أهمية فرط ميثلة الجينات ($p14^{ARF}$ - $p16^{INK4A}$) في تشخيص سرطان الخلايا الحرشفية بالفم والفم والبلعوم: مراجعة

نجيب محمد محمد الجبو[1] سميرة ضو فرج امعيقل[2]

قسم المختبرات الطبية، كلية التقنية الطبية -مصراته [1]

قسم المختبرات الطبية، المعهد العالي للتقنيات الطبية -بني وليد[2]

الملخص:

سرطان الخلايا الحرشفية بالفم والفم والبلعوم أحد أنواع سرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق والذي يضم مجموعة مختلفة من الأورام تتغاير من الناحية النسيجية والجزيئية ولكنها تشترك إلى حد ما في نفس المسارات لنشوء السرطان والتي تشمل العديد من التغيرات الجينية والتغيرات الفوق جينية (اللاجينية). التغيرات الفوق جينية هي التي تحدث في التعبير الجيني دون تغير في سلسلة الDNA، حالياً أصبح جلياً أن تثبيط الجينات الكابتة للورم قد يكون ناجما عن هذه التغيرات والتي يعتبر فرط المبثلة أكثرها شيوعا، حيث أظهرت الدراسات الحديثة أن أنماط ميثلة الDNA تحوي إشارات ودلائل على نوع الورم ويمكن أن تكون مؤشرات حيوية على بدء تسرطن الأنسجة ونشوء الورم قبل حدوث التغيرات النسيجية.

الهدف من الدراسة: تحليل البيانات المتاحة عن فرط ميثلة الجينات ($p14^{ARF}$_ $p16^{INK4A}$) وأهميتها كمؤشرات حيوية لنشوء سرطان الخلايا الحرشفية بالفم والفم والبلعوم وتشخيصه.

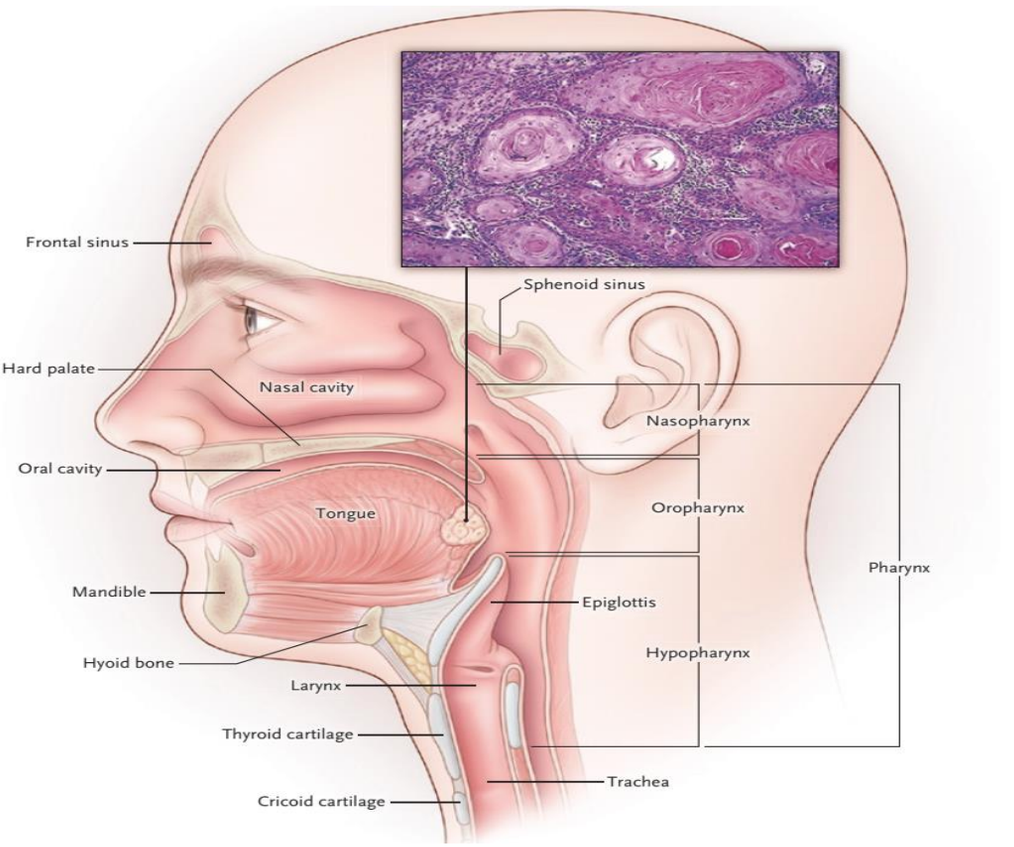
النتائج: أظهرت الدراسات أن حالة الميثلة للجينات المذكورة تمثل مؤشرات حيوية للتنبؤ بنشوء سرطان هذه الخلايا وتشخيصه والذي يسهم في المعالجة الصحيحة والمبكرة للمرض. ونستنتج إمكانية تجاوز مشاكل التشخيص المتأخر ومخاطر معاودة ظهور الورم وانتشاره بدراسة التغيرات الجزيئية بالأنسجة السرطانية والانسجة المجاورة لها والتي تعتبر سليمة بالتشخيص النسيجي والاعتماد على حالة ميثلة الDNA في الجينات المختلفة ومن بينها هذه الجينات للتنبؤ بالنشوء وتشخيص المرض.

الكلمات المفتاحية: سرطان العنق والرأس، سرطان الخلايا الحرشفية، المحفز الجيني، فرط ميثلة

الـDNA.

المقدمة:

نعلم جيداً أن أعداد المصابين بالسرطان على مستوى العالم في تزايد مستمر، ويعتبر سرطان الرأس والعنق (Head and neck cancer) سادس أنواع السرطان الأكثر انتشاراً حول العالم والذي يضم مجموعة من الأورام السرطانية أشهرها سرطان الخلايا الحرشفية (Squamous cell carcinoma "SCC"). ويعد التشخيص المتأخر والتأخر في وضع خطة علاج مناسبة من أسباب الإنذار والتوقع السيئ للمرض (poor prognosis) and (Coca-Pelaz A et al., 2018) (Johnson DE et al., 2020). ويبين الشكل رقم1 المواضع التشريحية لسرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق (Chow LQM. 2020).



الشكل 1 : المواضع التشريحية الرئيسية لسرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق.

يعتبر التدخين وتناول الكحول من أهم عوامل الاختطار للإصابة بسرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق وخاصة في الرجال ذوي الأعمار المتقدمة، والنساء بسبب ازدياد أعداد المدخنات بينهن

خلال العقود الأخيرة، كما أن الإصابة بعدوى فيروس الورم الحليمي البشري تصنف من عوامل الاختطار للإصابة بأحد أنواع هذا السرطان وهو سرطان الفم والبلعوم لدى ذوي الأعمار الأقل ومن هم في سن الشباب، وبصورة أقل هناك عوامل أخرى وتشمل التعرض للأشعة، السموم والملوثات البيئية، ضعف المناعة أو تثبيطها، ومضغ التنباك (Johnson DE et al., 2020), (Chow LQM. 2020), (Blot .WJ et al., 1988), and (Tuyns AJ et al., 1988). تشترك أورام الرأس والعنق في وجود نفس التغيرات النسيجية في مرحلة ما قبل ظهور السرطان إلى حد ما وكذلك في المسارات متعددة الخطوات لنشوء السرطان مؤدية لظهور سرطان الخلايا الحرشفية (Leemans CR et al., 2011)، وهذه العملية متعددة الخطوات تشمل مجموعة من التغيرات الجينية والتي اتضح في العقدين الأخيرين أن تثبيط أو إخماد الجينات الكابتة للورم (tumor suppressor genes) هو أحد المبادئ الأساسية للتسرطن والذي لا ينجم فقط عن التغيرات الجينية (genetic changes) بسبب الطفرات أو الحذف وإنما كذلك بسبب التغيرات فوق الجينية (اللاجينيةepigenetics changes) (Herman JG. et al., 2003), and (Baylin SB. et al., 2011) Jones PA.) , (et al., 2002

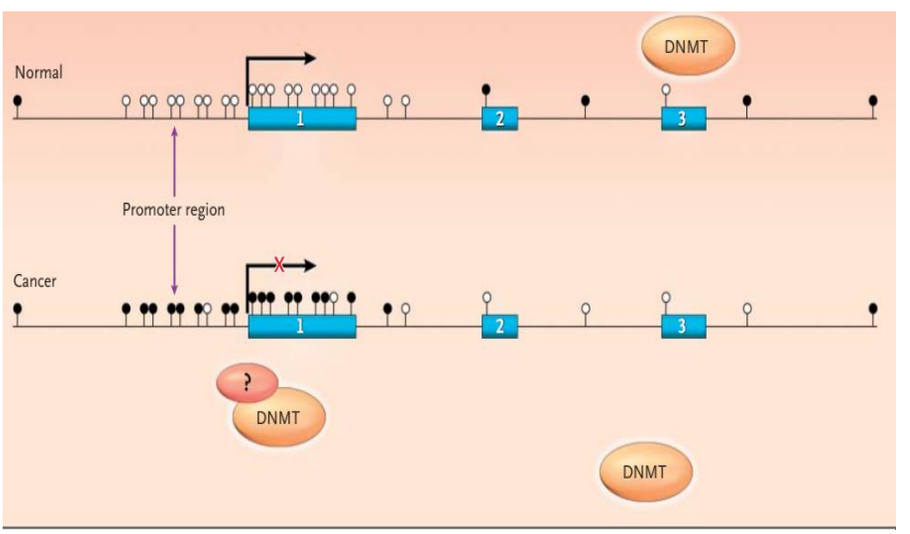
التغيرات فوق الجينية تتضمن كل التغيرات في أنماط التعبير الجيني دون التغير في سلسلة الDNA، ويعتبر فرط الميثلة أحد هذه التغيرات التي تم دراستها على نطاق واسع والذي يؤدي إلى تثبيط أو إخماد نسخ الجينات الكابتة للورم وهذا يلاحظ بشكل أكثر شيوعا من الطفرات في السرطان (Stebbing J. et al., 2006). وهذا التغير قابل للتعديل بعكس التغيرات التركيبية في بنية الDNA ولذا تعتبر دراسة هذا التغير ذات أهمية لاستحداث نظم علاج فعالة (Herman JG. et al., 2003), and (Momparler R. 2003).

هناك تباين كبير بين أنواع سرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق (Head and neck squamous cell carcinoma "HNSCC") من حيث الأسباب، التغيرات النسيجية، المظاهر السريرية، وكذلك التوقع والتكهن لسير المرض كل هذا يقود إلى دراسة ما إذا كان للأساس الجزيئي بما في ذلك فرط الميثلة دور في هذا التغاير (Leemans CR et al., 2011), and (Sankaranarayanan R et al., 1998). ومعرفة النمط اللاجيني سيمكن من تصنيف سرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق إلى مجاميع فرعية حسب هذا الأساس والذي كذلك يحوي العديد من المعلمات الحيوية (Biomarkers) لكل مجموعة والتي ستحسن من سبل التحري،

التشخيص المبكر، والمعالجة السليمة للمصابين (Laird PW. 2003).

ويعتبر تجويف الفم من أكثر مواضع نشوء وتطور الأورام بالرأس والعنق لذلك ستتمحور هذه المراجعة على أحد أنواع سرطان تجويف الفم وهو سرطان الخلايا الحرشفية بالفم، والفم والبلعوم (Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma "OSCC") وذلك لتزايد معدلات الإصابة بهذا النوع والحاجة لمعرفة محددات ومعلمات حيوية أكثر خصوصية لتحسين سبل التشخيص والمعالجة وخاصة في الحالات غير المرتبطة بعدوى فيروس الورم الحليمي البشري التي ما زالت تعاني من تأخر التشخيص والمعالجة بالإضافة إلى التوقع السيء لتطور الإصابة (Sung H et al., 2021) يتميز هذا السرطان بمعدل بقاء على قيد الحياة لحوالي 5 سنوات، معاودة الظهور بعد المعالجة وكذلك بعد الاستئصال الجراحي حتى وإن كانت الحواف الجراحية نسيجيا خالية من الورم (Mohan M et al., 2014). وسيكون التركيز على فرط الميثلة للجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** المنظمة لدورة انقسام الخلايا والتي تحدث في منطقة ما يعرف بالمحفز (Promoter) لمعرفة أهميتها وإمكانية الاعتماد عليها كمعلمات حيوية للإنذار(prognostic biomarkers).

تم التعرف على أنماط ميثلة غير طبيعية للDNA في الخلايا السرطانية منذ أكثر من 25 سنة؛ حيث وجد نقص أو فقدان الميثلة في خارج منطقة المحفز والتي يجب أن تكون مميثلة في الخلايا الطبيعية كذلك يوجد ميثلة بمنطقة المحفز في الخلايا السرطانية والتي تكون غير مميثلة في الخلايا الطبيعية، الشكل رقم 2 يبين الفروق في نمط الميثلة بين الخلايا الطبيعية والخلايا السرطانية (Herman JG. et al., 2003).



الشكل 2: الجزء العلوي يبين توزيع الثنائيات ونمط الميثلة في الخلايا الطبيعية والجزء السفلي لتوزيع الثنائيات ونمط الميثلة في الخلايا السرطانية؛ حيث تشير الدوائر البيضاء إلى الثنائيات بلا ميثلة في حين أن الدوائر السوداء تشير إلى مواضع الميثلة فيما يشير السهم الأسود في الأعلى إلى موضع البدء في النسخ في موضع المحفز حيث الثنائيات غير مميثلة بينما في الأسفل يشير السهم إلى توقف عملية النسخ في منطقة المحفز بسبب ميثلة الثنائيات.

فرط ميثلة المحفز:

يستعمل مصطلح فوق الجيني غالبا للإشارة إلى فرط ميثلة محفز الجين (promoter hypermethylation) إلى جانب التعديلات الأخرى مثل نقص الميثلة الشامل global genomic (hypomethylation). تتمثل عملية فرط الميثلة في إضافة مجموعة ميثايل (a methyl group) لنيوكلتيدة السيتوسين (a cytosine nucleotide) بتحفيز من إنزيمات عائلة الانزيم الناقل للميثايل الـDNA DNA methyltransferase enzyme family (DNMTs) مع S - أدينوسيل الميثيونين (S-adenosylmethionine) الذي يعمل كمتبرع بمجموعة الميثايل لينتج 5 -ميثايل سيتوسين (5–methylcytosine) (Herman JG. et al., 2003). يحدث هذا التعديل في نيوكلتيدة السيتوسين بثنائي نيوكلتيدات السيتوسين -الجوانين (CpG dinucleotides) المتوزعة بشكل غير متماثل بالجين، نسبة صغيرة من هذه الثنائيات تتجمع في ما يعرف بجزر السيتوسين -الجوانين (CpG–islands)، وهذه الجزر تتموضع بمناطق محفز الجين والتي تشكل ما نسبته 50٪ من جينات الثدييات (Antequera F. et al., 1993).

منطقة المحفز عبارة عن سلسلة تواليات من الـDNA تمثل منطقة سيطرة وتحكم لارتباط عوامل النسخ وعوامل مضاعفة بلمرة الـRNA لبدء عملية نسخ الـDNA الى RNA (Herman JG. et al., 2003), and (Veigl ML et al., 1998). في الحالة الطبيعية أغلبية الجينات بها مواضع محفزة وتكون جزر السيتوسين -الجوانين بهذه المواضع بلا ميثلة، وعملية الميثلة تكون لثنائيات السيتوسين -الجوانين خارج الجزر بشكل كبير وهذه الوضعية تحمي سلامة الجين أثناء التضاعف وتكبت نسخ المواضع غير الحاملة لشفرة (noncoding DNA) و غير المرغوب نسخها ونسخ المواضع الحاملة للشفرة من الـDNA (coding DNA), (Herman JG. et al., 2003) and (Leemans CR et al., 2011).

- في الخلايا الورمية يحدث تحول مهم في نمط ميثلة الـDNA بزيادة ميثلة جزر السيتوسين

الجوانين في منطقة المحفز لجينات معينة وخاصة المتداخلة في إصلاح الـDNA (DNA repair)، الموت المبرمج للخلية (apoptosis)، تنظيم دورة انقسام الخلية (cell cycle regulation)، بالإضافة إلى الجينات الكابتة للورم (tumor suppressor genes). في حين سيكون هناك فقدان لعملية الميثلة لثنائيات السيتوسين –الجوانين خارج منطقة المحفز فيما يعرف بنقص الميثلة الشامل مما يؤدي إلى زيادة التعبير الجيني بسبب ضعف كبح النسخ لهذه المواضع الناجم عن نقص ميثلتها، وهذه التغيرات ستؤثر على ثبات الجينات وتؤدي الى تسرطن الخلية. ولوحظ فرط ميثلة المحفز في كل أنواع السرطان تقريبا (Costello JF et al., 2000) (Laird PW. 2003), and). ولإمكانية انعكاس الميثلة غير الطبيعية وإرجاعها إلى طبيعتها جعلت من فرط ميثلة الـDNA هدفا جذابا لمعالجة السرطان باستعمال عوامل للمعالجة الكيماوية لها القدرة على إزالة مجاميع الميثايل من المحفزات وتنشيط الجينات الكابتة للورم من جديد (Yoo C et al., 2006).

فرط ميثلة المحفز في سرطان الفم والفم والبلعوم:

التغيرات فوق الجينية في سرطان الخلايا الحرشفية بالفم، والفم والبلعوم كانت محور العديد من الدراسات والتي أظهرت أن فرط ميثلة المحفز الجيني لعديد الجينات كان شائعا بشكل كبير وأن الجينات الكابتة للورم هي التي يتم تثبيطها بهذه التغيرات والتي منها الجينات موضع الدراسة.

البروتينات p16 وp14 نواتج نسخ الجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** تعمل كمثبطات وموانع لتطور انقسام الخلايا (Leemans CR et al., 2011), and (Pérez-Sayáns M et al., 2011)، وان التغيرات بهذه الجينات من أهم أسباب نشوء سرطان الرأس والعنق (López F et al., 2017). في العقدين الأخيرين لوحظ فرط ميثلة شاد في الأنسجة التالفة قبل سرطان الفم والأنسجة المصابة بالسرطان الفم، الفم والبلعوم (premalignant oral lesions and OSCC) Papadimitrakopoulou V et al., 1997), (Kresty LA et al., 2002), and (Cao J et al., 2009)، وكذلك بالأنسجة المخاطية السليمة نسيجيا والمحيطة بالورم (Kato K et al., 2006)، وتعزى عملية كبت الجينات (Kaur J et al., 2010), and (Sinha P et al., 2009) **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** في المقام الأول إلى فرط ميثلة المحفز (Ohta S et al., 2009).

في واحدة من الدراسات الأولى عن OSCC لدراسة طبيعة التغيرات في عدد 58 عينة لخلايا سرطانية مأخوذة من مرضى مصابين بسرطان الخلايا الحرشفية بالفم والفم والبلعوم أظهرت نتائجها أن كبت الجين **$p16^{INK4A}$** وفقدان البروتين p16 قد وجد في الأغلبية العظمى من

الأنسجة السرطانية (87٪) وأن فرط الميثلة لمحفز الجين **$p16^{INK4A}$** كان أكثر شيوعا لديهم من الطفرات (23٪، و7٪ على التوالي) (Wu CL et al., 1999). وفي دراسة على مجموعة مرضى برازيليين ضمت 45 مريضاً أجريت لهم جراحة استئصال لـ OSCC لدراسة حالة الميثلة لعدد أربعة جينات من بينها الجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** أظهرت النتائج وجود معدلات عالية لفرط ميثلة هذه الجينات وملاحظة أن هذا المعدلات العالية لوحظت بشكل كبير لدى المرضى الذين يعانون من انتشار الورم للعقد اللمفاوية (de Freitas Cordeiro-Silva M et al., 2012). كذلك في دراسة هندية لمعرفة نمط ميثلة محفز الجين لعدد أربعة جينات من بينها الجين **$p16^{INK4A}$** شملت 92 عينة لمصابين بـOSCC أظهرت نتائجها ارتفاع معدل الميثلة بمنطقة المحفز للجينات محل الدراسة بالنسيج الورمي وأن ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** ترتبط بانتشار الورم للعقد اللمفاوية (Kaur et al., 2010).

في دراسة للتحديد الكمي لفرط ميثلة المحفز لعدد خمسة جينات كان من بينها الجين **$p16^{INK4A}$** في عينات مرضى OSCC ودراسة العلاقة ما بين مؤشر الميثلة النوعي (quantitative methylation index) لهذه الجينات والمتغيرات السريرية بينت نتائجها عدم وجود علاقة أو ارتباط بينها (Viswanathan M et al., 2003) وأن ميثلة الجينات بالنسيج الورمي أعلى من ميثلة النسيج بحواف للورم بمعنى أن الميثلة من العوامل المرتبطة بالورم (Kaur et al., 2010) and (Viswanathan M et al., 2003), وقد لوحظ في دراسة أخرى أجريت على 28 عينة لأنسجة مرضى يعانون من نمو نسيجي شاد (dysplastic lesions) بمنطقة الفم والحلق بدرجات خلل تنسج متفاوتة منها 3 بخلل تنسج خفيف، 14 بخلل تنسج معتدل، و11 بخلل تنسج شديد ارتفاع معدل ميثلة محفز الجين **$p16^{INK4A}$** في الأنسجة ذات الخلل المعتدل(14/11 مريض يمثلون نسبة 79٪) والخلل الشديد(11/9 مرضى يمثلون نسبة 82٪) بينما كان معدل الميثلة بالأنسجة ذات الخلل الخفيف منخفضاً (3/1 مريض يمثل نسبة 33٪) وبنسبة عامة 75٪ لجميع العينات وخلصت الدراسة إلى أن فرط ميثلة محفز الجين **$p16^{INK4A}$** هو تغيير فوق جيني مبكر في التسرطن للرأس والعنق (Papadimitrakopoulou VA et al.,2001)، في حين وجد **كريستي** وآخرون من خلال دراستهم لعدد 28 عينة خزعات مأخوذة من مرضى يعانون من خلل التنسج الظهاري الفموي الشديد أن ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** كانت بمعدل 57٪ وميثلة الجين **$p14^{ARF}$** في نفس الأنسجة

كانت بمعدل 3.8٪ وأن فرط ميثلة الجين هو أحد أهم أسباب كبت الجين p16INK4a في خلل التنسج الظهاري الفموي (Kresty LA et al., 2002).

في دراستين لمعرفة أهمية فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** كنذير لنشوء السرطان في خلل التنسج الظهاري الفموي (oral epithelial dysplasia)، في الدراسة الأولى والتي أجريت على 24 عينة مأخوذة من مرضى يعانون من خلل التنسج الظهاري الفموي وجد أن فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** كانت في نسبة مهمة من عينات المرضى ممن تطور الامر لديهم الى OSCC (14/8 مرضى يمثلون نسبة 57٪) مقارنة بمن لم تتطور حالتهم (24/2 مريض يمثلون نسبة 8.33٪) وفرط ميثلة هذا الجين لم تكن مرتبطة بوقت بداية تطور الورم(Hall GL et al., 2008)، في الدراسة الثانية والتي تم فيها دراسة علاقة فرط الميثلة للجين **$p16^{INK4A}$** بتطور الحالة إلى نشوء سرطان الخلايا الحرشفية لدى 78 مصاباً بخلل التنسج الظهاري الفموي 32 منهم كان لديهم فرط ميثلة و46 لم يكن لديهم فرط ميثلة للجين المذكور تم متابعتهم بالكشف النسيجي كل ثلاثة أشهر لمدة بلغت في متوسطها اشهر 45.8 فكان معدل التطور الى OSCC عالياً بشكل ملحوظ في الحالات ذات فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** وخاصة عند ذوي الأعمار فوق الستين (32/14 مريضاً يمثلون نسبة 43.8٪، مقابل 46/8 مرضى يمثلون نسبة 17.4٪) (Cao J et al., 2009)، وهذه النتائج تؤكد أن فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** تمثل مؤشراً مهماً للتنبؤ بتطور خلل التنسج الظهاري الفموي إلى سرطان الخلايا الحرشفية بالفم، الفم والبلعوم.

في دراسة بأمريكا أجراها **قولدنبيرغ** وزملاؤه لمعرفة أهمية فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** في هوامش الورم (margins) وهي النسيج المحيط بالورم وتعتبر سليمة بالتشخيص النسيجي كمؤشر تنبؤي لنشوء وتطور الورم في الهوامش بعد الاستئصال الجراحي شملت عينات لعدد 13 مريضاً مصاباً بسرطان الخلايا الحرشفية بالرأس والعنق أظهرت نتائجها وجود فرط ميثلة للجين **$p16^{INK4A}$** بالنسيج السرطاني وفرط ميثلة في عينات الهوامش لعدد 3 مرضى وخلصت الدراسة إلى أهمية دراسة فرط الميثلة في هوامش الورم للمرضى الذين تتطلب حالتهم الاستئصال الجراحي لتشمل العملية استئصال النسيج المحتوي على التغيرات فوق الجينية بالهوامش (Goldenberg D et al., 2004)، وفي دراسة أخرى بالهند شملت عدداً أكبر من المرضى لمعرفة أهمية فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** في هوامش الورم بعد الاستئصال الجراحي لعدد 38 مريضاً بسرطان الخلايا

الحرشفية باللسان وجد فرط الميثلة في عينات النسيج الورمي لعدد 33 مريض (86٪)، بالفحص النسيجي لنسيج هوامش الورم تبين أن عينات 3 مرضى منهم أظهرت وجود تغيرات سرطانية بنسيج الهوامش فيما الـ30 عينة الأخرى لا توجد بها أي تغيرات نسيجية بينما كان هناك فرط ميثلة عدد 13 عينة منها (30/13 بنسبة 43.3٪) وخلصت الدراسة إلى إمكانية اعتبار فرط الميثلة لمحفز الجين **$p16^{INK4A}$** مؤشراً للتنبؤ لمعاودة ظهور السرطان حيث وجد أن هذا الخطر يزيد عند المرضى الذين وجد فرط الميثلة في عينات هوامش المرض لهم يزيد بمقدار 6.2 ضعف عن أولئك الذين لا يوجد فرط ميثلة في عينات هوامش المرض لهم (Sinha P et al., 2009). وكانت هاتين الدراستين الأولى لمعرفة أهمية فرط المثيلة بالهوامش كمؤشر تكهني أو تنبؤي وكذلك كمؤشر إنذار بعد الاستئصال الجراحي. في دراسة أخرى أجريت لمعرفة وجود فرط ميثلة الجينات **$p16^{INK4A}$** و **$p14^{ARF}$** في الأنسجة الورمية، هوامش الورم، والأغشية المخاطية الطبيعية للشدق لعينات مأخوذة من مرضى مصابين بسرطان الخلايا الحرشفية بالفم، الفم والبلعوم أظهرت نتائجها وجود فرط الميثلة بالأنسجة الثلاثة وهذا دليل على أهمية هذا التغير في نشوء سرطان الفم وخلصت الدراسة إلى أن وجود فرط الميثلة والتغيرات الجينية الأخرى تشير إلى أهمية دراسة فرط الميثلة في التشخيص المبكر والحاجة إلى طرق تشخيص أكثر دقة من التشخيص النسيجي (Eljabo N et al., 2018).

نظراً لمعرفة وجود فرط ميثلة محفز الجينات **$p16^{INK4A}$** و **$p14^{ARF}$** في الأنسجة المحيطة بالورم (peritumoral tissues) والأنسجة في مرحلة ما قبل الورم أو في طور التسرطن (premalignant tissues) فذلك يشير إلى أن التغيرات فوق الجينية تمثل حدثاً مبكراً لجعل الأنسجة عرضة للتحول الورمي، وهذه الاستنتاجات تتفق مع مفهوم "مجال التسرطن" الذي اقترحه **سلاوتر** وآخرون (Slaughter et al., 1953) لشرح معدل معاودة ظهور السرطان بعد المعالجة والاستئصال الجراحي لسرطان الرأس والعنق (Slaughter DP et al., 1953). العديد من الدراسات تناولت هذا الجانب ومن بينها الدراسة التي أجريت بالهند لتقييم التغيرات الجينية والتغيرات فوق الجينية بالجينات **$p16^{INK4A}$** و **$p14^{ARF}$** وعلاقتها بالمحصلة السريرية لمرضى سرطان الفم تم فيها دراسة التغيرات في عدد 116 عينة لمرضى حديثي التشخيص بسرطان الفم، والفم والبلعوم ومن بينها هذه التغيرات ميثلة محفز الجين **$p16^{INK4A}$** والجين **$p14^{ARF}$**، أظهرت نتائج وجود ميثلة لمحفز الجين **$p16^{INK4A}$** في عدد 34 عينة (29.3٪) وميثلة محفز الجين **$p14^{ARF}$** في عدد 21 عينة (18.1٪) بينما وجدت ميثلة الجينين معا في عدد 7 عينات (6٪)، وتبين من خلال متابعة المرضى انخفاض

احتمالية معاودة ظهور المرض عند المرضى ممن وجد فرط ميثلة لمحفز الجين **$p14^{ARF}$** لديهم بمعدل 9 أضعاف عن احتمالية المعاودة عند المرضى الذين لا يوجد فرط ميثلة للجين **$p14^{ARF}$** لديهم ووجود ارتباط قوي ما بين ميثلة محفز الجين **$p14^{ARF}$** ومحصلة مبشرة للحالة فتثبيط هذا الجين يجعل الخلايا أكثر حساسية للأشعة، كذلك لم تسجل معاودة ظهور المرض عند المرضى الذين وجد فرط ميثلة الجينين معا لديهم، بينما ارتبطت ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** بقصر فترة البقاء على قيد الحياة وكذلك بزيادة تصل إلى ثلاثة أضعاف لاحتمالية معاودة ظهور الورم ، وخلصت الدراسة إلى أهمية دراسة التغيرات الجينية والتغيرات فوق الجينية للجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** والتي يأتي فرط الميثلة في مقدمتها كمؤشرات على تطور سرطان الفم وشدته وفعالية المعالجة كذلك (Sailasree R et al., 2008). كذلك في دراسة أخرى لمعرفة حالة ميثلة عدد من الجينات من بينها الجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** في أنسجة سرطانية لعدد 96 مصاباً بسرطان الخلايا الحرشفية بالفم وعلاقتها بالعلامات السريرية المرضية للورم فوجد فرط مثيلة الجين **$p16^{INK4A}$** في عدد 28 (29٪) وفرط ميثلة الجين **$p14^{ARF}$** في 13 عينة (14٪) ووجد ارتباط كبير بين فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** والأعمار الصغيرة وكذلك صغر حجم الورم (المراحل المبكرة lower T stage) في حين كان فرط ميثلة الجين **$p14^{ARF}$** وبشكل ملحوظ على ارتباط وثيق بفترة بقاء أطول للمرضى، وبينت النتائج ان الشدود في الميثلة يعتبر علامة ذات فائدة للتنبؤ بنشوء المرض ومآل الحالة (Ogi K et al., 2002). وبصورة مماثلة في دراسة لفرط ميثلة المحفز لعدد من الجينات من بينها الجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** في 49 عينة لمرضى مصابين بسرطان الخلايا الحرشفية بالفم وعلاقتها بالعلامات السريرية المرضية للورم فوجد فرط ميثلة لمحفز الجين **$p16^{INK4A}$** في عدد 17 عينة (34.7٪) وفرط ميثلة الجين p14ARF في عدد 10 عينات (20.4٪) وخلصت الدراسة إلى ارتباط فرط ميثلة الجين **$p14^{ARF}$** بالتدخين، ادمان الكحول، انتشار الورم للعقد اللمفاوية، والمراحل المتقدمة للورم (كبر حجم الورم late T stage)، وارتباط فرط ميثلة الجين **$p16^{INK4A}$** بكبر حجم الورم والمراحل المتقدمة (Ishida E et al., 2005).

كذلك في دراسة أجريت على 35 عينة لأنسجة مأخوذة من مصابين بسرطان الجلد المخاطي للغدد اللعابية أحد أنواع سرطان الرأس والعنق و10 عينات خزعات لغدد لعابية طبيعية لدراسة فرط ميثلة المحفز لعدد 4 جينات من بينها الجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** أظهرت نتائجها وجود فرط ميثلة لمحفز الجين **$p16^{INK4A}$** في عدد 35/21 (60٪) من عينات الأنسجة السرطانية مقابل فرط

ميثلة في 10/2 (20٪) من عينات الخزعات الطبيعية، ووجد فرط الميثلة لمحفز الجين **$p14^{ARF}$** في عدد 35/35 (100٪) من عينات الأنسجة السرطانية، وفي عدد 10/2 (20٪) من عينات الخزعات الطبيعية وخلصت الدراسة إلى أن فرط ميثلة محفز هذه الجينات من عوامل نشوء السرطان (Nikolic N et al., 2018).

المناقشة:

للمؤشرات الحيوية الجزيئية سواء كانت جينية أو فوق جينية دور مهم في تشخيص وتقدير مخاطر تطور السرطان وكذلك التنبؤ بفاعلية العلاج والنتائج السريرية لعديد الأنواع من الأورام لكون بعض من هذه المؤشرات تظهر خلال المراحل المبكرة لنشؤ الورم وهذا يسهل من التدخل السريع والمعالجة المبكرة للورم، وهناك العديد من المحاولات للتحقق من وجود هذه المؤشرات في العينات السليمة نسيجياً لتحديد الأشخاص ذوي الاختطار لنشوء الأورام لديهم.

مع زيادة معرفة طبيعة التغيرات الجينية والتغيرات فوق الجينية تغير فهم الأساس الجزيئي للسرطان وأصبح لدينا ما يكفي من الأدلة على الدور المهم الذي تمثله التغيرات فوق الجينية في تطور السرطان وتأثيرها على الجينات الكابتة للورم، وأصبح واضحاً في العديد من الأورام وجود علامات فوق جينية مميزة وأن فرط ميثلة الـDNA هو أحد أهم هذه العلامات. لذلك أصبح البحث منصباً على إمكانية استحداث تصنيف جزيئي جديد للمرض إلى مجاميع فرعية بسبب اتساع المعرفة بالتغيرات الفوق جينية.

يعد تجويف الفم تربة خصبة لنشوء الورم بسبب تعرضه المستمر لمختلف المطفرات البيئية أو المواد المسرطنة مما يؤدي إلى زيادة احتمالية حدوث التغيرات الجينية والتغيرات فوق الجينية بالخلايا وبالتالي تسرطنها (Mohan M. et al., 2014). ولا يزال التحدي في كيفية التعامل والسيطرة على سرطان الفم عند المصابين لصعوبة توقع تطوره، معاودة ظهوره بعد الاستئصال، والانتشار، لذلك أصبح واضحاً إمكانية الاعتماد على المؤشرات الجزيئية وبالأخص فوق الجينية والتي أهمها فرط الميثلة للتنبؤ والإنذار بنشوء الورم وتحسين نتائج الاستئصال الجراحي بالإضافة لمراقبة للورم.

من خلال البيانات ونتائج الدراسات التي تم استعراضها حول OSCC يتضح أن فرط مثيلة محفز الجينات **$p16^{INK4A}$** و **$p14^{ARF}$** يرتبط بنشوء الورم وكذلك فرط مثيلة الجين **$p16^{INK4A}$** يعتبر مؤشر على علامات ونتائج سريرية سيئة، ومؤشر على إمكانية معاودة ظهور الورم، في حين أن نتائج فرط مثيلة الجين **$p14^{ARF}$** واعدة وأهمية فرط مثيلة هذا الجين الكابت للورم من الناحية

السريرية تحتاج للمزيد من الدراسة والبحث. كذلك بينت النتائج أنه لا يمكن اعتبار الأنسجة المجاورة للورم والأنسجة المخاطية السليمة نسيجياً خالية من الورم لوجود نفس التغيرات الموجودة بالأنسجة السرطانية وهذا يدل على احتمالية تسرطن هذه الأنسجة وبالتالي معاودة ظهور المرض وانتشاره.

الاستنتاج:

للتطور في مجال اللاجينات تغير فهمنا للأساس الجزيئي للسرطان وأصبح جلياً أن التغيرات فوق الجينية لـ DNA تلعب دوراً حاسماً في نشوء وتطور السرطان لدورها في تنظيم عملية نسخ الجينات الكابتة للورم والتحكم فيها. كذلك في عديد الأورام يمكن تمييز بعض الخصائص فوق الجينية والتي أهمها فرط ميثلة الـDNA.

وبناء على ما تم استعراضه نخلص إلى التالي:

1. أن فرط ميثلة الجينات **$p16^{INK4A}$** و**$p14^{ARF}$** هو شدود مرتبط بالسرطان نظراً لوجوده بالأنسجة الورمية لسرطان الخلايا الحرشفية بالفم والبلعوم بعكس الأنسجة السليمة.
2. أن فرط المثيلة لهذه الجينات يظهر مبكراً في المراحل ما قبل السرطان (مرحلة التسرطن) لوجوده في الأنسجة قبل السرطانية والأنسجة المجاورة للورم.
3. لمثيلة الجين **$p16^{INK4A}$** أهمية كمؤشر للتنبؤ بعديد من العلامات السريرية والمرضية كتطور الانسجة المتضررة السابقة للسرطان الى سرطان الخلايا الحرشفية بالفم والبلعوم، معاودة ظهور السرطان، وفترة البقاء على قيد الحياة الخاصة بالمرض (disease-specific survival).
4. تحديد فرط مثيلة الجين **$p16^{INK4A}$** المبكر قد يساعد على تحديد المرضى الذين يحتمل ان تسوء حالتهم وربما يحتاجون لنظم علاج مختلفة.

التوصيات: مما لا شك فيه ان قطار التطور في مجال تشخيص ومعالجة أنواع السرطان المختلفة في العالم يسير بوتيرة متسارعة من أجل تحسين طرق التشخيص والمعالجة ولمواكبة هذا التطور علينا:

1. إنشاء مراكز أبحاث وتشخيص جزيئي لدراسة أنواع السرطان المنتشرة من الناحية الجزيئية.
2. الاعتماد على التشخيص الجزيئي للتشخيص المبكر وتحديد نمط المعالجة الفعالة لكل

مريض.

3. للتقليل من مخاطر معاودة ظهور المرض يستوجب كذلك دراسة التغيرات الجزيئية بالأنسجة المجاورة للنسيج المصاب حتى وإن كانت سليمة نسيجياً قبل استئصال النسيج المصاب لزيادة حجم النسيج في حالة تبوث وجود التغيرات في النسيج المجاور.
4. حتى وإن لم يكن بالإمكان فتح مثل هذه المراكز في كل مستشفيات ومراكز علاج الأورام بالإمكان إنشاء مركز يقدم الخدمة لها جميعاً في الوقت الحالي إلى أن تتوافر الظروف الملائمة للتوسع في انشاء هكذا مراكز.

المراجع:

- Antequera F, Bird A. (1993) "Number of CpG islands and genes in human and mouse" Proc Natl Acad Sci U S A. 90(24):11995-9.
- Baylin SB, Jones PA. (2011) "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications" Nat Rev Cancer. 11(10):726-34.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. (1988) "Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer" Cancer Res. **48(11):3282-7.**
- Cao J, Zhou J, Gao Y, Gu L, Meng H, Liu H, Deng D. (2009) "Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study" Clin Cancer Res. 15(16):5178-83.
- Chow LQM. (2020) "Head and Neck Cancer" N Engl J Med. 382(1):60-72.
- Coca-Pelaz A, Takes RP, Hutcheson K, Saba NF, Haigentz M Jr, Bradford CR, de Bree R, Strojan P, Lund VJ, Mendenhall WM, Nixon IJ, Quer M, Rinaldo A, Ferlito A. (2018) "Head and Neck Cancer A Review of the Impact of Treatment Delay on Outcome" Adv Ther. 35(2):153-160.
- Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. (2000) "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns" Nat Genet. 24(2):132-8.
- de Freitas Cordeiro-Silva M, Stur E, Agostini LP, de Podestá JR, de Oliveira JC, Soares MS, Mendonça EF, Gouvea SA, Von Zeidler SV, Louro ID. (2012) "Promoter hypermethylation in primary squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a study of a Brazilian cohort" Mol Biol Rep. 39(12):10111-9.
- Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, Jelovac D, Lazarevic M, Tanic N, Milasin J.

(2018) "Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer" Int J Oral Maxillofac Surg. 47(8):976-982.

- Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Califano JA. (2004) "Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer" Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 130(1):39-44.

- Hall GL, Shaw RJ, Field EA, Rogers SN, Sutton DN, Woolgar JA, Lowe D, Liloglou T, Field JK, Risk JM. (2008) "p16 Promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 17(8):2174-9.

- Herman JG, Baylin SB. (2003) "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation" N Engl J Med. 349(21):2042-54.

- Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, Shimada K, Matsuyoshi S, Kirita T, Konishi N. (2005) "Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma" Oral Oncol. 41(6):614-22.

- Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. (2020) "Head and neck squamous cell carcinoma" Nat Rev Dis Primers. 6(1) 92: 1¬22

- Jones PA, Baylin SB. (2002) "The fundamental role of epigenetic events in cancer" Nat Rev Genet. 3(6):415-28.

- Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. (2006) "Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa" J Cancer Res Clin Oncol. 132(11):735-43.

- Kaur J, Demokan S, Tripathi SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, Ralhan R. (2010) "Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma" Int J Cancer. 127(10):2367-73.

- Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, Weghorst CM. (2002) "Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia" Cancer Res. 62(18):5295-300.

- Laird PW. (2003) "The power and the promise of DNA methylation markers" Nat Rev Cancer. 3(4):253-66.

- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. (2011) "The molecular biology of head and neck cancer" Nat Rev Cancer. 11(1):9-22.

- López F, Sampedro T, Llorente JL, Hermsen M, Álvarez-Marcos C. (2017) Alterations of p14 ARF , p15 INK4b , and p16 INK4a Genes in Primary Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Pathol Oncol Res. 23(1):63-71.

- Mohan M, Jagannathan N. (2014) "Oral field cancerization: an update on current concepts". Oncol Rev. 30;8(1):244.

- Momparler, R. (2003) "Cancer epigenetics" Oncogene 22, 6479–6483.
- Nikolic N, Carkic J, Ilic Dimitrijevic I, Eljabo N, Radunovic M, Anicic B, Tanic N, Falk M, Milasin J. (2018) "P14 methylation: an epigenetic signature of salivary gland mucoepidermoid carcinoma in the Serbian population". Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 125(1):52-58.
- Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, Kohama G, Tokino T. (2002) "Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma" Clin Cancer Res. 8(10):3164-71.
- Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, Miyamoto H, Yazawa T, Danenberg K, Danenberg PV, Tohnai I, Kubota Y. (2009) "Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma" Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 107(1):81-91.
- Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, Ro JY, Hittelman WN, Lotan R, Hong WK, Mao L. (1997) "Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions" Oncogene. 14(15):1799-803.
- Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM, El-Naggar A, den Hollander P, Liu D, Hittelman WN, Hong WK. (2001) "Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: role in response to chemoprevention and cancer development" Clin Cancer Res7(10):3127-34.
- Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. (2011) "p16(INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? " Cancer Lett. 306(2):134-41.
- Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. (2008) "Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 17(2):414-20.
- Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. (1998) "Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis" Anticancer Research. 18(6B):4779-4786.
- Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, Gupta SD. (2009) "Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue" Head Neck. 31(11):1423-30.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. (1953) "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin" Cancer. 6(5):963-8.
- Stebbing J, Bower M, Syed N, Smith P, Yu V, Crook T. (2006) "Epigenetics: an emerging technology in the diagnosis and treatment of cancer" Pharmacogenomics. 7(5):747-57.

- Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. (2021) "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries" CA: Cancer J Clin. 71: 209- 249.
- Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, et al. (1988) "Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France) " Int J Cancer. 41(4):483-91.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. (1998) "Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers" Proc Natl Acad Sci U S A. 21;95(15):8698-702
- Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. (2003) "Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma" Int J Cancer. 105(1):41-6.
- Wu CL, Roz L, McKown S, Sloan P, Read AP, Holland S, Porter S, Scully C, Paterson I, Tavassoli M, Thakker N. (1999) "DNA studies underestimate the major role of CDKN2A inactivation in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas" Genes Chromosomes Cancer. (1):16-25.
- Yoo, C., Jones, P. (2006) "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future" Nat Rev Drug Discov 5: 37–50.