دراسة نسيجية مناعية بـــ ki67 لمعرفة دور عادة مضغ القات في تحفيز تكاثر الخلايا البشروية لمخاطية الفم

أيمن عبد المجيد علي*

الملخص

خلفية البحث: ما يزال الجدل قائماً بين الباحثين حول دور عادة مضغ القات في نشوء سرطانات الفم و الجهاز الهضمي. مما دفعنا لإجراء هذه الدراسة النسيجية المناعية التي تهدف إلى تقييم الانقسامات الخلوية في البشرة المبطنة لمخاطية الفم عند أشخاص يمارسون عادة مضغ القات.

مواد وطرائق البحث: أجريت هذه الدراسة على 40 عينة نسيجية مأخوذة من المخاطية الفموية لأشخاص يمضغون القات على جهة واحدة من الفم، بحيث أخذت 20 عينة من جهة مضغ القات، وعشرون عينة أخرى من الجهة المقابلة غير المعرضة لمضغ القات. استخدمت الواسمة ki67 التي تميز الخلايا ذات النشاط الانقسامي مع العينات جميعها.

النتائج: أظهرت النتائج اصطباغ نوى الخلايا القاعدية في العينات جميعها 100% (العدد 40) كما أظهرت اصطباغ جزء من نوى الخلايا فوق القاعدية 45% من عينات مجموعة الدراسة (العدد 20)، ولم يظهر أي اصطباغ في الطبقات فوق القاعدية (0%) لعينات المجموعة الضابطة (p=0.0006). كما لوحظ أن حالات الاصطباغ فوق القاعدي كلّها في مجموعة الدراسة كانت مجاورة تماماً للخلايا القاعدية.

الاستنتاج: نستنتج أن عادة مضغ القات يمكن أن تؤدي دوراً في تحفيز خلايا البشرة الفموية على الانقسام ولكنه لا يرقى إلى مستوى الكشم الخلوي؛ لأنه لم يحدث في الطبقات الحرشفية، بل اقتصر على شكل ازدحام في الطبقات فوق القاعدية، و الذي يمكن عده عسر تصنع خفيفاً.

الكلمات المفتاحية: سرطانات الفم، القات، Ki67

* أستاذ- قسم طب وأمراض الفم- كلية طب الأسنان. جامعة الدمّام- المملكة العربية السعودية.

Effect of Qat Chewing on the Proliferating Activity of the Epithelial Cells of Oral Mucosa: Immunohistochemical Study Using ki67

Aiman A. Ali*

Abstract

Background: The role of qat chewing habit in developing oral and GIT cancer still questionable. This stimulated us to conduct this immunohistochemical study, which aims to evaluate the proliferating activity of the epithelial cells in the oral mucosa of qat chewers.

Materials and methods: This study was done on 40 biopsies taken from the buccal mucosa of qat chewers who chew on one side only. Of them 20 biopsies were taken from the chewing side and the other 20 biopsies were taken from the opposite side. With all cases, ki67 marker was used to evaluate the proliferating activity of cells.

Results: results of this study showed positive staining in the basal cells of the epithelium in all cases 100% (n=40), and positive staining in the supra-basal cells of 45% of study group cases (n=20), while it was negative in the supra-basal cells in all cases of control group (p=000.6). However, all cases with positive staining of supra-basal cells in study group affected the layers directly subjacent the basal layer.

In conclusion qat chewing may play a positive role in the proliferating activity of epithelial cells, but these pathological changes are not considered as atypia because they did not affect the squamous cells. These changes can be diagnose as crowding of epithelial cells, which classified as mild epithelial dysplasia.

Key words: Oral Cancer, Qat, Ki67

* Prof. faculty of Dentistry, Damam University, Saudi Arabic.

مقدمة:

تعود سرعة انتشار عادة مضغ القات والازدياد المضطرد في شعبيته إلى العنصر الفعال الموجود في أوراق القات والمسمّى بالكاثينون، هذه المادة التي تمتلك خصائص منشطه مشابهة لخواص مادة الأمفيتامين (1). إن انتشار هذه العادة في العديد من الدول مثل اليمن، جيبوتي، الصومال، الحبشة وغيرها (2) وحتى وصوله حديثاً إلى بعض الدول الغربية مثل أمريكا الشمالية وأوروبا (3) مع الوافدين من الدول سابقة الذكر، كل ذلك دفع العديد من الباحثين من مختلف دول العالم بما فيها منظمة الصحة العالمية إلى تكثيف البحوث حول تأثيرات هذه العادة في جسم الإنسان. تركزت هذه الدراسات في البداية حول تأثيرات عادة مضغ القات في الجهاز العصبي المركزي والجهاز القلبي الوعائي، بحيث أثبتت تلك الدراسات أن هذه العادة تمتلك القدرة على تحرير مادة الدوبامين من الجهاز العصبي (4) وإحداث تسرع في نبض القلب، خفقان وارتفاع ضغط الدم (5, 6). كما أثبتت دراسات أخرى بأن تأثيرات عادة مضغ القات في جسم الإنسان تتعدى هذين الجهازين لتشمل العديد من الأجهزة الأخرى مثل اضطرابات الجهاز الهضمي والإمساك (7) فضلاً عن ازدياد إمكانية الإصابة بسرطانات الجهاز الهضمي (8) وغيرها.

على مستوى الحفرة الفموية، أظهرت العديد من الدراسات أن عادة مضغ القات يمكن أن تؤدي إلى التهابات فموية وكذلك اصطباغ الأسنان وتلونها (5)، فضلاً عن التهابات في اللثة والأنسجة الداعمة للأسنان (9). كما أظهرت دراسات حديثه أن هذه العادة تزيد من تقرن المخاطية الفموية، مما يؤدي إلى ظهور آفات بيضاء في الدهليز الفموي مكان مضغ وتخزين القات (2). وقد دعم ذلك الرأي الدراسات النسيجية التي أجريت على عينات مأخوذة من مخاطية الفم لدى الأشخاص الممارسين لعادة مضغ القات والتي أثبتت أن هذه العادة يمكن لها أن تؤدي إلى ظهور طبقة من القرنين في مخاطية الخد، في حين تعدُّ هذه المخاطية نسيجاً غير متقرن في الحالات الطبيعية فضلاً عن ظهور ارتشاح التهابي ووذمه خلوية في بعض العينات (10-12)، كما أظهرت الدراسات النسيجية نفسها أن جزءاً من العينات المدروسة تحتوي على عسر تصنع بشروي. و لكن السؤال الذي لم تتضح الإجابة عنه حتى الآن هو إمكانية إحداث هذه العادة للأورام الفموية الخبيثة؟ إذْ إنَّ بعض الدراسات قد أشارت إلى ذلك بوضوح (8, 13) بينما أظهرت دراسات أخرى أن التغيرات الناجمة عن عادة مضغ القات لا تتعدى فرط التقرن والارتشاح الالتهابي وغيرها من التغيرات الحميدة (2, 10-12). و لمحاولة الإجابة عن هذا السؤال أجرينا هذه الدراسة التي تهدف إلى معرفة هل كانت عادة مضغ القات تمتلك القدرة على إحداث انقسامات في الخلايا البشروية أم لا؟ وذلك من خلال استخدام تظاهر الـــ (ki-67) الذي يعدُّ مؤشراً على التكاثر الخلوي وواسماً للخلايا ذات النشاط التكاثري.

مواد البحث وطرائقه:

لإجراء هذه الدراسة النسيجية المناعية فقد أخذت 40 عينة نسيجية من عشرين شخصاً يمني الجنسية يمارسون عادة مضغ القات في جهة واحدة من الفم (إما الدهليز الفموي اليميني أو اليساري) ومدة تزيد على عشر سنوات، العمر الوسطي 37،5 سنة (الانحراف المعياري= 9،84) بعمر أصغري 21 سنة وعمر أعظمي 56 سنة. كامل العينة كانت مكونة من الرجال الذين يمارسون عادة مضغ القات 5 مرات على الأقل أسبوعياً. استبعد كل الأشخاص الذين يعانون من أمراض جهازية، وكذلك أي شخص استخدم الجهة المقابلة للدهليز الفموي مسبقاً في مضغ القات ولو

مرة واحدة، وذلك للتقليل من إمكانية ظهور تحيز في النتائج.

قسمت العينات إلى مجموعتين متساويتين كالآتي:

1- **مجموعة الدراسة**: وتتكون من 20 عينة نسيجية مأخوذة من مخاطية الخد في جهة ممارسة عادة مضغ القات.

2- **المجموعة الشاهدة**: وتتكون من 20 عينة نسيجية مأخوذة من مخاطية الخد للأشخاص أنفسهم في مجموعة الدراسة، ولكن من الجهة المقابلة التي لم تستخدم قط لممارسة عادة مضغ القات.

في كل من الحالات السابقة أعطي المريض تخديراً موضعياً في مكان بعيد عن مكان أخذ العينة حتى لا يحدث حقن المخدر أي تغيرات على مستوى الخلية قد تؤثر في نتائج الدراسة. بعد حدوث التخدير أخذت العينة باستخدام المبضع الجراحي وملقط الأنسجة (وسطياً 3*4*10مم)، ومن ثم وضعت في الفورمالين 10% لإجراء التحضير الروتيني باستخدام صبغة الهيماتوكسيلين و الايوزين (H&E).

التحليل النسيجي المناعي:

أخذت مقاطع بسماكة 5 ميكرون من المكعبات الشمعية المحضرة بالطريقة الروتينية، ومن ثم أذيب الشمع وغمست مدة 5 دقائق في الميثانول مع الماء الأوكسجيني بتركيز 3%. بعد ذلك أجري تعقيمها بدرجة حرارة 121 درجة مئوية ضمن وسط حمضي (Ph = 6.0) مدة 10 دقائق. ولإجراء التحليل المناعي النسيجي استخدم نظام فينتانا (Ventana Medical Systems - Arizona-USA). زمن الحضانة للأجسام الضدية الأولية (ki67) كانت 32 دقيقة. بعد ذلك استخدم مع كل عينة واسمات ki67 الضدية(Anti-ki67 antibody : Mouse monoclonal antibody. Clone K-2) بعد ذلك وضعت صبغة الهيماتوكسيلين بعناية ومن ثم تم تغطيتها وتجهيزها للتقييم.

تقييم اصطباغ الخلايا:

أجري تقييم الشرائح المجهرية المعدة لكلتا المجموعتين بواسطة مجهر ضوئي وبتكبيرات مختلفة. احتسبت الخلايا كلّها التي اصطبغت بـــ ki67 بغض النظر عن كثافة الاصطباغ ضمن الخلايا. كما قسم الاصطباغ للعينات إلى:

(-) لا يوجد اصطباغ بـــ ki67 على الإطلاق.

(+) يوجد اصطباغ بـــ ki67 و لكنه محصور على الخلايا القاعدية.

(++)اصطباغ بـــ ki67 في الطبقات فوق القاعدية.

التحليل الإحصائي:

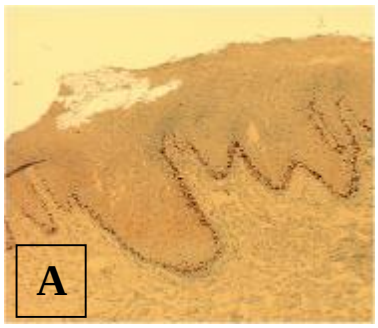
المعلومات كلّها التي جمعت من خلال تقييم عينات الدراسة عبئت في جدول خاص بالدراسة. ومعد على برنامج (SPSS) وذلك لتحليل النتائج إحصائياً. كما استخدم برنامج (chi-square test) و(Fisher's test) لتحديد قيمة (Pvalue)

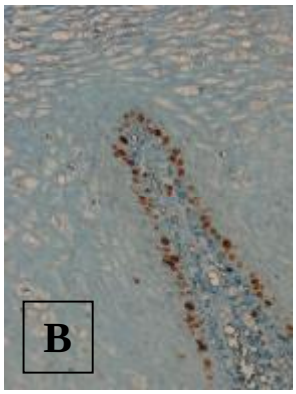
النتائج:

أظهرت كامل العينات التي أجريت عليها الدراسة 100% (العدد 40 عينة) اصطباغاً بالواسمة ki67 إلاّ أن هذا الاصطباغ كان محصورا على خلايا الطبقة القاعدية (طبقة أو طبقتان كحد أعظمي)، وذلك في العينات المأخوذة من المجموعة الضابطة100 كلّها % (العدد 20 عينة) كما هو مبّين في الصورة (1).

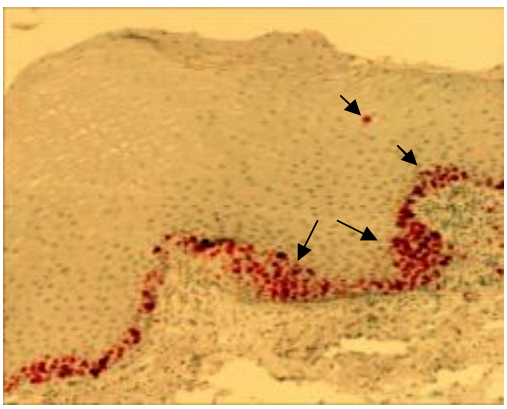
أما فيما يتعلق بعينات مجموعة الدراسة فإن 45% منها أي(9 حالات من أصل 20 عينة) أظهرت اصطباغاً لنوى الخلايا فوق الطبقة القاعدية، ولكن في الحالات المذكورة كلّها كانت الخلايا الايجابية مجاورة مباشرة للطبقة القاعدية، كما هو مبين في الصور (2 و3).

إن الفروق في نتائج اصطباغ نوى الخلايا بالواسمة ki67 ما بين عينات المجموعة الضابطة و عينات مجموعة الدراسة كانت ذات قيمة إحصائية (p=0.0006).

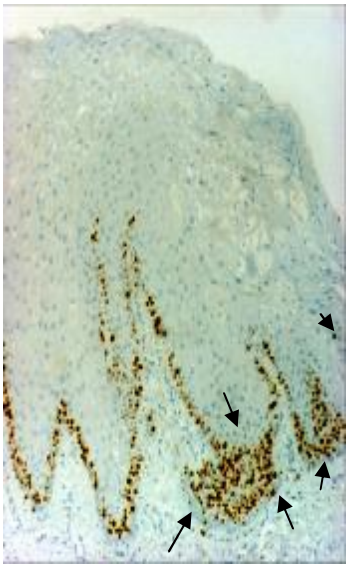




صوره 1: صورة مجهريه تظهر اصطباغ الطبقة القاعدية للبشرة بعد معالجتها بالواسمة ، Ki67 يتضح أن الاصطباغ مقتصر على طبقة واحدة أو طبقتين على الأكثر (المجموعة الضابطة). (A) تكبير 4 X. (B) تكبير 20 X



صورة 2: تظهر اصطباغ الطبقة القاعدية و الطبقات المجاورة لها مباشرة، كما هو محدد بالأسهم (مجموعة الدراسة)



صورة 3: تظهر اصطباغ الطبقة القاعدية و الطبقات المجاورة لها مباشرة، كما هو محدد بالأسهم (مجموعة الدراسة)

المناقشة:

إن التباين في نتائج الدراسات التي أجريت حول القات واضح جداً، وخصوصاً عندما يتعلق الموضوع بدور عادة تخزين القات في نشوء الأورام الخبيثة في الفم والأنبوب الهضمي. ففي حين يعدُّ غرادوك (Craddock VM) (13) عادة مضغ القات أحد العوامل المقترحة والمحتملة لنشوء سرطانات المرئ ويدعمه في ذلك الرأي كل من الجنيد وزملائه (Gunaid et al.) (8) الذين أظهروا في إحدى دراساتهم أن نسبة حدوث سرطانات البلعوم، المرئ والمعدة أعلى عند الأشخاص الذين يمارسون عادة مضغ القات أكثر من الأشخاص الذين لا يمارسون هذه العادة، في حين في الجانب الآخر، نجد العديد من الدراسات التي تظهر أن التغيرات الناجمة عن عادة تخزين القات لا تتعدى تغيرات بشروية حميدة مثل فرط التقرن، وذمة داخل الخلايا البشروية، ازدياد سماكة النسيج البشروي، وفي أشد الحالات فقد ظهر سوء تصنع بشروي بسيط مترافق مع ارتشاح التهابي خفيف (10-12). ولمحاولة توضيح هذه النقطة أجريت هذه الدراسة لتقييم دور عادة

مضغ القات في تحفيز الانقسامات الخلوية التي إن حدثت في غير مكانها الطبيعي كأن تحدث في طبقات الخلايا الحرشفية فإنها في تلك الحالات تعدُّ أحد مظاهر سوء التصنع أو الكشم الخلوي. ولدراسة الانقسامات الخلوية استخدمت الواسمة ki67 التي تصبغ كل أنوية الخلايا ذات النشاط الانقسامي (14, 15).

إن نتائج هذه الدراسة التي تظهر ازدياداً واضحاً في تكاثر الخلايا القاعدية وما حولها في عينات مجموعة الدراسة مقارنة بالمجموعة الضابطة (p=0.0006) تدلُّ على أن عادة مضغ القات تؤدي دوراً مهماً كعامل مخرش للبشرة و محفز للانقسام الخلوي، ولكن هذه التغيرات لا ترقى إلى مرحلة الكشم الخلوي، فهي مقتصرة على الطبقات المجاوره مباشرة للطبقة القاعدية، وهذا ما يطلق عليه بعضهم (16) مصطلح (crowding of the basal cells or basal cell hyperplasia) أي تزاحم الخلايا القاعدية الذي يعدُّ أحد مظاهر عسر التصنع البشروي البسيط. إلا أنه لم يظهر في أي عينة من عينات مجموعة الدراسة أو عينات المجموعة الشاهدة أي اصطباغ واضح للخلايا الحرشفية ضمن الطبقات المتوسطة والسطحية أو الخلايا الحبيبية للبشرة. ووفقاً لبعض الدراسات (16) فإن التطور المنطقي لنشوء سرطانات الفم الحرشفية تبدأ من سوء التصنع الخفيف إلى المتوسط، الشديد، ومن ثم السرطان البشروي الموضع وبعد ذلك تخترق الخلايا المتكاثرة وغير الطبيعية الغشاء القاعدي وتغزو النسيج الضام المجاور ليطلق عليها في هذه المرحلة بالسرطان الحرشفي الخلايا. ولكن وفي الوقت نفسه فإنَّ العديد من الباحثين (16, 17) يعدون أن المراحل الأولى من هذا التطور أي مرحلة عسر التصنع هي مراحل ردودة ومن ثَمَّ يمكن عدها حميدة.

إن نتائج هذه الدراسة لا تظهر أي علائم لوجود انقسامات في الطبقات المتوسطة و السطحية للبشرة، ولكنها في الوقت نفسه لا يمكن أن تنفي إمكانية تفاقم الحالات التي ظهر فيها ازدياد في تكاثر الخلايا القاعدية وانقسامها في حال استمر تحريض مخاطية الفم وتخريشها بواسطة القات. إن ما يدعم نظرية أن عادة مضغ القات يمكن أن تسبب تغيرات نسيجية في مخاطية الفم ليست بمستوى الكشم الخلوي هو الدراسات المسحية التي أجريت على المجتمع اليمني من قبل وزارة الصحة اليمنية والتي أظهرت أن نسبة انتشار سرطانات الفم في اليمن مشابهة لنسبة انتشار سرطانات الفم في بقية دول العالم (18)، فلو كانت هذه العادة عادة مسرطنة لكانت نسبة انتشار سرطانات الفم في اليمن أعلى بكثير من مثيلاتها في بقية دول العالم، نظراً إلى كون الملايين من اليمنيين يمارسون هذه العادة.

ومما سبق يمكن الاستنتاج أن عادة مضغ القات هي عادة مؤذية للصحة الفموية، وتسبب تخريشاً للمخاطية الفموية، يتظاهر في التحاليل النسيجية المناعية بشكل ازدياد في تكاثر الخلايا القاعدية بنسبة أعلى من الطبيعية، إلا أن هذه الدراسة لم تتمكن من إثبات أن عادة مضغ القات يمكن لها أن تؤدي إلى نشوء أورام خبيثة في الحفرة الفموية.

References

1. Kalix P. Qat: A plant with amphetamine effect. J Substance Abuse Treat 1988; 5: 163-169.
2. Aiman Ali; Al-Sharabi, A. K.; Aguirre, J. M.; Nahas, R. A study of 342 oral keratotic white lesions induced by takhzeen al-qat among 2500 Yemeni. J Oral Pathol Med., 2004, 33, 368-72.
3. El-Wajeh YA, Thornhill MH. Qat and its health effects. Br Dent J. 2009 Jan 10; 206 (1): 17-21.
4. Kalix P. Cathinone: a natural amphetamine. J Pharmacol Toxicol 1992; 70: 77–86.
5. Halbach H. Medical aspects of the chewing of khat leaves. Bull WHO 1972; 47: 21–9.
6. Hassan NM, Gunaid AA, Abdulla AA, Abdulkader ZY, Almansoob MK, Awad AY. The effect of qat chewing on blood pressure and heart rate in healthy volunteers. J Trop Doc 2000; 30: 107–8.
7. Kennedy J. A medical evaluation of the use of qat in the north of Yemen. Soc Sci Med 1983; 17: 783–93.
8. Gunaid AA, Sumairi AA, Shidrawi RG, al-Hanaki A, al-Haimi M, al-Absi S, et al. Oesophageal and gastric carcinoma in the Republic of Yemen. Br J Cancer 1995; 71: 409-10.
9. Aiman Ali. Qat Habit in Yemen Society: A Causative Factor for Oral Periodontal Diseases. Int. J. Environ. Res. Public Health 2007, 4(3), 243-247
10. Aiman Ali, Ali Al-Sharabi. A pilot study on the histopathological changes in oral mucosa induces by takhzeen el-qat. Damascus University Journal for Health Sciences 2004; 20(1): 217-229 (Arabic)
11. Aiman Ali; Alsharabi, K. A.; Agurre, J. M. Histopathological changes in oral mucosa due to takhzeen al-qat: a study of 70 biopsies. J Oral Pathol Med., 2006, 35, 81-5.
12. Aiman Ali. Histopathological changes in oral mucosa of Yemenis addicted to water-pipe and cigarette smoking in addition to takhzeen al-qat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 103, e55-e59.
13. Craddock VM. Cancer of the esophague: approches to the etiology. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1993. p. 37.
14. Miguel AGM, Izabel RA, Alberto RA, Ilfonso ML. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. Head Neck 2000 Oct;22(7):658-61.
15. Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle associated proteins P16, pRb, p53, 27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinoma. J Oral Pathol Med 1999; 28: 226-32
16. Regezi J A., Sciubba J J., Jordan Richard C. K. Oral pathology: clinical pathologic correlations. 5th edition. London: W B Saunders; 2007.
17. Cawson RA, Odell EW. Cawson's Essentials of Oral Pathology and Oral Medicine. 8th Edition. Churchill Livingstone; 2008.
18. Yemen Ministry of Health Annual Statistics Reports 1975-1985. Sana'a Republic of Yemen, 1986.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2010/5/25.
تاريخ قبوله للنشر 2010/12/20.