تحديد تعبير الجينة السرطانية Cyclin D في السرطانة شائكة الخلايا الفموية*

عبد الله عداس** أحمد المنديلي***

الملخص

خلفية البحث: تهدد السرطانات (بما فيها سرطانات الفم) الحياة الإنسانية لذلك يجب تحريها وتشخيصها مبكرا لنستطيع تجنبها،وأكثر من 90% من هذه الخباثات الفموية هي سرطانات شائكة الخلايا، ومازال إنذار هذه الخباثات سيئاً (نحو 50% نسبة بقيا 5 سنوات).

الهدف: مازال دور الجينة (Cyclin D) قيد الدراسة، والهدف من البحث تحري تعبيرها.

مواد التجربة: مجموعة عينات من 35 مريضاً بالسرطان الفموي (SCC) ذوي المراحل I , II, III, IV ومعالجين فقط جراحياً، أدمجت بالبارافين وحضِّر منها مقاطع نسيجية لإجراء التحاليل الروتينية ثم بالكيمياء النسيجية المناعية لتحديد تعبير الجينة (Cyclin D) .

النتائج: كانت نسبة ايجابية التلوين لتعبير الجينة الورمية 69 % وكانت هناك علاقة بين التعبير والدرجة النسيجية الورمية I, II .

الاستنتاج: أكدت هذه الدراسة دور الجينة(Cyclin D) في السرطان الفموي. وتحتاج الدلائل الإنذارية السريرية إلى دراسات إضافية.

الكلمات المفتاحية: الموت الخلوي المبرمج (apoptosis)، الكينازات مرتبطة بالسيكلين (CDK), الجينة Cyclin D، السرطان الفموي (OC). سرطان شائك الخلايا(scc)، التلوين بالكيمياء النسيجية المناعية (IHC)، الجينة السرطانيةOncogene .

* أعد البحث في سياق رسالة الدكتوراه للطالب عبد الله عداس بإشراف الأستاذ الدكتور أحمد المناديلي.

** قسم النسج و التشريح المرضي- كلية طب الأسنان - جامعة دمشق.

*** أستاذ- قسم النسج و التشريح المرضي- كلية طب الأسنان - جامعة دمشق.

Demonstrating of Oncogene Expression Cyclin D in Oral Squamous Cell Carcinoma

Abdalla Addas* **Ahmad Almandily****

Abstract

Background: cancers (include oral cancers) endanger the human life so they must be detected, diagnosis early and avoided. More than 90% of these oral malignancies are squamous cell carcinomas. The prognosis for these malignancies continues to be poor with approximately 50%survival at five years.

Purpose: The role of (Cyclin D) in (SCC) of the head and neck is not well defined. The purpose of the current study is to demonstrate (Cyclin D)expression.

Experimental Design: specimens cohort of 35 patients with SCC of oral cancers, with stage I, II, III or IV disease and uniformly treated with surgical resection. All specimens had been paraffin-embedded. Each of them was HC for routine analysis and IHC stained for (Cyclin D) expression.

Results: The percentage of tumors staining positive for Cyclin D by IHC was 69%.There was correlation between it and Tumor grade (I,II).

Conclusions: This study insists role of Cyclin D gene in SCC of the head and neck. The prognostic significance and clinical implications of Cyclin D expression in head and neck cancer will require additional studies.

Key words: programmed cell death (apoptosis), Oral Cancer(OC), Cyclin-dependent kinase(CDK), Squamous cell carcinomas(SCC), (Cyclin D) Oncogenes of Cell Cycle Control, Immunohistochemically(IHC), oncogene.

* Department HistoPathology, Damascus University.
** Prof. Department HistoPathology, Damascus University.

ا. مقدمة:

السرطان هو مجموعة أمراض تتصف بالنمو الخلوي غير المسيطر عليه، وتنتشر فيه الخلايا غير الطبيعية إلى الأنسجة المجاورة، على المستوى الجزيئي يُعدّ السرطان كتلة خلوية تحررت من الآليات الطبيعية المنظّمة والمحدّدة لنمو الخلايا في العضويات الحية، مما ينعكس بإنتاج خلايا طافرة شاذة، تراكمت فيها الطفرات الجينية المتعاقبة.[1,2,3,4,5]

يُعدّ السرطان على المستوى المورثي مرضاً جينياً genetic disease ينجم عن تغير أو طفرة جينية في الجينات المسؤولة عن الوظائف الخلوية الأساسية، فتسبب تغيرات في النمط الظاهري. تُصنف الجينات في مجموعتين اثنتين الأولى جينات سرطانية oncogene والثانية جينات كابحة الأورام tumor suppressor gen. [1,2,,5,6,7,8]

تقُسم الدورة الخلوية عند الإنسان إلى أربعة أطوار رئيسة:

(G1) طور النمو وطورالتصنيع (S) و (G2) طور التحقق من تصنيع DNA و (M) طور الانقسام الخلوي .[1,2,5,9,10,11,12,13]

يتم التحكم بأطوار الدورة الخلوية عبر نوعين من الإشارات داخلية وأخرى محرضة أو مثبطة للحوادث الخلوية: :[5,9,11,12,13,14,15]

1. الإشارات الداخلية الآتية من داخل الخلية مثل زمرة الكينازات، التي تنزع الفوسفات من ATP لتضيفه إلى جزيء آخر و زمرة السيكلينات.
2. الإشارات الخارجية الآتية من خارج الخلية مثل عوامل النمو والهرمونات، فمنها ما يحرض النمو والانقسام الخلوي مثل EGF عامل النمو البشروي.

ومنها ما يثبط مثل

أ-مثبط التماس(Contact Inhibition) عندما تصل الخلايا المنقسمة إلى حجوم وأعداد لتصبح على تماس مع بعضها بعضاً فإنها تتوقف عن الانقسام.

ب- الشيخوخة(SENESCENCE)عندما يبلغ عدد انقسام الخلية الواحدة 70 مرة فإنها تتوقف عن الانقسام بوساطة خاصية (telomere) التيلومير وهي تتابعات نيكليوتيدية سداسية(TTAGGG) في أطراف الصبغي تعمل كدارئ ومحدد لشيخوخة الخلية . [5,9,11,12,13,14,15],

هناك ثلاث زمر من البروتينات التي تتحكم وتفعّل الدورة الخلوية:

- زمرة السيكلينات Cyclins
- زمرة الكينازات المرتبطة بالسيكلين Cyclin-dependent kinase.
- زمرة البروتينات مثبطة الكيناز المرتبطة بالسيكلين Cyclin-dependent kinase inhibitor protein.
- وهناك بروتينات ومعقدات كثيرة منها Cdc2 ، Cdc25 ، Cdc42.[4,5,9,12,13,14,15,16]

تتضمن آليات مراقبة الدورة الخلوية المئات من البروتينات المكتشفة حديثاً، التي تشكل نقاط التحقق لكن يمكن تصنيفها في ثلاث نقاط كبيرة :

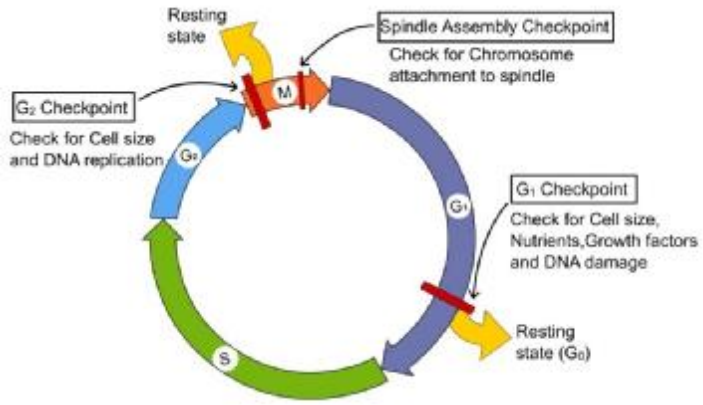
1. نقاط التحقق G1\S التي تقرر وصول الخلية إلى الحجم المناسب وإذا كانت DNAالخلية متأذية، فسيحصل تكسرات في DNA مما سيحجب التضاعف ويوقفه. يتم بهذه الآلية منع إنتاج خلايا بنات طافرة، يحصل تأخير في نهاية الدورة الخلوية حتى تتمكن الظروف الضرورية لإصلاح الخلل في DNA وبعد عملية الترميم يتم الانتقال إلى المرحلة التالية، وأهمها معقدات:

- CDK4-CylinD &CDK2-CylinE التي تفسفر بروتين Retinoblastoma (RB) الذي يحرر E2F عامل ترجمة جينات تضاعف DNA .
- S-phase promoting factor (SPF) المؤلف منCyclin A المرتبط إلى CDC2 الضروري لتحضير النواة وDNA للتضاعف.

2. نقاط التحقق G2\M تقيّم اكتمال تضاعفDNA وإذا كان هناك أذى يحتاج إلى ترميم وأهمها عامل تحفيز الانقسام mitosis-promoting factor (MPF) الذي يُبدئ طور الانقسام الفتيلي في الدورة الخلوية.

3. نقاط التحقق M تتحقق من المناظرة في DNA، حيث يتم التأكد من الانتقال الصبغي الصحيح للخلايا البنات، ولا تتم الدورة الخلوية حتى تكون الصبغيات كلها جاهزة من أجل عملية الانقسام النووي.[4,5,9,12,13,14,15]

تتوقف الدورة الخلوية اعتيادياً عند ضرر DNA ، وإذا كان هذا الضرر كبيراً غير قابل للإصلاح فإنَّ الخلية تدخل بما يدعى تتالي الموت الخلوي المبرمج programmed cell death ويرمز لهapoptosis وأهم بروتيناتها P53 .[1,2,4,5,9,12,13,14,15]



شكل يوضح نقاط التحقق للدورة الخلوية.

كما ذكرنا فالسرطان هو مرض الدورة الخلوية، حيث يحدث التكاثر والانقسام الخلوي بسرعة وبشكل متكرر دون نهاية. يعدُّ التكاثر الخلوي غير المسيطر عليه من الصفات المميزة للسرطانات والخلايا الورمية حيث تفقد الخلايا التنظيم المورثي للدورة الخلوية مما يؤدي إلى اكتسابها نموذجياً عيوباً مباشرة في الجينات التي تنظم الدورات الخلوية من تضخيم للجينات التي تحرض الإشارة الخلوية، أو تثبيط للأخرى التي تكبح الدورة الخلوية التي تكون ضرورية لتطور الأورام. تكون العيوب في وظائف نقاط التحقق المسؤولة عن توازن التجدد النسيجي عبر الحياة.[4,5,9,12,13,14,15,16,17,18]

تُنظم الدورة وفقا لآليتين رئيستين: [4,5,9,12,13,14,15,16,17,18, 19,20,21,22,23,]

أولاً- الآلية الأولى مسؤولة عن الاقتران المتغايرheterodimer بين السيكلينات Cyclin والكينازات المتعلقة بالسيكلين Cyclin-dependent kinase(CDK).

ثانياً- تستجيب الآلية الثانية لعوامل النمو خارج خلوية التي تفعّل بروتين Ras الذي يفعّل شلال الإشارة الوسيط داخل الخلوية، لتنتقل الإشارة من خارج الخلية إلى النواة.

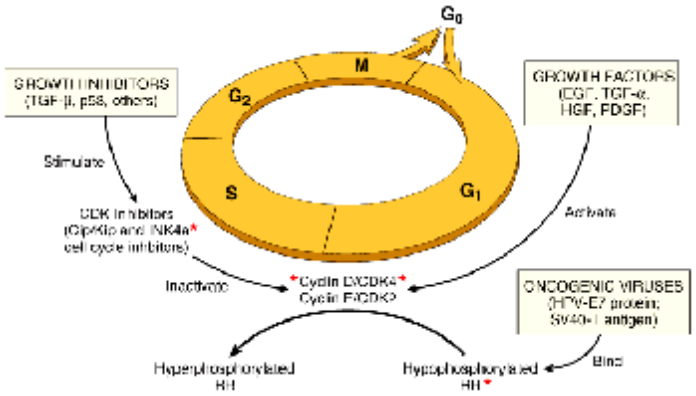
v الاقتران المتغاير للسيكلينات والكينازات المتعلقة بالسيكلين:

السيكليناتCyclin هي البروتينات المتغيرة الحجم التي ينقص أو يزداد تعبيرها خلال مراحل الدورة الخلوية وهناك 4 فئات من السيكلينات(A, B,D,E) كل منها يتفعّل في مرحلة من مراحل الدورة الخلوية ويقترن مع كيناز المتعلق بالسيكلين خاصٍ به ليفعّله الذي يعبر في مستويات ثابتة تقريبا خارج الدورة الخلوية، فارتباط السيكلينات بالوحدات المختلفة للكينازات المرتبطة السيكلين يفعّلها في حين تحطم الأولى يثبط الثانية.

- يُنظم التطور في المرحلةG1 بشكل رئيس عند اقتران كلٍّ من Cyclin D/CDK6و Cyclin D/CDK4، التي تستجيب لعوامل النمو خارج الخلوية مما تسمح هذه السيكلينات للخلية إلى انتقال نقطة الإعاقة في المرحلةG1 إذا كانت عوامل النمو الخارجية كافية.
- يحتاج الانتقال من المرحلةG1 إلى S اقتران كلٍّ من Cyclin E/CDK2 التي تلزم الخلية على تصنيعDNA بالتعاون مع.CyclinA /CDK2
- تنظم آخر مرحلة بوساطة Cyclin B /CDK1 التي تتضمن بأنَّ انقسام الصبغي لا يبدأ حتى تكون كل الصبغيات البنات قد ارتصفت بشكل مناسب والتشكل المغزلي قد اكتمل.

فضلاً عمَّا ما ذكر سابقاً تتعدل Cyclin /CDK بوساطة بروتينات مثبطات كيناز السيكلين Cyclin Kinase Inhibitory (CKI) بشكل خاصP21,P27 التي

تتحرض عند تأذي DNA، حيث يرتبط بروتين CKI بشكل ردود مع معقد Cyclin /CDK المفعّل ليوقف انتقال الخلية إلى المرحلة S , وينظم تعبيرCKI بوساطة P53الذي يتحطم عند إصلاح DNA ويتوقف انتساخ CKI مما يسمح للدورة الخلية بالاستمرار, ويقود ارتفاع مستوىP53 إلى إطالة مدة إصلاح DNA وإلى تحريض الانتحار الخلوي apoptosis والى موت الخلية. وتترافق أيضا الانتقال خلالG1 بتفعيل بروتين retinoblastoma(Rb1). [4,5,9,12,13,14,15,16,17,18, 19,20,21,22,23,].



شكل يوضح علاقة السيكلينات والكيناز وعوامل النمو ومثبطاته للتحكم بالدورة الخلوية

الجينات الجزيئية لسرطان الرأس والعنق:

تتصف سرطانات الرأس والعنق بشذوذات جينية متعددة تملك تأثيراً في تصرف الأورام، ولها فوائد محتملة في تطوير معالجات جديدة.

تعوق الأعداد الكبيرة من التغيرات الجينية في خلايا سرطان الرأس والعنق من الاستخدام الهدفي للفحوص الجزيئية البسيطة وللمعالجات.

تزود تحري الطفرات في الجينات المتعددة معلومات إنذارية أفضل من التحري المفرد لهم.

تنتج الجينات الورمية بروتينات تحرض النمو الخلوي والورمي، تظهر في أورام الرأس والعنق تفعيل العديد من الجينات الورمية أهمها زمرة السيكلينات التي تضم

أنواعاً مختلفة عديدة من البروتينات التي يتراوح حجمها من 35-90 KD. تمتلك السيكلينات بنية مركزية متشابهة وتختلف في مواقع الالتصاق. تتفعّل في أزمنة مختلفة من الدورة الخلوية لتشكل معقدات مع الكينازات مرتبطة السيكلين، تفسفر مواد مختلفة. وهي أربعة أنواع:

- السيكلين D مع شريكيه CDK4 / Cyclin D , CDK6 / Cyclin D (): الاسم المورثي Cyclin D ويرمز بCycD وله اسم مرادف-Cyclin :Cdi3 Cdi3 dependent kinase interactor ووظيفته تنظيم تحت وحدة للكيناز مرتبط السيكلين(CDK4 , CDK6)، وله 3 أشكال(cyclins D1, D2, and D3) .

يشير السيكلين D إلى سيكلينات الطور G1 التي تنظم دخول الخلايا إلى الطورG1 من الطورG0، وهو يُنظم بوساطة عوامل النمو والإشارات الخارجية عبر طريق الإشارة Ras GTPase. ويفسفر بروتين (pRB) ويسهل تعبير cyclin E.(42→4,5,9,14,15,20,,27).

- السيكلين A مع شريكه CDK2 (CDK2 /Cyclin A).
- زمرة السيكلينات B
- السيكلين E مع شريكه CDK2

استخدمت عدة تقنيات لتقييم الطفرات في جينة السيكلين Cyclin D1 في أورام الرأس والعنق البشروية منها تقنيات IHC, FISH, Southern blotting.

لوحظ تضخم جين Cyclin D1 في كل من هذه التقنيات:

إذ كانت نسبة فرط تعبير جينة السيكلينD1 36% بتقنية FISH[26].

بينما كانت نسب فرط تعبير جينة السيكلينD1 متفاوتة من 12 إلى 68% بتقنية IHC [27,28,29,30,31,32,33,34,35,36].

كما كانت نسب فرط تعبير هذه الجينة متفاوتة من 18 إلى 58% بتقنية Southern blotting[37,38,39,40,41,42].

أظهرت الدراسات علاقة بين Cyclin D1 وإنذار الورم (علاقة بين فرط التعبير والتضخم الجيني والنكس والانتقالات العقدية والموت)[26,27,28,30,,31,32,33,].

تُعد السسيكلنات والكينازات مرتبطة السيكلينات هدفا للمعالجة ضد السرطان، وقد أُنتج مثبطات للسيكلينات والكينازات مرتبطة السيكلينات مثل Seliciclib التي ما تزال قيد الدراسة.[5,8,9,23].

II. **الهدف من البحث**:

مازال دور الجينات السرطانية التي تتحكم بالدورة الخلوية في السرطان الفموي قيد الدراسة. لذا كان الهدف من هذا البحث هو تحري ودراسة تعبير الجينة السرطانية Cyclin D في المحضرات النسيجية الملونة بالكاشف المناعي AntiCyclin D ومقارنتها بالمحضرات الملونة بالطريقة التقليدية (هيماتوكسلين ايوزين) بما ينعكس إيجاباً على التشخيص واختيار طريقة المعالجة وتحسين العمر الوسطي لمرضى سرطان الفم.

III-**المواد والطرائق** :

أولا- عينات البحث:

اختيار العينات:

اختيـــــرت العينـــات من المرضى البالغين المصابين بالسرطان البشروي شائك الخلايا في الحفرة الفموية، والمراجعين لكل من مشفى جراحة الفم والفكين في كلية طب الأسنان جامعة دمشق ومشفى المواساة والمشفى الجامعي بحلب ما بين عامي 2004 و2009 من الفئات العمرية كلها وبدرجات خبث مختلفة.

1. شروط اختيار العينات:
2. ألا يكون المرضى قد تعرضوا لأية معالجة شعاعية أو كيميائية.
3. المدة الزمنية تم قبول كل العينات السرطانية الفموية لاستخدامها في الإحصاء في حين قبلت العينات المأخوذة حديثاً للعامين 2007-2008 من أجل تطبيق الملونات النسيجية والنسيجية الكيميائية.
4. الموقع: قبلت كل العينات السرطانية الفموية داخل الحفرة الفموية فقط إلى حدود البلعوم الفموي واستبعدت عينات سرطانات الجلد والحنجرة وما بعدها تشريحياً.
5. حجم الخزعة المستأصلة: أن لا تقل حجم الخزعة عن نصف سم^3.

- العينات النسيجية الجيدة التحضير التي لا تحتوي على تنخر.

عدد العينات:

بعد الاطلاع الكلي على أرشيف مرضى مشفى جراحة الفم والفكين في كلية طب الأسنان جامعة دمشق والبالغ 2500 حالة مرضية مختصة بالفم والأسنان، بلغ عدد المرضى المشخصين بالسرطان البشروي شائك الخلايا في الحفرة الفموية 37 مريضاً ضمن المدة المذكورة سابقا، وعدد العينات من مستشفى المواساة والمخابر الخاصة 20 عينة، وبلغ أرشيف مرضى المشفى الجامعي جامعة حلب 13000 حالة عامة (حيث لا يوجد في حلب مخبر خاص بكلية طب الأسنان) بلغ عدد المرضى المشخصين بالسرطان البشروي شائك الخلايا 330 حالة، وكان عدد الحالات الخاصة بالحفرة الفموية 75 **حالة**، اختيرت 35 حالة سرطان بشري شائك الخلايا مما سبق(مناصفة بين مشفى كلية الأسنان بدمشق ومشفى الجامعة بحلب) ووفقاً للمعايير السابقة.

العينات الشاهدة:

اختيرت 4 عينات طبيعية (التهابية)، لمقارنة درجة تلونها بالملونات المناعية بدرجة تلون العينات السرطانية .

ثانيا- المواد والأجهزة المستخدمة في البحث :

أوعية خاصة لحفظ العينة بعد اخذ الخزعة ووضعها بالفورمول، شاش معقم، فورمول 10%، كحوليات متدرجة التركيز، كزيلول لإزالة البارافين، ملونا الهيماتوكسيلين والإيوزين، بلسم كندا، الماء المقطر، الماء العادي، ورق نشّاف، الجيلاتين، شبّة الكروم، سائل تريس، الكيت المناعي العام LASB الخاص لشركة DAKO، مستضدات الجينة Cyclin D ،لامات زجاجية عادية، لامات زجاجية مطلية بمادة لاصقة لتطبيق الملونات المناعية، سواتر زجاجية، قفازات، كمامة. جهاز قياس الحموضة PH، المبشرة النسيجية microtome، محم لتسخين وفرش المحضرات، ومحم بدرجة حرارة 50^0 م لإدماج البارافين، جهاز تسخين حراري جاف بالأمواج القصيرة، براد خاص للقوالب الشمعية، مجهر ضوئي خاص للدراسة المجهرية والتصوير مزود بكاميرا دقيقة التصوير يابانية .

ثالثا- طرائق الدراسة :

I- الدراسة النسيجية الروتينية (هيماتوكسيلين ايوزين): وتمر بعدة مراحل

1- مرحلة التثبيت: بوساطة الفورمول الممدد 10% مدة لا تقل عن 24 ساعة.

2- مرحلة الإدماج:نقوم بإدماج العينة إلى شمع البارافين

3-مرحلة القطع: بوساطة الميكروتوم يعطينا شرائح رقيقة 7-5 ميكرون.

4-مرحلة وضع هذه الشرائح على الصفائح الزجاجية.

5-نزع البارافين : بوساطة محم بدرجة حرارة 64 0م ثم الكزيلول والكحول.

ثمّ تلون المحضرات بالملون الروتيني (هيماتوكسيلين ايوزين)لإجراء الدراسة .

II- طريقة التلوين بالملونات الكيميائية النسيجية المناعية:

اعتمدنا في تلوين المحضرات بالملونات الكيميائية النسيجية المناعية على طريقة الشركة الصانعة للأضداد المناعية و كانت شركة DAKO الدانماركية . وقد كانت هذه الطريقة وفقاً للتسلسل الآتي:

1. غسل السلايدات المنزوعة الشمع والمجهزة مسبقا بالماء المقطر بشكل جيد.
2. وضع السلايدات في محلول Target wash buffer المسخن لدرجة حرارة 95-99 م بحرارة قياسية داخل مكروويف، مع تغطية الجرة للمحافظة على درجة الحرارة، و منع التبخر مدة 15د.
3. ترك المحضرات لتبرد بدرجة حرارة الغرفة، ومن ثم يتم غسل المحضرات بالماء المقطر بشكل جيد، وبالاستعانة بورق نشاف، تجفف الصفائح الزجاجية.
4. استخدام الكيت العام الخاص بالتلوين المناعي لشركة داكو LASB على الشكل التالي حسب تعليمات الشركة المصنعة :

أ- تغمر العينات بالماء الأكسجيني3% مدة خمس دقائق، ثم يتم غسل المحضرات بسائل تريس، ومن ثم تغمر المحضرات بشكل كامل بسائل تريس مدة خمس دقائق .

ب- تجفيف حول العينات بالاستعانة بورق نشاف لعدم انزلاق المستضد خارج العينة، ثم يتم غمر العينات بالمستضد الأولي مستضدات الجينة ,Cyclin D مدة 15 دقيقة، ثم تغسل هذه المحضرات بسائل تريس، ومن ثم يتم غمرها بسائل تريس مدة 5 دقائق.

ج- تغمر العينات بالرابط " Link " مدة عشر دقائق، ثم تغسل بسائل تريس، ومن ثم تغمر المحضرات في هذا السائل مدة خمس دقائق .

د- تغمر العينات بالستربتافيدين " Straptavidin" مدة عشر دقائق، ثم تغسل بسائل تريس ومن ثم تغمر المحضرات في هذا السائل مدة خمس دقائق.

ه- يمزج "2 مل" من Substrate buffer مع نقطة واحدة من AEC-Chromogen وهذه الكمية تكفي من 8 إلى 10 مقاطع نسيجية. ثمّ يتم غمر العينات في المزيج السابق Substrate+Chromogen مدة 10 دقائق.

و- تغسل المحضرات بالماء المقطر مدة دقيقة واحدة، ثم تجفف بالاستعانة بورق نشاف.

ز- تلون المقاطع النسيجية بهيماتوكسيلين ماير، ثم يتم غسل المحضرات بالماء المقطر مدة دقيقة واحدة، ومن ثم يتم غسلها بالماء الجاري .

ح- ستر المقاطع النسيجية باستخدام البلسم أو مزيج " الجيلاتين والغليسرين.

6. الفحص بالمجهر الضوئي بالتكبير (60-40-10-4) لتحديد إيجابية التلوين.

IV. النتائج :

1) نتائج الدراسة الإحصائية:

شكلت نسبة الذكور المصابين بالسرطان البشروي شائك الخلايا في دراستنا 72% والإناث نسبة 28%. وكانت أكبر نسبة من المصابين في العقد الخامس من العمر بنسبة 40% من المرضى، ثمّ في العقد الرابع بنسبة 24% من المرضى، ونسبة 15% أكبر من 60 سنة .

وكانت نسبة 70% من الحالات بحجم سريري يتراوح من 1 – 2 سم ، في حين كانت 22% من الحالات بحجم أكبر من 2 سم ، وكانت نسبة 8 % فقط من الإصابات بحجم أقل من 1سم.

2) نتائج الدراسة النسيجية(التلوين بملون الهيماتوكسين والايوزين):

استخدمنا المعايير المتبعة لتشخيص خلل التنسج حسب تقرير المنظمة العالمية للصحة لأورام الرأس والعنق لعام 2005 حسب الجدول الآتي.[43]

الاضطرابات البنيوية للظهارة	اللانمطية الخلوية
الارتصاف الظهاري الشاذ	تعدد الأحجام الخلوية
فقدان قطبية الخلايا القاعدية	تعدد الأشكال الخلوية
الامتدادات الإصبعية للظهارة	ازدياد حجم النواة وتنوعها
ازدياد عدد الانقسامات الخلوية	ازدياد نسبة حجم النواة للهيولى
الانقسامات السطحية الشاذة	اختلال اصطباغ النوى(زيادة أو نقصان)
عسر التقرن الخلوي(لآلئ قرنية)	ازدياد عدد وتنوع حجم النويات
	الأشكال الانقسامية الشاذة

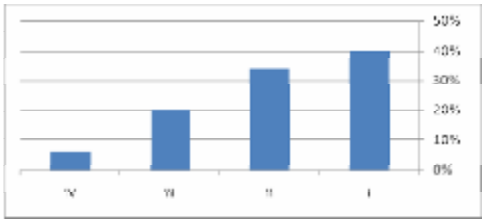
جدول معايير منظمة الصحة العالمية لتشخيص خلل التنسج لعام 2005

صنفت العينات المدروسة إلى 4 درجات وذلك على درجة قرب هذه الخلايا شكلياً من الخلايا الطبيعية، وعلى وجود المنتج الطبيعي لهذه الخلايا وهو القرنين. وعلى مدى اجتياح جزر الخلايا البشروية ودرجة خباثتها.

وقد أبدت العينات المدروسة جميعها علائم الخبث النسيجية الأربع من انقسامات شاذة وفرط اصطباغ واختلال النسبة النووية السيتوبلامية ووجود التقرن الفردي، أمّا كرات التقرن المعكوس فقد كانت موجودة في 60% من الحالات.

وقد كانت نسبة الدرجات الورمية النسيجية على التوالي الأولى 40% والثانية34% والثالثة 20% والرابعة 6%.

درجة الخبث	I	II	III	IV
عدد الحالات	14	11	7	3
النسبة	%40	%34	%20	%6

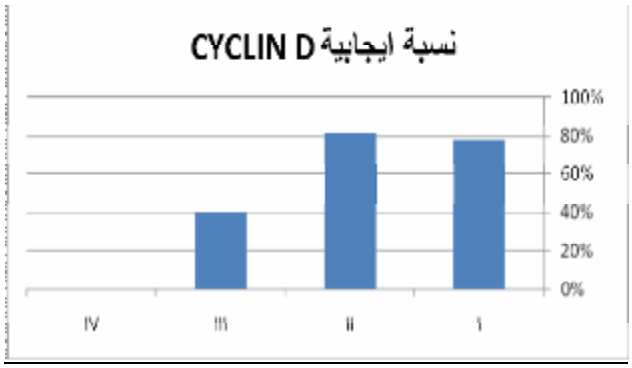


جدول ومخطط يبين نسبة العينات السرطانية مقارنة بالدرجة الورمية النسيجية

3) **نتائج الدراسة النسيجية المناعية(التلوين بكاشف بروتينات الجينةCYCLIN D):**

قورنت العينات المدروسة المصنفة إلى 4 درجات حسب التلوين السابق وحددت هل إذا كانت إيجابية أو سلبية لتلوين الكيمياء المناعية، حيث كانت نسبة الإيجابية تقريباً 69% لكامل الدرجات الورمية النسيجية مع سلبية التلوين في عينات الفم الالتهابية.

درجة الخبث	**I**	**II**	**III**	**IV**
إيجابي	**11**	**9**	**5**	**0**
سلبي	**3**	**2**	**2**	**3**
نسبة الايجابية	**%78**	**%82**	**%40**	**%0**



جدول ومخطط يبين نسبة إيجابية تلون العينات مقارنة بالدرجة الورمية النسيجية

V. المناقشة :

يعدُّ السرطان آفة قاتلة مهددة للحياة البشرية، وكان من أهداف الجامعة وقسم التشريح المرضي في كلية طب الأسنان التعامل بما يخدم المجتمع خاصة والبشرية عامة، فرجونا من هذا البحث أن يكون لبنة في هذا الطريق وفي بناء المجتمع وخدمته.

وجد من العينات الإحصائية العشوائية للسرطان شائك الخلايا الفموي أن نسبة الإصابة عند الذكور أكبر من نسبة الإناث (72% و الإناث نسبة 28%)، وهذا ما يتفق مع الدراسات العالمية كلّها ومع Cawson ,Regezi, Harrison, Eugene ([1,2,3,8]) .

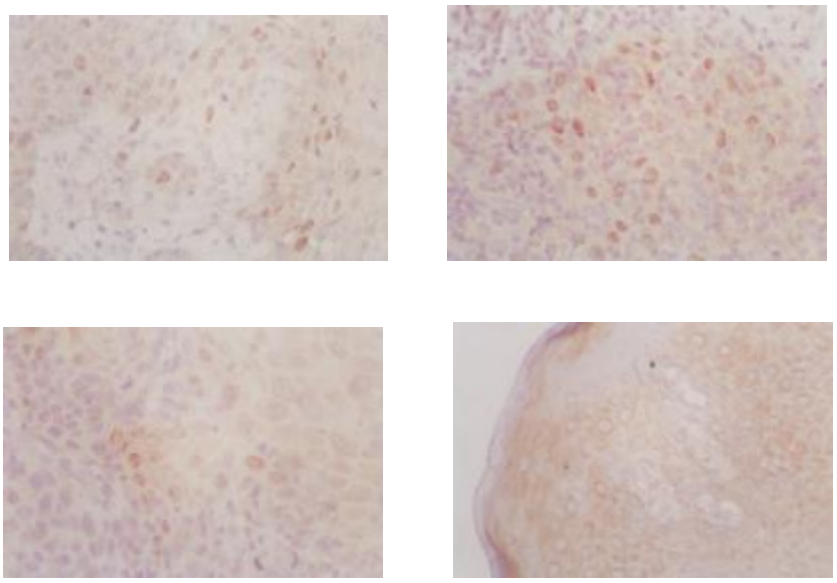
ولاحظ تزايد الإصابة بالسرطان بدءاً من العقد الرابع وكانت ذروة الإصابة عند الذكور للفئة العمرية فوق60، في حين كانت ذروة الإصابة عند الإناث في العقد؟ وقد يعزى ذلك عند النساء بسبب التغيرات الفيزيولوجية والهرمونية والنفسية التي تصاحب سن الأمل ، وهذا ما يتفق مع Cawson ,Regezi, Harrison, Eugene ([1,2,3,8]).

و لاحظنا من الدراسة الإحصائية لحجم الآفة ومكان توضعها في الفك نلاحظ أنها أكثر توضعاً في الفك السفلي، وكانت حجوم الآفة صغيرة فلم تتجاوز حجم الافة2سم في 61%، وربما يعزى إلى عدم تأخر الكشف السريري للآفة بسبب سهولة الرؤية عند المريض والطبيب الممارس نسبة إلى السرطانات الحشوية.

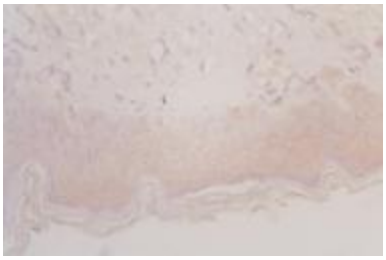
ومن الدراسة الإحصائية النسيجية كانت أكبر نسبة لتقييم الدرجة الورمية النسيجية من ذات **درجة II** أكبر من النصف من عينات البحث، ونستنتج من الدراسة الإحصائية النسيجية أنَّ السرطان الفموي من السرطانات المتمايزة نسيجياً وما يؤكد ذلك وجود كرات التقرن بنسبة أكبر، وكذلك درجة التمايز البشروية، وكذلك وجود الالتهاب المنتشر الذي يدل على ردة فعل العضوية الجيدة تجاه السرطان الفموي، وهذا ما يتفق مع Regize و cawson .بينما تدلُّ النسبة الكبيرة لشمول علائم الكشم لخلايا العينة البشروية وتقرح البشرة على الطبيعة السرطانية لهذه الآفة ونسبة البقيا السيئة له.

كان الهدف الأساس من هذا البحث دراسة المورثة السرطانية فاستخدمنا الكيمياء النسيجية المناعية(كاشف بروتينات الجينة CYCLIN D) لدراسة تعبير الجينة الورمية التي قد تتداخل بشكل مباشر بتنشؤ السرطان لاحظنا من خلال تلوين العينات السرطانية بكاشف بروتينات الجينة CYCLIN D زيادة في تعبير بروتينات هذه الجينة، وخاصةً في درجات الخبث المنخفضة للسرطان الفموي على النقيض من نتائج العينات الشاهدة(العينات الالتهابية الفموية) التي غاب فيها تعبير الجينة، وهذا ما يؤكد تشارك الجينة السرطانية CYCLIN D كجينة ورمية في السرطانات الفموية شائكة الخلايا. وهذا ما توافق مع ثلة من الباحثين الذين استخدموا طريقة التلوين بالكيمياء النسيجية المناعية وأكدوا زيادة في تعبير بروتينات CYCLIN D بنسب مختلفة في السرطانات الفموية الشائكة. [26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,].

أكدت هذه الدراسة بمجملها دور تراكم الطفرات في طلائع المورثات الورمية، وتشارك الجينة السرطانية CYCLIN D كجينة ورمية في السرطانات الفموية شائكة الخلايا مما يعزز أهمية تحري الجينات الورمية التي يعدُّ تطفرها محفزاُ لحدوث السرطانات (متضمنة السرطان الفموي).ويحتاج تعبير الدلائل الإنذارية السريرية لهذه المورثات إلى دراسات إضافية.



إيجابية للملون CYCLIN D



سلبية للملون CYCLIN D

المراجع

1. Cawson R.A. , E.W.Odell, Oral Pathology & Oral Medicine, Churchill Liningston, 8th edition ,2008.p.1-16,228-243.
2. Regizi , Sciubba, Jordan. Oral Pathology, Clinical-Pathologic Correlation. Chapt 2, Neoplasms. Saunders Elsevier, 5nd 2008.
3. Guyton C. & et all, Medical Physiology & Mechanism of disease, Harcourt Asia ,PTE ltd, 2001
4. Kumar Vinyl , Abul K. Abbas ,Nelson Fausto. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th edition. 0-7216-0187-1. ISBN 0-8089-2302-1. © 2005, Elsevier Inc.
5. David Hyde, Introduction to Genetic Principles, chapter 1,2,3,7,8,9,10,11,12,22. McGraw-Hill. 2009. USA.
6. Frank Gorga , The Molecular Basis of Cancer. Bishop's and Varmus' (Biosci Rep. 10(5): 413-430, December 21, 2000.
7. Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler, The Genetic Basis of Human Cancer, 2nd edition,McGraw-Hill Professional, 2002, ISBN 0071370501, 9780071370509.
8. Eugene Myers, James Suen . Cancer of the Head and Neck, Chap 2-3-4-5-13-32-32-33-34, Elsevier Science , 4th Edit, 2003, USA.
9. Sylvia S Madar, et al, *Essentials of* biolpgy, Chap8,9,10,11,12. Mc ROW-HILL. ©2007
10. Joseph A. Brennan, M.D., Li Mao, et al. Molecular Assessment of Histopathological Staging in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. The New England Journal of Medicine, 2005, Vol 332:429-435.
11. Louis B. Harrison, R B. Sessions, et al. Head and Neck Cancer A Multidisciplinary Approach. Chapter 16-17-36-37-38-39-40-41-42, LIPPINCOTT Co. 2nd Edition, 2004.USA.
12. David Hyde, Introduction to Genetic Principles, chapter 1,2,3,7,8,9,10,11,12,22. McGraw-Hill. 2009. USA.
13. Madeleine Armstrong . Molecular diagnostics - paving the way for personalised medicine , Science & Technology, *Clinica's Review of 2008, Clinica Issue 1332*
14. Cambridge University Press, Mitogens drive cell cycle progression by induction of cyclinD and inactivation of the retinoblastoma (Rb) protein, Accession: (02)00441-6a.pdf.ISSN 1462-3994 ©2002 .
15. Elizabeth A. Barnes, Monica Kong, Vincent Ollendorff and Daniel J Donoghue. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. the *EMBO Journal* (2001) 20, 2214–2223, doi:10.1093/emboj/20.9.2214.
16. Kannemeier, C., Liao, R. Sun, P., Yoshizuka, N., et al, Signal Transduction Pathways Mediating Cellular Responses to Oncogenic Mutations. Mol. Biol. Cell 18:2367, 2007.

17. Karl Herrup & Yan Yang. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology?, Basics of the cell cycle. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 368-378 (May 2007). doi:10.1038/nrn2124.
18. Sander van den Heuvel, Cell-cycle regulation :WormBook, General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129 USA . September 21, 2005.
19. Z.E.Winters . P53 pathways involving G2 checkpoint regulators and the role of their subcellular localization. J.R.Coll.Surg.Edinb., August 2002, 591- 598 .
20. Sylvia S Madar, et al, Essentials of biolpgy, Chap8,9,10,11,12. Mc ROW-HILL. ©2007
21. Choi HR, Batsakis JG, et al. Differential expression of p 53 gene family members p63 &p73 in head and neck Squamous tumorogenesis. Pathol 2002 feb;33(2):158-64
22. Jeffrey N. Myers; F. Christopher Holsinger.et al, Targeted Molecular Therapy for Oral Cancer With Epidermal Growth Factor Receptor Blockade. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:875-879. Vol. 128 No. 8, August 2002.
23. L.L.Loro, et al. Cell death regulation in oral SCC: methodological considerations and clinical significance. J.Oral Pathol Med VOL:32,3,0904-2512. 2003.
24. Sol Silverman, L. Roy Eversole, et al. Essentials of Oral Medicine, Chap20, BC Decker, Hamilton, London, 2002.
25. Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, et al. Cell BIOLOGY. Chapter12-17,43-48. SAUNDERS Elsevier, 5nd Edition 2005.
26. Okami K, Reed AL, Cairns P, et al. Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene. 1999;18:3541-3545.
27. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. Clin Cancer Res. 1999;5:2810-2819.
28. Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, et al. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997;123:497-502.
29. Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, et al. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. Oral Oncol. 2000;36:334-339.
30. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, et al. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. Cancer Lett. 2000;160:3-8.
31. Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, et al. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of

chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. Cancer. 1997;79:380-389.
32. Capaccio P, Carboni N, Pignataro L, et al. Cyclin D1, p53, mdm2, and Ki67 protein expression in preneoplastic lesions of the larynx. J Chemother. 1997;9:113-114.
33. Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, et al. Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein overexpression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma. Int J Cancer. 1997;74:576-581.
34. Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, et al. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. Cancer. 1996;78: 390-395.
35. Pignataro L, Pruneri G, Carboni N, et al. Clinical relevance of cyclin D1 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol. 1998;16:3069-3077.
36. Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, et al. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. Clin Cancer Res. 1996;2:175-180.
37. Callender T, El-Naggar AK, Lee MS, et al. PRAD-1 (CCND1)/ cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. Cancer. 1994;74:152-158.
38. Fortin A, Guerry M, Guerry R, et al. Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence. Clin Cancer Res. 1997;3:1609-1614.
39. Gleich LL, Li YQ, Wang X, et al. Variable genetic alterations and survival in head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;125:949-952.
40. Meredith SD, Levine PA, Burns JA, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;121: 790-794.
41. Muller D, Millon R, Velten M, et al. Amplification of 11q13 DNA markers in head and neck squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. Eur J Cancer. 1997;33:2203-2210.
42. Derynck R. The physiology of transforming growth factoralpha. Adv Cancer Res. 1992;58:27-52.
43. Leon Barnes , John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, World Health Organization Classification of Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC),IARCPress:Lyon, WHO OMS. 2005.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: 2009/11/19.
تاريخ قبوله للنشر:2010/3/2.