دراسة وراثية خلوية لتأثير عقار الميثوتركسيت على خلايا الدم اللمفاوية لمرضى التهاب القولون التقرحي والمرضى المتطور لديهم المرض الى السليلات الكاذبة وسرطان القولون

Cytogenetic studies of methotrexate drug on the peripheral blood samples from patients suffered of ulcerative colitis & ulcerative colitis developed to pseudo polyps &colon cancer

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

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

المستخلص

تضمنت الدراسة على 43 عينة من الدم المحيطي لمرضى التهاب القولون التقرحي المزمن و24 عينة من سرطان القولون و24 عينة من الاصحاء و10 عينات من مرضى التهاب القولون التقرحي المتطور الى ظهور السليلات الكاذبة ، لمعرفة التغييرات التي تطرأ على المقاييس الوراثيةالخلوية المتمثلة بمعامل الارومة ، ومعامل الانقسام الخلوي ، ومعامل تضاعف الخلية ومعدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي ، وأختبار تردد الطفرة . نميت الخلايا في الوسط الزرعي RPMI المضاف الية 10% من المصل البقري و10مايكروغم / مل من مادة 5-بروموديوكسييوريدين و0.3 مل من PHA وبوجود تراكيز مختلفة من عقار الميثوتركسيت والتي هي (0.2 ، 0.5 ، 1 ، 2 ، 4 ، 8) مايكروغم/مل . أوضحت النتائج أنخفاضا في معدلات كل من معامل الارومة ، معامل الانقسام ، معامل التضاعف ، ومعامل تردد الطفرة بأزدياد تركيز العقار . أذ أنخفضت معدلات هذه المقاييس الوراثية الخلوية الى الصفر في التراكيز العالية من العقار والتي هي (1 ، 2 ، 4 ، 8) مايكروغم /مل ، كما لوحظ وجود خلايا مقاومة في التراكيز الواطئة من العقار (0.2 ، 0.5 مايكروغم/مل) . أما فيما يتعلق بمعدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي فقد ارتفعت معدلاته في كل من الاصحاء والمجاميع المرضية المعاملة بالعقار قياسا بغير المعاملة بالعقار . ان وجود خلايا طافرة في التراكيز الواطئة يدل على حصول مقاومة للعقار قياسا بالتراكيز العالية التي اظهرت تأثيرا قاتلا على الخلايا اللمفاوية لمجاميع المرضى تحت الدراسة .

Abstract

The investigation was done on 43 samples of peripheral blood which drawn from patients suffered of chronic ulcerative colitis, 20 samples from patients of colon cancer, 10 samples from ulcerative colitis developed to pseudo polyps & 20 samples of healthy individuals. The samples were taken from female and male of different ages. The cytogenetic studies was done in order to define the damaging effects of the disease and the drug on the peripheral blood lymphocytes, these damages were manifested through the significant reduction in the blastogenic index, mitotic index, replication index, sister chromatid exchange, and mutation fraction after cells were grown in RPMI media supplemented with 10% of bovine serum, 10 microgram/ml of Budr, 0.3ml of PHA & different concentrations of drug (0.2,0.5,1,2,4,8) microgram/ml. The results indicated reduction in the blastomeric, mitotic, replication indices & mutation fraction to zero with high concentrations of the drug (1, 2, 4, 8) microgram / ml. Furthermore, the results showed presence of resistant cells with low concentration of drug (0.2, 0.5 microgram /ml) through measuring mutation fraction. Moreover, means of SCEs were increased in treated groups (patients & normal individuals) in comparison with untreated groups. Finally

presence of mutated cells within low conc. of drug showed resistant to the drug in comparison with high conc. of drug which showed cytotoxic effect on the cells of the patients under investigations.

المقدمة

منذ 1994 بذلت جهود كثيرة لتشخيص الجينات الحساسة ذات العلاقة بأمراض الجهاز الهضمي المعوي والتي اعتمدت على فرضيات مسببات المرض (disease pathogenesis) وعوضا عنها اعتمد على المسح النظامي لواسمات متعددة الاشكال (polymorphic marker) متوزعة على طول الجينوم البشرى لعوائل عديدة للبحث عن مواقع حساسة ذات علاقة بالمرض [1] .

تم التعرف لحد الان على 7 جينات لها علاقة بامرض IBD مسوؤلة عن امراض Crohn Disease و ulcerative Colitis هذه الدراسات اوضحت وجود candidate region لهذه المورثات على كروموسومات (1، 3 ، 6 ، 12 ، 14) [2] . فيما اشار مركز المسح الجيني في اكسفورد عندما اجرى المسح على 186 sibpairs بتشخيص مناطق على كروموسومات (3 ، 7 ، 12) الذي اعزي اليها مرض التهاب القولون التقرحي و مرض كرون ومنطقة اخرى قريبة الى موقع مستضد خلية HLA leucocyte للانسان على كروموسوم 6 ، ايضا اظهرت نتائج تحليل الارتباط في دراسة أصابة الاشقاء sibpairs في مرض التهاب القولون التقرحي وجود موقع على كروموسوم 12 وهو المسؤول فعليا على الاصابة بمرض التهاب القولون التقولون [2] .

ان التهاب القولون التقرحي هو الشكل الناكس relapse form لامراض الجهاز الهضمي الالتهابيه ، وهناك علاقة بزيادة خطورة الاصابه بسرطان القولون المتطور من التهاب القولون التقرحي ، اذ اوضحت الانسجه القولونيه المصابه مراحل تطورالمرض والتي ظهر انها عملية متعددة الخطوات شملت طفرات تراكمية مشابهة لما يحصل في سرطان القولون الشائع (Sporadic colorectal carcinoma) ، ماعدا الاورام الناشئه من التهاب القولون التقرحي (UC) تنشأ من الخلايا الطلائية المصابة بخلل في التنسج flat dysplastic cell اكثر من خلايا الورم الغدي adenomas ، كما ان تشخيص هذه المواقع lesion dysplastic precursor يكون صعب بسبب عدم امكانية ملاحظة ظهوره خلال مرحلة الفحص بالناظور . ان مرض UC في مرحلته المزمنه والحادة تولد انواعا وفيرة من الاوكسجين الفعال reactive oxygen species مثل الجذور الحرة للهيدروكسيل او بيروكسيد الهيدروجين والتي بامكانها تدمير الحامض النووي ، ومقدار التلف الحاصل يتجاوز الية قابلية الاصلاح (DNA repair machinery) وهذا يؤدي الى حدوث طفرات تشمل الجينات التي تؤثر في الثبات الجيني . ففي الظروف الاعتياديه فأن DNA التالف يرصد من خلال نقاط التفتيش (check point G2 / M) ، وهذا يؤدي الى دخول الخلية في مرحلة سكون في دورة الخلية الى ان يتم اصلاح التلف الحاصل او يمر بمرحلة الموت المبرمج . اما اذا كان التلف لا يمكن اصلاحه ، فالخلايا التي لا تستطيع اصلاح الجزء التالف ، وهذا يدل على وجود نقص في نقاط التفتيش G2 / M ، سوف تدخل مرحلة الانقسام مع الجزء التالف والذي يؤدي الى فقدان مناطق واسعه من الكروماتين وهذا ما لاحظه العالم [3] . ان التقارير العلمية التي توضح عدم الثبوت الكروموسومي و التوابع الدقيقة (microsatellite) في مراحل مبكره من عملية تطور الورم تدعم فرضية المظهر التطفيري (mutator phenotype hypothesis) والتي تبين بان هناك مسارات متعددة في المحافظه على الثبات الجيني في كل من مستويات تسلسل النيوكليوتيدات او حتى على مستوى الكروموسومات . والطفرات التي تتقاطع مع هذه المسارات سوف تؤدي الى المظاهر التطفيرية . لانها تشمل التغيرات في التسلسلات المتكررة (repetitive sequences) التي تعتبر مناطق ساخنه hot spots لحدوث الطفرات او تشمل تغيرات في طبعة النواة karyotype changes [4] .

طريقة العمل

جمع نماذج الدم

تم جمع العينات من الدم من المرضى المصابين بالتهاب القولون التقرحي المزمن 43 عينة من الجنسين كليهما و مرضى سرطان القولون (24 عينة) و (10) عينات من المرضى المتحول الى ظهور السليلات الكاذبة و24 عينة من الاصحاء من مستشفى اليرموك و مستشفى الكاظمية حيث اخذت عينة الدم حوالي 10مل من المرضى المصابين و جمعت في انابيب اختبار زجاجية معاملة بالهيبارين لمنع التخثر .

التأثير السمي والوراثي لعقار الميثوتركسيت في الخلايا

تم زراعة حوالي 0.4 مل من الدم المعامل بالهيبارين الماخوذ من المرضى المصابين بالتهاب القولون و مرضى سرطان القولون اضافة الى دم الاصحاء السليمين في الوسط الزرعي RPMI المضاف اليه 10% من مصل العجل البقري و 100 I.U من البنسلين و 100ملغم من الستربتوماسين و مادة البروموديو اوكسي يوريدين -5 (BrdUrd) بتركيز10مايكروغم/ مل و 0.2 مل من مادة (PHA) Phytohaemaglutinine وعوملت بتراكيز معينة من مادة الميثوتركسيت (MTX) ، والتي هي (0.2, 0.5, 2, 4, 8) مايكرغرام/ مل وحضنت بالحاضنة على درجة 37م لمدة 72 ساعة . اضيفت مادة الكولجسين Colchicine بتركيز 10مايكروغم/مل قبل 3 ساعات من الحصاد ، ثم حضنت بالظروف السابقة نفسها مع التحريك على اوقات معينة .

جمع الخلايا المنماة بعد الحضانة

تم جمع الخلايا المنماة في الوسط الزرعي بعد الحضانة بوساطة عملية الطرد المركزي على 2500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق . أهمل العالق و أخذ الراسب , وأضيف اليه 5 مـــــل من مـــــحلول Hypotonic solution (KCL) 0.075M و وضعت الانابيب في حمام مائي لمدة 30 دقيقة بعدها جمعت الخلايا بوساطة عملية الطرد المركزي على 2500 دورة / دقيقة ، أهمل العالق و أضيف الى الخلايا محلول المثبت المتكون من الميثانول و حامض الخليك بنسبة 1:3 اذ أضيف بحدود 5 مل من محلول المثبت و يترك بعدها في الثلاجة لمدة نصف ساعة بعدها توضع الانابيب في حهاز الطرد المركزي بالظروف نفسها . و تكرر عملية الغسل بمحلول المثبت ثلاث مرات او اكثر ثم تؤخذ الخلايا المترسبة و تقطر بوساطة ماصة باستور على شرائح زجاجية لغرض فحصها بالمجهر . بعد صبغها بصبغة كمزا GIEMSA أو صبغة DAPI للفحوصات الوراثية الخلوية الآتية :-

- حساب معامل الانقسام الخلوي(Mitotic index (MI

صبغت الشريحة الزجاجية الحاوية على الخلايا المثبتة بمحلول صبغة الكمزاGiemsa Stain لمدة 5- 10 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر ، و تركت لتجف ثم فحصت بالمجهر الضوئي اذ حسب معامل الانقسام الخلوي كما يلي:

$$\text{معامل الانقسام الخلوي Mitotic index (MI)} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

تم حساب العدد الكلي للخلايا في كل شريحة زجاجية بحدود 1000 خلية

حساب معامل تكون الاورمة Blastogenic index حسب معامل تكون الاورمة في الخلايا اللمفاوية بعد تقطيرها على الشريحة الزجاجية و صبغها بصبغة كمزا كما يلي:

$$\text{معامل تكون الاورمة Blastogenic index (BI)} = \frac{\text{عدد خلايا الاورمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

تم حساب العدد الكلي للخلايا في كل شريحة زجاجية بحدود 1000 خلية

-حساب معامل التضاعف Replicative index حسب عدد الخلايا المنقسمة في الانقسام الاول M1 و عدد الخلايا المنقسمة في الانقسام الثاني M2 و عدد الخلايا المنقسمة في الانقسام الثالث M3 ثم حسب معامل التضاعف كما يلي:

$$\text{Replicative index RI} = \frac{\text{M1\% * 1+ M 2\%* 2+ M3 \%* 3}}{\text{100 (\% معامل التضاعف)}}$$

فحص التبادل الكروماتيدي الشقيقي Sister chromatid exchange (SCEs)

تم صبغ الشرائح الزجاجية الحاوية على نماذج الخلايا بصبغة DAPI وعوملت كما في الطريقة السابق ذكرها في الفقرة اعلاه ثم فحصت بالمجهر الفلورسيني المتألق و حسب عدد التبادل الكروماتيدي في كل خلية في مرحلة الانقسام الثاني (M2) .

النتائج والمناقشة

تأثير عقار الميثوتركسيت على معامل الارومة Blastogenic Index (BI)

تبين النتائج الموضحة في الجدول (1) بان هناك انخفاض في معدل معامل الاورمة (Blastogenetic Index) بازدياد تركيز العقار ، وعلى مستوى احتمالية $P \leq 0.01$ في كل من المرضى المصابين بالتهاب القولون التقرحي والمرضى المتطور لديهم الى السليلات الكاذبة ومرضى سرطان القولون بالمقارنة مع الاصحاء . ففي الاصحاء كان تاثير العقار على معامل الارومة في خلايا الدم اللمفاوية الذي تميز بانخفاض معامل الاورمة مع زيادة التركيز . كان معدل معامل الاورمة7 . 27 % في معاملة السيطرة و قد تناسب الأنخفاض مع زيادة التركيز . اذ انخفض الى 18.4 % في التركيز0.2 مايكروغم / مل ثم الى 17 % في تركيز0.5 مايكروغم / مل ، والى 16 % في تركيز 1 مايكروغم / مل ونزولا الى التركيز 8 مايكروغم / مل اذ تناقص الى 5. 3 % . ولقد اوضحت التحليلات الاحصائية وجود فروقات معنوية في التراكيز(2 ، 4 ، 8) مايكروغم / مل . اما في مجموعة المرضى المصابين بالتهاب القولون التقرحي المزمن فقد لوحظ ايضا انخفاض في معامل الاورمة بازدياد تركيز العقار . اذ كان معدله 26 % في معاملة السيطرة ، ثم انخفض الى 1. 19 % في التركيز 0.2 مايكروغم / مل ثم تناقص تدريجيا في التراكيز العالية ، اذ كان معدله 11 % في تركيز 2 مايكروغم / مل والى 4.5 % في تركيز 8 مايكروغم / مل . اشار التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية بين التراكيز للمعاملة الواحدة . وكذلك الحال مع عينات الدم الماخوذة من مرضى سرطان القولون . اما في مجموعة المرضى المتطور الى ظهور السليلات الكاذبة , اذ لوحظ ارتفاع في معامل الاورمة في التركيز صفر اذ بلغ 34.9 % بالمقارنة مع المجاميع الاخرى ثم تناقص بازدياد التركيز . اذ بلغ 27 % في تركيز 0.2 مايكروغم / مل ثم الى 24 % في تركيز 0.5 مايكروغم / مل وصولا الى تركيز 8 مايكروغم / مل الذي كان 5.2 % . اوضحت التحليلات الاحصائية بوجود فروقات معنوية بين التراكيز المستعملة . كما اوضحت التحليلات الاحصائية بعدم وجود فروقات معنوية بين الاصحاء ومرضى التهاب القولون في التركيز صفر (السيطرة) بينما هناك فروقات معنوية بين الاصحاء ومرضى سرطان القولون ومرضى التهاب القولون المتطور الى السليلات الكاذبة جدول (1) . اما في التركيزين2 .0 ، 0.5 مايكروغم / مل فقد اوضحت التحليلات الاحصائية بعدم وجود فروقات معنوية بين الاصحاء ومرضى التهاب القولون التقرحي ومرضى سرطان القولون . بينما وجدت فروقات معنوية في المرضى المتطور لديهم الى ظهور السليلات الكاذبة قياسا بالاصحاء . كذلك وجدت فروقات معنوية في التركيزين (1 ، 2) مايكروغم / مل في معدلات معامل الاورمة . اما في التركيزين 4 ، 8 مايكروغم / مل فلم تظهر فروقات معنوية بين المجاميع كافة وذلك نتيجة التاثير السام للعقار جدول (1) .

جدول رقم (1): تأثير التراكيز المختلفة لعقار الميثوتركسيت في معدل معامل الارومة (BI) Blastogenic Index في مرضى ا لتهاب القولون التقرحي (UC) والمرضى من UC المتطورالى pseudo polyps وسرطان القولون قياسا بالاصحاء

تركيز العقار (MTX)	(BI) في الاصحاء	(BI) في مرضى التهاب القولون التقرحي	(BI) في مرضى (UC) المتطور الظهور polyps	(BI) في مرضى سرطان القولون
السيطرة	2.53±27.73 a B	1.82±26.05 a B	5.98±34.93 a A	4.56±28.63 a A
0.2 مايكروغم /مل	1.85±18.40 b B	1.53±19.16 b B	5.2±27.14 ab A	3.21±18.65 b B
0.5 مايكروغم/مل	2.04±17.01 bc B	1.42±17.19 b B	3.54±24.08 b A	1.5±14.50 bc B
1مايكروغم/مل	1.90±16.18 bc AB	1.25±13.66 c BC	2.90±19.60 bc A	1.3±10.43 cd C
2مايكرومل/مل	1.40±12.28 cd A	1.06±11.04 cd AB	1.99±12.46 cd A	0.85±6.86 de B
4مايكروغم/مل	1.01±8.65 de A	0.69±7.97 de A	1.62±9.13 cd A	0.94±6.72 de A
8مايكروغم/مل	0.73±5.31 e A	0.54±4.49 e A	0.96±5.22 d A	0.60±3.32 e A

القيم تمثل المعدل الى معامل الارومة Blastogenic index ± الخطأ القياسي . الاحرف الصغيرة المختلفة بين التراكيز للمعاملة الواحدة (الاعمدة) تدل على وجود فروقات معنوية بين التراكيز للمعاملة الواحدة .

الاحرف الكبيرة المختلفة بين المعاملات (الصفوف) تدل على وجود اختلافات معنوية بين المعاملات (مجاميع المرضى)

يلاحظ من الجدول نفسه وجود انخفاض معنوي في معامل الارومة مع زيادة التركيز في مجاميع المرضى ، بينما نلاحظ زيادة في معامل الارومة في مرضى التهاب القولون التقرحي المزمن والمتطور الى ظهور السليلات الكاذبة قياسا بالمجاميع الاخرى (الاصحاء ، ومرضى التهاب القولون التقرحي ، و مرضى التهاب القولون التقرحي المتطور الى ظهور السليلات الكاذبة ، ومرضى سرطان القولون) ، خصوصا في التراكيز الخمسة الاولى جدول (1) . ان تحول الخلايا اللمفاوية هو مقياس لسلسلة التغييرات الشكلية والبيولوجية التي تطرأ على الخلايا اللمفاوية المتحسسة بالمشطرات او المستضدات خلال اطوار الانقسام . اذ ان استجابة الخلايا اللمفاوية للمشطر تعتمد على طبيعة ، و عدد الخلايا اللمفاوية التائية أو البائية ((T او B) الموجودة في الوسط ، وكذلك على نوع و تركيز المشطر اذ وجد ان التفاعل بين المستضدات النوعية او المشطرات والخلايا اللمفاوية يؤدي الى انتقال الاشارات الى داخل الخلية وتنشيط النواة التي في حالة سكون . لذا تستجيب للانقسام وغالبا ما ترافق هذه الاستجابة تغييرات شكلية تتحول فيها الى ارومات اللمف . ويمكن الكشف عن هذا النشاط عن طـــريق قياس معامل الارومة [5] . ان مراحل الانقسام الخلوي تبدأ بطور السكون والذي يتمثل عادة بأرتباط المستضد أو جزيئة المشطر عن طريق ربط لجين (Ligand) مع مستقبل موجود على سطح الخلية اللمفاوية مؤديا الى تحفيز الانزيمات المسؤولة عن نشاط الخلية وفعالياتها ولهذا تظهر التغييرات الشكلية نتيجة تحول الخلايا الصغيرة الساكنة rest cell عند تعرضها للمشطر الى خلايا أرومية حيث يزداد حجم الخلايا اللمفاوية وينشط السايتوبلازم ويزداد عدد الفجوات وتصبح النوية مرئية داخل النواة نتيجة تجمع بروتينات النواة . اما التغييرات البيولوجية بزيادة النفاذية الغشائية وزيادة نسبة تدفق الايونات الموجبة الى داخل الخلايا وتدخل الخلايا في طور النمو الاول G1-phase الذي يتميز بأنتاج البروتينات الضرورية للخلية و RNA وحركيات اللمف ثم تحول الخلايا الى طور S-phase وأخيرا تدخل الخلايا المتحسسة الى طور الانقسام الخيطي [6] .

تأثير عقار الميثوتركسيت في معدل معامل الانقسام الخلوي(MI)

درس تأثير العقار في معدل معامل الانقسام الخلوي على عينات دم مأخوذة من الاصحاء ، و من المرضى المصابين بالتهاب القولون التقرحي ومن المصابين بسرطان القولون ، ومن المرضى المصابين بالتهاب القولون التقرحي المزمن والمتحول الى ظهور السليلات الكاذبة (pseudopolyps) . استعملت تراكيز مختلفة من عقار الميثوتركسيت ابتداء من التركيز صفر ثم (2. 0 ، 5 . 0 ، 1 ، 2 ، 4 ، 8) مايكروغرام/مل . اظهرت النتائج انخفاضا في معدل معامل الانقسام الخلوي بازدياد تركيز العقار في كل من الاصحاء والمرضى ، وكان الانخفاض معنويا وعلى مستوى احتمالية $P\leq 0.01$ & $P\leq 0.05$. ففي خلايا السيطرة التي تمثل الاصحاء فقد كان (MI) في التركيز صفر هو 3.2 % ثم انخفض في التركيز 2. 0 مايكروغم / مل الى 96. 1% ، وانخفض في تركيز 5 .0 مايكروغم/مل الى 57 .1% ، وفي التركيز 1مايكروغرام / مل كان 27. 0 % ، اما في التراكيز الاعلى من العقار لم يلاحظ انقسام للخلايا . اما بالنسبه لمرضى التهاب القولون التقرحي(UC) المعاملة بنفس التراكيز من العقار ، فقد كان معدل (MI) في التركيز صفر 84 .3% تلاه انخفاض في معدل MI الى 58 .2 % في التركيز 2. 0 مايكروغرام/مل ، ثم انخفض اكثر في التركيز 5 . 0 مايكروغم / مل الى 57 . 1% ، واستمر الانخفاض الى تركيز 2 مايكروغرام/مل الى 0.28 % ، ثم في تركيز 4 مايكروغرام /مل كان 0.06 % وكما موضح في الجدول (2) ، من هذه النتائج نستنتج وجود مقاومة الخلايا اللمفاوية المنماة الى عقار الميثوتركسيت قياسا بالاصحاء .

اما بالنسبة للمصابين الذين ظهر لديهم من خلال فحص الناظور وجود السليلات الكاذبة (pseudo polyps) نتيجة للاصابة المزمنة ، فلوحظ ان معدل MI في التركيز صفر كان 86 .4 % و اخذ بالتناقص الى 8. 3 % في تركيز2 .0 مايكروغرام /مل والى (68 . 2%) و في تركيز0.5 مايكروغم/مل والى1.13% في تركيز1مايكروغم/مل والى 22 .0 % في تركيز 2 مايكروغم/مل . لذا نلاحظ ان هذه المجموعة ايضا لديها مقاومة للعقار المستعمل .

اوضح التحليل الاحصائي بالنسبة للاصحاء بوجود فروقات معنوية بين التركيز صفر (السيطرة) والتراكيز الاخرى المستعملة في الدراسة كما هو موضح في جدول (2) . بينما لم يظهر التحليل الاحصائي أي فروقات معنوية بين

التراكيز(1 ، 2 ، 4 ، 8) مايكروغم / مل . اما في مرضى التهاب القولون التقرحي المتطور لديهم المرض الى ظهور السليلات الكاذبة pseudopolyps وسرطان القولون فقد لوحظ وجود فروقات معنوية بين التركيز صفر والتراكيز الاخرى المستعملة في التجربة . بينما لم تظهر فروقات معنوية بين التراكيز (2 ، 4 ، 8) مايكروغم / مل في المرضى المتطور لديهم الى ظهور السليلات الكاذبة . اما في سرطان القولون فلم تظهر فروقات معنوية بين التراكيز العالية ة (1، 2 ، 4 ، 8) مايكروغم / مل . اما في دراسة تاثير العقار فيما بين المجاميع التي تحت الفحص (الاصحاء ومرضى التهاب القولون التقرحي والمرضى المتطور لديهم المرض الى pseudopolyps ومرضى سرطان القولون) ، فقد اوضحت التحليلات الاحصائية بعدم وجود فروقات معنوية بين التركيز صفر (السيطرة) والتراكيز(0.2 ، 0.5 ، 1) مايكروغم / مل بين مجموعة الاصحاء و مرضى التهاب القولون التقرحي و مرضى سرطان القولون . بينما وجدت فروقات معنوية في مجموعة المرضى المتطور الى ظهور السلالات الكاذبة pseudopolyps في التراكيز المذكورة اعلاه قياساً مع السيطرة . اما في التراكيز العالية (2 ، 4 ، 8) مايكروغم / مل فلم تظهر فروقات معنوية بين المجاميع كافة جدول (2) .

وهذه النتائج تشير الى ان التراكيز العالية من الميثوتركسيت لها تأثير سمي في الخلايا الدم اللمفاوية .

جدول (2) :تأثير التراكيز عقار الميثوتركسيت (MTX) في معامل الانقسام الخلوي(MI) في مرضى التهاب القولون التقرحي والمرضى المتطور لديهم الى السليلات الكاذبة وسرطان القولون قياسا بالاصحاء

التركيز مايكروغم/مل	الاصحاء(السيطرة)	المرضى المصابينUC	مرضى UCالمتطور الى polyp	مرضى سرطان القولون
0	0.29±3.2 a B	0.22±3.84 a B	0.37±4.86 a A	0.46±3.63 a B
0.2	0.16±1.96 b B	0.17±2.58 b B	0.30±3.8 b A	0.19±2.31 b B
0.5	0.17±1.57 b B	0.17±1.57 c B	0.39±□.68 c A	0.32±1.61 c B
1	0.08±0.27 c B	0.14±0.55 d AB	0.29±1.13 d A	0.1±0.18 d B
□	0+0 c A	0.10±0.28 de A	0±0 d A	0.09±0.22 e A
4	0+0 c A	0.04±0.06 e A	0±0 d A	0±0 e A
8	0+0 c A○	0+0 e A	0±.0 d A	0±0 e A

القيم تمثل المعدل لمعامل الانقسام الخلوي ± الخطأ القياسي . الحروف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين التراكيز للمعاملة الواحدة وعلى مستوى احتمالية P≤0 .01 & P ≤ 0.05

الحروف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين المعاملات (مجاميع المرضى) وعلى مستوى احتمالية (P ≤ 0.01 & P ≤ 0.05) .

تأثير عقار الميثوتركسيت في معامل التضاعف (RI) Replicatve Index

يوضح الجدول (3) تأثير العقار في معدل معامل التضاعف في مجاميع المرضى تحت الدراسة قياسا بالاصحاء . حيث نلاحظ ان زيادة تركيز العقار تؤدي الى انخفاض معامل التضاعف معنويا في كل من الاصحاء والمرضى ككل . اذ كان معدل معامل التضاعف (RI) في مجموعة الاصحاء 2 ، بينما انخفض في التركيز 0.2 مايكروغم/مل الى 9. 1 وفي التركيز 5. 0 مايكروغم/مل الى 76. 1 وفي التركيز1 مايكروغم/مل الى 9. 0 . وهذا الانخفاض هو انخفاض معنوي يشير الى ان العقار له تأثير سمي في مجموعة السيطرة الموجبة اذ لم يظهر أي انقسام للخلايا في التراكيز العالية (2 ،4 ، 8) مايكروغم/مل ، وهذا يدل على التأثير السمي للعقار في خلايا الدم اللمفاوية . وكذلك

الحال مع مجاميع المرضى (سرطان القولون والتهاب القولون التقرحي (UC) . بينما في مرضى UC المتطور الى ظهور السليلات الكاذبة (pseudo-polyps) . فنلاحظ ان تركيز عقار الميثوتركسيت (0.5 و1) مايكروغم/مل لم يختلفا معنويا فيما بينهما قياسا بالتركيز صفر (السيطرة) . بينما اختلف معنويا عند التركيز 0.2 مايكروغم/مل ومجموعة الاصحاء (السيطرة الموجبة) والمرضى (السيطرة السالبة) . كما يلاحظ من الجدول نفسه ان تأثير العقار على معدل معامل التضاعف لم يختلف معنويا بين الاصحاء والمرضى ماعدا في التركيز 0.2 مايكروغم/مل قد اختلف معنويا بين مجموعة UC المتطورالى السليلات الكاذبة pseudopolyps وبقية المجاميع الاخرى (الاصحاء وسرطان القولون وUC) ، بينما في التركيزين (0.5 و1) مايكروغم/مل من عقار الميثوتركسيت لم يلاحظ وجود أي تأثير معنوي في معامل التضاعف . نستنتج من ذلك وجود تأثير سمي للتراكيز العالية للعقار على معدل معامل التضاعف للمرضى قياسا بالاصحاء .

جدول (3) : تأثير التراكيز المختلفة لعقار الميثوتركسيت في معدل معامل التضاعف replicative index (RI) لمرضى التهاب القولون التقرحي والمرضى من UC المتطور الى pseudo polyp ومرضى سرطان القولون قياسا بالاصحاء .

التركيزمايكروغم/مل	معامل التضاعف في الاصحاء	معامل التضاعف في مرضىUC	معامل التضاعف في مرضىUC المتطور الى pseudo-polyps	معامل التضاعف في سرطان القولون
صفر	bA 2 .0	1 .89 bA	aA □ .16	1. 9 bA bA
0.2	aA1 . 9	1 . 92 aA	1 .99 AB	1 . 94 a B
0.5	1 .76 bB	1 . 82 A	2 a A	1.84 bB
1	0 . 9 bC	0.93 c A	1 . 7 aB	0 .7 bC

القيم تمثل المعدلات لدورة الخلية ± الخطأ القياسي . الحروف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية ضمن العمود الواحد بين التراكيز للمعاملة الواحدة .

الحروف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية ضمن الصف الواحد بين المعاملات للتركيز الواحد

ومن الجدول يلاحظ وجود اختلافات معنوية بين التراكيز في المعاملات المدروسة كافة (الاصحاء والمرضى) ولا توجد اختلافات بين المعاملات (الاصحاء والمرضى) الا في حالة تركيز 0.2 مايكروغرام/مل حيث لوحظ وجود اختلافات معنوية بين مجموعات المرضى .

تساعد التقنيات التطبيقية باستعمال 5-بروموديوكسي يوريدين على التشخيص السريع و الواضح لعدد دورات التضاعف التي تمر بها الخلية خلال الانقسام . وقد استعمل الباحثون اختبار معامل التضاعف وسيلة للتحري عن التأثيرات الضارة للمواد المختلفة في انقسام الخلية . اذ يستعمل كوسيلة لمعرفة امكانية المواد الكيميائية المدروسة على تثبيط حركية التضاعف للخلية وهذه تقاس بانخفاض النسبة المئوية لعدد الخلايا في الانقسام الثالث ، وزيادة النسبة المئوية الى عدد الخلايا في الانقسام الاول وقد لوحظ ذلك عند استعمال عقار الميثوتركسيت في هذه الدراسة .

نتائج تأثير عقار الميثوتركسيت في معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCEs) لخلايا الدم اللمفاوية لمرضى التهاب القولون التقرحي (UC) و مرضى UC المتطور الى pseudopolyps و سرطان القولون

توضح النتائج الموضحة في الجدول (4) ان معدل (SCEs) في الاصحاء لم يختلف معنويا عن معاملة السيطرة الموجبة عند التركيزين 0.2 و0.5 مايكروغم/مل حيث كان معدل SCEs (5.66 ، 6.5) على التوالي مقارنة مع السيطرة 5.45 وهذا الشئ ينطبق على المرضى UC باستثناء التركيز 1 مايكروغم/مل اذ ارتفع معدله الى 10.9 قياسا بـ 7.47 في مجموعة السيطرة و(8.7 ،8.82) عند التركيزين 0.2 و 0.5 مايكروغم/مل على التوالي . اما في مرضى سرطان القولون فان معدل التبادل الكروماتيدي قد ارتفع الى (10.4 ، 10.49) عند التركيزين (0.2 ،0.5) مايكروغم/مل على التوالي قياسا 8.47 في معاملة السيطرة . كما اختلف معنويا عند هذين التركيزين عن معاملة السيطرة . كما نلاحظ ايضا ان مرضى UC المتطور لديهم المرض الى pseudo-polyps قد ارتفع لديهم معدل

(SCEs) الى 10.66 عند التركيز 0.5 مايكروغم/مل ، وهذا الاختلاف كان معنويا مع التركيز 0.2 مايكروغم/مل) ومعاملة السيطرة والتي كان معدل SCEs لديهما (8.81 ، 8.69) على التوالي . كما لوحظ من الجدول نفسه ان معدل SCEs في مجاميع المرضى ومجموعة السيطرة قد اختلف معنويا على مستوى احتمالية $P\leq0.01$ &$P\leq0.05$. بينما عند التركيز 0.2 مايكروغم/مل نلاحظ ان معدل SCE_s في مرضى سرطان القولون قد اختلف معنويا عن مرضى التهاب القولون التقرحي ، و المرضى المتطور لديهم المرض الى (pseudo-polyps) ، ومجموعة الاصحاء المعاملة التركيز نفسه، بينما في مرضى التهاب القولون التقرحي (UC) و مرضى UC المتطور لديهم المرض الى pseudo polyps لم يختلفا معنويا فيما بينهما ، اذ لوحظ ارتفاع معنوي في معدل SCEs في كل من مجاميع المرضى عند قياسه بالسيطرة . اذ بلغ معدله 5.66 في السيطرة ، بينما بلغ في مرضى التهاب القولون التقرحي 8.7 ، ومرضى UC المتطور لديهم المرض الى ظهور السليلات الكاذبة pseudopolyps الى 8.81 ، ومرضى السرطان 10.41 . وهذا يعني زيادة في تردد معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCEs) مما يدل على حدوث طفرات على المستوى الكروموسومي والحالة نفسها تنطبق على التركيز 0.5 مايكروغم/مل . نستنتج من الجدول (4) ان معاملة الخلايا بالتركيزين 0.2 و0.5 مايكروغم/مل من عقار الميثوتركسيت قد ادى الى زيادة تردد SCEs نتيجة زيادة التلف الحاصل في DNA . كما يستدل من النتائج ان معاملة الخلايا بتراكيز قليلة من العقار لها القدرة على استحثاث التبادل الكروماتيدي مما يعطي مؤشرا بأن هذه التراكيز لها قابلية تطفيرية قد تحدث طفرات وراثية . أما في التركيز 1 مايكروغم / مل في كل المجاميع تحت الدراسة ، فلم يمكن قياس SCE وذلك لأن عدد الخلايا المنقسمة قليل جدا نتيجة للتأثير السام للعقار، فضلاعن اغلبية الخلايا المنقسمة في مرحلة الأنقسام الأول .

جدول (4): تأثير التراكيز المختلفة لعقار الميثوتركسيت في معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCE_s) في مرضى التهاب القولون التقرحي ، وسرطان القولون ، ومرضى التهاب القولون التقرحي المتطور الى ظهور pseudopolyps قياسا بالاصحاء

التركيز	معدلs SCE في الاصحاء	معدلSCEs في مرضى UC	معدل SCEs في مرضى سسرطانى سرطان القولون	SCE في مرضىUC المتطور الى polyp
صفر	0.45±5.45 a B	0.31±7.47 b AB	0.56±8.47 b A	0.79±8.69 b A
0.2	0.36±5.66 a C	0.4±8.7 b B	0.88±10.41 a A	0.61±8.81 b B
0.5	0.51±6.56 a C	0.61±8.82 b B	1.44±10.49 a A	0.42±10.66 a A

القيم تمثل المعدلات للتبادل الكروما تيدي الشقيقي ± الخطأ القياسي . الاحرف الصغيرة تدل على وجود اختلافات معنوية ضمن العمود الواحد (بين التراكيز) ضمن المعاملة الواحدة على مستوى احتمالية ($P\leq0.05$)
الاحرف الكبيرة المختلفة تدل على وجود اختلافات معنوية ضمن الصف الواحد للتركيز الواحد.

كما اوضح التحليل الاحصائي في الاصحاء بعدم وجود فروقات معنوية بين التراكيز ، ولكن وجدت فروقات معنوية لدى مجاميع المرضى ، اذ لوحظ ارتفاع معنوي في معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCEs) بين مجاميع المرضى .

من التغييرات الوراثية الخلوية التي تحصل في الخلايا ، هو حساب معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCEs) والذي يساعد في الكشف عن العديد من المطفرات والمسرطنات في الخلايا الحيوانية داخل وخارج جسم الحي . ان تعداد SCE s في الخلايا المختلفة من الوسائل الحساسة للكشف عن التلف الحاصل في DNA . يتأثر تردد SCE s بالمواد التي تؤثر في دورة الخلية ، منتجة تغير في تردد SCEs . وهذه التغييرات ربما لاترتبط بفعل العامل المؤثر في المادة الوراثية نفسها ولكن عن طريق تغيير في مدة تضاعف الخلية . كما ان تحفيز حدوث SCEs وتثبيط تضاعف الخلية عمليتان تحدثان بشكل مستقل احدهما عن الاخر . وهذا يبين ان لزيادة قيم SCEs فعلا تطفيريا

واضحا . هناك العديد من المواد الكيميائية تم دراستها حول تأثيرها في زيادة SCEs مثل المايتومايسين-C (MMC) ، و السايكلوفوسفومايد ، وكذلك الافلاتوكسين B1 ، و caffeine ، اذ اعـــتبرت هذه المواد محفزات فعالة لظاهرة SCEs [7] وهذا يفسر النتائج التي حصل عليها بهذه الدراسة عند استعمالنا عقار الميثوتركسيت فضلا عن ذلك يمكن اعتبار فحص التبادل الكروماتيدي الشقيقي هو مقياس اخر من مقاييس التحليلات الوراثية الخلوية ويمثل كسر في Two double helices of DNA ثم يعاد التحامها في مواقع جديدة . ان اعادة الالتحام تحدث بشكل غير دقيق نتيجة فشل نظام الاصلاح في الدنا DNA وان ذلك قد يسبب تحورا في الشفرات الوراثية أي انه يسبب التزاوج الخاطئ للقواعد (miss-pairing) ونتيجة لذلك فقد يحصل حذف أو حشر لقواعد جديدة مما يؤدي الى حدوث طفرة ويكشف عن التبادل الكروماتيدي الشقيقي بوصفها مواقع تبادلية للمناطق شديدة التصبغ في الكروموسومات الخلوية المتضاعفة بوجود 5-BrdUrd . وتعد هذه الظاهرة مؤشرا حساسا يمكن بوساطته تقدير مدى التطفير الحاصل والتسرطن في الانظمة المختبرية . وقد بينت نتائج الدراسة كما موضح في جدول (4) ان هناك ارتفاعا في المعدلات التلقائية للـ SCEs في عينات السيطرة للمرضى المصابين (العينات غير المعاملة بالعقار) وقد يكون ارتفاع معدلات SCEs له علاقة بشدة المرض . ان الالية التي حصلت بها قابلية الخلايا على النمو في التراكيز المذكورة في الدراسة توضح المقاومة للعقار ، حيث اشارت الدراسات التي اجريت على خطوط لخلايا لبونة أن المقاومة تنشأ نتيجة حصول طفرة في موقع الجين لانزيم الداي هايروفوليت (DHFR) dihydrofolate reductase [8] . وتبين وجود استبدال لحامض اميني في موقع البروتين ونتيجة لذلك يحصل زيادة في فعالية الانزيم تؤدي الى المقاومة . كما ان وجود البروتينات الجدارية المسماة p-Glycoprotein التي لها قابلية الارتباط مع العقار ومن ثم تمنع دخوله الى داخل الخلية . هناك الية اخرى وهي تضخيم الجين وتعد من الاليات الاساسية للمقاومة وهذا يعني زيادة نسخ الجين في الخلية الواحدة ، وتبعا لذلك يزداد ناتج الجين المسؤول عن اظهار صفة او وظيفة معينة . وقد لوحظ ان الخلايا المقاومة غالبا ما تكون موجودة في التراكيز الواطئة قياسا بالتراكيز العالية [9] . ان التراكيز العالية هي تراكيز قاتلة في حين ان التراكيز الواطئة يمكن ان تستحث الطفرة في الخلايا المنماة في الوسط الزرعي الحاوي على العقار [10] . كانت هذه النتائج متوافقة مع [11] في دراسته الوراثية الخلوية والانزيمية على مرضى سرطـــــان القولون وعلى مرضـــى سرطان المعدة [12] . وكذلك مع [13] في دراسته على الخلايا اللمفاوية لمريضات سرطان الثدي وكذلك لدراسة تمت من قبل [14] على خطوط خلايا قولونية ورمية حيث اظهرت الدراسة ان الخلايا المقاومة تنمو في التراكيز القليلة للعقار .

ان فحص التبادل الكروماتيدي يعد اكثر حساسية من فحص النوى الصغيرة والانحرافات الكروموسومية في تحديد الاضرار الوراثية نتيجة حدوث ضرر في جزيئة الحامض النووي ومن ثم يزيد من معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي [15] .

نستنتج من هذه الدراسة أهمية أستعمال هذه المقاييس في دراسة تطور المرض في الحالات المزمنة ومدى استجابة الخلايا المصابة بالآلتهاب للعقارات المستعملة .

المصادر :

1. Lander, E.S & Schork , N.J . (1994). Genetic dissection of complex traits. Science, 265:2037 -2048.
2. Parkes, M & Jewell, D. (2001). Ulcerative colitis & Crohn s disease: Molecular genetics &clinical implications. Review in molecular genetics 19: 1426 -1445.
3. Keith, R. Loeb & Lawerance A. Loeb. (1999). Genetic instability & the mutator phenotype. Am. J. Pathol . 154: 1621-1626.
4. Kneith , R. Loeb & Lawerance A . Loeb. (1999). Genetic instability & the mutator phenotype. Am. J. Pathol . 154: 1621-1626.
5. الموسوي ، رافد غبد الواحد عبد الكريم ، (2002) . دراسة التغييرات الوراثية الحلوية و الأستجابة المناعية لمرض أبيضاض الدم النخاعي الحاد . رسالة ماجستير

6. Stites, D.P., (1994). Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity. In: Basic and Clinical Immunology. By Stites D.P., Terr, A.T.and Pasloe , T.G. 8th Lange medical publishing , U.S.A. pp : 195-214.

7. Willenbucher,R.F., Aust,D.E., Chang,C.G., Zelman,S.J., Ferrell,L.D., Moore,D.H., Waldman, F.M.(1999). Genomic instability is an early event during the proression pathway of ulceration – colitis –related neoplasia . American Journal of pathology.154:1825-1830.

8. Spencer, H., Sorrentino, B.V.P., Chundra, S.K., Sleep, S.E., and Blakley , R.L. (1996). Mutation in the gene for human dihydrofolate reductase (DHFR) an unlikely cause of clinical replace. In Pediatric Leukemia after therapy with methotrexate. Leukemia. 10 (3): 439-446.

9. 9- Shubber EK., Jaffer ZMT. Nada SM., and Karma AH (1998). Induction of chromosomal anomalies and gene amplification in human cells by anti-cancer drugs .The Nucleus 41:120-127.

10. الملاجسن ، زينب محمد طاهر جعفر ، (1989) . دراسة وراثية خلوية على خلايا الهامستر الصيتي . رسالة ماجستير , كلية العلوم ، جامعة بغداد

11. العباسي ، حازمة موسى خليل . (2001) . دراسة وراثية خلوية وانزيمية لمرضى سرطان القولون . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

12. Karman,A., Binici,D.N., Kabalar,M.E., Dursun,H., Kurt,A.(2008). Alteration of SCE frequency in gastric cancer and chronic atrophic gastritis patients with and without H.pylori.World J. Gastroenterol. 28:14(16):2534-2539.

13. Al-Amiry, E.W.(1999). Enzymaticcytogenetic and drug resistance studies on blood from patients with breast cancer. M.Sc .Thesis, College of Education for Women , Baghdad University .

14. Valentina , B., Nicola, T., Stefaria,B., Francessco,G., Rossana,P., Gin,T., Autouella,M., Francessco,s., Mario,G., and Marcella,C.(1998). Deoxyadenine metabolism in a human colon –carcinoma cell line (LOVO) in relation to its cytotoxic effect in combination with deoxycoformycin . Int. J. Cancer.75:713-720.

15. Cottlier,A., Fundia,A., Boerr,L., Sambuelli,A., Negreira,S., Gil,A., Gomez,J.C., Chopita,N., Bernedo,A., Slavutsky,L.(2001).High frequencies of telomeric associations, chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in ulcerative colitis . Am.J.Gastroenterol. 96(5):1641-1643.