Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

دراسة وراثة خلوية عن اورام القولون والمستقيم في الانسان

ناهي يوسف ياسين[1] ، خليل حسن الجبوري[2] ، صفاء كاطع منهوب[2]
1 المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، الجامعة المستنصرية
2 كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة:

تضمن البحث الحالي اجراء دراسة مرضية وراثية خلوية على (29) عينة ورمية لمصابين باورام القولون والمستقيم وكذلك دراسة وراثية خلوية للخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي لنفس المصابين.

أجريت الدراسة الوراثية الخلوية على نفس العينات الورمية حيث استعملت طريقة الزرع المباشرة وكذلك على الدم المحيطي لنفس المرضى باستعمال طريقة الزرع لفترة قصيرة. تم النجاح في تحليل الكروموسومات لـ (7) حالات باستخدام تقنية التحزيم بالنسبة للعينات الورمية و(22) حالة بالنسبة لعينات الدم المحيطي. أظهرت حالتين للخلايا الورمية تغيراً مفرداً واحداً. الحالة الأولى أظهرت زيادة في نسخ كروموسوم (7) (xy,+7,47) اما الحالة الثانية فقد أظهرت زيادة للكروموسوم (1) (X (i1q) متناظر الذراع الطويل. اما بقية الحالات فقد أظهرت تغيرات تركيبية وعددية مختلفة شملت كل من كروموسوم #1,#5,#7,#11,#17,#18,#20,Y.

اما الدراسة الوراثية الخلوية للخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي فقد أظهرت وجود خلايا رباعية المجموعة الكروموسومية في حالتين فقط.

الاستنتاجات: لوحظ تكرر التغيرات للكروموسوم #1 ، وكذلك تؤكد النتائج الحالية علاقة زيادة كروموسوم #11 بمراحل تطور سرطان القولون والمستقيم.

الكلمات الدلالية: دراسة وراثة خلوية لاورام القولون والمستقيم

المقدمة:

بالنسبة للدراسات الوراثية الخلوية فقد بدأ يعول عليها او على نتائجها خلال الثلاث عقود الأخيرة وخصوصاً بعد ايجاد بعض التغيرات التي تحدث في الكروموسومات بصورة غير طبيعية والتي تكون مقتصرة على نوع او شكل واحد من الأورام. لهذا فأن الوراثة الخلوية قد اضافت بعداً آخراً في تشخيص وتوصيف ومتابعة الكثير من الامراض المهمة (Sandberg.1992)(1). كذلك سادت دقة اجراء التقنيات الوراثية الخلوية العاملين في مجال الوراثة الجزئية في تسليط الضوء على بعض الامراض الوراثية المتزانة مع تغيرات كروموسومة محددة لاضافة نتائج مهمة واضافية في معرفة سير ومثال بعض الامراض (Fearon and Vogelstein.1990)(2).

ان علاقة الكروموسومات ونشوء الأورام السرطانية تم الاشارة اليها منذ بداية القرن السابق بواسة (Yassen.1990)(3). وأصبحت هذه الإشارة الحقيقية أساسية ومهمة، حيث ان خلال العقود التي تبعت فرضية Boveri وبواسطة التقارير والبحوث المتخصصة بالوراثة الخلوية وخصوصاً بعد اكتشاف تقنية التحزيم في بداية السبعينات من القرن العشرين والملاحظات الأخيرة والحديثة في مجال الوراثة الجزئية. كل هذه المؤشرات قد أظهرت بل أكدت ان الأورام امراض وراثية بطبيعتها او مرتبطة بتغيرات تحدث في المادة الوراثية المتمثلة بالكروموسوم وحدة بناء المادة الوراثية (Yassen.1990)(3) (Kund-son.1986)(4). تم بعد ذلك تحديد تغيرات خاصة ومميزة لاغلب امراض الدم الخبيثة بل استعملت هذه التغيرات في تشخيص وتصنيف ومثال امراض كهذه (MIC II.1988)(6)، (MICI.1986)(5). وبصورة مماثلة اصبح من الممكن تحديد التغيرات الكروموسومية للاورام اللمفاوية والاورام الصلدة (Solid Tu-mours) الا انها اختلفت عن امراض الدم كون ان امراض الدم الخبيثة امتازت بتغيرات مميزة تكاد تكون مفردة ومحددة وان هذه التغيرات تكون متزامنة مع الاشكال السريرية، والنسيجية او مثال المرض ومثل هذه الملاحظات امكن تطبيقها على الأورام اللمفاوية ولكن بصورة اقل دقة مما عليه في امراض الدم (Yunis.1983)(7)، (Sandberg.1992)(1) الا انه في حالة الأورام الصلدة وعلى الرغم من المؤشرات الوراثية الخلوية التي تم تشخيصها الا انها لم تكن كافية في إيجاد علاقة بين هكذا مؤشرات وبايولوجية هذه الأورام كما هي الحالة في امراض الدم (Sandberg and Bridge.1992) (8) لذلك أصبحت هناك ضرورة ملحة لتوافق الجهود في إيجاد مثل هكذا علاقة للاورام الصلدة التي تصيب أعضاء جسم الكائن الحي.

وعلى الرغم من كثرة الدراسات الوراثية الخلوية التي تنجز على مختلف الأورام الا انها غير كافية وذلك للأسباب التالية:

1 - صعوبة الحصول على كروموسومات الخلايا الورمية بصورة واضحة وقابلة للتحليل.

2 - من خلال التحليلات الوراثية الخلوية التي تم الكشف عنها يبدو ان هناك تغيرات وراثية خلوية متباينة heterogeneity للاورام نفسها بل وحتى ضمن العينة الواحدة وخصوصاً في اورام القولون والمستقيم (Yassen.1990)(3). ولعدم وجود دراسات وراثية خلوية كافية للامراض وبالاخص الأورام في قطرنا لذا اصبح من الضروري استعمال مثل هذه التقنيات في مجال دراسة علم الامراض التي تصيب الانسان في العراق وخصوصاً الوراثية منها او التي تحدث نتيجة لخلل في المادة الوراثية. لذلك هدفت هذه الدراسة الى:

اجراء دراسة وراثية خلوية لكل من الخلايا الورمية لنسيج الأمعاء الغليضة والخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للمصابين بأورام الأمعاء الغليضة ومحاولة

Corresponding Address:
Nahi Yousif Yaseen
Iraqi Centre for Cancer and Medical Genetics Research, Al-Mustansiriya University
Email: nahiyaseen@iccmgr.org

تحديد او تاشير اهم التغيرات التي تحدث في كروموسومات هذه الخلايا وعلاقتها بالصورة المرضية للاورام.

المواد وطرق العمل:

أ- الوراثة الخلوية للعينات الورمية

1 - جمع العينات المرضية

جمعت العينات الورمية المرضية بواقع 29 عينة مرضية بشرية. جمعت اغلب العينات البشرية من مستشفى المستنصرية الأهلي ومستشفى بغداد التعليمي، عند الحصول على الورم يتم اخذ جزء بقدر 2سم3 من حافة الورم ويوضع في الوسط الزراعي الناقل المبرد وتنقل فوراً الى المختبر.

2 - تحضير النسيج

هنـاك عدة طرق مسـتعملة لغـرض الحصول علـى خلايا ورمية فـي الطور الاسـتوائي للانقسـام وتعتمد هذه الطريقة على شـكل ونوعية الورم. اسـتخدمت الطريقة المباشـرة المثبتة من قبل (3)(Yassen.1990)، يوضع النسيج الورمي مباشرة بعد وصوله الى المختبر في اطباق بلاستيكية ليتم تنظيفه بواسطة الوسط الزرعـي الناقل بأمطاره ولعدة مرات للتخلص من جميـع المواد الغريبة الممكن وجودها ضمن الأمعاء الغليظة، كذلك يتم رفع وإزالة المواد المتنخرة والانسـجة الدهنية.

3 - تفتيت الورم Tumours disaggregation

تم استخدام الطريقة الميكانيكية فقط لتفتيت الورم للحصول على اكبر عدد ممكن مـن الخلايا الورمية، يتم ذلك بوضع قطعة النسـيج الورمـي بعد تحضيرها لهذه المرحلة في طبق بلاستيكي معقم حاوي على 4-2 مل من الوسط الزرعي الحاوي على كولجسـين بتركيـز 12 مايكروغرام لكل مللتر من الوسـط الزرعي بحيث يعمل على تقطيع وهرس النسيج جيداً بواسطة شفرة جراحية وملقط جراحي معقم حتى يتم الحصول على عالق خلوي خالي من قطع النسيج الكبيرة التي لم تستجب للتقطيع والهرس. بعد عملية تجويل النسـيج الى عالـق خلوي يتم نقله الى انابيب زجاجيـة ليحفـظ في الحاضنة لمدة 1-30،1 سـاعة بدرجة حـرارة 37م واثناء عملية الحضن تتم عملية سحب وارجاع للعالق بواسطة ماصة باستور Pasteur pipette بصورة سريعة لعدة ثاني بواقع مرة واحد كل ربع ساعة.

4 - المعاملة بمحلول واطيء التوتر

بعـد الانتهـاء من الحضن يتـم فصل الخلايا من العالق بواسـطة نبذه بسـرعة 1500 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق بعدها يتم سحب الرائق ثم ترج الانبوبة بعدها يضاف محلول واطي التوتر الدافيء(2% 37 kcl) بكمية 10-5 مل لكل انبوبة بحيث تجري هذه العملية بدرجة حرارة الخليط 37م وتكون الاضافة تدريجية مع الاسـتمرار بتحريك العالق لتوضع بعدها الانابيـب في حمام مائي بدرجة حرارة 37م لمدة 30-20 دقيقة.

5 - التثبيت

ينقل العالق بعد الخطوة السابقة الى جهاز النبذ المركزي وبسرعة 1500 دورة/ دقيقـة ولمـدة 10 دقائق فيتم فصل الرائق ونبذه وإبقاء الخلايا في قعر الانبوبة مع القليـل من الرائق. تخلط الخلايـا بعد ذلك مع إضافة المثبت بحيث تكون الاضافة في البداية قطرة قطرة مع الرج المستمر حتى تصبح كميةرائق حتى يتم الحصول على عالق خلايا ضبابي اللون.

6 - تحضير الشرائح الزجاجية

يقطـر عالق الخلايا بعد ان اصبح ضبابياً على الشـريحة الزجاجية والمحضرة حسب الفقرة (4-3-2-1) بحيث يكون التقطير من ارتفاع (50-30) سم والشريحة تكون مائلة بزاوية 45 درجة مئوية، تترك بعد ذلك لتجف.

7 - التصبيغ

تصبغ الشـرائح بصبغة كمزا حيث تغطى الشـريحة بالصبغـة لمدة 3-2 دقيقة ثم تغسل بمحلول سورنسين المدفيء وتترك حتى تجف لتكون جاهزة للفحص.

8 - التحزيم

بعـد عملية التقطيـر لعالق الخلايا على الشـرائح الزجاجية يتم حفظ الشـريحة لمدة 4-2 يوم بدرجة حرارة الغرفة وفي مكان جاف، بعد الخطوة السابقة توضع الشـرائح في فرن كهربائي بمدة سـاعة وبدرجة حرارة 60م، بعدها يتم تعريض الشـريحة الى محلول التربسـين لمدة 17-12 ثانية ثم تغسـل الشـريحة مباشـرة بمحلول داريء الفوسـفات المبرد 4° م وبعد ذلك مباشرة تصبغ الشريحة بالكمزا حيث يجري بعدها عملية فحص الشـريحة بواسـطة المجهر الضوئي ويتم تحديد التغيرات الكروموسومية غير الطبيعية وحسب (9)(ISCN.1995).

ب- الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي

Cytogenetic of peripheral blood lymphocyte

استخدمت طريقة الزرع لفترة قصيرة Short term culture وحسب (Cros-sin.1982) (10).

1 - عينات الدم

تم جمع 29 عينة دم بواقع 3 مل بواسـطة محقنة طبية نبيذة سـعة 5 مل بعد ان غطى سـطحها الداخلـي بمادة الهيبارين وبصورة معقمة تم سـحب الدم من نفس المرضى المصابين بالاورام قبل او بعد عملية إزالة الورم.

2 - تحضير مزرعة الدم

أجريـت عملية زراعة خلايـا الدم اللمفاوية تحت ظـروف معقمة بإضافة 0.3 مل عينة دم المرضى الى 5 مل من الوسـط الزرعي RPMI وبعدها يتم إضافة 0.25 مـل مـن مادة pHA ، يحضـن الخليط بدرجة حـرارة 37° م لمدة 71.5 سـاعة وبصورة معقمة مع مراعاة التحريك اليومـي الخفيف خلال فترة الحضن وبواقع مرتين يومياً.

3 - الحصاد والتثبيت

أ- إيقاف الانقسام

بعـد إتمام الفقرة السـابقة تبدأ فتـرة الحصاد وتبدأ بإضافـة 0.1 مل من محلول الكولجيسـين الخزين الى مزرعة الدم (أي بتركيز 12 مايكو غرام لكل مللتر من الوسط الزرعي) ويعاد حضنه مرة ثانية لمدة 30 دقيقة مع مراعاة التحريك 4-3 مرات خلال هذه الفترة.

ب- المعاملة بمحلول واطيء التوتر

بعد إتمام الفقرة السابقة يتم نبذ أنبوب الزرع بسرعة 1500 ددورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائـق، بعدهـا يتم التخلص مـن الرائق ويضاف الى راسـب الخلايا محلول واطـيء التوتر الدافيء (2 % kcl) بصـورة تدريجية قطرة فقطرة مع التحريك المستمر حتى يصل حجم الإضافة الى 10 مل، يتم بعدها وضع الانبوب في حمام مائي وفي درجة حرارة 37° م لمدة 30-20 دقيقة.

ت- التثبيت

تنبـذ الانابيـب بعد الفترة السـابقة لمـدة 10 دقائق وبواقـع 1500 دورة/ دقيقة ليتم التخلص بعدها من الرائق مع الإبقاء على كمية قليلة منه تكاد تغطي راسـب الخلايـا. ثم يضاف محلول المثبـت المتكون من مزيج الميثانول (3مل) وحامض الخليـك الثلجي (1 مل) حيث تكون هذه الإضافة تدريجية قطرة فقطرة خصوصاً القطـرات الأولـى حتى يصل حجم المثبت الى 5 مل. يتـم بعدها حفظ الخلايا في الثلاجة بدرجة 4 م ولمدة نصف ساعة. وبعد ذلك ينبذ الخليط أيضا لمدة 10 دقائق وبواقـع 1500 دورة/ دقيقة ليتم التخلص من الرائق واضافة المثبت الذي يحضر آنيـا الى الخلايا، تكرر عمليـة النبذ واضافة المثبت حتى يتم الحصول على عالق خلايا ضبابي اللون.

4 - تحضير الشرائح وصبغها

اتبعت نفس الخطوات في تحضير شرائح لخلايا النسيج الورمي.

5 - التحزيم

بعـد اجـراء عملية التقطير يتم حفظ الشـرائح في مكان جـاف وبدرجة حرارة الغرفة لفترة 4-2 أيام لتوضع بعد ذلك في فرن بدرجة حرارة 60 م ولمدة 40-30 دقيقة. بعد ذلك تم تعريض الشـريحة الى محلول التربسين (0.25%) ولمدة 6-5 ثانية بعدها مباشرة غسل الشريحة بمحلول داريء الفوسفات المبرد 4 م ومباشرة يتم صبغ الشريحة.

6 - التصبيغ

يحضـر محلـول الصبغة بتركيز 1 مل مـن خزين صبغة كمـزا مع 4 مل من محلـول سورنسـن حيث يتم خلـط المزيج جيداً ليتم بعد ذلـك فحص 50 خلية في الطور الاستوائي للتعرف على التغيرات الكروموسومية غير الطبيعية ان وجدت وحسب (9)(ISCN.1995).

نتائج الدراسة الوراثية الخلوية

الوراثة الخلوية لأورام الامعاء الغليظة

تـم اجـراء التحليـلات الوراثيـة الخلوية على عينـات اورام الامعـاء الغليظة والمشخصة التي تم اجراء الدراسة المرضية لها وكانت (29) نموذجاً . استعملت طريقة الزرع المباشرة في هذه الدراسة للحصول على خلايا في الطور الاستوائي

لانقسام الخلية . اعداد الاورام التي اعطيت نتائج والتي لم تعطي نتائج موضحة في الجدول (1) ، علماً ان تقرير نجاح النموذج للتحليلات الوراثية الخلوية يتم بفحص (10) شرائح زجاجية للنموذج الواحد على الاقل .

جدول (١) : عدد النماذج المرضية التي تم الحصول عليها والتي تم اجراء التحليلات الوراثية الخلوية عليها

عدد الحالات	النتيجة
١١	لم يتم الحصول على خلايا في الطورالاستوائي
٥	الكروموسومات غيرمنتشرة وغير واضحة وغيرقابلة للتحليل
٦	الكروموسومات قصيرة جداً وقابلة لتحليل نتائج التغيرات العددية
٧	الكروموسومات جيدة وممكن تحليلها

أ- التغيرات العددية

اوضحت النتائج ان ثلاثة عشر نموذجاً ورمياً فقط يمكن اجراءالتحليلات الوراثية الخلوية لها لمعرفة التغيرات العددية للكروموسومات وكما موضحة في الجدول (2) حيث كان منوال mode عدد الكروموسومات لاربع حالات قريبة من ثنائية المجموعة الكروموسومية Neardiploid ، في حين ان خمسة حالات كان تعداد منوال عدد الكروموسومات لها اكثر من ثنائية المجموعة الكروموسومية Hyperdiploidy ، اما الأربع حالات الباقية فكان منوال عدد كروموسومات خلاياها اقل اواكثر من تعداد ثلاثية المجموعة الكروموسومية Hypertriploidy.

جدول (٢) : منوال ومدى التغيرات العددية للحالات التي تم ملاحظتها لـ (٣١) حالة ورمية

التسلسل	رقم الحالة	مراحل الورم حسب تصنيف Dukes المحور	عدد الخلايا المفحوصة	عدد الكروموسومات	
				المنوال	المدى
1	5	C2	18	58	52-67
2	7	C1	55	47	46-47
3	8	D	43	52	47-60
4	10	B2	30	46	46-47
5	13	C2	20	66	49-78
6	15	B2	9	60	46-68
7	17	B2	48	50	46-57
8	18	C2	33	49	46-53
9	20	C2	12	72	68-92
10	22	C2	21	53	45-60
11	23	C1	13	82	82-92
12	24	C1	28	57	52-66
13	27	C2	25	47	46-50

ب- التغيرات التركيبية :

تشير النتائج الى ان سبع حالات فقط تم اجراء التحليل الكروموسومي لها بنجاح لمعرفة التغيرات التركيبية والعددية معاً ، وكانت نتائجها كما مدونة تباعاً ، علماً بأنها كانت جميعها تمثل نوعاً واحداً من الاورام الا وهو ورم الخلايا الظهارية الغذائية الخبيث adenocarcinoma .

• حالة رقم (7) : جرى استئصال الورم من منطقة المستقيم وتبين من خلال الفحص النسيجي وحسب نظام Dukes انه في مرحلة C2 . تم تحليل (13) خلية منها حيث وجد تغيراً واحداً فقط في (6) خلايا وهو زيادة لنسخة واحد لكروموسوم رقم (7) أي الخلايا ذات هيئة كروموسومية 47, 7+, XY ، اما بقية الخلايا فكانت تبدو ذات هيئة كروموسومية طبيعية .

• الحالة رقم (8) : كانت عائدة لمريض تم استئصال ورم له من القولون وبالتحديد في المنطقة السينية وتم ملاحظة خلايا نقيلة لهذا الورم في الكبد ، امكن اجراء تحليل (7) خلايا حيث كان مدى عدد كروموسوماتها (47-55) وبمنوال (52) وبتغيرات عددية وتركيبية متمثلة بالهيئة الكروموسومية التالية وكما موضحة في الصورة (1) .

XO,-Y,+del(1)(p32),+3,+del(5)(q22),+7,-8,+i(8q) ,+,52 11,-12,+13,-15,-17-18,+del(18)(q22),+19,+20,+20,+21,-22,+1mar.

• الحالة رقم (10) : اظهرت خلايا هذه الحالة تغيراً واحداً تم تأشيره في (9) خلايا ، وهو X+1(iq) اما بقية الخلايا وعددها (8) فكانت تبدو ذات هيئة كروموسومية طبيعية علماً بأن الورم تم استئصاله من منطقة المستقيم ولم تظهر خلايا نقيلة له في بقية الاعضاء الاخرى.

• الحالة رقم (17) : كانت تمثل ورماً تم استئصاله من الجهة اليمنى للقولون ومحدد ضمن طبقات الامعاء وغير مخترق لها ولم يلاحظ خلايا نقيلة في بقية

الاعضـــاء القريبة . تم تحليل التغيرات التركيبية والعددية لـ (7) خلايا وكان مدى عدد كروموســومات هذه الخلايا 47-57 وكانت هــذه التغيرات ولمعظم خلاياها متمثلة في الهيئة الكروموسومية ادناه وكما في الصورة رقم (2) :

XX,-1,+del(1)(p32), +2,-5,+der(5)t(5;HSR),50 .(q33;HSR),+7,-11,+13,+14,-17,-17+i(17q),+20+20

• الحالــة رقم (18) : هذه الحالة عائدة لورم تم اســتئصاله من القولون وبالتحديد من المنطقة السينية اشرت خلايا نقيلة لهذا الورم في 5 عقد لمفية نامية . وقد تم تحليل (14) خلية لتأشــير التغيرات التركيبية والعددية للكروموســومات حيث كان منوال عدد الكروموســومات (49) وبمدى 46-53) وادناه التغيرات والمتمثلة بالهيئة الكروموسومية التالية وكما في الصورة رقم (3):

XO,-Y,+i(1q),+2,+4,-5,+6,-8,+11,-13,+14,-18,-,49 19,+20,+22,+1mar

• الحالــة رقــم (20) : تعود الى ورم في الجهة اليســرى من القولون (المنطقة الســينية) وبمرحلة (c2) وكان المدى لعدد كروموســومات خلايا هذه الحالة قريبة من خلايا ثلاثية المجموعة الكروموسومية وقد تم تحليل ثلاث خلايا لهذه العينة وتمثلت بالهيئة الكروموسومية وكما في الصورة رقم (4) :

XX,+del(1)(p32),+2,+3,+3,+4,+5,+5,+del(6),72 (q22),+7,+7,+9,+9,+11,+11,-12,+13,+der(16)t(16;?)(p1:?),- .18,+19,+20,+20+21,1mar+6 Demin

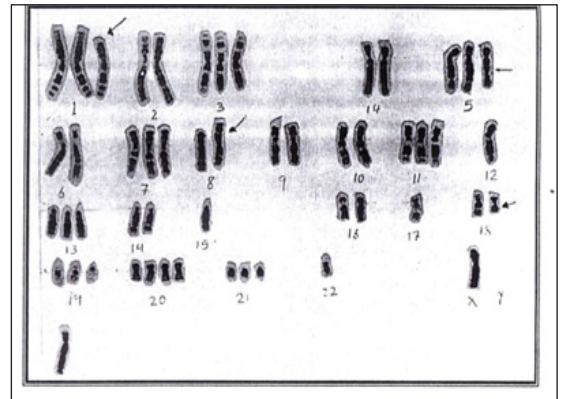
• الحالة رقم (24) : تمثل ورم تم استئصاله من منطقة المستقيم وبمرحلة (C1)، تم الحصول على تســعة خلايا قابلية للتحليل الوراثي الخلوي حيث كان مدى عدد الكروموسومات 52-66 وبمنوال 57 كروموسوم وقد تم تأشير تغيرات عددية وتركيبية متمثلة بالهيئة الكروموسومية ادناه وكما في الصورة رقم (5) :

X X , + 1 , + 3 , + 7 , - 8 , + d e r (8) t (8 ; 1 3) ,5 7 (q 1 ; q 1) , + 1 0 , + 1 1 , + 1 3 , + 1 3 , + 1 5 , - 1 6 , + i (1 6 q) , - 17,+19,+i(20q)+21+1mar

الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي

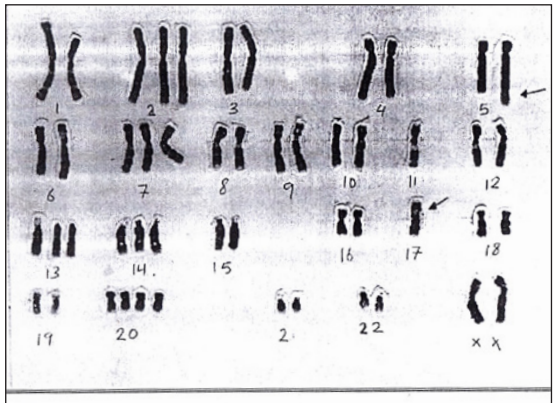
درســت (26) عينــة دم من الناحيــة الوراثية الخلوية ولنفــس المرضى ، وتم الحصــول علــى خلايا في الطور الاســتوائي بصورة واضحة فــي (22) نموذج دم ، جــرى التحــري عن (50) خلية منقســمة في الطور الاســتوائي لكل نموذج ، اظهــرت النتائــج عدم وجود أي تغيــرات عددية وتركيبية في عشــرين نموذج فيما اظهر نموذجين عن وجود خلايا رباعية المجموعة الكروموســومية حيث تم ملاحظة خمس خلايا للحالة رقم (10) ، وثلاث خلايا في الحالة رقم (25)

صورة (1)



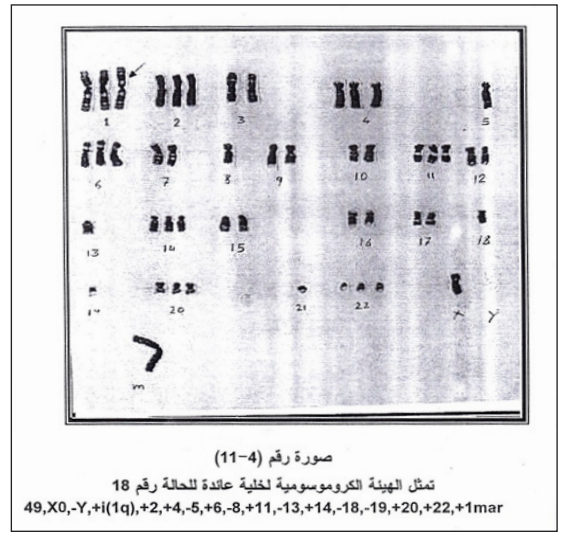
صورة رقم (4-9)
تمثل الهيئة الكروموسومية لخلية عائدة للحالة رقم 8
52,X-Y,+del(1)(p32),+3,+del(5)(q22),+7,-8,+i(8q),+11,-12,+13,-15,-17-18,+ del(18)(q22),+19,+20,+20,+21,-22,+1mar.

صورة (2)



صورة رقم (4-10)
تمثل الهيئة الكروموسومية لخلية عائدة للحالة رقم 17
50,XX,-1,+del(1)(p32),+2,-5,+der(5)t(5;HSR)(q33;HSR),+7,-11,+13,+14,-17,- 17+i(17q),+20+20.

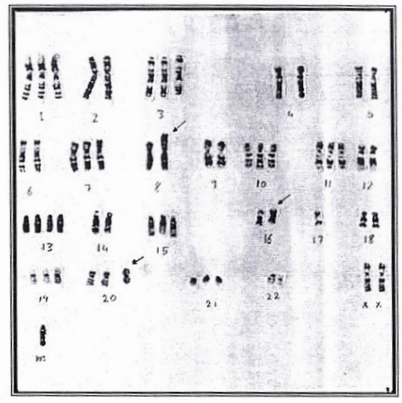
صورة (3)



صورة رقم (4-11)
تمثل الهيئة الكروموسومية لخلية عائدة للحالة رقم 18
49,X0,-Y,+i(1q),+2,+4,-5,+6,-8,+11,-13,+14,-18,-19,+20,+22,+1mar

صورة (4)

صورة رقم (4)
تمثل الهيئة الكروموسومية لخلية عائدة للحالة رقم 20 حيث يلاحظ الدقائق الكروموسومية المزدوجة (سهم)



صورة رقم (4-12)

تمثل الهيئة الكروموسومية لخلية عائدة للحالة رقم 24

57,XX ,+1,+3,+7,-8,+der(8)t(8;13)(q1;q1),+10,+11,+13,+13,+15,-16,+i(16q),-17,+19,+i(20q)+21+1mar

المناقشة :

الدراسة الوراثية الخلوية للخلايا الورمية :

كشفت هذه الدراسة عن النجاح في زراعة واجراء التحليلات الوراثية الخلوية لسبع حالات من اصل (29) اي (24 %) وهذا يشير الى صعوبة التعامل مع زراعة الانسجة واجراء فحص الكروموسومات في مجال الاورام الصلدة Yaseen,1990) (3) (Sandberg & Bride,1992)(8) (Sandl-) (bery,1992) (1 .

وتعزى هذه الصعوبة الى عدة عوامل :

صعوبة الحصول على عينات ورمية طرية Fresh حيث ان عدداً كبيراً من عينت الاورام الصلدة تكون حاوية على مناطق تنخر او خلايا ميتة او ان هذه العينات قد تتلف بسبب التأخر في الحصول عليها من صالة العمليات او التأخر في نقلها من المستشفى الى المختبر.

معظم كروموسومات الاورام الصلدة تكون قصيرة وغير واضحة او تكون غيرقابلة للتحزيم وغيرقابلة للفحص والقراءة .

قلة معامل انقسام الخلايا السرطانية وبالتالي قلة الفرص للحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام ايضاً .

تم استخدام الطريقة المباشرة للزرع في تحضير الكروموسومات وذلك للتقليل من نسبة حدوث التلوث في حالة الزرع لمدة قصير Short term culture حيث ان مكان العينة الورمية تمثل منطقة غنية بالاحياء المجهرية ، وكذلك للوقوف على طبيعة التغيرات الحقيقة للكروموسومات التي حدثت لحظة استئصال الورم وقبلها والابتعاد عن تأثير العوامل البيئية المرافقة للزراعة النسيجية (Smith et al ,1989) (11 وكذلك فأن الطريقة المباشرة تعطي صورة مطابقة لمحتويات الخلية وهي داخل الورم (1) أي العامل الزمني يكون موحداً (Yaseen,1990) (3 .

اظهرت نتائج التحليلات الوراثية لخلايا الاورام عن وجود تغيرات عددية وتركيبية متنوعة في اورام المنطقة اليسرى من القولون وكذلك المستقيم مما يؤكد تباين التغيرات الوراثية Heterogeneity في اورام القولون والمستقيم وهذا ما اشارت اليه الكثير من الدراسات السابقة

Yaseen,1990) (3) (Konstantinova et al, 1991) (12) ( ) (Sandberg,1992) (1 . كانت معظم الحالات في هذه الدراسة في مراحل مرضية متنوعة حسب تصنيف Dukes وهذا يبين عدوم وجود علاقة بين المراحل المرضية والتغيرات العددية والتركيبية للكروموسومات ، كذلك لوحظ في هذه الدراسة تغيرات الكروموسومية المفردة في حالتين . حيث الاولى (حالة رقم 7) اظهرت زيادة نسخة واحدة للكروموسوم (7) tirsomy . ولم تكن هذه الدراسة هي الوحيدة التي تم تسجيل مثل تغير كهذا بل هناك عدد من الدراسات التي لاحظت زيادة نسخة الكروموسوم (7 #) () (3) (Yaseen ,1990 (13) (Baradi et al ,1997) على الرغم من ان هذا التغير قد لوحظ في الكثير من الاورام ومتزامناً مع تطورها (14) (Van den Berghe,1987) فربما يكون ايضاً متزامناً مع تطور سرطان القولون والمستقيم حيث تم ملاحظة زيادة نسخة من كروموسوم رقم (7 #) في الكثيرمن خلايا السليلات الغدية في القولون ايضاً (15) (Longy ,et al , 1993) ان اهمية كروموسوم (7) متأتية من كونه يحتوي الموروث المسؤول عن مستقبلات احد عوامل النمو للبشرة (16) اما الحالة الثانية (حالة رقم 10) والتي اعطيت تغيراً واحد هو (i1q) والذي يعتبر مرحلة سابقة لزيادة نسخة لنفس الكروموسوم المشمول بهذا النوع من التغير (Yaseen,1990)(3) حيث ان زيادة نسخة واحدة لكروموسوم (1) كتغير وحيد لم يشيرله سابقاً بل اشير له كتغير ثانوي في الخلايا الورمية الخبيثة لأورام القولون والمستقيم فقط (3) (Yaseen ,1990)(17)(Reichmann,1984) اوقد يكون هناك تغيراولي غيرمرئي بواسطة المجهرالضوئي(Sandberg& -carel, 1987) (18

ان اهمية وجود تغير كورموسومي واحد قد يشير الى انه تغير اولي ممكن ان يعطي صورة اولية لمراحل تطور الورم (3) (Yaseen,1990) .

اما بقية الحالات فقد سجلت فيها تغيرات تركيبية وعددية مختلفة وغير عشوائية حيث سجل حذف طرفي للذراع القصير لكروموسوم رقم (1) في ثلاث حالات او حذف كامل للذراع القصير في حالة واحدة علماً بأن هناك عدة تغيرات تركيبية لكروموسوم رقم واحد تمت ملاحظتها في دراسات اخرى (Reichman, 1984) (17) (Divinsi et al ,1996) (19 وقد يشكل هذا التغير سبباً مهماً في مراحل مهمة في بايولوجية الاورام ونشوئها كبداية تحول الخلية الورمية الحميدة الى خبيثة او خلود الخلية Immortalization (Paraskeva et al,1989) (21) (Bomme et al ,1998) (20 .

وفيما يخص كروموسوم رقم (5) فقد تم ملاحظة فقدان كامل لإحدى نسخه او حذف بيني] (del (5) (q21] حيث ان هذا التغيير مسجل في حالات سرطان القولون من قبل (22) (Anna ,et at , 1991) (3) (Yaseen,1990) ولأن سرطان القولون والمستقيم متباين التغيرات الوراثية فقد يكون هذا التغير سبب في احداث المرض علماً بأن الموروث FAP يقع ضمن المنطقة السابعة وكذلك الموروث 23) (Yaseen,2001) (24) (Kinzler et al ,1991) (Mcc ، كذلك لوحظ زيادة في نسخ كروموسوم رقم (7) وكذلك بنسبة (85%) وهذا مبين في دراسات اخرى (Schlegel et al ,1995) (3) (Yaseen, 1990

25) () ، وحيث ان زيادة كروموسوم رقم (7) سجل ايضاً في الاورام الحميدة للقولون (20) (Bomme et al,1998) (15) (Longy et al ,1993) فربما يدل على اهمية الكروموسوم (7) في تطوراورام القولون .

تم تأكيدالتغيرات التي حدثت لكرموسوم رقم (8) كتكوين الكروموسوم المتناظرالذراع الطويل(I (8q ، او فقدان الكروموسوم وتزامن هذه التغيرات مع وجود الورم في منطقة اتصال المستقيم مع المنطقة السينية recto sigmoid وهذا مشابه لما ذكره (26) (Ferti et al,1988) (3) (Yaseen,1990) ، وبما ان هذه التغيرات مشتركة في فقدان الذراع الصغير للكروموسوم وكذلك هنالك دراسات تؤكد على وجود مورثين كابحين للورم ضمن هذا الذراع (Fuji-wara et al ,1993) (27) لذا فأن هذا التغير مهم في مرضية سرطان القولون والمستقيم . لوحظ فقدان للكروموسوم (17 #) في حالة رقم (8 ، 24) وكذلك لوحظ فقدان لنسختين مع تكون الكروموسوم المتناظر للذراع الطويل ((17q i في حالة رقم (17) .

ان اهمية فقدان الذراع القصير لكروموسوم (17) مؤشرة من قبل (Yaseen 3) (,1990)

(20) (Bomme et al,1998) (28) (Tagawa et al,1997) حيث ان بعضهم اشار الى هذا التغير حتى في الاورام الحميدة المحتوية على خلايا سرطانية ، فربما يكون هذا التغير مهم في احداث اورام القولون والمستقيم علماً هنالك اوراماً اخرى قد سجل بها الحذف الحاصل في الذراع الصغير لكروموسوم (17) كأورام الثدي (29) (Steinardottir et al , 1995) ، ان اهمية فقدان كروموسوم (17) متأتي من كون هذا الكروموسوم يحوي على موروث كابح للاورام هو P53 الواقع على الذراع القصير والذي لوحظ غيابه في كثير من الاورام (30) (Hollstein et al , 1991) بضمنها اورام القولون والمستقيم .

اما فقدان كروموسوم رقم (18) او حدوث حذف في الذراع الطويل له فقد تمت ملاحظته في حالتين (8، 18) حيث ان مثل هذه التغيرات مسجلة من قبل (Ferti 3) (Yaseen ,1990) (26) (et al ,1998) ، في حين لاحظ (Bardi et al,1995) (31) حدوث التغيرالسابق في خلايا الاورام الحميدة المرافقة للاورام الخبيثة ، ولما كان المورث الكابح للاورام (DCC) موجود في الذراع الطويل لكرموسوم رقم (18) ، فربما يكون هذا التغير ايضاً من الاحداث المهمة في حدوث السرطان في الحالات المدروسة .

ومن التغيرات العددية المهمة وغيرالعشوائية ايضاً والتي قد يكون لها علاقة باورام القولون والمستقيم هي زيادة نسخ كروموسوم رقم (11) في اربع حالات ، جميعها في حالات متقدمة ، وان هذه الزيادة قد يكون لها علاقة مع تقدم المرض في اختراق الخلايا السرطانية لطبقات الامعاء او الانتقال الى اعضاء اخرى حيث المورث MMP7 والذي يشفر لإنتاج بروتين حال Proteolytic وهو Metalloproteinase موجود على الكروموسوم (#11) (Yoshimato et al,1993)(32

اما زيادة كروموسوم رقم (20) لنسخة او نسختين والتي تمت ملاحظتها في اربع حالات (8 ، 17، 18، 20) وحالة رقم (24) اظهرت زيادة للذراع الطويل لنفس الكروموسوم من خلال تكوين كرموسوم متناظر الذراع الطويل (i (20q ، وهذا التغير هوالاكثر ملاحظة في سرطان الامعاء الغليظة ((Yaseen,1990 12) (Konstantinova et al,1991) (3)) بل ان بعضهم كشف عن وجود تضخم ضمن المادة الوراثية يحدث ضمن منطقة في الذراع الطويل لكرموسوم رقم (20)

(33) (Korn et al , 1999) فربما هناك مورث ضمن هذه المنطقة من الكرموسوم .

اظهرت الدراسات فقدان الكروموسوم (Y) في الخلايا الورمية لذكرين (حالة رقم 8 و18) من اصل ثلاث ، حيث لوحظ هذا التغير من قبل (Yaseen 3) (1990,) في ست عينات من اصل ثمان ، الا ان (Winqvist et al 34) (1995,) لاحظوا هذا التغير في خطوط الخلايا العائدة للاورام السرطانية مستأصلة من القولون والمستقيم ، ولأن هذا الفقدان الطبيعي في كبارالسن ، حيث لاحظ(35) (Pierre and Hoagland) فقدان الكروموسوم (Y) في خلايا الدم الليمفاوي المنقسمة . وبما انه لم يلاحظ هذا الفقدان في خلايا الدم المحيطي للمرضى انفسهم فربما يكون هذا الفقدان له علاقة في تطور المرض .

ان وجود العلامات الكروموسومية كالمنطقة الصبغية المتجانسة (HSR) والكروموسومات المزدوجة الدقيقة (D.M) والتي تمت ملاحظتها في حالتين (17، 20) وعلى التوالي حيث ان هذين التغيرين مهمين وذلك لأنهما ذو منشأ واحد ، قد يتحول احدهما الى الاخر ((Balaban-Melenbum & Gilbert,1997 36)) يستدل عن وجود هذين التغيرين بأن الخلايا المحتوية على احدهما تكون مقاومة للادوية المضادة للأورام (37) (Biedler& spangle) .

وجدت خلايا تبدو ذات هيئة كروموسومية طبيعية ضمن الخلايا الورمية في هذه الدراسة وان هذه الظاهرة نفس كون ان هذه الخلايا ممكن ان تمثل خلايا ورمية ذات تغيرات لاترى بالمجهر الضوئي (Sanedberg & Turs-Carel,1987 3) (Yaseen,1990) (18) () او ربما تمثل خلايا طبيعية للنسيج الطبيعي حيث اخذ العينات من حافة الورم قد تكون حاوية على خلايا للنسيج الطبيعي.

الدراسة الوراثية الخلوية للخلايا الليمفاوية في الدم المحيطي

من خلال الفحص المجهري للخلايا الليمفاوية المنقسمة والعائدة للمرضى المصابين بأورام الامعاء الغليظة تم ملاحظة خلايا رباعية المجموعة الكروموسومية في خمس خلايا للحالة رقم (10) وخليتين للحالة رقم (25) ان مثل هذه الخلايا ممكن ان تمثل خللاً في عملية الانقسام ناتجاً من تأثير الكولجيسين اثناء عملية تحضير الكروموسومات ((Winchester & Mertens,1983 38)) او قد تمثل خلايا نقلية من الورم حيث تم ملاحظة مثل هذه الخلايا في اورام الحالة (20، 23) . وفي دراسة اخرى تم ملاحظة مثل هذه الخلايا لمرضى مصابين بابيضاض الدم النخاعي المزمن

(39) (Aljasha'my , 2000) .

المصادر

1. Sandberg ,A.A. (1992). Cytogenetic of human neoplasia. In: Koss, G.L., Diagnostic cytology and it's Histopathological bases. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
2. Fearon ,E.R. and Vogelstin, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorgeinesis Cell. 61:754-767.
3. Yaseen, N.Y. (1990). Cytogenetic study of human colorectal cancer cell. Ph.D. Thesis. Univ. Sheffield.
4. Kundson, A.C. (1986). Genetics of human cancer. Ann. Rev. Genet.20: 231-251.
5. MIC I. (1986) cooperation study group morphological, immunologic and cytogenetic. Working classification of acute lymphoblastic leukemias. Cancer Genet. Cytogent. 23: 189-197.
6. MIC II. (1988). cooperation study group Morphologic, immunologic and cytogenetic MIC. Working classification of acute myeloid leukemias. Cancer Genet. Cytogent. 30: 1-15.
7. Yunis,J.J (1983). The chromosomal basis of human neoplasia. Science. 221: 227-236.
8. Sandberg, A.A and Bridge, A.J. (1992). Techniques in cancer cytogentics. An review and update Cancer. Invest 10: 163-172.
9. ISCN(1995) An international system for human cytogenetic nomenclature, Mitelman, F.(ed) S.Karger. Basle.
10. Crossin,P.E. (1982). SCE in Lymphocyte In: Sister chromatied exchange. Sandberg, A.A. (ed): Alan R.Liss Inc. New York. USA. Pp: 175.
11. Smith, A. ;Van Haften- Day C. ; Russell, P. (1989). Sequential cytogenetic studies in an ovarian cancer cell line. Cancer Genet. Cytogenet. 38: 13-24.
12. Konstantionova ,N.L. ; Fleischman ,W.E.; Knisch, I.V. ; Perevozchikov, G.A, and Kopnin, P.. (1991). Karyotype. Pecularities of human colorectal Adenocarcinoma . Human Gen 68:491-496

13. Bardi, G. ; Parada, A.L.; Bomme, L, ; Pands,N. ; Johansson,B.; Wilen,R. ; Claus,F. ; Ole,K. ; Felix,M. ; Sverre,H. (1997). Cytogenetic findings in metastases from colorectal cancer. Int. J. Cancer. 72: 604-607.
14. Van den Berghe ,H.(1987). Chromosome anomlies in solid tumours and their significance secind international workshop on chromosomes in solid tumours. Cancer Genet Cytogenet. 28: 27-47.
15. Longy, M. ; Suva.R. ; Dumas,F. ; Leseve,J. ; Tani.L. ; Goussot,J. ; Gousigou,P. (1993). Chromosomal analysis of adenomatous polyps of the colon , Cancer Genet. Cytogent. 67: 7013.
16. Mchusick,V. (1980). The anatomy of the human genmic. J. Hered 71: 370-391.
17. Reichmann .A. ; Martin,P. ; Levin,B. (1984). Chromosomes in human large bowel. Tumors: A study of chromosome #1. Cancer Genet. Cytogen. 12: 295- 301.
18. Sandberg. A.A ; Turc- Carel,C. (1987). Progress in soild tumour cytogentics. Cancer Genet. Cytogen. 26: 177-178.
19. Divinci,A. Infusini,E. ; Peveri, C, ; Risio,M. ; Rossiui,F.P. ; Giaretti,W. (1996). Deletion of chromosome 1P by fluorescence in situ hybridization are an early event in human colorectal tumourigensis. Gastroenterology. 111: 102-107.
20. Bommel,L. ; Bradi,G, ; Pandis,N ; Fenger,G. ; Kronborg,O. ; Heim,S.(1998). Cytogenetic analysis of colorectal adenomas karyotiypic comparisons of synchronous tumours. Cancer Genet. Cytogent. 106: 66-71.
21. Paraskeva,C. ; Harrey,A. ; Fienrty,S. ; Powell,S. (1989). Possible involvement of chromosome 1 in invitro immortalization: evidence from progression of human adenoma derived cell line invitro. Int.J. Cancer. 43: 743- 746.
22. Anna, D.P. ; Ferti,A. ; Raptis,S. (1991). Involvement of chromosome 5 in large bowel cancer. Cancer Genet. Cytogent. 54:259-261.
23. Yaseen, N.Y. (2001). Chromosomal findings in patients with familial adenomatous poyposis. Med.J. Tikrit. Univ. (in Press).
24. Kinzler, K.W. ; Nibert, M.C. ; Vogelstein,D. ; Bran, T.M. ; Levy,D.B. ; Smith, K.J. ; Preisinger,A.C. ; Hamilton,S.R. ; Hedge,P. ; Markham,A. ; Carlson,M. ; Joslyn,G, ; Grooden,J. ; White,R. ; Miki,Y. ; Miyoshi.Y ; Nishisho,I. ; Nakamura,Y.; (1991). Identification of a chromosome 5q21 gene that is mutated in colorectal cancer. Science. 251: 1366- 1370.
25. Schlegel,J. ; Stumm,G. ; Scherthan,H. ;Bocker,T. ; Zirnigible,H. ; Ruschoff,J. ;Hofstadter,F. (1995). Comarative genomic in situ hybridization of colon carcinoma with replication error-cancer Res. 55:6002-6005.
26. Ferti,A.D. ; Panani,A.D. ; Raptis.S. (1988). Cytogenetic study of rectosigmoidal of adenocarcenomas Cancer Genet. Cytogenet. 34: 101-109.
27. Fujiwara,T. ; Emi,M. ; Ohata,H. (1993). Evidence for the presence of tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal cancer. Cancer. Res. 53:1172-1174.
28. Tagawa,Y.; Yasutake,T. ; Nanashime,A, ; Jibiki,M. ;Morinaga,M ; Akama,F. ; Nakagoe,T. ; Ayabe,H. (1997). Clinical and pathological singnificance of numerical aberration of chromosomes 11 and 17 in colorectal neoplasma. Clin. Cancer Res. 3:1587-1592.
29. Steinardottir,M; Petursdottir,I. ; Surradttir,S. ; Eypyord,J. and Ogmundsdottir, H.M. (1995). Cytogenetics studies of breast carcinoma (Different karyotypic profiles detected by direct harvesting and short-term culture). Genes Chromosom Cancer. 13:239-248.
30. Hollstein,M.; Sidransky,D. ; Vogelstein, B. ; Harris,C. (1991). P53 mutations in human cancer. Science. 253: 49-53.
31. Bardi,G ; Sukhikh,T. ; Pandis,N. ; Fenger,C. ; Kronborg,O. ; Heim,S. (1995). Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinoma. Genes chromosome cancer. 12:97-109.
32. Yoshimoto,M. ; Itoh,F. ; Yamamoto,H. ; Hinoda,Y ; Lmai,K. ; Yachi,A. (1993). Expression of MMP-7 (lump 1). mRNA in human colorectal cancer. Int.J. Cancer. 54:614-618.
33. Korn,W.M. ; Yasutake,T. ; Kuo,W.L. ; Warren. R.S. ; Collibs,C. ; Tomita,M. ; Gry.J. ; Waldman, F.M. (1999). Chromosome arm 20q gains and other genomic alteration in colorectal cancer metastatic to liver as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization Genes Chromosomes. Cancer. 25:82-90.
34. Winqvist,R. ; Knuutila,S. ; Lepribce,D. ; Steheline,D. and Alitalo,K. (1985). Mapping of amplified C-myb oncogene, sister chrmotid exchanges, and karyotypic analysis, Cancer Genet. Cytogenet. 18:251-264.
35. Pierre, R.V. ; Hosgland,H.C. (1972). Age associated aneploid Y: loss of Y chromosome from human bone marrow cell with aging. Cancer. 30:889-904.
36. Balaban-Malcnbaum ,G and Gilbert,E. (1977). Double minute chromosome and the homogeneously staining regions in chromosome of human neurobalstoma cell line. Science. 198: 739-741.
37. Biedler and Spengelr (1976). Maraphase chromosome Anomaly. Association with drug resistance and cell specific products. Science. 191:185-187.
38. Wincheste,M.A And Mertens,R.T. (1983). Human genetics. Charles Merrill Publishing Company, Colombia, Toronto, London, Sydney.
39. Al Jasha'my, Z.A (2000) study the chromosomal structure and skin cell lines on chromic myloid leukemia patients. MSC thesis, College of Education IBN- AL- Haitham- University of Baghdad. Iraq.