دراسة فعالية كل من المورثين P53 & Bcl-2 في الخزع النسيجية المأخوذة من قولون المرضى المصابين بالتهاب القولون التقرحي

Study the activity of P53 & Bcl-2 genes in the biopsies of inflamed colon from patients of ulcerative colitis

زينب محمد طاهر جعفر **اسماعيل كاظم شبر**
وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البحوث الزراعية وتكنولوجيا الغذاء

Zainab M. T. Jafer **Esmail K. Shubber**
MoST, Directorate of Agric. Res. & Food Tech

المستخلص :

تضمنت الدراسة فحص36عينة من الخزع النسيجية المأخوذة من قولون المرضى المصابين بألتهاب القولون التقرحي المزمن ومن الجنسين كليهما ، ومن مختلف الاعمار ، لغرض الكشف عن التعبير الجيني للمورث الكابح للورم P 53 و المورث المثبط للموت المبرمج Bcl-2 وذلك بأستعمال تقنية التهجين في الموقع . أوضحت النتائج وجود علاقة بين كلا المورثين في مرضى التهاب القولون التقرحي عند قياسها بالأصحاء . أذ أعطى المورث الكابح للورم نسبة 63% في المرتبة 3 و 29% في المرتبة 2 ، و 8% في المرتبة 1 . وكذلك الحال مع المورث الكابح للموت المبرمج Bcl-2 الذي أعطى نسبة 66% في المرتبة 3 و27% في المرتبة 2 و7% في المرتبة 1 قياسا بالأصحاء . هذه النتائج تشير الى وجود طفرات تراكمية في المورث الكابح للورم والمورث الكابح للموت المبرمج وهذا قد يساهم في أعطاء مؤشر يساعد في التشخيص المبكر لسرطان القولون وعلى تقدم المرض نحو التسرطن وتحول الخلايا الى Neoplasm stage وبداية التحول التحول الى خلايا غير طبيعية .

Abstract

The study has been done on 36 samples of biopsies which drawn from patients suffering from ulcerative colitis, the samples were taken from female & male of different ages. The goal was to observe the gene expression of the suppresser tumor gene P53, & the suppresser apoptosis gene Bcl-2, by using in situ hybridization technique. The results showed that there were relationships between both genes (P53 & Bcl-2) in patients suffered from ulcerative colitis compared with healthy individuals. The suppresser gene P53 gave 63% in the high grade(3) , 29 % in the intermediate stage (2) & 8% in the low grade (1) .While for the suppresser apoptosis gene Bcl-2 , the results showed increasing in the activity of this gene , which gave 66% in the high grade(3) , 27% in the intermediate stage (2) , & 7% in the low grade (1) . These results indicate accumulated mutations in the gene P53 & increase in the activity of gene Bcl-2 in inflamed colonic tissue of chronic ulcerative colitis. This gave an indication of early detection for diagnostic, therapeutic and monitoring purposes.

المقدمة

هناك عدد من الفعاليات البيولوجية تعزى الى وجود الطراز البري (wild type) P53 او الى حدوث طفرات في P53 للطراز البري . اذ ان بروتين P53 ينشط عملية استنساخ الجينات المستلمة (receptor gene) الحاوية على consenous DNA binding site وتسمى العملية بالتنشيط الأنتقالي trans-activation فضلا عن ذلك فان p53 يكبح استنساخ انواع عديدة من المعززات promoters التي تتداخل مع ماكنة الاستنساخ الاساسيةtranscriptional machinary [1] .

يسيطر مورث P53 على دورة الخلية في الخلايا الاعتيادية حيث ينظم على الاقل دورتين من دوره الخلية في الانتقالات وهي : مرحله G1/S ، ومرحلة G2/M . وهذه الانتقالات تعمل نقاط السيطرة (check points)

لتاخير تقدم دورة الخلية. للسماح للخلية لاصلاح التلف في DNA قبل ان تدخل الخلية مرحلة (S-phase) او (M - phase) . ان جين P53 الطراز البري يشفر بروتينات نووية مفسفرة تنظم نمو الخلية عن طريق توقف (arrest) لدورة الخلية في مرحلة (G1) لغرض اصلاح DNA التالف ، وفي حالة DNA المتضرر غير قابل للاصلاح فان الخلية تمر في مايسمى الموت المبرمج ، وعلى العكس من ذلك فان الخلية التي تحتوي على طفرات في مورث P 53 لاتتوقف في مرحـلة (G1) وانما تتحرك باتجاه مرحلة (S) ومعها DNA المتضرر [2] .

ان P53 له دور في استحثاث مسارين منفصلين من اشارات الموت المبرمج (apoptotic signal) التي تؤدي الى تنشيط (caspases) التي هي asparatate specific cysteine proteases وهذه لها دور في الموت المبرمج غير المباشر mediate apoptosis . حيث هناك المسار الخارجي الذي يشمل ارتباط مستلمات خاصة بالموت التي تعود الى عائلة مستلمات عوامل تنخر الورم (Tumor necrosis factor-R) (TNF-R) وخلال عملية تكوين معقد اشاره حث الموت (death inducing signal complex DISC) فانه سوف يقود الى تكوين سلسلة فعاليات مرتبطة (cascade) تعمل على تنشيط الخمائر الحالة للبروتينات الغنية بالسستين والأسبارتين [3] التي تحث على الموت المبرمج . اما المسار الداخلي فانه يتعلق بالحامض النووي DNA المتضرر ويقترن مع فقدان قطبية المتقدرات (mitochondrial depolarization) ويحرر سايتوكروم C من الاغشية الداخلية للمتقدرات الى داخل السايتو بلازم . يعمل سايتوكروم -C (APAF-1) A poptotic protease activity factor_1 مع9 procaspase ليكون معقد مايسمى apotosome يتم بعدها تنشيط Caspase 9 ومنه ينشط caspase 3 ، وcaspase-6 ، و caspase-7 [4] . كما ان جين P53 يستطيع ان ينشط مسار الموت المبرمج الخارجي خلال عمل استحثاث لجينات تشفر الى ثلاثة بروتينات غشائية (transmembrane protiens) وهي Fas وDR5 وPERP .

اما المسار الداخلي للموت المبرمج فيكون بوساطة عائلة بروتينات Bcl-2 التي تسيطر على اطلاق السايتوبلازم_C_ من المتقدرات [5] .

في دراسة للمصابين بمرض التهاب القولون التقرحي درس تطور تقدم الورم (neoplastic progression) خلال التطور النسيجي الى السرطان حيث وجدت علاقة بين DNA aneuoploidy و الطفرات الحاصلة في مورث P53 التي تختلف باختلاف المرض ، كما وجدت علاقة قوية بين التطور النسيجي من مرحلة خلل التنسج واطئ الدرجة low grade dysplasia الى التحول الى التسرطن وهذا يوضح ان الطفرة في الجين هي حدث مبكر في تحول التهاب القولون التقرحي الى سرطان [6] .

و قد تم الكشف عن الطفرات في P53 باستخدام تقنية (polymerase chain reaction (PCR وهي من الطفرات النقطية في الخلايا الخبيئة المتجددة regenerative crypt ، و low grade dysplasia (LGD) ، كما ان الطفرة النقطية ليست دائما مرتبطة مع زيادة التعبير الى P 53 (P53 overexpression) ، وهذا يدل على ان هناك تباين بين التعبير الجينى وتراكم التعبيرللبروتين في مرحلة خلل التنسج واطئ الدرجة [7] .

و في دراسة اخرى للمرضى لأكثر من ثماني سنوات باستعمال تقنية طبعة الاصابع ، اذ لوحظ ان عدم الثبات الجيني يمكن ان ينتشر و يصل الى مستوى عالي في مرحلة مبكرة من تطور الورم ، و بكلمة اخرى ان الطبقة المخاطية للقولون تحدث فيها عدم الثبات الجينومي [8] .

يسيطر على عملية الموت المبرمج مجموعة من المورثات التي تعمل اما على تنشيطه او تثبيطه ومنها مورث Bcl-2 المحمول على كروموسوم رقم (18) ويشير لانتاج بروتين غشائي وزنه 26 KD يثبط الموت المبرمج للخلايا ، بينما تقوم مورثات اخرى مثل مورث Bax على حث الموت المبرمج للخلايا [9] .

و يقوم بتنظيم هذه المورثات مورث اخر هو P35 الذي يحث على التعبير الجيني لمورث Bax بشكل يؤدي الى ابطال فعالية مورث (Bcl-2) لتدخل الخلية في مرحلة الموت المبرمج ، اذ يسمح الخلل الذي يصيب الموت المبرمج للخلايا بحدوث الاورام السرطانية ، ويسمح للمواد المسرطنة بخلق بيئة غير مستقرة جينيا تؤدي الى تراكم الطفرات الوراثية ، و تدمير الجهاز المناعي ، و مقاومة العلاجات المضادة للسرطان [2] .

ان الهدف من البحث هو دراسة فعالية كل من مورث P53 و مورث Bcl-2 بأستعمال طريقة التهجين في الموقع في الخلايا الألتهابية في الخزع النسيجية المصابة بألتهب القولون التقرحي المزمن و علاقة هذين المورثين مع تطور هذين المورثين مع تطور المرض الى سرطان القولون .

المواد و طرائق العمل

اخذت الخزع النسيجية من المرضى والتي كانت بجدود 36 خزعة نسيجية من المرضى المصابين بألتهاب القولون التقرحي المزمن و12 خزعة نسيجية من مرضى سرطان القولون و وضعت في دارئ الفورمالين 4% ثم اجريت العمليات الاتية على الخزع النسيجية المستاصلة [10] و وفق الآتي :

1. غسلت الخزع بماء الحنفية لدقائق عدة ثم نقلت الى كحول اثيلي بتركيز 50% لمدة ساعتين . وضعت في كحول اثيلي 70% لمدة 24 ساعة على ان يتم تبديل الكحول كل 8 ساعات.
2. وضعت في كحول اثيلي 90% لمدة 16 ساعة .
3. وضعت في كحول اثيلي مطلق لمدة ساعتين .
4. وضعت في كحول اثيلي مطلق لمدة 3 ساعات .
5. وضعت في كحول اثيلي مضاف اليه مادة تلوين Toluene لمدة 16 ساعة .
6. وضعت في شمع البارافين لمدة 3 ساعات مع تغير شمع البارافين مرة كل ساعة .
7. صبت قوالب الشمع الحاوي البارافين اذ اصبحت الانسجة في هذه المرحلة جاهزة للتقطيع .
8. تم تقطيع قالب الشمع الحاوي على النسيج المعين الى مقاطع رقيقة باستخدام المقطع الدقيق Microtome حيث قطعت الانسجة الى مقاطع بسمك 4- 6 مايكرومتر .

تهجين مجس الحامض النووي في الموقع

طريقة اعداد النسيج اعملية التهجين

بعد تحضير النسيج [11] ، اتبعت الخطوات الاتية :

قطعت الانسجة في البلوك بسمك 4- 6 مايكرون ثم عومت في حمام مائي .

وضعت الشرائح النسيجية بدقة على االشريحة الزجاجية المشحونة بشحنة موجبة positive charged slides.

وضعت الشرائح الزجاجية الحاوية على مقاطع الانسجة بشكل عمودي في حاوية زجاجية (jar slide) ، و وضعت في فرن ذي درجة حرارة 60- 80م لمدة 24 ساعة.

غمرت الشرائح الزجاجية بالتسلسل بالمحاليل الاتية :

5 دقائق	زايلين
2 دقائق	ايثانول 100%
1 دقيقة	ايثانول 95%
1 دقيقة	ايثانول 70%
1 دقيقة	ماء مقطر

وضعت الشرائح في حامل الشرائح الزجاجية ، وغمرت في داري الستريك المغلي على درجة حرارة 98 م لمدة 15 دقيقة بعدها نقلت الشرائح مباشرة الى ماء مقطر بدرجة حرارة (20- 25)م ، و غسلت ثلاث مرات لمدة 2 دقيقة في كل مرة .

اضيف محلول انزيم بروتينيزK ليغطي النسيج ثم حضن لمدة 10 دقائق على درجة حرارة الغرفة ، بعدها غسلت الشرائح في الماء المقطر ثلاث مرات لمدة 2 دقيقة في كل مرة .

غمرت في محاليل متسلسلة التخفيف بدرجة حرارة الغرفة و هي كما يلي:

1 دقيقة	ايثانول 70%
1 دقيقة	ايثانول 95%
1 دقيقة	ايثانول 100%

جففت الشرائح الزجاجية الحاوية على مقاطع الانسجة على درجة 37 م لمدة 5 دقائق بعدها تكون المقاطع النسيجية جاهزة لعملية التهجين في الموقع (In situ hybridization) .

التهجين والتشخيص Hybridization & Detection

بالنسبة لمجس DNA (DNA probe) خفف بوساطة داريء التهجين ، ثم وضع في درجة 95 م لمدة 5 دقائق ثم وضع مباشرة في الثلج لاستعماله مباشرة في الفقرة التالية .

اما بالنسبة الى Housekeeping gene والذي يعد سيطرة موجبة للمجس فيعامل كما ذكر أعلاه ويعامل بالخطوات اللاحقة كما هي الحال مع Bcl-2 & P53 .

تهجين الحامض النووي في الموقع DNA In Situ Hybridization

وضعت قطرة من DNA probe/ Hybridization solution على المقاطع النسيجية المراد فحصها ، ثم وضع غطاء الشريحة على الشريحة الزجاجية الحاوية على المقاطع النسيجية . ثم وضعت الشريحة مع غطاء الشريحة في فرن على درجة حرارة 70م لمدة 8- 10 دقائق .

وضعت الشرائح الزجاجية في جو رطب و تحضن على درجة 37م لمدة 24 ساعة لغرض حصول عملية تهجين المجس و الحامض النووي الهدف في النسيج .

غمرت المقاطع النسيجية في محلول داري الغسل المنظف على درجة 37م .

وضعت قطرة الى قطرتين من محلول RNase A 15 (مايكروغم/مل) على المقاطع النسيجية و وضعت الشرائح الزجاجية الحاوية على المقاطع النسيجية في محيط رطب Humidity chamber و حضنت لمدة 30 دقيقة على درجة 37م .

غسلت الشرائح الزجاجية في محلول (Protein block) الدافئ على درجة 37م لمدة 3 دقائق .

وضعت قطرة أو قطرتين من محلول المقترن Sterptavidin (conjugate)على المقاطع النسيجية و حضنت على 37م لمدة 20 دقيقة في محيط رطب .

غمرت ا لشرائح الزجاجية في محلول داري الغسل المنظف Detergent wash buffer solution لمدة خمس دقائق .

وضعت قطرة او قطرتين من مادة الاساس Substrate على النسيج ثم حضنت لمدة من (20 - 40 دقيقة) بدرجة حرارة الغرفة .

غمرت المقاطع النسيجية بالماء المقطر 3 مرات .

عوملت بعدها بصبغة Nuclear fast red counterstion لمدة دقيقة واحدة ثم غسلت بالماء المقطر .

عوملت المقاطع النسيجية بمحاليل متدرجة من الكحول مرة في 95% ايثانول ومرتين في 100% ايثانول ، ثم في زايلين .

فحصت االمقاطع النسيجية بالمجهر الضوئي بعد اضافة مادة (DPX) ، ثم وضع غطاء الشريحة للحصول على شرائح دائمة الصبغة ليتم صبغها بالمجهر الضوئي .

الكشف عن فعالية المورثين P53 & Bcl-2

طريقة اجراء حساب تدرج شدة الصبغة الى مورث Bcl-2

تم اعطاء درجة شدة الصبغة الى المورث Bcl-2 وذلك باعطاء grades تتراوح بين (0 ، 1 ، 2 ، 3) اذ تشير هذه الارقام الى اعطاء فكرة عن درجة التعبير والأنتشار extent & intensity التي تعبر عن نسب التعبير الجيني للمورث [12] . اذ تدل الارقام على ما يلي :-

0 - تدل على ان الخلايا لم تأخذ أية صبغة أي ليس هناك فعالية للمورث .

1 – تدل على ان الخلايا اخذت الصبغة بنسبة 25 % .

2- تدل على ان الخلايا أخذت الصبغة بنسبة 25- 50 % .

3 – تدل على ان الخلايا أخذت الصبغة بنسبة اكثر من 50 % .

طريقة اجراء حساب تدرج الصبغة الى مورث P53

اما بالنسبة الى المورث P53 فاعتمد حسب [12] المقياس الاتي :-

0- تدل على ان الخلايا أخذت الصبغة بنسب اقل من 10 % .

1- تدل على ان الخلايا أخذت الصبغة بنسبة تتراوح بين 10- 25 % ، وهذا يدل على فعالية قليلة للمورث .

2- تدل على ان الخلايا اخذت الصبغة بنسبة تتراوح بين 25-50 % ، وهذا يدل على فعالية متوسطة للمورث .

3- تدل على ان الخلايا اخذت الصبغة بنسبة اكثر من 50 % ، وهذا يدل على فعالية عالية للمورث .

النتائج والمناقشة

أوضحت النتائج في المقاطع النسيجية وجود عدم تجانس للصبغة بشكل عام والتي كانت ذات مدى تراوح من شدة الصبغة intensity يعطى مرتبة صفر و أنتشار الصبغة extent يعطي مرتبة صفر الى كل درجات الـ moderate الحالة المتوسطة للتعبير الجيني (مثال ذلك 1- intensity الذي يأخذ الضبغة الباهتة ولكن extent بأخذ المرتبة 3) الى الدرجة عالية الاصطباغ High grade staining مثال ذلك (intensity 3 , extent 3) .

من النتائج لوحظ ان في العينات النسيجية لمرضى التهاب القولون التقرحي عند قياس extent لمورث Bcl-2 قد اعطت نسبة (66 %) في high grade أي يعني في مرتبة رقم 3 ، بينما اعطت (25 %) في intermediate grade من عينات المرض نفسه و(8 %) في low grade اى يعني في مرتبة رقم 1 . اما في العينات النسيجية لسرطان القولون للموروث نفسه فقد اعطى نسبة اعلى في high grade اذ بلغ (75 %) من الخلايا اخذت الصبغة أي في مرتبة رقم 3 بينما كانت النسبة في grade moderate متقاربة لما هو في التهاب القولون التقرحي (UC) أي في مرتبة رقم 2 بينما في عينات اخرى اعطت درجة صفر دلالة على عدم وجود فعالية للموروث في العينة النسيجية قياسا بالسيطرة . اما بالنسبة للموروث P53 فقد اوضحت النتائج وجود طفرات لمورث (P53) اذ لوحظ ان مرضى التهاب القولون التقرحي اعطوا نسبة (9 . 63 %) في high grade أي في مرتبة رقم 3 ، وهذا يعني حصول طفرات في هذا الموروث والذي يعطي مؤشر لتحول الخلايا الى neoplasm وهي بداية تحول الى خلايا غيرطبيعية . كما اعطت نسبة (27.7 %) في moderate grade أي في مرتبة رقم 2 واعطى (8.3 %) في low grade أي اخذت الرقم 1 . اما في العينات النسيجية لسرطان القولون كانت النسبة العالية في مجموعة moderate اذ اعطت نسبة (63.9 %) أي في درجة رقم 2 ، بينما اعطت في high extent نسبة (33.3 %) ، واعطت نسبة (2.77 %) في low grade أي أخذت الرقم 1 . وهذه النتائج موضحة في الجداول (1 و 2 و 3 و 4) و في الاشكال(1 و 2 و B3 و A3) على التوالي .

جدول (1) : التعبير الجيني الى مورث Bcl-2 (Intensity of gene Bcl-2)

	Intensity of Bcl-□		
	Low grade	Moderate grade	High grade
Normal	11.1± 44.5	11.1 ± 55.5	0+0
	A a**	A a	C b
UC	1.86± 21.27	3.33± 50.87	4.3±7.86
	B b	A a	B b*
Colon cancer	0.3±2.76	5.54±55.53	4.82±41.63
	C b	A a	A a**

جدول (2) : التعبير الجيني الى مورث P53 (Intensity of P53)

	Low grade	Moderate grade	High grade
Normal	1.11±11.1	5.54±55.53	9.7±33.3
	B c	A a	A ** b
UC	0±33.3	1.61±47.2	2.7±18.47
	A *b	A a	B c
Colon cancer	A A 7.35±36.1	5.6±55.6	4.8±8.3
	** b	A a	C c

الحروف الصغيرة المتشابهة ضمن الصف الواحد تدل على عدم وجود اختلافات معنوية بين مستويات intensity للمعاملة الواحدة لكلا الجينين .

الحروف الكبيرة المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود اختلافات معنوية بين المعاملات ضمن مستوى intensity لكلا الجينين

*** تدل على وجود اختلافات معنوية بين الجينين على مستوى P≤0.05**

**** تدل على وجود اختلافات معنوية بين الجينين على مستوى P≤0.01**

جدول (3) : التعبير الجيني الى مورث Bcl-2 (Extent of gene Bcl-2)

	Extent of Bcl-□		
	Low grade	Moderate grade	High grade
Normal	11.01±44.5	11.1±55.5	0 ±0
	A a**	A a	B b
UC patients	0 ±8.37	2.8±25.0	2.8±66.63
	B c	B b	A a
Colon cancer	0 ±0	8.3±24.97	0.03±75.03
	C c	C b	A ** a

جدول (4) التعبير الجيني الى مورث P53 (Extent of P53)

	Low grade	Moderate grade	High grade
Normal	1.11±11.1 A c	9.61±49.97 B a	38.93±14.7 B ** b
UC	0±8.3 A c	1.6±27.73 C b	1.6±63.97 A a
Colon cancer	0.3±2.77 A c	2.8±63.93 A ** a	0± 33.3 B b

الحروف الصغيرة المتشابهة ضمن الصف الواحد تدل على عدم وجود اختلافات معنوية بين مستويات extent للمعاملة الواحدة لكلا الجينين .

الحروف الكبيرة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود اختلافات معنوية بين المعاملات للمستويات Extent ولكلا الجينين .

** تدل على وجود اختلافات معنوية بين الجينين لمستويات Extent ضمن المعاملات على مستوى احتمال P≤0.01

هذه الدراسة توضح التغييرات في التعبير الوراثي لكل من جين P53 & Bcl-2 اذ تعد prognostic factor في كل من سرطان القولون والتهاب القولون التقرحي المزمن . اذ ان هناك دراسات تشير الى زيادة خطورة المصابين بالتهاب القولون التقرحي المزمن من تطور الاصابة الى سرطان القولون . ان الدراسات الاخيرة اوضحت وجود علاقة بين الالتهاب المزمن مع الطفرات الجسمية الحاصلة وزيادة الخطورة للاصابة بسرطان القولون[8,6,3] . وهناك كثير من الامثلة على ذلك منها التهاب الكبد نوع B , C المتطور الى سرطان الكبد[14] وكذلك التهاب القواون التقرحي المتطور الى سرطان القولون [13] التهاب البنكرياس والذي يتطور الى سرطان البنكرياس . ويبين المقطع النسيجي للمصابين بالالتهاب المزمن بالتهاب مستمر ومنظم للطبقة المخاطية للقولون وهذا التفاعل الالتهابي يعود الى ارتشاح الخلايا العدلة مسببة تحطم الخلايا الطلائية مؤدية الى التقرح والنزيف . ان UC – associated neoplasm تشمل تحول الخلايا الطلائية الى مرحلة dysplasia حيث تصيب مناطق اكبر من الطبقة المخاطية . ان التغيير في التعبير الوراثي لجين P53 يعد حدث مبكر في UC-associated dysplasia lesion . [15] .

أن زيادة تردد الطفرة في اليلات جين P53 في الانسجة غير السرطانية في الامراض الالتهابية ربما يعد مؤشرا حياتيا للكشف عن زيادة الحساسية نحو التسرطن . كما ان الطفرة في الجين الكابح للورم P53 هي التغييرات الاكثر حدوثا في انواع عديدة من السرطان ومنها سرطان القولون . وهناك عوامل ممكن ان تحث على استحثاث الطفرة في هذا الجين وهي وجود وسائط أيضية للأوكسجين فعالة تنتج خلال الالتهاب ومن هذه الانواع : H2O2 و OH و OONO ممكن ان تتولد خلال مرحلة الالتهاب وان زيادة مستوى هذه الانواع الفعالة ممكن ان تؤثر في DNA . ان حدوث الطفرات في جين P53 في انواع السرطان تحدث خلال مرحلة النمو الغازي كما ان انواع الطفرات وترددها وتوزيعها يختلف بالاعتماد على التعرض البيئي والعوامل الداخلية [16] .

ان مورث P53 يحوي 393 amino acid nuclear phosphoprotein وهذا المورث ممكن ان يقسم على خمس مناطق domain وظيفية وتركيبية ، و من هذه المناطق هناك DNA binding domain وفي هذه المنطقة تحدث فيها حوالي 93 % من الطفرات الجسمية ، وان هذه الطفرات هي التي توقف وظيفة مورث P53 [1] .

كذلك الحال مع التعبير الجيني الى مورث Bcl-2 ، والذي هو عبارة عن بروتين سايتوبلازمي ممكن التعرف عليه في أنسجة مختلفة وله دور في منع الموت المبرمج . ولوحظ أن هناك زيادة في التعبير الجيني لهذا المورث في العديد من الخلايا الطلائية للورم وخاصة في الاورام التي تظهر في الامعاء الكبيرة [17] .

أوضحت النتائج وجود زيادة في التعبير الجيني في نماذج المقاطع النسيجية لمرضى التهاب القولون التقرحي ومرضى سرطان القولون ، وهناك صفات عديدة مختلفة في الورم والتي بدورها تؤثر على سلوك التعبير الجيني لكلا المورثين ، وعلى prognosis للمريض . كما لوحظ أن مورث Bcl-2 يتوسط منع الموت المبرمج في مرحلة Adenomatous وهي مرحلة مبكرة من تطور الورم في القولون ، كما لوحظ تعبير جيني عالي over-expression في خلايا adenomas الحاوية على uni-cryptal adenomas قياسا بالاورام الغازية (invasive tumor) لذا يكون هذا المورث أكثر أهمية في الكشف عن التحول المبكر لسرطان القولون من المراحل المتقدمة للمرض وكما أشار اليه [17] .

أن فقدان تنظيم عملية الموت المبرمج Dysregulation apoptosis هي نتيجة للتغييرات الحاصلة في التعبير الوراثي لمورث Bcl-2 ، اذ يمثل خطوة مهمة في تولد السرطان . ولقد فسرت زيادة التعبير لمورث Bcl-2 هو فقدان وظيفة مورث P53 نتيجة حصول الطفرات المتراكمة [18] . لذا يمكن أن نستنتج أن فقدان وظيفة مورث P53 ربما يسرع من زيادة التعبير الوراثي لمورث Bcl-2 .

يمكن استخدام هذه التقنية في دراسة الجينات المسوؤلة عن الامراض الوراثية على المستوى الجزيئي ، ومعرفة التغيرات المسببة لهذه الامراض ، زيادة على توفر مجسات لهذه الجينات ستزيد بالتأكيد من امكانية تشخيص عدد اكبر من الامراض المسببة عن طفرات تؤدي الى حذف او اضافة لمواضع حساسة تؤدي الى تغيير في ترتيب الحامض النووي للجين الطافر ، و يمكن ان تفسر عملية التحول الاولي لنشؤ الورم والتي هي عملية معقدة تشمل مراحل مختلفة من التحول وتشمل ما يلي :

الشروع و التعزيز و التقدم ، أن عملية الشروع تشمل الطفرات الاولية في الحامض النووي DNA التي ادت الى انتاج خلايا ذات نمو متزايد معتمدة على التغييرات المظهرية والوراثية للوصول الى التحول الكامل وغالبا تبدأ نتيجة وجود مسرطنات ذات تأثير سمي على المورثات geno-toxic التي يكون تأثيرها مباشرا في DNA . بينما مرحلة التعزيز Promotion تشمل ظهور النسائل من الخلايا الابتدائية . اما مرحلة التقدم progression فهي تمثل طلائع الخلايا الورمية (early neoplastic clone) ذات مظهر ورمي متكامل . وبما ان خلية الورم تحتوي على اكثر من طفرة ، لذا من الصعب معرفة أي من الطفرات هي سبب مرحلة الابتداء او المراحل الاخرى . وهناك عدد من الميكانيات التي تفسر الفعالية الاولى للتسرطن وهي :

1- التطفير Mutagenesis

جميع الخلايا السرطانية تحوي على تغيرات دائمة في DNA مؤدية الى تحول مظهري يتوارث بعد انقسامات متعددة للخلايا . في حالة الظروف الاعتيادية الطفرة لجبن معين محدد ينتج فقدان في homeostasis ومن ثم موت الخلية . اما في prone plastic mutation فان الخلية تقاوم التغيرات الثانوية وتنمو في ظروف لا تستطيع فيها الخلية السليمة الاستمرار فيها . واكثر الطفرات الملاحظة في مرحلة neoplastic stage هي الناتجة من زيادة التعبير الى الجينات الورمية (oncogenes (e . g. Myc , ras , Bcl-2 او نقص في تعبير الجينات الكابحة للورم (e.g. P53 , Rb) . ان التغييرات المظهرية للطفرات الحاصلة تشمل قلة الاحتياجات للفعاليات الايضية واشارات توصيل غير طبيعية كذلك التعبير غير الملائم للمستلمات الخاصة بعوامل النمو ، ايضا انعدام في نقاط السيطرة لدورة الخلية ، واخيرا المقاومة الى الموت المبرمج [19] .

2- تكاثر الخلية Cell proliferation

اصبح الرأي بان أي عامل agent تسبب زيادة في تكاثر الخلية يزيد من خطورة التحول الى مرحلة neoplastic stage . ان الضرر الحاصل في DNA يؤدي الى عدم تخليقه ثم الى موت الخلية لذا هناك احتمالية حدوث طفرة في تلك الخلية وهذه الطفرة عندما تنمو في ظروف انتخابية فانها سوف تصبح موقعا لطلائع سرطانية أولية recancerous lesion [20] .

3- التكيف Adaptation:-

الخلايا لها القابلية لفتح او غلق الجينات التي تساعد الخلية على مقاومة الا شارات السمية القاتلة (مثل حث انزيمات P450 لايض المواد الكيميائية والادوية) . تحت ظروف قاسية طويلة او مستمرة كما هي الحال في الالتهاب المزمن ، اذ ان الطفرة تغير من الشكل المظهري للنمو ، لذا فالتعرض الطويل الى عامل مميت او stress ممكن ان ينتج الى انتخاب طلائع خلايا سرطانية(proneoplastic cells). بعض الامثلة على ذلك زيادة التعبير الى انزيمات مضادات الاكسدة antioxidant enzymes ، مستلمات منظمات النمو ، زيادة التنفس اللاهوائي .

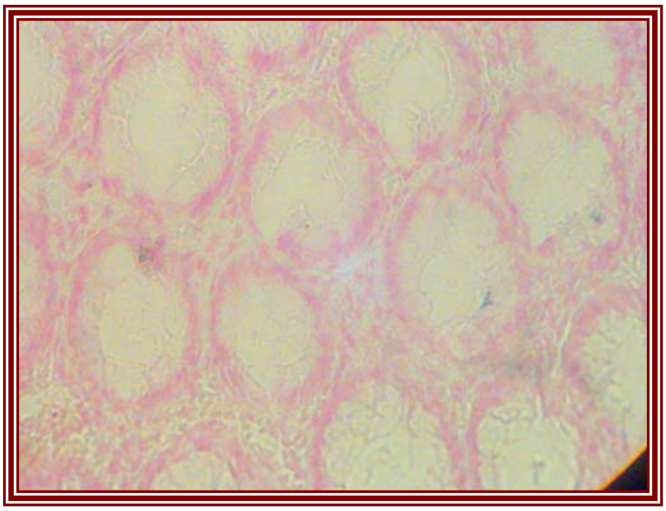
Angiogenesis -4

اوضحت البحوث المتعلقة بمعالجة الاورام ان توليد الاورام يحتاج الى تكوين اوعية دموية جديدة في الانسجة الصلدة (angiogenesis , neovascularization) . اذ ان في الانسجة الاعتيادية الحاجة الى الدم والاوعية الدموية ثابتة ولا تحتاج الى توليد اوعية جديدة الا في المراحل التطورية . اما في حالة الاورام فانها تحتاج الى اوعية جديدة لمواكبة زيادة الحجم وعدد الخلايا السرطانية . الدراسات على النماذج الورمية التجريبية experimental tumor model توضح بان منع تكوين أوعية دموية angiogenesis ممكن ان يحد من نمو الورم او الانتشار وربما يؤدي الى موت الورم . كذلك الحال مع الالتهاب المزمن يكون مقترن مع angiogenesis كما في الانسجة الحبيبية granulation tissue التي تحتاج الى اوعية جديدة ، كما ان الخلايا البلعم الكبير macrophage والاقراص الدموية وخلايا الارومة الليفية fibroblast وخلايا الورم نفسها تعد من المصادر

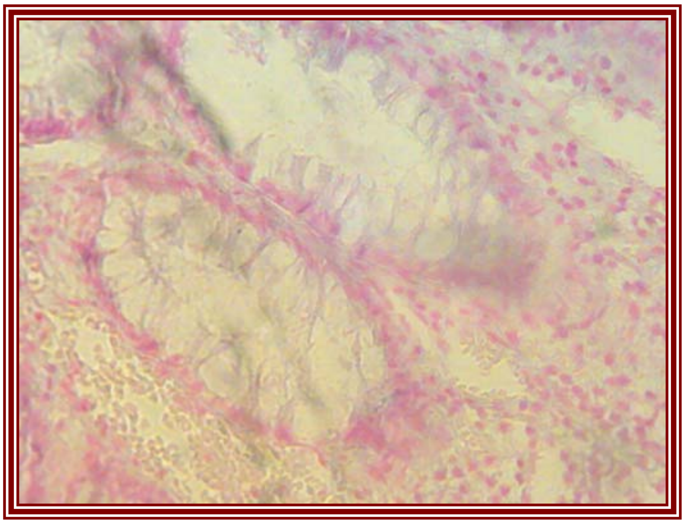
الرئسية الى عوامل angiogenesis مثال ذلك عوامل النمو للخلايا البطانية الوعائية و inflammatory cytokines مثل (عوامل التنخر الورمي –الفا ، و عوامل موت الورم ، و الانترلوكين - 1 بيتا والانترلوكين – 6) فضلا عن مواد اخرى مثل prostaglandin -1 &2 و الكيموكاينين [21] .

5- منع الموت المبرمج Inhibition of apoptosis

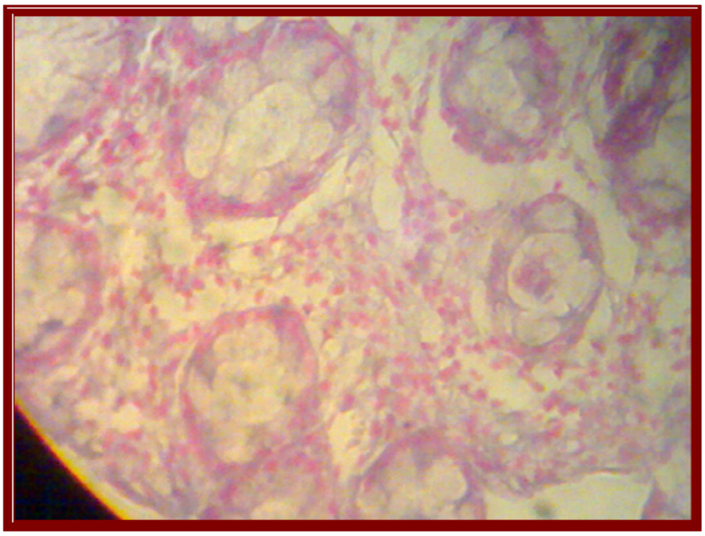
الانسجة الاعتيادية تظهر توازن دقيق بين نسبة الخلايا المنقسمة والخلايا الميتة . لذا فان أي اضطراب لهذا التوازن سوف يؤدي الى زيادة في اشارات النمو باتجاه توليد الورم oncogenesis لان الخلايا الميتة يندر تشخيصها في الانسجة الاعتيادية لانه يرجح ان هناك موت مبرمج يحدث خلال عملية مسيطر عليها وتسمى apoptosis . كما ان العلاج بالادوية او باستعمال مواد تؤثر في عوامل نمو الورم التي تقتل الخلايا الورمية بالحالة الاعتيادية بوساطة الحث على الموت المبرمج ، ولكن عند وجود مستويات عالية من المواد المؤكسدة او وجود مواد كيميائية سامة او وجود severe hypoxia فانها سوف تؤدي الى تنخر الخلية necrosis . ان الخلايا التي أصبحت مقاومة الى الموت المبرمج تزداد خطورتها للتحول الى الحالة الورمية [20] . ان هناك علاقة قوية بين انخفاض مستوى الموت المبرمج وتوليد الاورام . وهذا لوحظ من خلال اكتشاف الجين الورمي oncogene Bcl-2 الذي له دور وسيط في توليد الورم في خلايا المفوسايت البائية B-cell ، اذ يعمل على منع الخلايا البائية الطبيعية B-cell على حصول الموت المبرمج[19] .



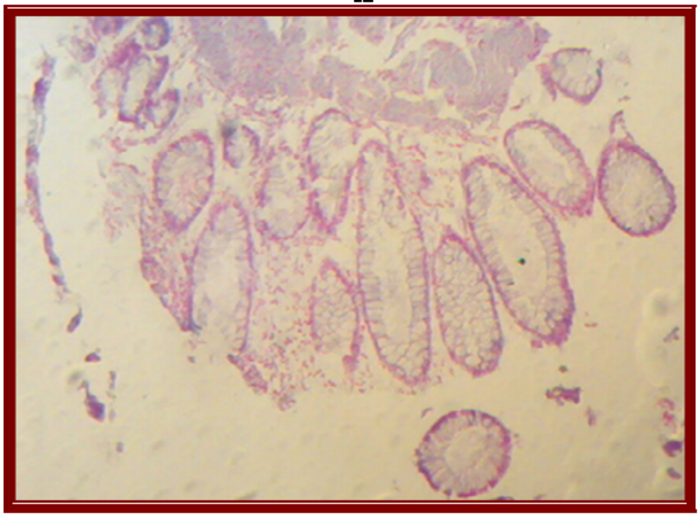
شكل (1): التعبير الجيني للمورثين (extent =1 , intensity =1) في خلايا المقطع النسيجي للمصابين بالتهاب القولون التقرحي(X40)



شكل (2): التعبير الجيني للمورثين (extent =2 , intensity =2) في خلايا المقطع النسيجي للمصابين بالتهاب القولون التقرحي(X40)



A



B

شكل (23A&B) : التعبير الجيني للمورثين (extent =3 , intensity =3) في خلايا المقطع النسيجي للمصابين بالتهاب القولون التقرحي
A=10X B=40X

المصادر

1. Millward, H.; Samonwitz, C.T.; and Bernard, P.S. (2002). Homogenous amplification and mutation scanning of the P53 gene using fluorescent melting curves. Clinic. Chemistry. 48: 1321-1328.
2. Zamameri , F.A. ; and Zambetti , G. P . " P53 Tumor suppressor genes" In : Stein ,G.S. and Pardee, A.B. ; " Cell cycle and growth control , biomolecular regulation and cancer " . 2nd ed.; John Wiley and Sons. Inc. Hoboken , New Jersey .
3. Ashkenazi,A . and Dixit , V.M. (1998). Death receptors : signaling and modulation . Science . 28: 1305-1308.
4. Nicholson ,D.W. ; Thornberry , N.A.(2003). Life and death decisions . Nature. 299: 214-215.
5. Cory , S. and Adams, J.M. (2002) . The Bcl-2 Family : Regulators of the cellular life or death switch . Nat. Rev. Cancer. 2: 647-656.

6. Holzman , K . ; Klump, B. ; Borchard , F.; Hsich, C.(1998). Comparative analysis of histology , DNA content , P53 and Ki-ras mutation in colectomy specimens with long standing UC. Inc. J. Cancer.
7. Yoshida ,T.; Mikami ,T.; Mitomi ,H ; Okayasu ,I. (2003) . Diverse P53 alterations in UC-associated low-grade dysplasia :full-length gene sequencing in microdisecting single crypts . J. Pathol. 199 (2) :166-175 .
8. Ru Chen ; Peter,S, Rabinovitch ; David ,A , Cripsin ; Mary J . Emond ; Kent .M . Koprowicz ; Mary ,D. Bronner ; Teresa. A. Brentnall . (2003) . DNA fingerprinting abnormalities can distinguish UC patients with dysplasia and cancer from those who are dysplasia/ cancer free . Am. J. of Pathol. 162 :665-672 .
9. Reed, J.C. (1997). Bcl-2 Family Proteins : Role in deregulation of apoptosis and chemo-resistance in cancer ." Apoptosis and Cancer. " ; Kramer , Landis System . Basel, Switzerland .
10. Dury , R.A. and Wallington , E.A. (1980). Carlton histological techniques 5th edition . Oxford university Press.
11. Lewis , F . A ; Griffiths , S ; Dunnicliffe , R ; Wells , M ; Dudding , N ; Bird , C .C .(1987) . Sensitive in situ hybridization technique using biotin – streptavidin – polyalkaline phosphatase complex . J . Clin . Pathol . 40 : 163 – 166 .
12. Ong, F. ; Moonen , L.M.; Gallee, M.p. (2001). Prognostic factors in TCC of the bladder : An emerging role for Bcl-□ and P53 . Radiotherapy and Oncology . 61:169-175.
13. Campell , S. and Ghosh, S. (2002). UC and colon cancer : Strategies for cancer prevention.
14. Jewell,D.P., (1998). Ulcerative Colitis In : Gastrointestinal and liver diseases . Pathophysiology / Diagnosis / Managements. Ed. by Sleisenger,M.H., Felman , M ., Klein, S., Scharschmidt,B.F.6th ed, vol.2. W.D. Saunders Company . pp:1735-1761.
15. 15-Hussain ,S.R., Amstad,P., Raja,K., Ambs,S., Nagashima,M., Bennett,W.P .(2000) . Increased P53 mutation load in noncancerous colon tissue from UC : A cancer-prone chronic inflammatory disease . Cancer Res. 60: 3333-3337.
16. Pravada , J. (2005). Radical induction theory 0f ulcerative colitis .World J. Gastro-enterol . 11: 2371-2384.
17. Ilays, M ., Hao, X-p., Wilkinson,K., Tomlinson,IPM., Abbasi A.M., Forbes,A., Bodmer, W.F., Talbot, I.C. (1998) . Loss of Bcl-2 expression correlates with tumor recurrence in colorectal cancer. Gut, 43: 383-387.
18. King ,R.J.B. (2000). Cancer Biology. Pearson education Limited. 2nd ed . Licensing Agency LTD. London.
19. Hanahan , D & Weinberg , R.A. .(2000) . The hallmarks of cancer . Cell . 100 : 57 – 70 .
20. Shacter ,E`; Weitzman (S.A. (2002) . Chronic inflammatory and cancer .Oncology ,16 No.2 ,Cancer network .com.
21. Jackson, J.R., Seed, M.P., Kircher, C.H. (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation . FASEB. J. 11: 457 – 465.