مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية/ العدد (4) / المجلد (15) : 2008

دراسة العلاقة بين فعالية إنزيم التيلومريز والإصابة بأورام سرطانية مختلفة باستخدام تقنية تفاعل سلسلة بوليمريز الدنا

محمد باقر صاحب أحمد **سامرة يونس يوسف**

كلية العلوم للبنات– جامعة بابل كلية العلوم –جامعة بغداد

علي عبد الرحمن طه

جامعة النهرين

الخلاصة

جمعت 30 عينة ورمية مختلفة من عدة مستشفيات ومراكز بحثية في بغداد لغرض قياس فعالية إنزيم التيلومريز ومدى علاقتها بتشخيص وجود السرطان في هذه العينات.

وجد بأن أفضل حرارة لخزن العينات هي 80- درجة مئوية. تم قياس فعالية إنزيم التيلومريز في عينات الأنسجة والدم المحيطي وخطوط الخلايا باستخدام عدة *T*elo *TAGGG* Telomerase PCR ELISA .

بالنسبة للعينات الورمية الخبيثة حسب التشخيص الخلوي والبالغ عددها 24 وجدت فعالية واضحة لإنزيم التيلومريز في 22 من أصل 24 عينة سرطانية حسب التشخيص الخلوي(90 % تقريباً) , 12 عينة منها كانت نسيجية خبيثة, و7 عينات منها و حسب التشخيص الخلوي كانت عينات دم سرطانية, أما الثلاثة الأخيرة فكانت لخطي خلايا سرطانية ومزرعة دماغ أولية. وهذا يشير إلى وجود إنزيم تيلومريز فعال في الأعم الأغلب من الخلايا الخبيثة.

غابت فعالية إنزيم التيلومريز في عينتين سرطانيتين من مجموع 24 عينة سرطانية (10 % تقريباً) حيث لم يكتشف فعالية ملحوظة لإنزيم التيلومريز في هاتين العينتين مقارنة بباقي العينات السرطانية الاثنتان والعشرون, وهذا يرشح احتمالية وجود آلية مستقلة عن إنزيم التيلومريز ليست لها الأولوية ولكنها قد تلعب دورا مهما في الحفاظ على الخلايا السرطانية حية من دون الحاجة إلى إنزيم التيلومريز.

أما العينات الورمية الحميدة حسب التشخيص الخلوي والبالغ عددها 6, فقد غابت فعالية إنزيم التيلومريز في 4 منها. وهذا يفتح الباب واسعا أمام إمكانية استخدام تقنية الكشف عن فعالية إنزيم التيلومريز كأداة للتفريق بين الأورام الحميدة والخبيثة.

Abstract

Thirty tumor specimens from several hospitals and research centers in Baghdad were collected to measure telomerase enzyme activity and it's correlation with the diagnosis of the existence of malignant tumors in these specimens.

It was found that the best temperature for specimens storage was -80 C°. Telomerase activity was measured in tissues, peripheral blood, and cell lines specimens using *T*elo *TAGGG* Telomerase PCR ELISA kit.

Clear telomerase activity was found in 22 out of 24 malignant specimens (about 90%) according to cytological diagnosis, 12 were malignant tissue specimens, 7 were malignant blood specimens, the last 3 were 2 malignant cell lines and 1 primary culture. These results indicated the existence of active telomerase in almost all malignant cells.

Telomerase activity was not detectable in two malignant specimens out of 24 malignant specimens (about 10%), where detectable telomerase activity was not discovered in these two specimens compared with the other 22 malignant specimens, this nominated the possibility of existence of an independent mechanism apart from telomerase wasn't had the priority but might play a crucial role in keeping malignant cells survive without the need for telomerase.

Telomerase activity was absent in 4 out of 6 specimens cytologically identified as benign tumors. These results let the door widely opened toward the possibility of utilizing telomerase activity detection technique as a differential tool between benign and malignant specimens.

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia. AML, acute myeloid leukemia. ALT, alternative lengthening of telomere. Anti-DIG POD, anti-digoxigenin peroxidase. CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid . CML, enzyme linked immunosorbent assay. Corp., corporation. PCR, polymerase chain reaction. RNase, ribonuclease. *Taq*, *Thermus aquaticus*. TRAP, telomeric repeat amplification protocol

المقدمة

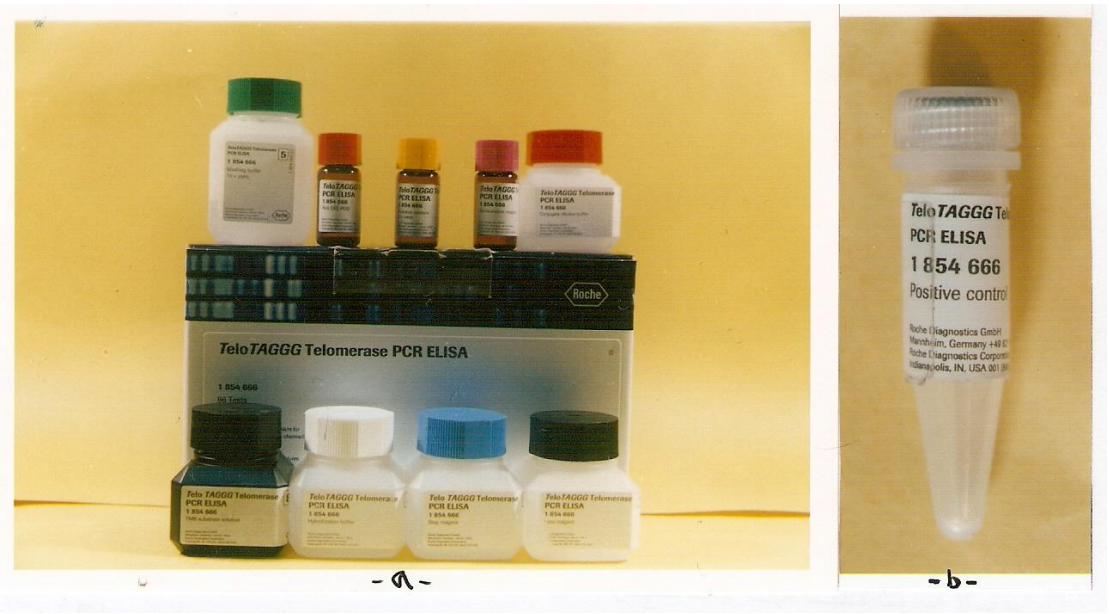
أن تشخيص السرطان تم إجرائه بشكل عام من قبل الاختصاصين بعلم الأمراض والذين يفحصون عينة النسيج بحثاً عن التشوهات الظاهرية المميزة. ولأن المختصين بهذا المجال يعولون على التبديلات الخلوية الرقيقة، فأن التشخيص المرضي هو ليس بالعلم الدقيق مقارنة بالتشخيص الجزيئي (Shay & Wright, 1998). ومن هنا توجهت الدراسات الحديثة إلى اعتماد اختبارات أكثر دقة معتمدة على الأحماض النووية (لاختبار العينات النسيجية، ما قبل السرطانية، والسرطانية) والحساسية (دقة الكشف عن وجود السرطان) لتشخيص مدى واسع من أنواع السرطان, ولهذا فأن الفحوصات السريرية الجديدة ذات المستوى الجزيئي والقابلة للتطبيق على معظم أنواع السرطان تكون ضرورية بشكل ملموس (Durusy and Ozturk, 2001). أن الإلية التي تؤدي إلى موت الخلايا الطبيعية هي الفقدان الحاصل في تراكيب معروفة بالتيلوميرات ، والتي تغطي نهايات الكروموسومات . وفي كل مرة تنقسم الخلية تتقصر التيلوميرات وفي النهاية تختفي، وهذا يؤدي إلى موت الخلية. وعلى العكس من ذلك تستعين الخلايا السرطانية بإنزيم التيلومريز والذي يستطيع تعويض ذلك الفقدان الحاصل في التيلوميرات عقب كل انقسام جاعلاً الخلايا خالدة (Bonney, 2000) . يمكن الاستفادة من هذا الأنزيم في تشخيص السرطان منذ مراحله المبكرة وذلك باستغلال جزء الرنا القالب لهذا الأنزيم وتضخيم نواتج استطالة البادئ المرتبط بالمناطق المكملة للرنا القالب في إنزيم التيلومريز بواسطة استخدام بادئ معكوس مكمل للتكرارات التيلوميرية المضافة ، وتضخيم هذه النواتج باستخدام تقنية الـ PCR. وهذا ما قام به Kim وجماعته لأول مرة عام 1994.

بما أن هذا الأنزيم لا يوجد في الخلايا السليمة إلا نادراً لذا يمكن استغلاله كواسم يشير إلى الوجود المبكر للخلايا السرطانية وبالتالي أمكانية علاج السرطان من خلال تثبيط هذا الأنزيم بوسائل مختلفة (Keith *et al.*, 2002). أن الكشف عن هذا الأنزيم ومعرفة مستواه يمتلك فائدة سريرية ملحوظة لتشخيص السرطان . وبينما كانت الوسائل الجزيئية المستخدمة في تشخيص السرطان تطبق على أنواع محدودة عادة من السرطان فأن التشخيصات المعتمدة على إنزيم التيلومريز تكشف وبكفاءة مدى واسع من أنواع السرطان ، كما أن وفرة التشخيصات السرطانية المعتمدة على هذا الأنزيم واعتماد الباحثين عليها قد يفتح الباب واسعاً لجعل متطلبات الأنزيم في متناول يد المختصين في هذا المجال وهذا يؤدي في كل الأحوال إلى زيادة فهم الأطباء لمدى علاقة هذا الأنزيم بوجود السرطان.

لعدم وجود دراسة سابقة في القطر لتقدير فعالية إنزيم التيلومريز ودوره في الكشف المبكر عن السرطان ، ولكون الوسيلة الوحيدة المتوفرة في القطر للكشف عن السرطان هي الفحوص الخلوية لذا أجريت الدراسة الحالية والتي تهدف إلى استخدام تقنية سريعة وحساسة ويعول عليها تدعى بروتوكول تضخيم التكرار التيلوميري telomeric repeat amplification protocol (فحص TRAP) للكشف عن فعالية إنزيم التيلومريز .

المواد وطرائق العمل

استخدمت عدة Telomerase PCR ELISA *TAGGG* *T*elo المجهزة من قبل شركة Roche والتي تتكون مما يلي حسب الشكل 1 (a و b):



شكل (1. a): يوضح مكونات عدة Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA المخزونة بدرجة حرارة 20- م° وبدرجة حرارة 4 م° (القلنسوة الحمراء :دارئ التخفيف الاقتراني ، القلنسوة البنفسجية : كاشف المسخ ، القلنسوة الصفراء :خليط التفاعل ،القلنسوة الحمراء: دارئ Anti-DIG-POD ، القلنسوة الخضراء : دارئ الغسل ،القلنسوة السوداء : دارئ CHAPS التحللي ، القلنسوة الزرقاء: دارئ الإيقاف ،القلنسوة البيضاء: دارئ التهجين ، العلبة السوداء : محلول مادة التفاعل TMB).

شكل(b.1) يوضح عبوة السيطرة الموجبة التابعة لعدة Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA المخزونة بدرجة حرارة 80- م°

جمعت عينات عديدة لأنسجة خبيثة وحميدة (شملت سرطان المثانة والغدد اللمفاوية والثدي والقولون والغدة الثايموسية والجلد والرحم) أخذت من عمليات جراحية مختلفة في مستشفى اليرموك ومستشفى الكرامة الكائنتين في بغداد, بالإضافة إلى عينات الدم محيطي والتي أخذت من عمليات السحب الروتيني من المركز الوطني لبحوث وأمراض الدم, وأخيراً خطوط الخلايا السرطانية التي أخذت من حاويات النتروجين السائل في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية. وقبل البدء بخطوات تقنية TRAP عوملت العينات كما في أدناه حسب طريقة Kim وجماعته سنة 1994.

1- حضرت شرائح نحيفة من عينات الأنسجة المجمدة في أطباق بتري بلاستيكية معقمة بوساطة سكينة معقمة إلى حد الوصول إلى قوام متجانس smooth consistency .
2- أخذت كمية صغيرة من القوام المتجانس وضعت في أنبوب أبندورف معقم بالمؤصدة بحيث لا يكون ارتفاع القوام أكثر من 1 مليمتر في الأنبوب ، أضيف 200 مايكروليتر من دارئ CHAPS التحللي المبرد مسبقاً ، مزج الدارئ مع القوام المتجانس بشكل جيد، تم الحضن بالثلج لمدة 30 دقيقة .
3- نبذ المستخلص الناتج من التحلل lysate مركزياً عند 14000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 م° .

4- أخذ وبحذر شديد 175 مايكروليتر من الرائق بوساطة ماصة دقيقة، نقل الرائق إلى أنبوب أبند ورف جديد (0.5 مليمتر) معقم بالمؤصدة .

5- قيس تركيز البروتين بطريقة Bradford، جمد مستخلص النسيج (الرائق) بسرعة في حاويات النتروجين السائل ، أخذ 100 مايكروليتر من كل عينة وتم تقدير تركيز البروتين حسب Bradford وجماعته سنة 1976, خزنت المستخلصات بدرجة حرارة 80- مْ لحين إجراء فحص TRAP عليها .

أما في حالة خطوط الخلايا وخلايا الدم المحيطي, اتبعت نفس الطريقة مع تحويرات بسيطة تتناسب مع طبيعة هذه الأنسجة.

بروتوكول تضخيم التكرار التيلوميري (فحص TRAP) (حسب Kim وجماعته سنة 1994)

الخطوة الأولى (تحضير السيطرات):

تحضير السيطرات السالبة لكل عينة : تم ذلك بمعاملتها بالأنزيم المحلل للرنا RNase (1مايكروغرام /مايكروليتر) المنشط بالغليان مسبقا لخمسة دقائق. حضن 2 مايكروليتر من مستخلص الخلايا أو الأنسجة أو الدم مع 1 مايكروليتر من محلول الأنزيم المحلل للرنا لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 25 مْ.

تحضير السيطرات السالبة لكل مجموعة من العينات: وضعت خلايا الكلية المجفدة الموجبة لأنزيم التيلومريز (.Roche corp) بالثلج لحين إذابتها أعيد تشكيلها reconstituted مع 20 مايكروليتر من الماء المقطر المزالة أيوناته والمعقم بالمؤصدة ،مزجت بشكل كامل مع مراعاة حفظ المستخلص بالثلج (امتلك المستخلص المعاد تشكيله تركيز مكافئ لـ 1×10^3 خلية للمايكروليتر الواحد). وزع المحلول إلى أحجام مناسبة (2 مايكروليتر للتفاعل الواحد) في أنابيب ابندورف صغيرة (0.5 مليلتر) خزنت بدرجة حرارة 80- مْ لحين إجراء فحص TRAPعليها بدلاً من مستخلص الأنسجة / الخلايا .

تم اعتبار عينات الأورام الحميدة كعينات سيطرة موجبة في هذا البحث لعدم وجود فعالية ملحوظة لإنزيم التيلومريز فيها.

الخطوة الثانية (الاستطالة والتضخيم):

وضع خليط التفاعل (.Roche corp) في الثلج لحين ذوبانه كلياً ، وزّع إلى أحجام صغيرة ملائمة (25 مايكروليتر لكل تفاعل) في أنابيب أبند ورف صغيرة (0.5 مليلتر) ، أضيف 2 مايكروليتر من مستخلص الخلايا أو الأنسجة أو الدم وأكمل الحجم إلى 50 مايكروليتر بإضافة 23 مايكروليتر من الماء المقطر المزالة ايوناته. نقلت الأنابيب إلى جهاز الدوار الحراري thermocycler وأنجز تفاعل الاستطالة والتضخيم بنفس الأنبوب لاحتواء عدة Tel TAGGG Telomerase PCR ELSA وبالتناقض مع التصاميم الأخرى لفحص TRAP على كل المكونات الضرورية لتفاعل إنزيم التيلومريز ولتقنية الـ PCR في دارئ تفاعل جاهز الاستخدام ربط كل من التفاعلين: الاستطالة والتضخيم في تفاعل ذي خطوة واحدة كما في جدول (1).

جدول (1): يوضح خطوتي استطالة إنزيم التيلومريز والتضخيم بوساطة تقنية PCR الجاريتان في نفس أنبوب التفاعل

رقم الدورة	الحرارة (م°)	الوقت	الخطوة
1	25	30 . 10 دقيقة	1- استطالة البادئ
2	94	5 دقيقة	2- تثبيط إنزيم التيلومريز
3 . 32			3- التضخيم amplification
	94	30 ثانية	المسخ denaturation
	55	30 ثانية	ارتباط البادئ annealing
33	4		4- الحضن

الخطوة الثالثة (الكشف عن الإنزيم بوساطة ELISA) (حسب Bosserhoff وجماعته سنة 1997)

1- مسخت نواتج PCR عن طريق إضافة 5 مايكروليتر من كل ناتج إلى 20 مايكروليتر من محلول المسخ (Roche corp.), حضنت بدرجة حرارة 25-15 م° لمدة 10 دقائق .

2- هجنت نواتج PCR بمجس كشف متخصص بالتكرار التيلوميري معلم بمادة digoxigenin (DIG) (Roche corp.) بإضافة 225 مايكروليتر من دارئ التهجين, مزج بوساطة رجّه لمدة 1-2 ثانية.

3- ثبت الناتج عبر البادئ المعلم بالبايوتين بصحيفة المعاير المجهري microtiter plate MTP المغطاة مسبقاً من قبل شركة Roche المجهزة للعدة بمادة streptavidin بوساطة نقل 100 مايكروليتر من الخليط لكل حفرة من وحدات MTP ،غطيت الحفر برقائق تغطية ذاتية الالتصاق لمنع التبخر .

4- حضنت وحدات MTP بدرجة حرارة 37 م° في هزازة بسرعة 250 دورة / دقيقة لمدة ساعتين .

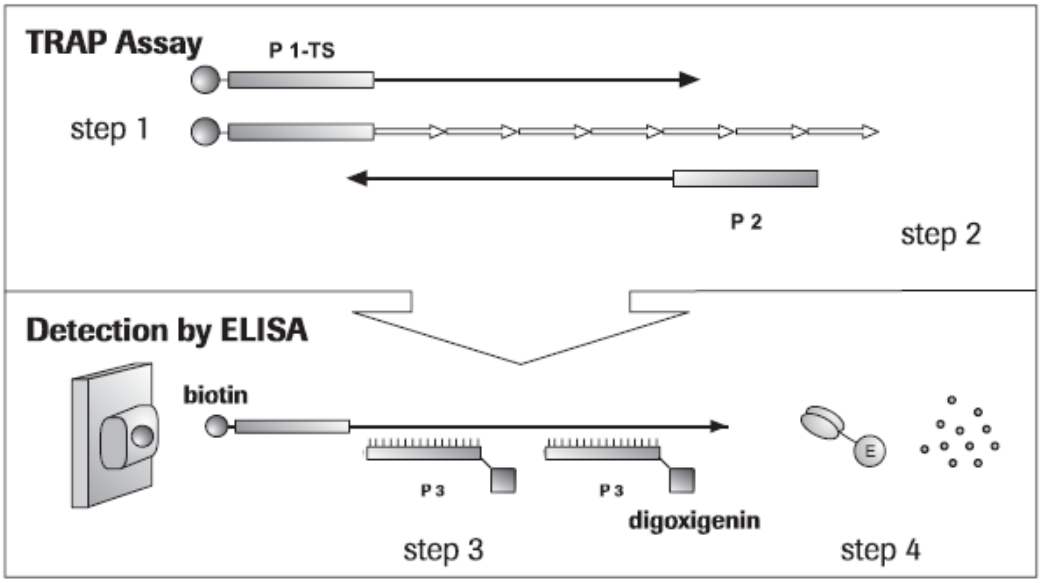
5- أزيل التهجين بالكامل ، خفف 1 مليلتر من دارئ الغسل (Roche corp.) في 9 مليلتر من الماء المقطر المزالة أيوناته ، غسلت وحدات MTP ثلاث مرات بـ 250 مايكروليتر من محلول العمل لدارئ الغسل لكل حفرة كل 30 ثانية ، أزيل دارئ الغسل بحذر .

6- خفف 100 مايكروليتر من محلول Anti-DIG-POD الخزين (Roche corp.) في 4.9 مليلتر من دارئ التخفيف الاقتراني (Roche corp.)، اقترن إنزيم البيروكسيديز مع الجسم المضاد بإضافة 100 مايكروليتر من محلول العمل Anti-DIG-POD لكل حفرة، غطيت وحدات MTP برقائق التغطية وحضنت بدرجة حرارة 25-15 م° لمدة 30 دقيقة مع الرج بسرعة 250 دورة / دقيقة .

7- أزيل المحلول بشكل كامل ، غسل خمس مرات بـ250 مايكروليتر من محلول العمل لدارئ الغسل لكل حفرة كل 30 ثانية على الأقل, أزيل دارئ الغسل بحذر .

8- أضيف 100 مايكروليتر من محلول المادة الأساس TMP (Roche corp.) (والمدفأة قبل إجراء التفاعل إلى درجة حرارة الغرفة) لكل حفرة ، غطيت الحفر برقائق التغطية، حضنت بدرجة حرارة 25 - 15 م° لمدة 20- 10 دقيقة مع الرج بسرعة 250 دورة / دقيقة .

9- أضيف 100 مايكروليتر من محلول الإيقاف (Roche corp.) لكل حفرة بدون إزالة المادة الأساس TMB المتفاعلة. باستخدام قارئة المعيار المجهري قيس امتصاص العينات عند 450 نانوميتر خلال 30 دقيقة بعد إضافة كاشف الإيقاف كما في الشكل (2):



شكل (2): يوضح آلية عمل عدة Telo *TAGGG* Telomerase PCR ELISA

النتائج والمناقشة

الكشف عن إنزيم التيلومريز بوساطة تقنية الـ ELISA:

أشارت النتائج المبينة في الشكل (3) إلى ظهور اللون الأصفر في بعض العينات عند اكتمال الفحص في تقنية الـELISA وبقاء عينات أخرى منها عديمة اللون . يعتبر ظهور اللون الأصفر نتيجة موجبة يمكن الاستدلال عليها بالعين المجردة حتى قبل الرجوع إلى قارئات المعايرة المجهرية لتقدير فعالية الإنزيم (Wu *et al.*, 2000) . وهذا ما كان واضحاً في 22 من مجموع 24 عينه سرطانية (90% تقريباً) أخضعت لهذا الفحص. هذه النسبة مقاربة لما أشارت إليه العديد من الدراسات المتعلقة بكشف فعالية إنزيم التيلومريز في الأنواع السرطانية المختلفة ، حيث وجدت فعالية الإنزيم في أغلب أنسجة الإنسان الورمية بنسبة (86-88%) (Shay *et al.*,1995; Perry *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001).

أما العينات عديمة اللون فكانت على نوعين ; الأولى هي تلك العينات المعاملة بالأنزيم المحطم للرنا والتي تم تحطيم فعالية أنزيم التيلومريز فيها نهائياً (شكل3) ولذلك كانت عديمة اللون .أما عينات النوع الثاني فهي العينات التي لم تستجب لفحص TRAP أصلاً أي أن لها فعالية سلبية لأنزيم التيلومريز ولذلك كانت عديمة اللون (شكل3) .اتفقت هذه النتيجة مع الكثير من الدراسات التي أكدت غياب فعالية إنزيم التيلومريز في أغلب الأنسجة الطبيعية والورمية الحميدة Kim *et al.*,1994; Breslow *et al.*,1997; (Bonney,2000;DeLange,1994).

شكل (3): يوضح صفيحة المعايرة المجهرية (MTP) المحتوية على العينات الموجبة والسالبة لفحص TRAP (اللون الأصفر يدل على النتيجة الموجبة) ، (+) تدل على العينات المعاملة بالأنزيم المحطم للرنا ، (−) تدل على العينات الغير معاملة بالأنزيم المحطم للرنا

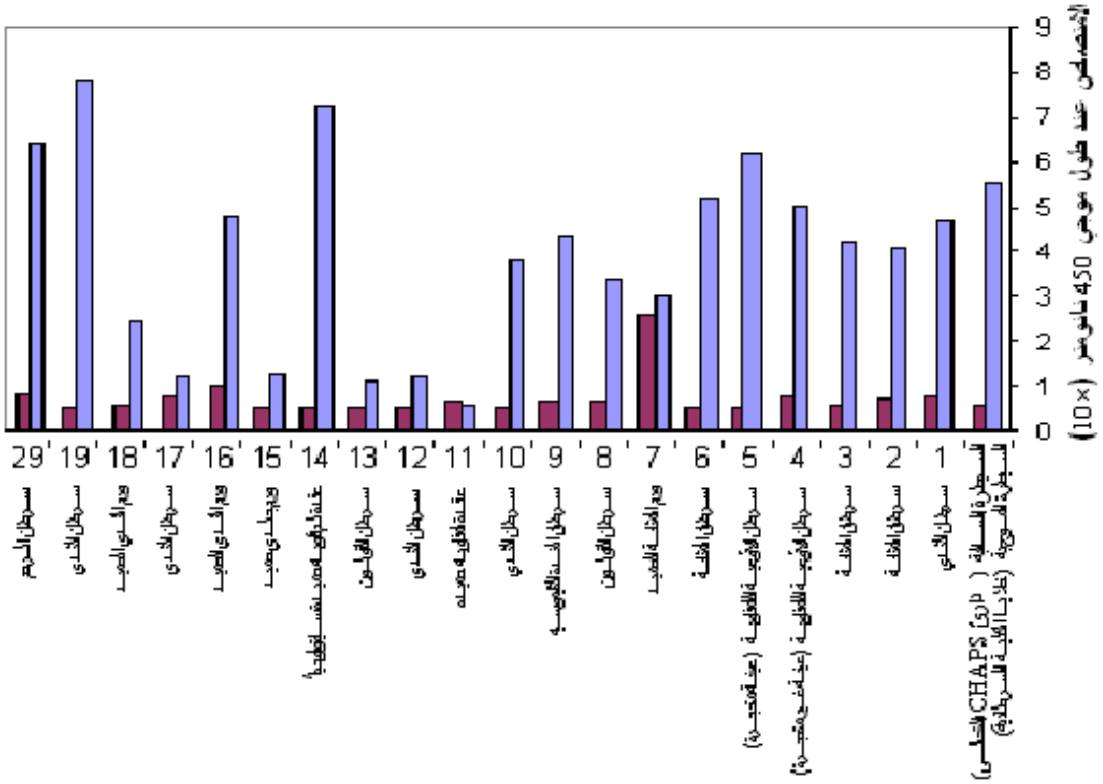
فيما يخص عينات الثدي ; فقد أخضعت 6 عينات ورمية مختلفة لفحص TRAP، استجابت 4 منها بشكل موجب للفحص (شكل 4) ، وعند معرفة نتيجة الفحوصات السايتولوجية لوحظ بأن هذه العينات الأربعة جميعها سرطانية أما العينات الأربعة الأخرى فكان 3 منها حميدة وعينة واحدة سرطانية ، أي أن فحص TRAP قد شخص 4 من مجموع 5 عينات سرطانية حسب التشخيص السايتولوجي. وهذا ما أكده Poremba وجماعته سنة 1999 حيث أشاروا إلى وجود فعالية ملحوظة لأنزيم التيلومريز في 80 من أصل 87 عينة من مرضى سرطان الثدي حسب التشخيص السايتولوجي . وأشار Shay و Bacchetti سنة 1997 بوجود فعالية ملحوظة لأنزيم التيلومريز في 88 % من عينات سرطان الثدي ، بينما توصلت المعاملة الحذرة التي قام بها Carey وجماعته سنة 1998على العينات السالبة مبدئياً إلى رفع معدل استجابة العينات السرطانية لفحص TRAP لتصل إلى 95 % كما وجدت الكثير من الدراسات علاقة وثيقة بين فعالية أنزيم التيلومريز وسرطان الثدي إذ وجدت فعالية الإنزيم في الأعم الأغلب من حالات سرطان الثدي (Bacchetti, 1996; Yashima *et al*., 1998; Chen *et al*., 2000; Artandi, 2003; Mueller *et al*., 2002; Sun *et al*., 1999). أما بالنسبة لعينات أورام الثدي الحميدة الثلاثة والتي لم تستجب جميعها لفحص TRAP في هذه الدراسة فلم تكن هذه النتيجة غريبة بسبب توافقها مع الدراسات الجارية على أورام الثدي الحميدة ، حيث وجد Poremba وجماعته سنة 1999 بأن 80 من أصل 85 عينة كانوا سالبين لأنزيم التيلومريز وحتى بالنسبة للعينات الخمس الباقية فأنها تميزت بفعالية قليلة لإنزيم التيلومريز حيث أعتقد Poremba وجماعته بأن منشئها هو وجود خلايا جذعية في هذه العينات. كما فحص Kim وجماعته سنة 1994 ثمانية عينات لأنسجة ثدي ورمية حميدة فلم

تعطي أي من العينات الثمانية أية فعالية تذكر لأنزيم التيلومريز. بينت نتائج هذا البحث بأن عينة سرطان الثدي ذات الرقم 12 (شكل4) لم تبد أية أشارة موجبة لأنزيم التيلومريز ولم يعبر إنزيم التيلومريز في هذه العينة المشخصة كعينة خبيثة سايتولوجياً , ولتفسير هذه النتيجة هنالك عدة احتمالات لعل أحدها يتمثل بعدم السماح بأخذ العينة لحين اكتمال العملية الجراحية تماماً ، أي بعد استئصال العينة جراحياً بساعتين تقريباً ، ربما أدى هذا إلى هبوط فعالية الإنزيم لهذا المستوى (شكل4) ، حيث أشار Tsujimura وجماعته سنة 2002 بوجوب خزن العينات فوراً بعد جمعها في درجة حرارة 80- م° إلى حين إجراء فحص TRAP. ومن المعروف بأن أدنى شرط لفعالية أنزيم التيلومريز هو سلامة جزئيه المرتبطين البروتيني والرايبونووي (Morin,1989). لكن حال موت الخلايا تصبح جدرانها كاملة النفاذية وتدخل الإنزيمات الهاضمة بأنواعها المختلفة وتقضي على مثل هذه المكونات الحيوية تدريجياً (Sedivy, 1998)، فقد يكون التنخر necrosis هو المسؤول عن ظهور هذه النتيجة السالبة إذا ما تألفت العينة من نسيج غير فعال حيويا بدون خلايا ورمية حية (Tsujimura *et al.*, 2002) . ومن ثم قلّت فعالية الأنزيم إلى الحد الذي يصعب به أي كشف لفعالية معقولة عنه كما في هذه الحالة. كما أن احتواء المستخلص على مثبطات لأنزيم *Taq* polymerase يؤثر على النتائج سلبياً مما يؤدي إلى إعطاء نتائج ليست ذات مصداقية معقولة (Wu *et al.*, 2000) . لذا استخدمت طريقة التخفيف بوصفها الملجأ المعقول وغير المكلف لتقليل تركيز مثل هذه المثبطات المحتملة في هذه العينات (Weidbrauk *et al.*,1995). لكن عدم تغيير نتيجة هذه العينة كما في الشكل (4) قلل من دور التركيز البروتيني للعينات في المسؤولية المباشرة عن عدم استجابة هذه العينة لفحص TRAP . أما الآلية الأكثر قبولاً في تفسير النتيجة السالبة لأنزيم التيلومريز هي آلية تطويل التيلومير البديلة (آلية ALT) فعلى الرغم من تجنب العديد من الخلايا الخالدة للتقصر التيلوميري بتعبيرها لأنزيم التيلومريز ولكن ربما تكون هنالك آلية أخرى في خلايا الإنسان للحفاظ على طول التيلومير (Dahse *et al.*,1997).

أكتشف Kim وجماعته سنة 2001 بأن ربع خطوط الخلايا الخالدة تقريباً لا تمتلك فعالية قابلة للكشف لهذا الأنزيم بوساطة فحوصات TRAP التقليدية خارج جسم الكائن حي ، ولكن وجد بأنها تمتلك تيلوميرات طويلة ومتغايرة، وهذه هي صفة التيلوميرات في هذا النوع من الخلايا كما أشار إليه Perrem وجماعته سنة 2001 حيث وجد بأنها ذات أطوال متغايرة من قصيرة جداً إلى طويلة جداً ، وسميت هذه العينات الخاصة والمكتسبة لآلية جديدة مستقلة عن هذا الأنزيم لإطالة التيلوميرات بعينات التطويل البديل للتيلوميرات (Smith,2000; Reddel *et al.*,1995) . اعتقد بأن إعادة الارتباط المتماثل homologous recombination هو الآلية المعقولة للحفاظ على طول التيلومير في خلايا ALT، والذي هو مسلك مستقل للحفاظ على طول التيلومير ولا يحتاج إلى إنزيم التيلومريز (Bechter *et al.*, 2003; Lundblad & Wright, 1996; Belair *et al.*,1997) ، على الرغم من احتمال تدخل آليات متعددة في الحفاظ على الطول التيلوميري ، إلا أن التركيز لحد الآن هو حول رأي واحد لاستطالة التيلومير في خلايا ALT تضمن اجتياح التيلومير القصير للتيلومير الواهب الأطول منه عبر عملية إعادة الارتباط مؤدياً إلى نقل غير متبادل non-reciprocal transfer للدنا التيلوميري إلى النهاية القصيرة (Bechter *et al.*, 2004).

أما فيما يخص الأورام الأخرى والتي تشمل أورام القولون والعقد اللمفاوية والمثانة والثايموسية فعندما أخضعت لفحص TRAP استجابت للفحص بشكل موجب (شكل4)، وعند معرفة نتيجة الفحوصات

السايتولوجية لوحظ توافق نتيجة هذه العينة المستجيبة ايجابياً لفحص TRAP مع العديد من البحوث التي أكدت وبشكل لا يقبل مجال للشك وجود هذا الانزيم في الأعم الأغلب من هكذا نوع من الأورام (Ophoven *et al.*,1999; Lin *et al.*, 1996; Ito *et al.*,1998; Kok *et al.*,2000).



شكل (4): يوضح عينات الأنسجة الورمية (biopsies) الموجبة لإنزيم التيلومريز.

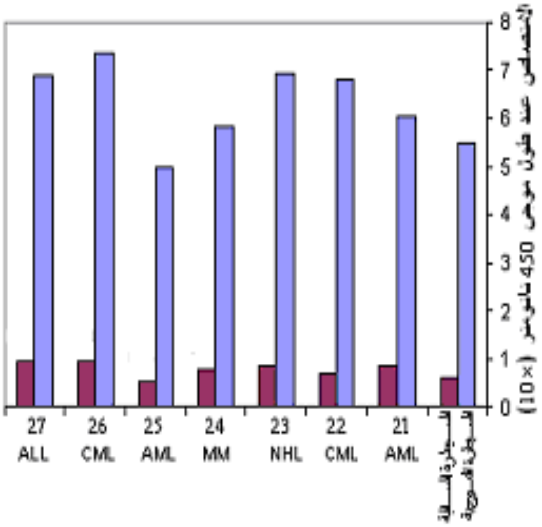
ملاحظة : الأعمدة الفاتحة اللون تبين العينات غير المعرضة للتثبيط / الأعمدة الغامقة اللون تبين العينات المعرضة للتثبيط

تقدير فعالية إنزيم التيلومريز في خلايا الدم المحيطي

عبّرت كل عينات الدم السبعة والممثلة لأنواع سرطانية مختلفة حسب التشخيص السايتولوجي عن فعالية ملحوظة لإنزيم التيلومريز مع تغايرات نسبية ربما عكست مراحل التسرطن المختلفة لهذه العينات. وهذا ما أكده MacNamara وجماعته سنة 2001 والذي وجد بأن فعالية إنزيم التيلومريز توجد بنسبة 93 % لعينات NHL, كما أشار Norrback وجماعته سنة 1996 إلى وجود فعالية ملحوظة لأنزيم التيلومريز في كل عينات NHL المدروسة. كما أبدت كل العينات AML و MM و NHL في دراسة أخرى فعالية ملحوظة أيضاً لهذا الإنزيم (Granger *et al.*, 2002). كما وجدت فعالية إنزيم التيلومريز في (34) من أصل (43) عينة (80%) من عينات NHL (Brousset *et al.*, 1997).

درس Song وجماعته سنة 2000 فعالية إنزيم التيلومريز في عينات CML, وأستنتج زيادة واضحة في فعالية إنزيم التيلومريز عند مراحل التسرطن, مقترحاً بأن تنشيط إنزيم التيلومريز ربما يرتبط مع التحول إلى

CML كما أكدت هذه النتائج عند دراسة فعالية إنزيم التيلومريز لخلايا CLL (Counter *et al.*, 1995). كما تبين بان الخلايا المحيطية أحادية النواة تعبر لإنزيم التيلومريز ولكن بمستويات واطئة جداً, لكن هذه الفعالية تزداد 5 إلى 10 أضعاف حين الإصابة بسرطان CML, أي أن الخلية السرطانية المفردة تمتلك فعالية التيلومريز أعلى من تلك التي تمتلكها الخلية الطبيعية المنشطة (Engelhardt *et al*., 2000;Rithidech *et al.*, 2001; Januskiewicz *et al.*, 2003; Hohaus *et al.*, 1997). ولكن Igarashi و Sakaguchi سنة 1997 أكدا بأن خلايا B للمفاوية المأخوذة من الأشخاص الطبيعيين لا تعبر بمستويات قابلة للكشف عن فعالية أنزيم التيلومريز ألا باستحثاثها بوساطة الجسم المضاد. لكن حتى هذه الخلايا المستحثة لوحظ بان الخلايا السرطانية أكثر فعالية منها بمرتين على الأقل (Januskiewicz *et al*., 2003).



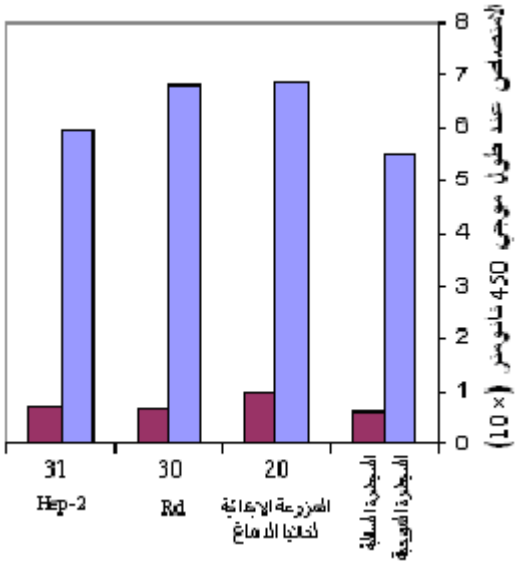
شكل (5): يوضح مستوى إنزيم التيلومريز في خلايا الدم المحيطي السرطانية .

ملاحظة: الأعمدة المضللة تبين العينات غير المعرضة للتثبيط/الأعمدة غير المضللة تبين العينات المعرضة للتثبيط.

تقدير فعالية إنزيم التيلومريز في خطوط الخلايا

قيست فعالية إنزيم التيلومريز في هذه الدراسة في اثنين من خطوط الخلايا السرطانية وهما خط Rd وخط Hep-2 , أما بالنسبة لعينة الثالثة فمثلت مزرعة خلايا ابتدائية للدماغ .وقد أبدت خطوط الخلايا Rd و Hep-2 أشارة موجبة لإنزيم التيلومريز كما في الشكل (6), وهذا يتوافق مع نتائج تقدير فعالية إنزيم التيلومريز في 18 من خطوط الخلايا من أنسجة الإنسان المختلفة والذي توصل إلى وجود فعالية لإنزيم التيلومريز في 98 من أصل 100 خط خلية خالد , وبالعكس لا يوجد هذا الإنزيم في 22 من أصل 22 من مزارع الخلايا اللاتكاثرية الجسمية كما في خلايا fibroblasts (Kim *et al.*, 1994). وفي بعض مستخلصات الأنسجة وخلايا الإنسان كشف إنزيم التيلومريز في 9 خطوط خلايا خالدة لسرطان المبيض ولم يكشف عنه في مزارع الخلايا الجسمية الطبيعية ولا في الأنسجة الطبيعية المجاورة للورم (Counter *et al.*, 1994; Morin, 1989; Prowse *et al.*, 1999). أفترض Counter وجماعته سنة 1992 بأن تنشيط إنزيم التيلومريز هو خطوه إجبارية في تخليد خلايا الإنسان, وبما أن أنزيم التيلومريز هو فعال في خطوط الخلايا الورمية فهنا برزت احتمالية مساهمة إنزيم التيلومريز في تكوين الورم كذلك. أظهرت مزرعة خلايا الدماغ الابتدائية في هذه الدراسة

فعالية موجبة لإنزيم التيلومريز وهي مازالت في التمريرة الرابعة, حيث تبين بوساطة فحص TRAP أمكانية الكشف عن فعالية لإنزيم التيلومريز حتى لو كانت خلية واحدة معبرة لهذا الإنزيم من مجموع مئة ألف خلية غير معبرة له(Kim *et al.*,1994) كما أشار Shay سنة 1999 باكتشاف فعالية لهذا الإنزيم في بعض المزارع الأولية. إن ظهور فعالية أنزيم التيلومريز في هذه المزرعة الأولية يشير إلى بداية ظهور خط خلية آخر في هذا القطر فضلاً عن خطي Rd و Hep-2 إن اكتساب الفعالية لهذا الإنزيم يعني الانتقال إلى حالة الخلود (Halm, 2003). يبدو بأن هنالك نقطتان تحددان فترة الحياة في خلايا المزرعة, فالتحول بجين مسرطن مثلاً خلوي كان أم فايروسي المصدر يمد من فترة حياة خلايا الإنسان إلى إن تصل إلى نقطة إيقاف النمو الأولى M1 (Hackett & Greider, 2002), ولكن هذه الخلايا المتحولة تدخل في النهاية بطور الأزمة. تهرب مستعمرات نادرة من ألازمة وتعيش بوساطة تنشيط إنزيم التيلومريز (Meyerson, 2000) وهذا ما حدث فعلاً في مزرعة خلايا الدماغ الأولية. وفقاً لذلك فأن إنزيم التيلومريز عبر في الخلايا الهالكة ما قبل الأزمة وتم تنشيطه في مستعمرات الخلايا المخلدة (Counter *et al.*,1992; Counter *et al.*,1994; Harley,1991).



شكل (6): يوضح مستوى إنزيم التيلومريز في خطوط الخلايا السرطانية الموجبة لإنزيم التيلومريز.

ملاحظة : الأعمدة الفاتحة اللون تبين العينات غير المعرضة للتثبيط / الأعمدة الغامقة اللون تبين العينات المعرضة للتثبيط

References

Albanell, J., Han, W., Mellado, B., Gunawardane, R., Seher, H. and Dmitrovsky, E. (1996). Telomerase Activity During Differentiation of Maturation-sensitive but Not Resistant Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 56: 1503-1508.

Albanell, J., Bosl, G.J., Reuter, V.E., Engelhardt, M., Franko, S., Moore, M.A. and Dmitrovsky, E. (1999). Telomerase Actrivity in Germ Cell Cancers and Mature Teratomas. *Journal of National Cancer Institute* 91: 1321- 1326.

Artandi, S. E. (2003). Complex roles for telomeres and telomerase in breast Carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 5: 37-41.

Bacchetti, S. (1996). Telomere Maintenance in Tumour Cells. *Cancer Surveys* 28: 197-216.

Bechter, O. D., Zou, Y., Shay, J. W. and Wright, W. E. (2003). Homologous Recombination in Human Telomerase-positive and ALT Cells Occurs with the Same Frequency. *EMBO Reports* 4:1138-1141.

Bechter, O. D., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2004). The Frequency of Homologous Recombination in Human ALT Cells. *Cell Cycle* 3: 547-549.

Belaire, C. D., Yeager, T. R., Lopez, P. M., and Reznikoff, C. A. (1997). Telomerase Activity, A Biomarker of Cell Proliferation, but not Malignant Transformation.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13677- 13682.

Bonney, R. C. (2000). Telomerase, The Immortality Enzyme and It's Role in Cancer. *European Clinical Laboratory Journal* 6:223-225.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Breslow, R. A., Shay, J.W., Gazdar, A. F., and Srivastava, S. (1997). Telomerase and Early Detection of Cancer. *Journal of National Cancer Institute.* 89: 618- 623.

Brousset, P., Al-Saati, T., Chaouche, N., Zenou, R., Schaifer, D., Chittal, S. and Delsol, G. (1997). Telomerase Activity in Reactive and Neoplastic Lymphoid Tissues, Infrequent Detection of Activity in Hodgkin's Disease. *Blood* 89:26-31.

Chen, X., Bonnefoi, H., Pelte, M., Lyautey, J., Ledderrey, C., Movarekhi, S., Schaeffer, P., Mulachy, H., Meyer, P., Stroun, M. and Anker, P. (2000). Telomerase RNA as a Detection Marker in the Serum of Breast Cancer Pateints. *Clinical Cancer Researchs* 6: 3827-3831.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeure, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. And Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921- 1929.

Counter, C. M., Hirte, H. W., Bacchetti, S. and Harley, C. B. (1994). Telomerase Activity in Human Ovarian Carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2900-2904.

Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B., Bacchetti, S. (1995). Telomerase Activity in Normal Leukocytes and in Hematologic Malignancies. *Blood* 85: 2315- 2320.

Counter, C. M., Hahn, W. C., Wei, W., Caddle, S. D., Beijersbergen, R. L., Landsdorp, P. M., Sedivy, J. M., and Weinberg, R. A. (1998). Dissociation Among In Vitro Telomerase Activity, Telomere Maintenance, and Cellular Immortilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14723- 14728.

Dahse, R., Fiedler, W., and Erust, G. (1997). Telomere and Telomerase, Biological and Clinical Importance. Clinical Chemistry 43: 708- 714.

DeLange, T. (1994). Activation of Telomerase in a Human Tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2882- 285.

Durusy, M. and Ozturk, K. (2001). Methods Used in Evaluating Telomerase Activity. *Turkish Journal of Medical Science* 31:381-384.

Engelhardt, M., Mackenzie, K., Drullinsky, P., Silver, R. T., and Moore, M. A. S. (2000). Telomerse Activity and Telomere Length in Acute and Chronic Leukemia Pre- and Post- *Ex Vivo* Culture. *Cancer Research* 60: 617- 610.

Granger, M. P., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002). Telomerase in Cancer and Aging. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology* 41: 29- 40.

Hackett, J. A., and Greider, C. W. (2002). Balancing Instability, Dual Roles for Telomerase and Telomere Dysfunction in Tumorigenesis. Oncogene 21: 619-626.

Halm, W. C. (2003). Role of Telomeres and Telomerase in Pathogenesis of Human *Cancer Journal of Clinical Oncology* 21: 2034- 2043.

Harley, C. B. (1991). Telomere Loss, Mitotic Clock or Genetic Bomb? *Mut. Res.* 256: 271-282.

Hohaus, S., Voso, M. T., Barbera, E. O., Carallo, S., Bellacosa, A., Rutella, S., Rumi, C., Genuardi, M., Neri, G., and Leone, G. (1997). Telomerase Activity in Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Haematologica* 82: 262- 268.

Igarashi, H., and Sakaguchi, N. (1997). Telomerase Activity Is Induced in Human Peripheral B-Lymphocytes by the Stimulation to Antigen Receptor. *Blood* 89: 1299- 1307.

Januskiewicz, D., Wysoki, J., Lewandowski, K., Pernak, M., Nowicka, K., Rembowska, J., and Nowak, J. (2003). Lack of Correlation between Telomerase Activity and Expression in Leukemia Cells International *Journal of Molecular Medicine* **12**: 935- 938.

Keith, W. N., Bilsland, A., Evans, T. R., and Glasspool, R. M. (2002). Telomerase Directed Molecular Therapeutics. *Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press* 22: 1462- 1487.

Kim, J. H., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. and Shay, J. W. (1994). Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* 266: 2011-2015.

Kim, J. H., Lee, G. E., Kim, J. C., Lee, G. H., and Chung, I. K. (2001). A Novel Telomere Elongation in an Adriamycin-resistant Stomach Cancer Cell Line with Decreased Telomerase Activity. *Molecules and Cells* 13: 228- 236.

Lundblad, V. and Wright, W. E. (1996). Telomere and Telomerase, A Simple Picture Becomes Complex. *Cell* 87: 369-375.

Meyerson, M. (2000). Role of Telomerase in Normal and Cancer Cells. *Journal of Clinical Oncology* 18: 2626- 2634.

Morin, G. B. (1989). The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme is a Ribonucleoprotein That Synthesizes TTAGGG Repeats. *Cell* 59: 521- 529.

Mueller, C., Riese, U., Kosmehl, H., Dahse, R., Claussen, U., and Ernst, G. (2002). Telomerase Activity in Microdissected Human Breast Cancer Tissues, Association with p53, p21 and Outcome. *International Journal of Oncology* 20: 385- 390.

Perrem, K., Colgin, L. M., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2001). Coexistence of Alternative Lengthening of Telomeres and Telomerase in hTERT – Transfected GM847 Cells. *Molecular and Cellular Biology* 21: 3862- 3862.

Perry, P. J., Norris, T. A., and Jenkins, T. C. (2002). Structural Selectivity of Tetraplex – Interactive Small Molecule Human Telomerase Inhibitors. *Yorkshire Cancer Research Laboratory of Drug Design, USA.*

Poremba, C., Shroyer, E., Frost, M., Diallo, R., Fogt, F., Schafer, K., Burger, H., Shroyer, A., Dockhorn, B. and Boecker, W. (1999). Telomerase is A Highly Sensitive and Specific Molecular Marker in Fine-needle Aspirates of Breast Lesions. *Journal of Clinical Oncology* 117:2020- 2026.

Reddel, R. R., Bryan, t. m. AND Murnane, J. P. (1995). Immortilized Cells with No Detectable Telomerase Activity. *EMBO Journal* 14: 4240- 4248.

Rithidech, K., Gordon, C. R., Cronkite, E. P. (2001). Telomerase Activity in Mouse Myeloid Leukemia Cells and in Cells from Normal Hematopoietic Systems Blood. *Cells, Molecules, Diseases* 27: 496-504.

Sedivy, J. M. (1998). Can ends justify the means?: Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9078-9081.

Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E. and Wright, W. E. (1995). Telomerase and Cancer: Diagnostics, Prognostics and Therapeutic Implications. *Human Molecular Genetics* 10: 677-685.

Shay, J. W., and Wright, W. E. (1998). Telomeres and Telomerase in The Regulation of Human Cellular Aging. *Human Molecular Genetics* 233: 10211-10222.

Shay, J. W. (1999). Toward Identifying A Cellular Determinant of Telomerase Repression. Journal of National Cancer Institute 91: 4-5.

Shay, J. W. and Bacchetti, S. (1997). A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *European Journal of Cancer* 33: 787-791.

Smith, S. (2000). Recombination, A Means to An End in Human Cells. *Nature Genetics* 26: 388- 389.

Song, G. Y., Qian, L. S., Ma, X. T., and Wu, K. F. (2000). Telomerase Obviously Activatedin The Accelerated Phase of Chronic Myeloid Leukemia. *Haematologica* 85: 1222- 1224.

Sun, W., Kang, K., Morita, I., Trosko, J. E., Chang, C. (1999). High Susceptibility of A Human Breast Epithelial Cell Type with Stem Cell Characteristics to Telomerase Activation and Immortilization. *Cancer Research* 59: 6118- 6123.

Tsujimura, A., Kawamura, N., Ichimura, T., Honda, K., Ishiko, O., and Ogita, S. (2002). Telomerase Activity in Needle Biopsied Uterine Myoma – like Tumors, Differential Diagnosis between Uterine Sarcomas and Leiomyomas. *International Journal of Oncology* 20: 361- 365.

Wei, Z., Yi-fu, S., Xing, X., Jian-yun, X., Qi, C. and Ming, S. (2000). Telomerase RNA and Telomerase Activity in Throphoblastic Tumors. *Journal of Zhejiang University Science* 1: 202-206.

Wu, W. J., Liu, L. T., Huang, C. N., Chang, L. L. (2000). The Clinical Implications of Telomerase Activity in Upper Tract Urothelial Cancer and Washings. *BJU International* 86: 675-685.

Yashima, K., Milchgrub, S., Gollahon, L., Maitra, A., Saboorian, M., Shay, J. W., and Gazdar, A. (1998). Telomerase Enzyme Activity and RNA Expression During the Multistage Pathogenesis of Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Researchs* 4: 229-234.