Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

دراسة وراثية خلوية لبعض الاورام الظهارية في جلد الانسان والابقار

خليل حسن الجبوري[1]، ناهي يوسف ياسين[2]، فراس صبحي صالح الطائي[2]

1 فرع الامراض كلية الطب البيطري، جامعة بغداد
2 المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، الجامعة المستنصرية

الخلاصة:

تضمن البحث اجراء دراسة وراثية خلوية على نفس العينات الورمية المستاصلة من الانسان حيث استعملت طريقة الزرع الخلوي المباشرة لغرض الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام. تم النجاح في تحليل كروموسومات ست حالات باستخدام تقنية التحزيم فضلا عن ثماني حالات تمكن فيها معرفة التغيرات الكروموسومية العددية. اظهرت بعض سرطانات الخلية الظهارية القاعدية تغيرا عدديا بسيطا تمثل بزيادة في نسخ كروموسوم (5) و (18) وفقدان للكروموسوم الجنسي (Y). لكن على الاغلب اظهرت السرطانات الجلدية غير الملانية (سرطانة الخلية الظهارية القاعدية والحرشفية) تغيرات عددية وتركيبية مختلفة شملت كل من كروموسوم: #17,#1,#12,#7,#5,#9 و الكروموسوم Y. و تميزت هذه الاورام ايضا بظهور العلامات الكروموسومية التي تشاهد بصورة متعددة في بعض الحالات المدروسة. اما بالنسبة للورم الغدي الزهمي فاظهر هيئة كروموسومية طبيعية من ناحية العدد والشكل كما هو الحال في بعض الخلايا السرطانية الخبيثة. اما بالنسبة للابقار, فاجريت الدراسة الوراثية الخلوية على الاورام الجلدية الحميدة والخبيثة, وقد اظهرت بعض خلايا سرطانة الخلية الحرشفية اطوارا استوائية من الانقسام الخلوي لكن نوعيتها وعددها قليل وغير واضح ولا يمكن الاعتماد عليها كمؤشرات لهذه الاورام, وان اغلب هذه الخلايا لوحظ فيها تغيرات كروموسومية عددية وتركيبية معقدة.

الكلمات الدلالية: الاورام الظهارية، دراسة وارثية خلوية.

المقدمة:

نتيجة للتطور الحاصل خلال الفترة الماضيه لارتباط كل من علم الامراض pathology, وعلم الوراثة الخلوية cytogenetic, وعلم الوراثة الجزيئية molecular genetic, بعضها ببعض للتشخيص والاستدلال على انواع مختلفة من السرطان البشري والحيواني, وعلى الرغم من ذلك التطور فان المحاولات في ايجاد علاقة بينهم مازالت غير متكاملة. علما انه قبل اقامة مبدا الوراثة الخلوية للسرطان كان تشخيص سلوك السرطان او ابيضاض الدم leukemia مقتصرا على الدراسات النسجية المرضية ومواصفات الخلية المرضية (1). ان تقنيات الوراثة الخلوية في السنوات العشرين الماضية وثقت وجود تغيرات وتغيرات فرعية في الكروموسومات في الحالات السرطانية, وتتمثل بحالات شذوذ كروموسومية خاصة او متكررة specific or recurrent chromo-somal abnormalities في ظروف لا يمكن فيها تمييز بعضها عن بعض من خلال دراسات علم الامراض وعلم الخلايا. هذه التغيرات تم الاستفادة منها في تشخيص وتصنيف ومآل prognosis امراض الدم الخبيثة (2, 3, 4) . بصورة مماثلة فقد توسع التعرف على حالات شذوذ كروموسومية للاورام اللمفاوية واخيرا للاورام الصلدة الا انها اختلفت عن امراض الدم كون الاخيرة تمتاز بتغيرات كرموسومية قليلة ومميزة تكاد تكون محدودة وتتزامن مع المظاهر السريرية والنسجية, او مآل المرض . ومثل هذه الملاحظات امكن تطبيقها على الاورام اللمفاوية ولكن بصورة اقل دقة مما عليه في امراض الدم (1, 5) . الا انه في الاورام الصلدة على الرغم من كون نتائج الوراثة الخلوية ذات قيمة تشخيصية لكنه لم يتم تعريف العلاقة المتبادلة بين التغيرات الكروموسومية وسلوك هذه الاورام بشكل واضح كما هي الحالة في امراض الدم (6) . وكل الدراسات توصي بتوسيع البحوث حولها للتوصل الى ابعد نقطة يتم فيها ايجاد تلك العلاقة.

ان عدد حالات سرطانات الجلد التي تم دراستها عن طريق تحليل الوراثة الخلوية قليل, لذلك فان الحاجة ما زالت قائمة الى اجراء دراسات اخرى من اجل فهم اوسع لنشوء الورم وتقدمه. وفي قطرنا لم يتم لحد الان اتمام دراسة في الوراثة الخلوية عن الاورام الجلدية البشرية او الحيوانية, ولذلك فقد خطط هذا البحث للسير خطوة في طريق فهم اسس علم الامراض والوراثة للاورام الجلدية. ونظرا لاهمية السرطان استهدفت الدراسة الى مايلي: تحليل وراثي خلوي لبعض الاورام الجلدية, ومحاولة تحديد كل من التغيرات العددية والتركيبية لكروموسومات الخلايا السرطانية.

المواد وطرق العمل Material and Methods

الوراثة الخلوية Cytogenetic

بعد الحصول على العينة الورمية ونقلها مباشرة الى المختبر بواسطة الوسط الزرعي الناقل transport media, بصورة مبردة ومعقمة, هناك عدة طرق مستعملة لغرض الحصول على خلايا ورمية في الطور الاستوائي للانقسام metaphase, وتعتمد هذه الطرق على شكل ونوعية الورم. استخدمت الطريقة المباشرة المثبتة من قبل (7) وهي كالاتي:

تحضير العينة الورمية Tumour specimen preparation

Corresponding Address:
Khalil H. Aljeboori
Dept. of Pathology, College of Vet. Medicine, univ. of Baghdad
Email: Khalilhassan1955@gmail.com

وضع النسيج الورمي مباشرة بعد الوصول الى المختبر في اطباق بتري, وتم تنظيفه من الخثر الدموية blood clot الملتصقة بالنسيج, و ازالة الانسجة المتنخرة والدهنية necrotic and adipose tissues.

تفتيت الورم Tumour disaggregation

هرس النسيج الورمي باستخدام الطريقة الميكانيكية, وذلك للحصول على اكبر عدد ممكن من الخلايا الورمية الحرة والحية. تم ذلك بوضع قطعة النسيج الورمي في طبق بتري معقم, ثم غمرت العينة بقليل من الوسط الزرعي (2 – 3 مل), وقطعت وهرست النسيج باستخدام المشرط الجراحي scalpel, وملقط جراحي معقم بحيث يحصل على عالق خلوي خال من قطع النسيج الكبيرة التي لم تستجب للتقطيع والهرس, على ان تتم هذه العملية باسرع وقت ممكن. بعدها يحول العالق الخلوي الى انابيب بلاستيكية, او زجاجية ذات حجم 10 مل, وتم اضافة الكولجسين بتركيز 12 مايكرو غرام لكل مللتر من العالق اي بواقع 0,02 مل لكل مللتر واحد من العالق. بعدها تحضن الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م ولمدة تتراوح بين 30 – 50 دقيقة, وتم اثناء عملية الحضن سحب وارجاع pipetting للعالق بواسطة ماصة باستور Pasteur pipette بصورة سريعة ولثواني قليلة, وبواقع مرة واحدة كل 15 دقيقة.

المعاملة بمحلول واطئ التوتر Hypotonic solution

بعد الانتهاء من عملية الحضن نقلت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 1500دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق وذلك لفصل الخلايا من العالق. بعدها نبذ الرائق وترك الراسب ثم ترج الانبوبة, واضيف محلول واطئ التوتر KCl الدافئ 37°م تدريجيا مع التحريك المستمر للعالق حتى يكمل الحجم الي 10 مل لكل انبوبة, ثم نقلت الانابيب الى الحمام المائي او الحاضنة بدرجة حرارة 37°م ولمدة 25 – 30 دقيقة.

التثبيت Fixation

بعد انتهاء مدة المعاملة بمحلول KCl, نقلت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي وبسرعة 1500دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق وذلك لفصل الخلايا من العالق. تم سكب الرائق وابقاء الراسب مع كمية قليلة من الرائق, ثم خلطت الخلايا مع اضافة المثبت قطرة قطرة مع الرج المستمر حتى تصبح كمية المثبت المضافة بقدر حجم الخلايا, ومن ثم يكمل الحجم الى 5 مل, ثم تركت الانابيب في الثلاجة 4°م لمدة لا تقل عن نصف ساعة او بعض الاحيان تترك الى اليوم التالي over night, بعدها نقلت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 1500دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق, وسكب الرائق ويترك الراسب مع اضافة كمية جديدة من المثبت ومع الرج المستمر, وكررت هذه العملية مرة اخرى ولثلاث مرات وذلك لغسل الخلايا والحصول على عالق خلايا ضبابي اللون.

التقطير Dropping

قطر عالق الخلايا بعد ان اصبح ضبابيا على الشريحة الزجاجية , ويكون التقطير من ارتفاع مناسب يتراوح بين 50 – 100 سم والشريحة تكون مائلة بزاوية 45 درجة ثم تترك بعد ذلك لتجف بصورة جيدة.

التصبيغ Staining

صبغت الشرائح بصبغة كمزا Giemsa stain, حيث غطت الشريحة الزجاجية بالصبغة لمدة 2,5 – 3 دقيقة, ثم تغسل بمحلول سورنسن المدفئ وتركت حتى تجف لتكون جاهزة للفحص.

التحزيم Banding

بعد عملية التقطير لعالق الخلايا على الشرائح الزجاجية حفظت الشرائح لمدة 2 يوم في الجو الحار (صيفا), ولمدة 3 – 4 يوم في الجو البارد (شتاءا) وبدرجة حرارة الغرفة في مكان جاف. ثم بعد هذه المدة وضعت الشرائح في الفرن الكهربائي لمدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة 65°م. بعدها عرضت الشريحة لمحلول التربسين لمدة 8 – 15 ثانية, ثم وغسلت الشريحة حالا بمحلول دارئ الفوسفات PBS المبرد الى درجة الانجماد. وصبغت الشريحة مباشرة بصبغة كمزا, حيث جرى بعدها عملية فحص الشريحة بواسطة المجهر الضوئي وتحديد التغيرات الكروموسومية غير الطبيعية وحسب (8).

النتائج Results

نتائج الدراسة الوراثية الخلوية Results of Cytogenetic study عينات الانسان Human biopsies

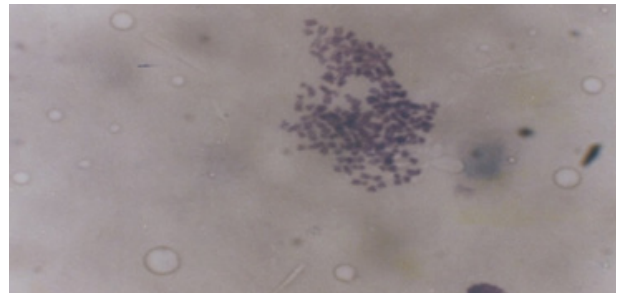
اجريت الدراسة الوراثية الخلوية على نفس عينات الاورام التي تمت عليها الدراسة المرضية (35 ورما) بما فيها الاورام الخبيثة والحميدة. وقد استعملت طريقة الزرع الخلوي المباشرة, وذلك لغرض الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام. ويوضح الجدول (1) اعداد الاورام وانواعها التي اعطيت نتائج وراثية خلوية والتي لم تعط , علما ان تقرير كون النموذج قد نجح في الدراسة الوراثية الخلوية, او فشل يعتمد على فحص شرائح زجاجية للنموذج لا تقل عن 15 شريحة. وقد كانت نسبة نجاح الحالات الي تم فيها الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام هي (40%).

جدول (1) : اعداد وانواع الاورام التي تم الحصول عليها ونتائج التحليل الوراثي الخلوي لها

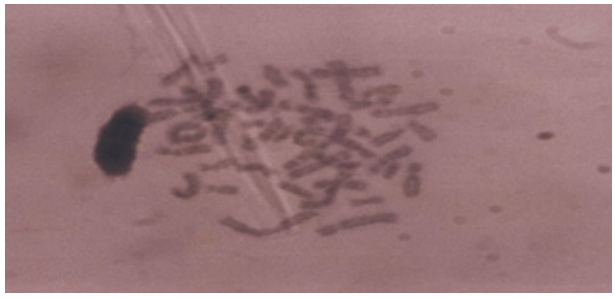
عدد الحالات	النتيجة	الاورام الخبيثة	الاورام الحميدة	افات ماقبل التسرطن	النسبة المئوية
16	لم يتم الحصول على خلايا في الطور الاستوائي	9	4	3	45,714%
5	الكروموسومات غير منتشرة وغير واضحة ولا يمكن تحليل النتائج	5	-	-	14,286%
8	الكروموسومات قصيرة وقابلة لتحليل نتائج التغيرات العددية	8	-	-	22,857%
6	الكروموسومات جيدة وقابلة لتحليل نتائج التغيرات العددية والتركيبية	5	1	-	17,143%
35	المجموع	27	5	3	100%

التغيرات العددية Numerical changes

اوضحت النتائج ان (14) نموذجا ورميا فقط يمكن اجراء التحليلات الوراثية الخلوية لها معرفة التغيرات العددية للكروموسومات وكما موضحة في الجدول (1), حيث كانت سبعة نماذج تمثل سرطانة الخلية الظهارية القاعدية BCC, اظهرت ثلاثة نماذج منها تغيرات عددية للكروموسومات قريبة من ثنائية المجموعة الكروموسومية near diploid, وكما في الشكل (1), وثلاثة نماذج كان منوال عدد الكروموسومات لها اكثر من ثنائية المجموعة الكروموسومية hyperdiploidy, والحالة الاخيرة اظهرت خلاياها منوال كروموسومات اقل من تعداد ثلاثية المجموعة الكروموسومية hypotriploidy. في حين كان عدد نماذج سرطانة الخلية الظهارية الحرشفية SCC القابلة للتحليل الكروموسومي العددي خمسة نماذج اظهرت ثلاثة منها منوال عدد كروموسومات اقل من تعداد ثلاثية المجموعة الكروموسومية hypotriploidy, واظهر نموذجان منوال عدد كروموسومات اكثر من ثنائية المجموعة الكروموسومية hyperdiloidy. بينما نجحت حالة واحدة من سرطانة الخلية القاعدية الحرشفية BSCC بالتحليل الكروموسومي العددي, حيث كان منال عدد الكروموسومات في بعض الخلايا قريبا من تعداد ثلاثية المجموعة الكروموسومية triploidy, وفي خلايا اخرى من ذلك العد (hypertriploidy), وكما في الشكل (2). تمكن اجراء التحليل الكروموسومي العددي لورم حميد واحد (الورم الغدي الزهمي), وكان منوال عدد الكروموسومات له ثنائي المجموعة الكروموسومية diploidy اي ذات عدد كروموسومي طبيعي مجهريا.



الشكل (2): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخليه عائدة لسرطانة (BSCC) حاله رقم 33 والتركيبيه المعقدة
40x10 , Giemsa stain) complex numerical & struc-(tural change



الشكل (1): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخليه عائدة لسرطانة (BCC) حاله رقم 32 حيث يلاحظ التغير العددي البسيط
(100x10, Giemsa stain) simple numerical change

جدول (2): منوال ومدى التغيرات العددية الكروموسومية ونوع الورم لـ (14) حالة ورمية

ت	رقم الحالة	نوع الورم	عدد الخلايا المفحوصة	عدد الكروموسومات	
				المنوال	المدى
.1	7	SCC	9	75	88 – 73
.2	9	BCC	14	57	65 – 46
.3	13	SCC	17	76	85 – 76
.4	14	SCC	16	55	74 – 50
.5	18	BCC	25	50	58 – 49
.6	22	SCC	16	83	89 – 70
.7	25	BCC	21	47	55 – 44
.8	26	BCC	18	78	90 – 64
.9	29	BCC	11	56	59 – 51
.10	31	SCC	15	60	60 – 54
.11	32	BCC	31	55	60 – 46
.12	33	BSCC	6	81	105 – 79
.13	34	BCC	27	47	57 – 47
.14	35	الورم الغدي الزهمي	7	46	46

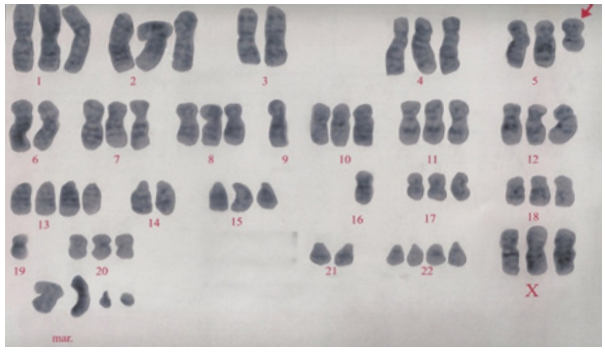
BCC: سرطانة الخلية الظهارية القاعدية SCC: سرطانة الخلية الظهارية الحرشفية,
BSCC: سرطانة الخلية القاعدية – الحرشفية

التغيرات التركيبية Structural changes

اشارت النتائج الى ان ستة نماذج فقط امكن اجراء التحليل الكروموسومي لها لمعرفة التغيرات العددية والتركيبية معا, علما بان خمسة نماذج منها كانت تمثل اوراما خبيثة, وورم واحد ورما حميدا, ومن ضمن الاورام الخبيثة كان ثلاثة منها تمثل سرطانة BCC وورمان سرطانة SCC. وادناه نتائج التغيرات التركيبية:

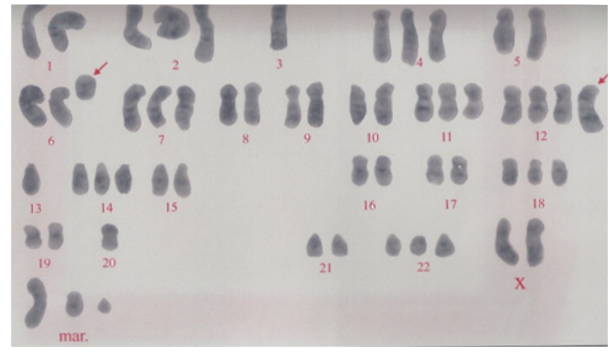
الحالة رقم (14): جرى استئصال الورم من منطقة جفن العين لرجل بعمر (60 سنة), وكانت نتيجة الفحص النسجي تشير الى انه سرطانة SCC. ان عدد الخلايا المفحوصة لهذا الورم (16 خلية), وكان مدى عدد كروموسوماتها (50 – 70) وبمنوال (55). واظهرت هذه الحالة تغيرات تركيبية وعددية متمثلة بالهيئة الكروموسومية التالية, شكل (3)

65,XXX,-Y,+1,+2,+4,+i(5p),+7,+8,-9,+10,+11,+12,+13,+13,+15,-16,+17,+18,-19,+20,+22,+22,+4 mar.



الشكل (3): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخليه عائدة لسرطانة (SCC) حاله رقم 14

65, XXX, -Y , +1, +2,+4 , +i(5p), +7, +8, -9, +10 , +11, +12, +13, +13, +15, -16, +17, +18, -19, +20, +22, +22, +4 mar .



الشكل (4): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخليه عائدة لسرطانة (BCC) حاله رقم 29

65, XX, +2,-3, +4, +del (6) (q11),+7, +11, +12, +add(12)(q24), -13, +14, +18, -20, +22, +3mar.

الحالة رقم (25): كانت عائدة لرجل يبلغ (43 سنة) من العمر, تم استئصال ورم له من الانف وتبين من خلال الفحص النسجي ان مصاب بسرطانة BCC. كشفت نتائج التحليلات الوراثية الخلوية للورم التغيرات التالية, (X,-Y,-9,+der(9,45

الحالة رقم (29): كان موقع الورم في خد امراة بعمر (58 سنة), وشخصت الحالة اعتمادا على الفحص النسجي سرطانة BCC. اظهرت الخلايا الورمية تغيرات عددية للكروموسومات كان مداها (51 – 59) وبمنوال (56), بينما شملت التغيرات التركيبية الكروموسوم (6) و (12) اضافة الى ظهور العلامة الكروموسومية marker chromosomes, شكل (4)

XX,+2,-3,+4,+del(6)(q11),+7,+11,+12,+add(12),56 .(q24),-13,+14,+18,-20,+22, +3 mar

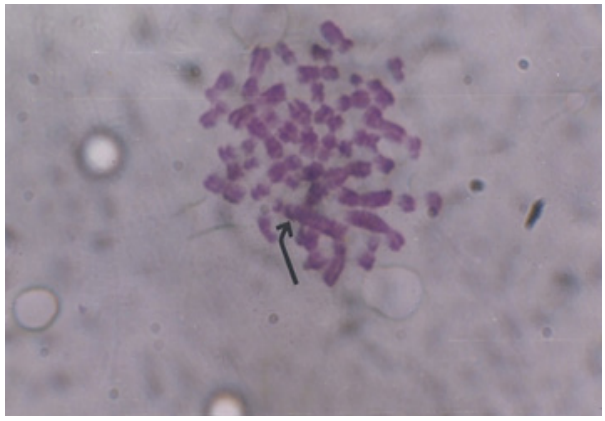
الحالة رقم (31): ورم استاصل من الشفة السفلى لامراة تبلغ (57 سنة) من العمر, وشخص سرطانة SCC, تم فحص (16) خلية وظهرت فيها تغيرات عددية وتركيبية كثيرة اهمها التغير الحاصل في الكروموسوم رقم (5), اضافة الى ظهور العلامات الكروموسومية, وكان مدى عدد الكروموسومات (54 – 60) وبمنوال (60). وفيما يلي الهيئة الكروموسومية لهذه الحالة:

XXX,-1,-1,-3,+4,-5,+i(5p),6,+7,+i(7p),-,54 9,+10,+12,+12,+del(12)(q13),+14, +del(17)(p12),- .18,+20,+21,+22,+1 mar

الحالة رقم (34): عائدة لرجل بعمر (55 سنة) ظهر له ورم على الانف, وشخصت الحالة على انها سرطانة BCC. كان مدى عدد الكروموسومات (47 – 57) وبمنوال (47), اظهرت الخلايا الورمية تغيرات بسيطة تمثلت في بعض الخلايا بزيادة نسخ الكروموسوم (5) و (18) وفقدان الكروموسوم الجنسي (Y):

X,-Y,+5,+18,47

في حين اظهرت خلايا اخرى وجود علامات كروموسومية, (شكل 5)

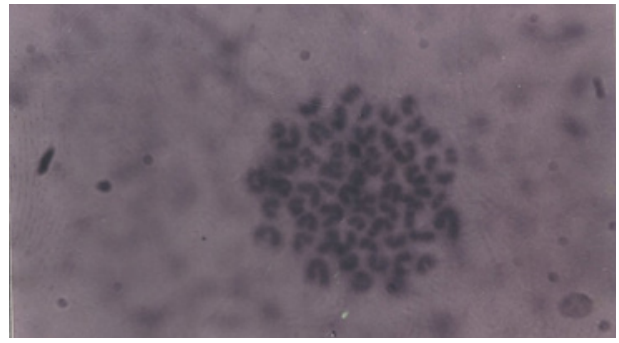


الشكل (5): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخليه عائدة لسرطانة (SCC) حاله رقم 22 حيث يلاحظ وجود Long marker chromosome (سهم) (100X10 m Gi emsa stain)

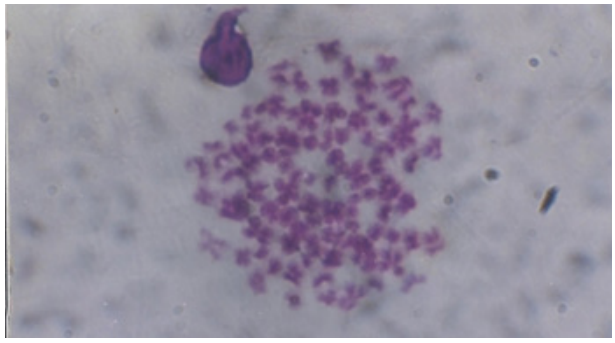
الحالة رقم (35): تمثل ورما حميدا يقع على الانف لرجل يبلغ (65 عاما) من العمر, وكشفت نتائج التحليل الكروموسومي لهذا الورم هيئة كروموسومية طبيعية من ناحية العدد والشكل حيث تم فحص سبع خلايا اظهرت عدد كروموسومات طبيعي (46 كروموسوم), مع العلم ان قد يكون هناك تغيرات لا يمكن رؤيتها بالمجهر الضوئي الاعتيادي, اي ان الورم كان ذات هيئة كروموسومية: 46,XY.

عينات الابقار Bovine necropsies

انجزت الدراسة الوراثية الخلوية لعينات الاورام الجلدية في الابقار على معظم الحالات التي تم الحصول عليها اثناء فترة البحث. وقد استعملت طريقة الزرع الخلوي المباشرة المتبعة لعينات الانسان لغرض الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام. كانت اغلب هذه العينات تمثل اوراما حليمية جلدية حميدة benign cutaneous papillomas اضافة الى ورمين لسرطانة الخلية الحرشفية SCC. ورغم قلة الحالات التي انتجت بعض الخلايا الورمية اطوارا استوائية من الانقسام الخلوي, الا انها غير جيدة الوضوح وغير قابلة للتحليل الكروموسومي ولا يمكن الاعتماد عليها كمؤشرات وراثية خلوية لهذه الاورام. علما ان تقرير كون العينة قد فشلت في الدراسة الوراثية الخلوية يعتمد على فحص شرائح زجاجية لا تقل عن (20) شريحة. لقد اظهرت عدد من خلايا سرطانة الخلية الحرشفية SCC تغيرات عددية وتركيبية معقدة complex numerical and structural changes, شكل (6) في حين كشفت بعض الخلايا تعداد كروموسومي طبيعي شكل (7).



الشكل (7): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخلية عائدة لسرطانة (SCC) في الابقار يوضح يوضح العدد الكروموسومي الطبيعي (X 10, Giemsa stain 100)



الشكل (6): يمثل الهيئة الكروموسوميه لخلية عائدة لسرطانة (SCC) في الابقار يوضح التغيرات العدديه والتركيبيه المعقدة (X 10, 100 Giemsa stain)

المناقشة Discussion:

الدراسة الوراثية الخلوية Cytogenetic study

الدراسة الوراثية الخلوية لخلايا الاورام الجلدية في الانسان

من خلال نتائج هذه الدراسة توضح النجاح في زراعة واجراء التحليلات الوراثية الخلوية للتغيرات التركيبية لستة اورام جلدية, كان خمسة منها اوراما سرطانية خبيثة وحالة واحدة كانت ورما جلديا حميدا, هذا فضلا عن التغيرات العددية التي تم ملاحظتها في ثمان حالات, وبالنسبة للافات ماقبل التسرطن (XP) فقد اظهرت صعوبة في الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام الذي قد يعود الى صغر حجم العينة الذي كان اقل او مساوي الى 0,5سم2 اضافة الى كثرة الالياف الغراوية في الافة. ومن هذا يتضح صعوبة التعامل مع زراعة الانسجة, واجراء فحص الكروموسومات في مجال الاورام الصلدة (6, 7, 9) وتعزى هذه الصعوبة الى عدة عوامل:

1. صعوبة الحصول على عينات ورمية طرية و حية حيث ان عددا كبيرا من عينات الاورام الصلدة تكون حاوية على مناطق تنخر او خلايا ميتة.
2. تلف العينات بسبب التاخر في الحصول عليها من صالة العمليات او التاخر في نقلها من المستشفى الى المختبر.
3. معظم كروموسومات الاورام الصلدة تكون قصيرة وغير واضحة, او تكون غير قابلة للتحزيم banding وبالتالي الصعوبة في فحصها وقراءتها.
4. قلة معامل انقسام الخلايا السرطانية وبالتالي قلة الفرص في الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام.

تم استخدام طريقة الزرع المباشرة في تحضير الكروموسومات, وذلك للتقليل من نسبة حدوث التلوث في حالة الزرع لمدة قصيرة short term culture حيث انه من المعلوم ان الجلد هو من اكثر الاعضاء تماسكا مع المحيط الخارجي, مما يزيد من خطورة تلوثه بالاحياء المجهرية, من جهة اخرى فلقد استخدمت طريقة الزرع المباشرة من اجل الوقوف على طبيعة التغيرات الحقيقية للكروموسومات التي حدثت لحظة استئصال الورم وقبلها, والابتعاد عن تاثير العوامل البيئية المرافقة للزراعة النسيجية, وكذلك فان الطريقة المباشرة تعطي صورة مطابقة لمحتويات الخلية وهي داخل الورم اي العامل الزمني يكون موحدا (7). بينت نتائج التحليلات الوراثية الخلوية لخلايا الاورام السرطانية الجلدية وجود تغيرات عددية وتركيبية متعددة, فبعض الاورام اظهرت تغيرات عددية بسيطة كما في سرطانة الخلية الظهارية القاعدية BCC والذي يتماشى مع نتائج الباحثين (10), ولكن على الاغلب تميزت الاورام السرطانية الجلدية غير الميلانية بتغيرات عشوائية random وهذا يتفق مع ما اكدته الكثير من الدراسات التي اجريت على الاورام سواء بطريقة الزرع المباشرة للاورام الطرية او على خطوط الخلايا العائدة لهذه الاورام (11, 12, 13, 14). وعلى الرغم من هذه الدراسات الا انها غير كافية وعليه توجد قلة في بيانات الدراسة الوراثية الخلوية لهذه الاورام ويرجع السبب في ذلك ؛ الى صعوبة زرع الخلايا الورمية

القاعدية basal cells او الحرشفية squamous cell, وفي الحصول على خلايا في مرحلة الانشطار الخيطي mitoses لغرض التحليل الوراثي الخلوي (9, 10, 14). من التغيرات العددية المهمة وغير العشوائية, التي قد يكون لها علاقة مع اورام الجلد هو فقدان احدى نسخ الكروموسوم رقم (9) monosomy 9 والذي تم ملاحظته في حالتين (14 و 31) من سرطانة SCC وان مثل هذا التغيير مبين في دراسات سابقة (13, 15) كما لوحظ في الخلايا المزروعة لمدة قصيرة في الوسط الزرعي (14 short term culture) وقد تعود اهمية هذا التغيير في الكروموسوم رقم (9) الى كونه حاويا على عدد كبير من المورثات المثبطة للورم وفي كلا الذراعين مثل TSC1, P15, P16 والتي تكون لها اهمية في تطور سرطانات عديدة (16, 17, 18), واضافة لذلك فان اهمية كروموسوم رقم (9) متاتية من كونه يحوي على مورث اصلاح الدنا (XPA) ضمن الذراع الطويل للكروموسوم (19). من التغيرات المهمة الاخرى التي لوحظت في سرطانة SCC هو تكوين الكروموسوم متناظر الذراع القصير (i5p) حيث تم ملاحظته في حالتين (14 و 31) وفي اكثر من خلية, ولا توجد ادلة على حدوث مثل هذا التركيب في الاورام الجلدية في دراسات سابقة مما يشير الى حدوث تغيرات كروموسومية جديدة لهذه الاورام معتمدا على الموقع الجغرافي, وعلى العكس تم تحديد مثل هذا التغير في اورام سرطانية عديدة كاورام القولون والمستقيم (7), وسرطانات المثانة (1, 18, 20), وسرطانات الخلية الحرشفية للراس والرقبة (21), اضافة الى اورام سرطانية اخرى (9) مما يدل على اهمية هذا الكروموسوم في احداث الاورام السرطانية وتطورها. كما لوحظ زيادة في نسخ الكروموسوم (5) في كلتا الحالتين السابقتين حيث ان مثل هذا التغير تم ملاحظته في سرطانة الخلية الظهارية القاعدية (10 BCC). اظهرت سرطانة BCC في الحالات رقم (25 و34) تغيرا عدديا بسيطا تمثل في حالة فقدان للكروموسوم الجنسي Y وهذا ماشار اليه ايضا الباحثون (9, 10) كما اثبت هذا الفقدان للكروموسوم Y في اورام سرطانية مختلفة (7, 20, 22) مما يدل على اهمية هذا الكروموسوم في تطور الاورام, مع العلم بان هذا الفقدان قد يكون طبيعيا في كبار السن حيث لاحظ (23) فقدان كروموسوم Y في خلايا الدم اللمفاوي المنقسمة وكذلك في خلايا نخاع العظم. تم تاكيد التغيرات التركيبية والعددية التي تحدث في الكروموسوم رقم (7) في الاورام السرطانية الجلدية, حيث لوحظ زيادة نسخ هذا الكروموسوم فضلاً عن تكوين الكوروموسوم متناظر الذراع القصير (i7p) وان مثل هذه التغيرات سجلت في الاورام السرطانية الجلدية من قبل (9, 10) وتم ملاحظتها في اورام اخرى كاورام القولون والمستقيم (7), واورام الكبد (24), وسرطانات المثانة وغيرها (1, 9, 20). ان اهمية كروموسوم رقم (7) متاتية من:

1. ارتباطه مع تطور سرطانات عديدة (25).
2. احتوائه على المورث المسؤول عن مستقبلات احد عوامل النمو (26 Epidermal growth factor).
3. احتواء هذا الكروموسوم على المورثات الورمية ERBB1/ EGFR والمورث الورمي CDK6 المهمة في احداث انواع عديدة من السرطانات (19).

لوحظ زيادة نسخ الكروموسوم رقم (12) في الاورام السرطانية الجلدية غير الملانية في الحالات (14و27و31), واظهرت الحالة رقم (27) زيادة في الذراع القصير للكروموسوم (12p+), ولم يلاحظ تكرار مثل هذه التغيرات للكروموسوم (12) في الدراسات السابقة لاورام الجلد مما يعطي مؤشرا على تباين التغيرات الوراثية hetero-geneity لهذه الاورام, او ربما يكون هذا التغير ذا اهمية في تطور اورام الجلد لاحتواء الكروموسوم (12) على مورثات ورمية مهمة مثل Cyclin D2 على الذراع القصير و MDM2 على الذراع الطويل (19). اظهرت بعض خلايا سرطانة SCC فقدان نسختي الكروموسوم رقم (1) وان مثل هذا الفقدان لكروموسوم (1) لوحظ في احدى خلايا الدراسة التي اجراها الباحثون (14) وكلن ليس بصورة متكررة, ومن المعلوم ان الكروموسوم رقم (1) يشكل غالبية التغيرات التي تحدث في اورام سرطانية عددية مما يجعل هذا التغير سببا مهما في مراحل مهمة من بايولوجية الاورام ونشوئها كبداية تحول الخلية الورمية الحميدة الى خبيثة او خلود الخلية (27 immortalization). بينت سرطانة BCC حالة فقدان لاحدى نسخ الكروموسوم رقم (17) كما اشارت اليه بعض الدراسات (9) وان اهمية حالة الفقدان هذه متاتية من كون احتواء الكروموسوم (17) المورث المثبط للورم P53 الواقع على الذراع القصير والذي لوحظ غيابه في كثير من الاورام (28) ومن ضمنها اورام الجلد (29, 30). كشفت اغلب الاورام السرطانية الجلدية في هذه الرداسة وجود العلامات الكروموسومية marker chromo-some في خلاياها, ومثل هذه العلامات تتواجد في اورام سرطانية مختلفة (7, 9) وربما يدل تواجدها على ان السرطانات قد اصبحت اكثر عدوانية more aggressive, حيث يلاحظ الغزو للانسجة المجاورة او الانتقال الى انسجة واعضاء اخرى (7). وجدت في الدراسة الحالية بعض الخلايا تبدو بهيئة كروموسومية طبيعية ضمن الخلايا الورمية, وان هذه الظاهرة تفسر كون هذه الخلايا من الممكن ان تمثل خلايا ورمية ذات تغيرات لا ترى بالمجهر اضوئي (1, 7) وان مثل هذه الصفة للكروموسومات تم ملاحظتها في هذه الدراسة للاورام الحميدة وبعض خلايا الاورام الخبيثة حيث كانت طبيعية من ناحية شكل الكروموسومات وعددها وهذا يتفق مع راي الباحث (9). من جهة اخرى فان سبب ظهور هذه الحالة في خلايا الاورام السرطانية الخبيثة قد يعود ايضا الى العينات الماخوذة من حافة الورم اذ تحتوي على خلايا للنسيج الطبيعي.

الدراسة الوراثية الخلوية لخلايا الاورام الجلدية في الابقار

اجريت الدراسة الوراثية الخلوية على بعض الاورام الجلدية المستاصلة من الابقار, وذلك لان بعض العينات لم يتم الحصول عليها بصورة مباشرة بل تم حفظها في الفورمالين. وقد لوحظ من خلال نتائج الدراسة المرضية ان اغلب الاورام كانت اوراما حليمية حميدة تتميز بفرط القرنين hyperkeratosis الشديد كما اشارت اليه العديد من الدراسات: (31, 32, 33, 34) وان صفة كهذه تجعل صعوبة في التعامل مع النسيج لغرض التحليل الكروموسومي وبالتالي التقليل من الفرص للحصول على خلايا ورمية حية بعدد كاف للتحليل الوراثي. وفيما يخص الاورام السرطانية الخبيثة فقد تمكن الحصول على خلايا في الطور الاستوائي من الانقسام لاحدى هذه الاورام لكن نوعية هذه الاطوار وعددها قليل وغير جيد ولم يتمكن اجراء التحليل الوراثي الخلوي لها, حيث انه من مجموع ثلاثة اورام خبيثة اجريت طريقة الزرع المباشرة لورمين فقط, والنموذج الورمي الثالث تم حفظه في الفورمالين. ومن الملاحظ قلة او عدم توفر البحوث الكافية حول الدراسات الوراثية الخلوية للاورام السرطانية الصلدة في الابقار, وعلى الرغم من ذلك فقد خطط البحث لاجراء هذه الدراسة ولكن صعوبة الحصول على عينات الاورام الخبيثة حال دون ذلك.

References:

1. Sandberg, A.A (1992). Cytogenetic of human neoplasia in: Koss, G.L. (ed). Diagnostic cytology and it's histopathological bases, J.B. lippicott company, Philadelphia.
2. First MIC. (1986). Cooperative study group Morphologic, Immunnologic and Cytogenetic (MIC): Working classification of acute lymphoblastic leukemias. Cancer Genet Cytogenet. 23:189-197.
3. Second MIC. (1986). Cooperative study group Morphologic, Immunnologic and Cytogenetic (MIC): Working classification of acute myeloid leukemias. Cancer Genet Cytogenent. 30:1-15.
4. Third MIC. (1986). Cooperative study group Morphologic, Immunnologic and Cytogenetic (MIC): Working classification of the primary myelodysplastic syndromes and therapy-related myelodysplastic and leukemias. Cancer Genet Cytogenet. 32:1-10.
5. Yunis, J.J (1983). The chromosomal basis of human neoplasia. Science. 221:227-236.
6. Sandberg, A.A.; Bridge, A.J. (1992). Techniques in cancer cytogenetic. An review and update. Cancer Invest. 10:163-172.
7. Yaseen, N.Y. (1990). Cytogenetic study on human colorectal cancer cells. Thesis submitted to the degree of Doctor of Philosophy, Medical School University, Sheffield.
8. ISCN (1995). An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman, F.(ed.). S. Karger. Basle.
9. Mitelman, F. (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. Mutat Res. 462:247-253.
10. Jin, Y. Mertens, F.; Persson, B.; Warloe, T.; Gullesttad, H.P.; Salemark, L.; Jin, C.; Jonssob, N.; Risberg, B.; Mandahle, N.; Mitelman, F.; Heim, S. (1998). Non random numerical carcinomas. Cancer Genet Cytogenet. 103:35-42.
11. Boukamp, P.; Tilgen W.; Dazarlieva, R.; Beritzkrentz, D.; Haag, D.; R.; Engstner, M, Fuseing, N. (1982). Phenotypic and genotpic characteristics of cell line from a squamous cell carcinoma of the skin. Jnat cancer INST. 68:415-427.
12. Tilgen, W.; Boutner, M.; Haag, D.; Fuesing, N. (1983). Preservation of morphological, functional and karyotypic traits during long – term culture and in vivo passage of two human skin squamous cell carcinomas. Cancer 43:5995-6011.
13. Heim, S.; Yue-Shing, J.; Mandahl, N.; Biorklund, A.; Wennerberg, J.; Jonsson, N.; Mitelman, F. (1988). Multiple unrelated clonal chromosome abnormalities in an in situ squamous cell carcinoma of the skin. Cancer Genet Cytogenet. 36:149-153.
14. Aledo, R.; Dutrillaux, B.; Lombard, M.; Aurias, A. (1989). Cytogenetic study on eleven cutaneous neoplasma and two pre-tumoral lesions from xeroderma pigmentosum patient. Int J Cancer. 44:79-83.
15. Leonard, N.: Chaggar, R.; Jones, C.; Takahashi, M.; Nikitopoulou, A.; Lakhani, S. R. (2001). Loss of heterozygosity at cylindromatosis gene locus, CYLD in sporadic skin adnexal tumours. J Clin Pathol. 54:689-692.
16. El – Naggar, A. K.; Hurr, k.; Batsakis, J. G.; M. A.; Goefert, H.; Heff, V. (1995). Squential loss of heterozygsity at microsatellite motifs in preinasve and invasive head and neck squamous carcinoma cancer res. 55:2656-2659.
17. Otsuki, T.; Clark, H.M.; Wellmann, A.; Jaffe, E.S.; Raffeld, M. (1995). Involvement of Cdkn 2 (p16 INK4a/MTSI) and p15 ink 4b /MTS2 in human leukemias and lymphomas. Cancer Res. 55:1436-1440.
18. Fadl – Elmula, I.; Gorunova, I.; mandahl, N.; Elfving, F.; Lundgeren, R.; Mitelman F.; Heim, S. (2000). Karytpic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. Genes chromosomes cancer. 29:256-265.
19. Miller, O. J.; Therman, E. (2001). Human chromosomes. 4th ed. Springer-Verlang New York, Inc. USA.
20. Thompson, F.H. (1997). Cytogenetic methods and findings in human solid tumors. In: Barch, M.J. Knutsen, T.; Spurbeek, J.L. The AGT cytogenetic laboratory manual (3rd ed.). Lippincott – Raven, Philadelphia.
21. Jin, Y.; Martens, F.; Jin, C.; Akervall, J.; Wennerberg, J.; Gorunova, I.; Mandahl, N.; Heim, S.; Miteman, F. (1995). Norandom chromosome abnormalities in short – term cultured primary squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res. 55:3204-3210.
22. Kadhum, W. (2000). Pathological and cytogenetic study on bone tumors. Thesis submitted to the degree of master, College of Veterinary, Medicine – Baghdad University.
23. Pierre, R. V.; Hoagland, H. C. (1972). Age associated aneuplaidy: loss of Y chromosome from human bone marrow cell with aging. Cancer 30:889-904.
24. Parade, L.; Hallen, M.; Tranberg, k.; Hagerstrand, I.; Bondeson, L.; Mitelman, F.; Johansson, B. (1998). Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7, and 8 in primary liver cancer. Genes chromosomes cancer. 23:26-35.
25. Johansson, B.; Heim, S.; Mandahl, N.; Mertens, F.; Mitelman, F. (1993). Trisomy 7 in nonneoolastic cells. Genes Chromosomes Cancer. 6:199-205. Cited by (Parada etal., 1998).
26. Mckusick, V. (1980). The anatomy of the human genomic. J. hered. 71:370-391.
27. Paraskeva, C.; Harrey, A.; Fierty, S.; Powell, S. (1989). Possible involvement of chromosome 1 in vitro immortalization: evidence from progression of human adenoma derived cell line in vitro. Int J cancer. 43:743-746.
28. Hollstein, M.; Sidransky, D. Vogelstein, B.; Harris, C. (1991). P53. Mutation in human cancer. Science 253:49-53.
29. Rees, J. L. (1995). P53 and the origins of skin cancer. J Invest Dermatol. 104:883-884.
30. Liang, S.; Ohtsuki, Y.; Furihata, M.; Takeuchi, T.; Iwata, J.; Chen, B.; Sonbe, H. (1999). Sun-exposure-and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumors cell in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. Virchows Arch. 434:193-199.
31. Jones, T.C.; Hunt, R. D. and King, N. W. (1997). Veterinary pathology 6th. Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
32. Moulton, J.E. (1978). Tumors in domestic animals 2nd. Ed. University of California Press Berkeley. Los Angeles, USA.
33. Al-Sheikly, S. A. (1988). Study on naturally occurring tumours in domestic animals, M.Sc Thesis, College of Veterinary Medicine, Univ. of Baghdad.
34. Al-Jashamy, K. A. (1993). Study the skin lesion in bovine in Baghdad city, M.Sc Thesis College of Veterinary Medicine, Univ. of Baghdad.

Study on Cytogenetic of Some Epithelial Skin Tumors in Human and Bovine

Khalil H. Al-Jeboori[1], Nahi Y. Yaseen[2], Firas S. Al-Taee[2]

1 Dept. of Pathology, College of Veterinary Medicine Univ. Of Baghdad
2 Iraqi Centre for Cancer and Medical Genetics Research, Al- Mutansiriya University

Summary:

The present research includes the cytogenetic study on the same biopsies of the pathological studies that were excised from human and bovine, where the direct cellular culture method was used to obtain cells in metaphase. The chromosomal analysis was successful in six cases using banding technique as well as eight cases of numerical changes. Some of BCC showed simple numerical changes represented by gain in chromosome 18 and 15 and loss of Y chromosome. Non-melanocytic skin tumors (SCC and BCC) almost showed complex numerical and structural changes which occurred in the following chromosomes: #9, #5, #7, #12, #1, #17 and #Y. these tumors were characteristic of marker chromosome which appeared several times in some cases. The sebaceous adenoma was of normal karyotype. In bovine, the cytogenetic study was made on malignant and benign skin tumors, some cells of SCC displayed metaphase of cellular division which due to its low number and fuzzy quality cannot be reliable as indicators for these tumors, and most of these cells showed complex numerical and structural abnormalities.