG, J. & WEINBERG, R. A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell,* 14**,** 818-29.

YANG, S. W., LEE, Y. S., CHANG, L. C., HWANG, C. C. & CHEN, T. A. 2012. Diagnostic significance of narrow-band imaging for detecting high-grade dysplasia, carcinoma in situ, and carcinoma in oral leukoplakia. *The Laryngoscope,* 122**,** 2754-2761.

ZAID, K. W. 2014. Immunohistochemical Assessment of E-cadherin and β-catenin in the Histological Differentiations of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP,* 15**,** 8847.

ZEISBERG, E. M., TARNAVSKI, O., ZEISBERG, M., DORFMAN, A. L., MCMULLEN, J. R., GUSTAFSSON, E., CHANDRAKER, A., YUAN, X., PU, W. T., ROBERTS, A. B., NEILSON, E. G., SAYEGH, M. H., IZUMO, S. & KALLURI, R. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med,* 13**,** 952-61.

ZEISBERG, M. & NEILSON, E. G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest,* 119**,** 1429-37.

ZEISBERG, M., SHAH, A. A. & KALLURI, R. 2005. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem,* 280**,** 8094-100.

الملخص

مقدّمة:
تعتبر آفات سوء التصنّع الفمويّة في كثير من حالاتها آفات ما قبل سرطانيّة وهي من الآفات ذات الانتشار الواسع ووجد أنّ أكثر من ٥٠% من السرطانات شائكة الخلايا الفمويّة تحوّلت عن آفات سوء تصنّع بشرويَة قبيل سرطانيَة ويقدّم التحوّل الظهاري الميزانشيمي آليّة تقوم من خلالها الخلايا الظهاريّة بالغزو و الاستعمار. وقد أجريت هذه الدراسة لتحرّي واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي β-catenin في الدرجات المختلفة لسوء التصنّع البشروي الفموي.

المواد والطرق:
تمّ دراسة ٤٥ خزعة مثبّتة بالفورمالين ومدمجة بشمع البارافين مؤرشفة ومشخّصة على أنّها أفات ذات سوء تصنّع بشروي فموي، وتمّ تقطيعها وتلوينها بالـ H&E ثمّ تقييم درجة سوء تصنّعها وتقسيمها لثلاث مجموعات حسب درجة سوء التصنّع، ثمّ لوِّنت بالملوّن المناعي الكيميانسيجي β-catenin لدراسة التحول الظهاري الميزانشيمي فيها. وتم مقارنتها مع عينة شاهدة من نسج فموية سليمة

النتائج:
لوحظ وجود ارتباط واضح بين تغيّر تعبيريّة البروتين β-catenin ودرجة سوء التصنّع حيث انخفضت التعبيريّة في الغشاء السيتوبلاسمي وازدادت في الهيولى والنواة مع ازدياد درجة سوء التصنع. فكانت متوسطات نسب الخلايا في طور التحول الظهاري الميزانشيمي % ٠,٣٩٤ للمجموعة الشاهدة و% ٢,٤١٨ في درجة سوء التصنع البسيط و% ٨,٩٨٥ في درجة سوء التصنع المتوسط و% ١٣,٣٣٣ في درجة سوء التصنع الشديد. ما يدل على الإحتمالية العالية للتحول الخبيث لآفات سوء التصنع من الدرجة المتوسطة والشديدة. أما ما يخص التعبيرية النووية فكانت متوسطات النسب في المجموعة الأولى% ٠,٣٥٨ وفي المجموعة الثانية % ٢,١٠٨ وفي المجموعة الثالثة % ٣,٧٠٥. مايدل على تورط مسلك إشارات Wnt في تراكمه في النواة.

الإستنتاجات:
يزداد معدّل التحوّل الظهاري الميزانشيمي مع زيادة درجات سوء التصنّع. يزداد تورط مسلك إشارات Wnt مع زيادة درجات سوء التصنّع. وجود علاقة عكسيّة بين التعبيرية الغشائيّة للـβ-Catenin وتعبيريّته النوويّة في الدرجات المختلفة لسوء التصنع البشروي الفموي حيث تنخفض تعبيريّته الغشائيّة وتزداد تعبيريّته النوويّة والسيتوبلازميّة مع زيادة درجات سوء التصنّع البشروي الفموي. فبالتالي يمكن استخدام واسم التحوّل الظهاري الميزانشيمي الـβ-Catenin للتنبّؤ باحتماليّة التحوّل الخبيث للآفات الفمويّة البشرويّة.

الكلمات المفتاحية:
سوء التصنع البشروي الفموي، التحول الظهاري الميزانشيمي، بروتين الـβ-Catenin ، سبيل إشارات Wnt، آفات الطلاوة الفموية.

Abstract

Background:

Oral epithelial dysplasia is a precancerous change develops in the oral mucosa, and leukoplakia is the most common precancerous lesions in oral mucosa. 50% of squamous cell carcinomas transform from precancerous lesions. The epithelial-mesenchymal transition is considered the mechanism through which the oral leukoplakia becomes malignant, and it's also responsible for the invasion and metastasis of cancers. This study investigates the expression of β-catenin which is an epithelial-mesenchymal transition marker detected by immunohistochemical staining in the different grades of oral epithelial dysplasia.

Materials and methods:

The sample consisted of 45 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of oral leukoplakia with different grades of oral epithelial dysplasia; specimens were stained with H&E to evaluate the grade of dysplasia and were divided into three groups according to the grade, then specimens were immunohistochemically stained with β-catenin antibody from Bio-SB. The control group was consisted of biopsies from the normal oral epithelia.

Results:

The membranous expression of β-catenin decreased while its cytoplasmic and nuclear expression increased with the elevation of the grade of oral epithelial dysplasia. The rates of cells undergo in EMT program were 0.39% in the normal group, 2.42% in the group of mild grade of dysplasia, 8.98% in the group of moderate grade of dysplasia and 13.33% in the group of severe grade of dysplasia. The rates of nuclear expression were 0.35% in the group of mild grade of dysplasia, 2.1% in the group of moderate grade of dysplasia and 3.7% in the group of severe grade of dysplasia.

Conclusion:

The EMT rates are associated with the severity of the oral epithelial dysplasia. The Wnt signaling pathway is involved in rising the availability of β-catenin in cells, and also associated with the severity of the oral epithelial dysplasia. The cytoplasmic and nuclear expression of β-catenin increased with the elevation of the oral epithelial dysplasia grade. That means, the epithelial-mesenchymal transition marker β-catenin could be used to evaluate the potentiality of malignant transformation in the precancerous lesions.

Key Words:

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