



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

دراسة الخصائص النسجية و الخلوية لخط خلايا سرطان الكبد

رسالة تقدمت بها الطالبة

هدى مؤيد عبد الرضا الموسوي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

و هي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة - علم الحيوان

بإشراف

أ.م.د سيناء جبوري البازي

أ.م.د أحمد مجيد الشمري

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿ قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا

مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِیْمُ

﴿ الْحَكِیْمُ

صَدَقَ اللّٰهُ الْعَلِیُّ الْعَظِیْمُ

(سورة البقرة: الآیة 32)

أقرار المقوم اللغوي

أشهد أنّ هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة الخصائص النسجية و الخلوية لخط خلايا سرطان الكبد) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ماورد فيها من اخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب والصحة في التعبير

التوقيع :

الاسم : د. وفاء عباس فياض

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم الإسلامية / قسم اللغة العربية / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2017

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (دراسة الخصائص النسجية و الخلوية لخط خلايا سرطان الكبد) المقدمة من قبل الطالبة (هدى مؤيد عبد الرضا) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان ، وبعد إجراء المناقشة العلمية بتاريخ 2017/5/21 وجد أنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز).

رئيسة لجنة المناقشة

التوقيع:

الاسم: د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2017

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. ندير عبد الكريم خضير

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: كلية الطب البيطري /

جامعة البصرة

التاريخ: / / 2017

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. عامر طالب توفيق

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: المركز العراقي لبحوث السرطان

والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

التاريخ: / / 2017

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

الاسم: د. أحمد مجيد حمزة

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: المركز العراقي لبحوث السرطان

والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

التاريخ: / / 2017

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

الاسم: د. سناء جبوري محمد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة /

جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2017

مصادقة عميد كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التوقيع:

الاسم: د. نجم عبدالحسين نجم

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / / 2017

الإهداء

إلى من رباني على حب العلم صغيراً ، إلى من ينافس الغيث في العطايا ، إلى النور الذي ينير لي درب النجاح ، إلى من علمني أن الأعمال الكبيرة لا تتم إلا بالصبر والعزيمة والإصرار.....

أبي

إلى من تتسابق الكلمات لتخرج معبرة عن مكنون ذاتها ، إلى من علمتني وعانت الصعاب لأصل إلى ما أنا فيه وعندما تكسوني الهموم أسبح في بحر حنانها ليخفف من ألامي.....

أمي

إلى توأم روحي ورفيقات دربي ، إلى الورود التي تفوح بعطر الطيب و الحنان، إلى من وقفن معي بقلوبهن وزرعن في نفسي زهور الأمل والعطاء.....

أخواتي

إلى سندي وقوتي وملاذي بعد الله ، إلى من أرى التفاؤل بعينهم والسعادة في ضحكاتهم ، إلى شعلة الذكاء والنور ، إلى رياحين حياتي.....

إخوتي

إلى من ترتسم صورهم في مخيلتي دائماً ، إلى من وقفوا معي وساندوني بكلمة أو موقف أو دعاء ، إلى كل من هممه أمري.....

أصدقائي و أحبتي

أهدي لهم ثمرةً جُهدِي المتواضع هذا

هدى

شكر و تقدير

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على أشرف الخلق والمرسلين الرسول الأمين وعلى آله الطيبين الطاهرين . يسرني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وإلى رئاسة وأساتذة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لي لإكمال دراستي.

وبطيب لي أن أتقدم بجزيل الشكر والإمتنان وبيبالغ التقدير والإحترام إلى أستاذي المشرف الدكتور احمد مجيد حمزة الذي وضع فكرة البحث و ساهم بإنجازها بتوفير كل المستلزمات المطلوبة للبحث فضلاً عن مسانדתه لي بتوجيهاته السديدة والتي كانت لي خير عون ، كما أتقدم بعظيم إمتناني و وافر الشكر و التقدير إلى من كانت لي الأخت قبل الأستاذة أستاذتي المشرفة الدكتورة سينا جوري محمد لإشرافها على هذا البحث و تقديمها الأراء القيمة ودعمها لي طيلة مدة بحثي ، لذا حقّ علي شكرهما لإقتراحهما مفردات خطة البحث وإشرافهما ودعمهما لي مقروناً بدعائي أن يوفقهما الله ويبسر لهما طريق العلم .

كما لا يسعني إلا أن أعبر عن جزيل شكري وفائق تقديري إلى المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية لما قدّمه لي من تسهيلات و دعم في مختلف الأصعدة من إدارة و موظفين على وقوفهم معي لإنجاز هذا العمل وأخص بالذكر قسم العلاج التجريبي كاملاً لتحملهم العبء الكبير في إنجاز هذا البحث وكذلك البيت الحيواني ومختبر الوراثة الطبية وبالخصوص الدكتورة آمال والست زينب لمساعدتهما لي في تجاربي الوراثة فجزاهم الله خير جزاء.

الحمد لله الذي وفقني وأغناني بفضله وسخر لي جمعاً من الخيرين ممن كانت رفقتهم عوناً لي ، وأتقدم ببالغ شكري في البدء لعائلتي الكريمة وبيت جدي الأعمام الذين تحملوا معي الكثير من أجل إنجاز هذا البحث ، وما قدموه لي من دعم مادي ومعنوي وعلى الوقت المسروق من راحتهم لأتمام مسيرتي ، فتقف الكلمات عاجزة عن شكرهم و الإمتنان لهم سائلة المولى عزّ وجل أن يعينني على ردّ معروفهم.

وأخيراً شكري يصل إلى كل من مدّ يد العون لي ولو بكلمة طيبه.... فألى جميع أحبتي وأصدقائي أتقدم بالشكر الجزيل وعذراً لمن نسيت...ومن الله التوفيق .

هدى

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	رقم البند
I - II	الخلاصة	
III - VI	قائمة المحتويات	
VII - VIII	قائمة الصور و المخططات	
IX	قائمة الجداول	
X - XI	قائمة المختصرات	
الفصل الأول		
1	المقدمة	1
الفصل الثاني		
3	إستعراض المراجع	2
3	الخلايا السرطانية	1-2
4	التركيب النسجي للكبد الطبيعي	2-2
7	سرطان الكبد	3-2
8	تصنيف أورام الكبد	1-3-2
8	الأورام الظهارية الكبدية	1-1-3-2
10	الأورام الوسيطة	2-1-3-2
10	الأورام المختلطة	3-1-3-2
10	عوامل خطر الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية	2-3-2
11	خطوط الخلايا السرطانية	4-2
12	خط سرطان الخلايا الكبدية HCAM	1-4-2
12	خط سرطان الغدد اللبنية AMN3	2-4-2
12	خط سرطان عنق الرحم HeLa	3-4-2
13	وظائف الكبد	5-2
13	الوظائف الكيمياحيوية لإنزيمات الكبد	1-5-2
14	المعلّقات الورمية للكبد	2-5-2
15	الدراسة الكيميانسجية المناعية لسرطان الخلايا الكبدية	6-2
16	الدراسة الوراثية الخلوية	7-2
الفصل الثالث		
18	مواد وطرائق العمل	3
18	المواد	1-3
18	الأجهزة و الأدوات المستعملة	1-1-3
20	المواد الكيمائية المستعملة	2-1-3
21	الأوساط الغذائية الزرعية المستعملة	3-1-3
21	العِدَد	4-1-3
22	البيادئات	5-1-3

23	المواد الكيميائية الخاصة بعمل تفاعل البلمرة المتسلسل	6-1-3
24	تصميم الدراسة	7-1-3
25	طرائق العمل	2-3
25	المحاليل المستعملة	1-2-3
25	محاليل زرع الخلايا	1-1-2-3
25	المضادات الحياتية	1-1-1-2-3
25	بيكاربونات الصوديوم	2-1-1-2-3
25	محلول دارى الفوسفات	3-1-1-2-3
25	مصل جنين البقر	4-1-1-2-3
25	التربسين	5-1-1-2-3
25	التربسين-فيرسين	6-1-1-2-3
26	الوسط الزرعى RPMI-164 مع 10% مصل جنين البقر	7-1-1-2-3
26	الوسط الزرعى الحافظ	8-1-1-2-3
26	محاليل المحافظة على درجة حموضة الوسط	9-1-1-2-3
26	هيدروكسيد الصوديوم	1-9-1-1-2-3
26	حامض الهيدروكلوريك	2-9-1-1-2-3
26	محاليل الصبغات	2-1-2-3
26	صبغة الهيماتوكسلين	1-2-1-2-3
27	صبغة الأيوسين	2-2-1-2-3
27	المكونات الخاصة بالدراسة الكيميانسجية المناعية	3-1-2-3
27	المصل العازل	1-3-1-2-3
27	الأجسام المضادة الأولية	2-3-1-2-3
27	الأجسام المضادة الثانوية المرتبطة بالبايوتين	3-3-1-2-3
27	الإنزيم الكاشف	4-3-1-2-3
27	مادة البيروكسيد	5-3-1-2-3
27	المحلول الدارى DAB buffer	6-3-1-2-3
28	المكونات الخاصة بالدراسة الوراثية بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل	4-1-2-3
28	مادة Master mix (2X)	1-4-1-2-3
28	مورثات Mouse and human GAPDH	2-4-1-2-3
28	المحلول الدارى TBE buffer	3-4-1-2-3
28	صبغة التحميل	4-4-1-2-3
28	صبغة بروميد الأثيديوم	5-4-1-2-3
28	هلام الاكاروز	6-4-1-2-3
28	سلم الحامض النووي	7-4-1-2-3
29	المكونات الخاصة بالدراسة الوراثية الخلوية	5-1-2-3

29	تحضير محلول التثبيت	1-5-1-2-3
29	تحضير صبغة كمزا	2-5-1-2-3
29	الزرع الخلوي	2-2-3
29	تخزين خط الخلايا في المختبر	1-2-2-3
29	الزرع الأولي لخلايا الكبد الطبيعية	2-2-2-3
30	الزرع الثانوي لخلايا سرطان الكبد	3-2-2-3
30	تنمية الخط الخلوي لسرطان الكبد	3-2-3
30	تصبيغ الهيماتوكسلين والايوسين	1-3-2-3
31	منحنى النمو ومعدل زمن التضاعف	2-3-2-3
31	قياس مستويات وظائف الكبد	4-2-3
32	الإختبارات الكيميائية لأنزيمات الكبد	1-4-2-3
32	إختبارات فعالية إنزيمات ALT, AST and GGT	1-1-4-2-3
32	إختبار فعالية إنزيم LDH	2-1-4-2-3
32	إختبار مستويات CRP	3-1-4-2-3
33	إختبارات المعلمات الورمية للكبد	2-4-2-3
33	إختبارات مستويات بروتينات AFP و CEA	1-2-4-2-3
33	إختبار مستوى بروتين CA19-9	2-2-4-2-3
33	الدراسة الكيميائية المناعية	5-2-3
34	الدراسة الوراثية الخلوية	6-2-3
34	حصاد الخلايا	1-6-2-3
35	التثبيت	2-6-2-3
35	تحضير السلايدات	3-6-2-3
36	الدراسة الوراثية لتفاعل البلمرة المتسلسل	7-2-3
36	إستخلاص جزيئة الحامض النووي (الذنى)	1-7-2-3
36	تحضير مزيج تفاعل PCR للمورث الهدف Mouse GAPDH	2-7-2-3
36	تحضير مزيج تفاعل PCR للمورث الهدف Human GAPDH	3-7-2-3
37	الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز	4-7-2-3
38	الحيوانات المختبرية	8-2-3
38	التحليل الإحصائي	9-2-3
الفصل الرابع		
39	النتائج والمناقشة	4
39	تنمية الخط الخلوي	1-4
39	الفحص المجهرى لخط خلايا سرطان الكبد	1-1-4
43	منحنى النمو ومعدل زمن التضاعف	2-1-4
46	وظائف الكبد	2-4
46	الوظائف الكيميائية لأنزيمات الكبد	1-2-4

48	مستويات بروتينات المعلمات الورمية للكبد	2-2-4
50	الدراسة الكيميائية المناعية لخط خلايا سرطان الكبد	3-4
53	الدراسة الوراثية الخلوية	4-4
57	الدراسة الوراثية لتفاعل البلمرة المتسلسل	5-4
الإستنتاجات والتوصيات		
60	الإستنتاجات	
60	التوصيات	
المصادر		
61	المصادر العربية	
61	المصادر الأجنبية	

قائمة الجداول

رقم الصفحة	الجدول	رقم الجدول
18	الأجهزة و الأدوات المختبرية	1-3
20	المواد الكيميائية	2-3
21	الأوساط الغذائية	3-3
21	العِدَد المستخدمة في هذه الدراسة	4-3
22	بادئات الدنى وتسلسل قواعدها النتروجينية وعددها المستخدمة في فحص Conventional PCR	5-3
23	المواد الكيميائية المستخدمة	6-3
36	مكونات مزيج تفاعل PCR للمورث Mouse GAPDH	7-3
37	مكونات مزيج تفاعل PCR للمورث Human GAPDH	8-3
37	الظروف الحرارية المثلى لمراحل PCR للمورثات Mouse GAPDH و Human GAPDH	9-3
46	الوظائف الكيمياحيوية لإنزيمات الكبد	1-4
49	وظائف المعلمات الورمية للكبد	2-4

قائمة الصور و المخططات

رقم الصفحة	الصور	رقم الصورة
4	مظهر أمامي ومظهر خلفي للكبد	1-2
5	تشريح فصيص الكبد	2-2
6	أنواع فصيصات الكبد الثلاث	3-2
7	الخلية الكبدية البرنكيميية Hepatocytes	4-2
17	الخريطة الكروموسومية للفأر الأبيض	5-2
38	فئران بيضاء سويسرية من سلالة Balb/c في البيت الحيواني للمركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية	6-2
40	خط خلايا سرطان الكبد HCAM ذات التمريرة الثامنة بعد 24 ساعة من الحضان داخل المختبر في الوسط الزرعى RPMI 10% FBS	1-4
41	خط خلايا سرطان الكبد HCAM ذات التمريرة الثامنة بعد 48 ساعة من الحضان داخل المختبر في الوسط الزرعى RPMI 10% FBS	2-4
42	خط خلايا سرطان الكبد HCAM ذات التمريرة الثامنة بعد 72 ساعة من الحضان داخل المختبر في الوسط الزرعى RPMI 10% FBS	3-4
51	(A) السيطرة السالبة للمستقبل GSTM1 في خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة الخامسة بقوى تكبير 400x ، (B) التعبير السالب للمستقبل GSTM1 في خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة نفسها بقوى تكبير 400x	4-4
51	(A) السيطرة السالبة للمستقبل GSTT1 في خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة الخامسة بقوى تكبير 400x ، (B) التعبير الضعيف الموجب للمستقبل GSTT1 في سايتوبلازم خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة نفسها بقوى تكبير 400x	5-4
52	السيطرة السالبة للمستقبل P53 لأنوية خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة الخامسة بقوى تكبير 400x ، (B) التعبير الموجب للمستقبل P53 لأنوية خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة نفسها بقوى تكبير 400x ، (C) السيطرة الموجبة للمستقبل P53 لأنوية خط خلايا سرطان عنق الرحم HeLa للتمريرة 30 بقوى تكبير 400x	6-4
54	العدد الطبيعي (40) لكروموسومات الخلايا الكبدية للفأر الأبيض السويسري	7-4
54	زيادة أعداد الكروموسومات إلى 155 و 83 كروموسوم في خلايا كبدية ورمية لخط الخلايا الورمي HCAM وبقوى تكبير 400x	8-4
55	التغيرات التركيبية في كروموسومات خلية ورمية لخط HCAM وبقوى تكبير 400x	9-4

55	التغيرات التركيبية في كروموسومات خلية ورمية لخط HCAM	10-4
58	تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي لخط الخلايا السرطانية AMN3 و HCAM	11-4
59	تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي لخط الخلايا السرطانية HeLa و HCAM	12-4
رقم الصفحة	المخططات	رقم المخطط
24	تصميم تجربة الدراسة	1-3
44	منحنى النمو لخط خلايا سرطان الكبد HCAM (10000 خلية/1مل)	1-4
44	منحنى النمو لخط خلايا سرطان الكبد HCAM (100000 خلية/1مل)	2-4

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ABEI	N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol
Abs.	Absorbance
AFB1	Aflatoxin B1
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALT	Alanine transaminase
AMN3	Ahmed-Mohammed-Nahi-2003 cell line
AST	Aspartate Aminotransferase
Biotinylated HRP	Biotinylated horseradish peroxidase
BDA	Bile Duct Adenoma
cHCC	Canine hepatocellular carcinoma
CA19-9	Carbohydrate antigen
CC	Cholangiocarcinoma
CEA	Carcinoembryonic antigen
CRP	C Reactive Protein
DMSO	Dimethyl sulphoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPX	Distyrene Plasticizer Xylene
D.W	Distill Water
D.D.W	Double Distill Water
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F	Forward
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GC content	Guanine-cytosine content
GGT	Gamma-glutamyl transferase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1
GSTT1	Glutathione S-transferase theta 1
H&E	Hematoxylin & eosin
HBV	Hepatitis B virus
HCA	Hepatocellular Adenoma
HCAM	Hepatic Cancer Ahmed Majeed
HCC	Hepatocellular Carcinoma
Hcl	Hydrochloric acid

Hepatitis C virus	HCV
Henrietta Lacks cell line	HeLa
Hypoxia inducible factor 1	HIF-1
Hepatoma cell line	HLE
human "hemochromatotic" cell line	Huh-7
Integrated DNA technologies	IDT
Immunohistochemistry	IHC
International unit	IU
Lactate dehydrogenase	LDH
Least significant difference	LSD
Metastatic adenocarcinoma	MA
Murine Double Minute 2	MDM2
Metastatic HCC	MHCC97
Minute	Min.
Number	No.
Phosphate Buffer Saline	PBS
Polymerase Chain Reaction	PCR
Population Doubling Time	PDT
Power of hydrogen	pH
Alexander hepatoma cell line	PLC/PRF/5
Reverse	R
Rough Endoplasmic Reticulum	RER
Rosswell Park Memorial Institute	RPMI
Smooth Endoplasmic Reticulum	SER
Tris-borate-EDTA	TBE
Temperature	Tm
United Arab Emirates	UAE
United Kingdom	UK
United States of America	USA
Very-Low-Density Lipoprotein	VLDL

الخلاصة

تم توصيف خط خلايا جديد لسرطان الكبد Haptic Cancer Ahmed Majeed (HCAM) ، إذ يعد هذا الخط أداة مفيدة في أبحاث سرطان الخلايا الكبدية. وتم إنشاء خط الخلايا السرطانية HCAM من الورم الكبدى الرئيسى للذكور السويسرية البيضاء المصابة إصابة تلقائية بسرطان الكبد HCC. وهدفت الدراسة الحالية إلى توصيف خط الخلايا السرطانية في تجارب مختلفة والتي تشمل الآتي:

دراسة مظهرية عن طريق تصبغ الخلايا بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين. وأخذت الخلايا صورة متعددة الأضلاع مشابهة للخلايا الطلائية في النمو داخل قارورة الزرع ، كما أظهر الفحص المجهرى إحتواء الخلايا على نواة مركزية ونويات متعددة ، ووضوح الفجوات في السائتوبلازم. بالإضافة إلى ذلك ، تم دراسة منحنين للنمو ولأعداد خلايا مختلفة (10,000 خلية/1 مل و 100,000 خلية/1 مل) وكان طور السكون متماثل لكلا المنحنين في 24 ساعة ، بينما الطور اللوغارتمى لهما يتراوح بين 24 ساعة إلى 144 ساعة ووصلت الخلايا بأعدادها المختلفة إلى طور الإنحدار عند 240 ساعة وهذا الوقت قيد الدراسة. وكذلك تم حساب زمن تضاعف المجتمع الخلوي إذ كان 54 ساعة لأعداد الخلايا 10,000 خلية/1 مل و 47 ساعة لأعداد الخلايا 100,000 خلية/1 مل.

وشملت الدراسة الفسيولوجية لتوصيف خط الخلايا الورمية HCAM للتمريرة الثامنة على قياس فعالية الإنزيمات الكبدية (Aspartate ، Alanine transaminase ، aminotransferase ، Gamma glutamyl transferase ، Lactic dehydrogenase و C-reactive protein) معنوياً ($P \leq 0.05$) وبوحدة قياس وحدة/لتر ومقارنتها بخلايا الكبد الطبيعية للأجنة والفئران البالغة الطبيعية. وتم العثور على قيم عالية معنوياً ($P \leq 0.05$) وبوحدة قياس وحدة/مل من المعلمات الورمية (Carcinoembryonic ، Alpha-fetoprotein ، Carbohydrate antigen و antigen الطبيعية).

وأجريت دراسة كيميائية مناعية للخلايا الورمية المنماة في شرائح الزرع النسيجي ، للكشف عن وجود بعض الإنزيمات المناعية المتمثلة بما يلي : الإنزيم Glutathione S- transferase Mu 1 (GSTM1) والذي أعطى نتيجة سلبية ، و Glutathione S- transferase theta 1 (GSTT1) الذي أعطى نتيجة إيجابية ضعيفة فضلا عن الكشف عن وجود بروتين P53 والذي أظهر نتيجة إيجابية واضحة.

وأظهرت الدراسة الوراثة الخلوية إنحرافات كروموسومية مع العديد من التغيرات العددية بين الخلايا السرطانية ، وكذلك وجود تغيرات هيكلية (مثل Metacentric chromosomes ، وتكسر في أذرع الكروموسومات و الطول غير الطبيعي للصبغيات) ، وهذه التغيرات أعطت الكروموسومات تسمية Marker chromosome.

وبينت الدراسة الوراثة لخلايا المزراعة بإستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي نتيجة إيجابية للمورث Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) الفأري

و سلبية للمورث GAPDH البشري. وينبغي أن يكون خط الخلية هذا مفيداً عند إختبار علاجات جديدة لسرطان الكبد.

الفصل الأول
المقدمة

Chapter One
Introduction

1- المقدمة Introduction

سرطان الكبد Liver cancer والمعروف أيضاً بسرطان الكبد الأولي هو نمو وإنتشار الخلايا الكبدية البرنكيميية Hepatocytes غير السليمة داخل الكبد ، إذ إن هذه الخلايا تفقد قدرتها على السيطرة على نموها وتتنمو بسرعة لخلق كمية كبيرة من الأنسجة الورمية ، وأن أكثر أنواع سرطانات الكبد شيوعاً هو سرطان الخلية الكبدية الخبيث Hepatocellular carcinoma (HCC) والذي يشكل حوالي 75 % من جميع سرطانات الكبد الأولية (Ahmed and Lobo, 2009).

ويعد سرطان الخلية الكبدية HCC ، خامس الأمراض الخبيثة شيوعاً في جميع أنحاء العالم (Yu, 2016) ، والنوع الخامس للوفيات بسبب السرطان من بين جميع أنواع السرطان في العراق (Mubarak *et al.*, 2009). ويختلف HCC حسب الموقع الجغرافي إذ يكون له تأثير مباشر على خصائص المرضى وعلى مسار المرض ، مما يجعله معقداً للغاية مع سوء التشخيص (Venook *et al.*, 2010) ، وأخذ سرطان الخلية الكبدية توزيعاً جغرافياً واضحاً في الصين ، إذ مثّل حوالي 50 % من الحالات وأكثر من 80 % من الحالات التي شُخصت في إفريقيا وشرق آسيا كانت بسبب التهاب الكبد الفيروسي البائي من النوع B (Jemal *et al.*, 2011 ; El-Serag and Rudolph, 2007).

وأن متوسط العمر للإصابة بهذا النوع من السرطان يظهر في الأشخاص الأكبر سناً ، إذ يصل ذروته في حوالي 70 عاماً من العمر ونادراً ما يحدث قبل سن 40 عاماً ، وأنه أكثر شيوعاً في الرجال بنسبة 2-4:1 مرات أعلى من المعدلات السائدة بين النساء وفي ذوي البشرة السوداء أكثر من البيضاء (Friedman and Keeffe, 2012). وتعد بداية تشخيص سرطان الخلية الكبدية عبارة عن عملية معقدة يمكن أن تشترك بها مؤثرات مختلفة لعدد من المسارات الجزيئية وكذلك التغيرات الجينية ، ويؤدي في نهاية المطاف إلى التحول الخبيث للخلايا الكبدية و تطور المرض (Monga, 2009).

وتوجد العديد من عوامل الخطورة للإصابة بسرطان HCC ، إذ يعد السبب الرئيسي لحدوث سرطان الخلية الكبدية في العالم هو التهاب الكبد الفيروسي البائي سواء من النوع C أو B ، ويشكّل حوالي 80 % من حالات سرطان الخلايا الكبدية (Arzumanyan *et al.*, 2013). وبالإضافة إلى ذلك ، هناك أسباب أخرى للإصابة مثل تليف الكبد وتشمّع الكبد وإدمان الكحول والتعرّض للأفلاتوكسين وبعض الظروف الوراثية مثل داء ترسب الأصبغة الدموية ، وبعض الإضطرابات الأيضية وغيرها من العوامل (Gomaa *et al.*, 2008). وإن ما يقرب من 70-90 % من المرضى لديهم خلفية ينشأ منها المرض: كوجود مرض كبدي مزمن أو يعانون من تليف كبدي ، أو يمتلكون عوامل تؤدي لتطور تليف الكبد كالعُدوى المزمنة بالتهاب الكبد الفيروسي البائي بنوعيه B و C و أمراض الكبد الكحولية ، و التهاب الكبد الدهني غير الكحولي (Poon *et al.*, 2009).

بشكل عام ، تعد خطوط الخلايا السرطانية أداة تجريبية مهمة في أبحاث السرطان ولها فائدة كبيرة كونها توفر إمدادات غير محدودة لأعداد خلايا متجانسة نسبياً ، والقدرة على الاستنساخ

الذاتي والتي يمكن توزيعها على نطاق واسع مختبرياً لتسهيل دراستها (Santhi *et al.*, 2014). ويعد أساس إستعمال خطوط الخلايا السرطانية الكبدية كإنموذج تجريبي هو أن هذه الخطوط تحتفظ تقريباً بصور الخلايا الطبيعية ، وكذلك تكتسب خطوط الخلايا السرطانية طفرات إضافية في الزرع النسيجي ، لذا من الضروري فهم الوراثة الخلوية للأورام. وأن خطوط خلايا سرطان الكبد HCC محدودة جداً إذ هناك فقط حوالي 30 خط خلوي متاح حتى الآن ، وأن تمثيل هذه الخطوط لسرطان الخلية الكبدية الأولي غير معروف ؛ لأن جميع الخطوط الخلوية تم إنشاؤها منذ عقود طويلة مما يحول دون المقارنة المباشرة لورم الخلية الكبدية الأساسي ، لهذا السبب فمن المهم جداً إنشاء خطوط خلايا سرطانية كبدية جديدة ووصفها للتحقق من صحة ما إذا كانت هذه الخطوط تمثل بصدق ورم الخلية الكبدية (Qiu *et al.*, 2016).

وجاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على خط خلايا سرطان الكبد HCAM ، وكيفية تنميته خارج جسم الكائن الحي *In vitro* ومعرفة خصائص هذا الخط . وعليه هدفت هذه الدراسة إلى :

1. دراسة نسجية لتوصيف خط خلايا سرطان الكبد HCAM المشتق من كبد فأر أبيض مصاب إصابة تلقائية بسرطان الخلايا الكبدية ، ومعرفة خصائصه عن طريق دراسة خلوية صورية للخلايا الورمية المزروعة في المختبر وكذلك دراسة منحنى النمو ومعدل زمن التضاعف للخلايا المزروعة.

2. دراسة وظائف الكبد لمعرفة تأثير سرطان الخلايا الكبدية على فعالية إنزيمات الكبد ومستوى المعلمات الورمية بالمقارنة مع الخلايا الكبدية الطبيعية البالغة والجنينية.

3. دراسة كيميائية مناعية Immunohistochemistry لأنزيمات مهمة مثل Glutathione S-transferase Mu1 (GSTM1) ، Glutathione S-transferase theta1 (GSTT1) وواحد من أهم البروتينات الكابحة للأورام P53.

4. دراسة وراثية خلوية لكروموسومات الخلايا الكبدية السرطانية للفأر الأبيض.

5. إثبات أن الخلايا المزروعة هي خلايا مشتقة من الفئران وغير ملوثة بخلايا بشرية عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي Conventional polymerase chain reaction.

الفصل الثاني
إستعراض المراجع

Chapter Two
Literature review

2- إستعراض المراجع Literature review

1-2 الخلايا السرطانية Cancer cells

النمو كمصطلح عام يشير إلى تغير في حجم الكتلة الخلوية ، وهو المنتج النهائي للعديد من التأثيرات المترابطة مثل التكاثر Proliferation ، والتمايز Differentiation ، وموت الخلية Cell death ، وإمدادات الدم Blood supply (Wilt, 2011).

وأن التكاثر الخلوي هو عملية نمو وإنقسام الخلية وهو ضروري للتطور وإصلاح الأنسجة في العضو متعدد الخلايا. وعلى الرغم من أن بعض الخلايا مثل خلايا البشرة في الجلد أو الخلايا المكونة للدم في نخاع العظمي تستمر في النمو والإنقسام طوال مدة حياة الكائنات الحية ، فإن معظم الخلايا في الأعضاء متعددة الخلايا البالغة لا يحصل فيها إنقسام ، وتكون في حالة ساكنة ومتميزة (William *et al.*, 2007). وأن الخلايا المتميزة هي تلك التي تتغير من نوع خلية إلى أخرى وتكون متخصصة في وظيفة محددة مثل خلايا عضلة القلب ، وعدم إنتظام التكاثر الخلوي يؤدي إلى تغير في نمو الخلية الطبيعية والتي تحولها إلى خلايا سرطانية ، إذ إن السرطان هو مرض سببه النمو غير المنضبط للخلايا ، والذي يتطلب العديد من التغييرات الخلوية التي تتولد وتنشأ عن طريق التوسع في أعداد الخلايا من خلية واحدة (Slack, 2007).

وتصنف الأورام وفقاً لسلوكها إلى أورام حميدة وخبيثة (Choe *et al.*, 2009) . وأن الأورام الحميدة Benign tumors تكون محددة بموقع معين وتنمو ببطء ولا تغزو الأنسجة المحيطة بها ولا تنتشر في أماكن أخرى في الجسم ، بينما الأورام الخبيثة Malignant tumors هي أورام غازية ، وعادة ما تنمو بسرعة ولا تنقيد بموقع وحدود معينة وتشبه الخلية الأم أو النسيج بدرجة أقل مما تفعل الأورام الحميدة (Merih and Aysegul, 2006). ومفهوم تطور مرض السرطان هو عملية متعددة الخطوات وتم إقتراحه أولاً من قبل Berenblum و Schubik في عام 1948 ودعم بدراسات لاحقة.

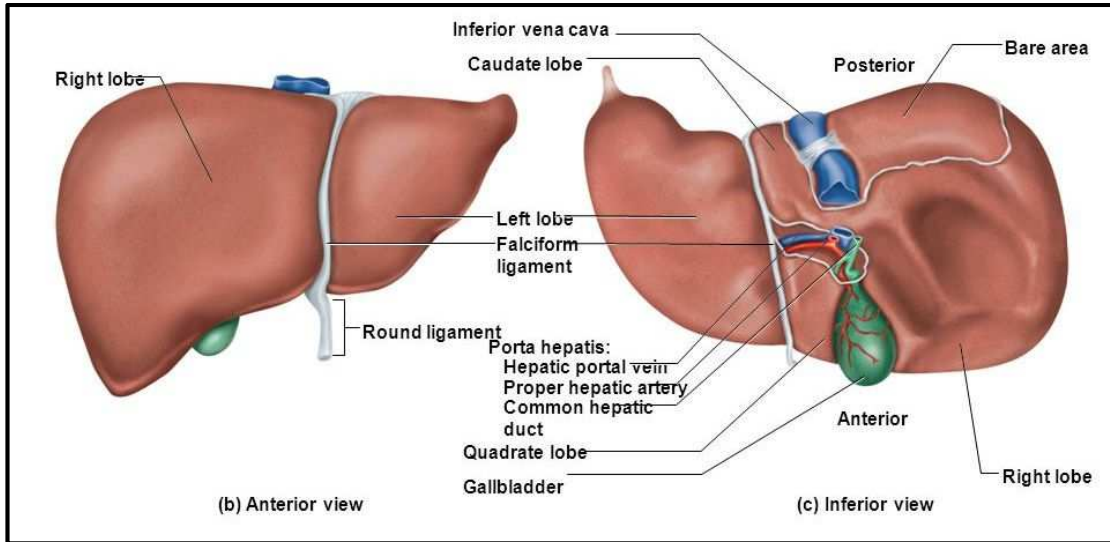
وتتكون عملية التسرطن Carcinogenesis من ثلاث خطوات رئيسية هي: الشروع Initiation ، إذ يؤثر تغيير لا رجعة فيه في الجينات الخلوية. الترقية Promotion ، إذ إن الخلايا تبدأ تتوسع عبر التكاثر الذاتي مما يؤدي إلى نمو غير طبيعي والمزيد من الطفرات. والخطوة الأخيرة الرئيسية هي التقدم Progression ، إذ يتم فصل الخلايا من الورم الرئيسي وتقوم بغزو الأعضاء والأنسجة الأخرى ، وتكوين الأورام النقيلية Metastatic growths (Oliveira *et al.*, 2007).

وتقع معظم أنواع السرطان في واحدة من ثلاث مجموعات رئيسية ، المجموعة الأولى هو الورم السرطاني Carcinoma ، المجموعة الثانية هو الورم الخبيث Sarcoma و المجموعة الثالثة هي سرطان الدم Leukemia أو سرطان اللمف Lymphoma (Gavhane *et al.*, 2011). وأن Carcinoma ، يشمل ما يقرب من 90% من حالات السرطان البشري ، وهو ورم سرطاني للخلايا الظهارية التي تبطن جميع أعضاء الجسم. أما Sarcoma ، يكون نادراً في البشر ، وهو ورم صلب للنسيج الضام ، مثل العضلات Muscles والعظام Bones والغضاريف Cartilages ، والأنسجة الليفية Fibrosarcoma والأنسجة

الدهنية Liposarcoma التي تنشأ من الخلايا الدهنية . وتمثل أورام Leukemia و Lymphoma حوالي 8 % من الأورام السرطانية ، إذ يصيب Leukemia الخلايا المكونة للدم ويصيب Lymphoma خلايا الجهاز المناعي (Taylor, 2000) ، وهناك أنواع أخرى من الأورام تنشأ من الجهاز العصبي مثل الأورام الموجودة في العين (ورم الشبكية Retinal tumor وورم الخلايا النجمية Astrocytes tumor) (Perry et al., 2013) .

2-2 التركيب النسيجي للكبد الطبيعي Histological structure of normal liver

الكبد هو عضو حيوي من ملحقات الجهاز الهضمي والذي يقع في الربع العلوي الأيمن من تجويف البطن مباشرة تحت الحجاب الحاجز ، إلى اليمين من المعدة ويغطي المرارة. وهو أكبر عضو داخلي وأكبر غدة في جسم الإنسان ويكون على هيئة مخروط بني محمر (Walker et al., 1990). ويزن كبد الإنسان البالغ عادة حوالي 1.5 كغم (Cotran et al., 2005). ينقسم الكبد تشريحياً من قبل أخاديد عميقة إلى أربعة فصوص غير متساوية الحجم: إثنان من الفصوص الكبيرة (الفص الأيمن والأيسر) وإثنين من الفصوص الصغيرة (الفص الذيلي الكبدي والفص المربعي الكبدي) (صورة 1-2) (Said, 2013).

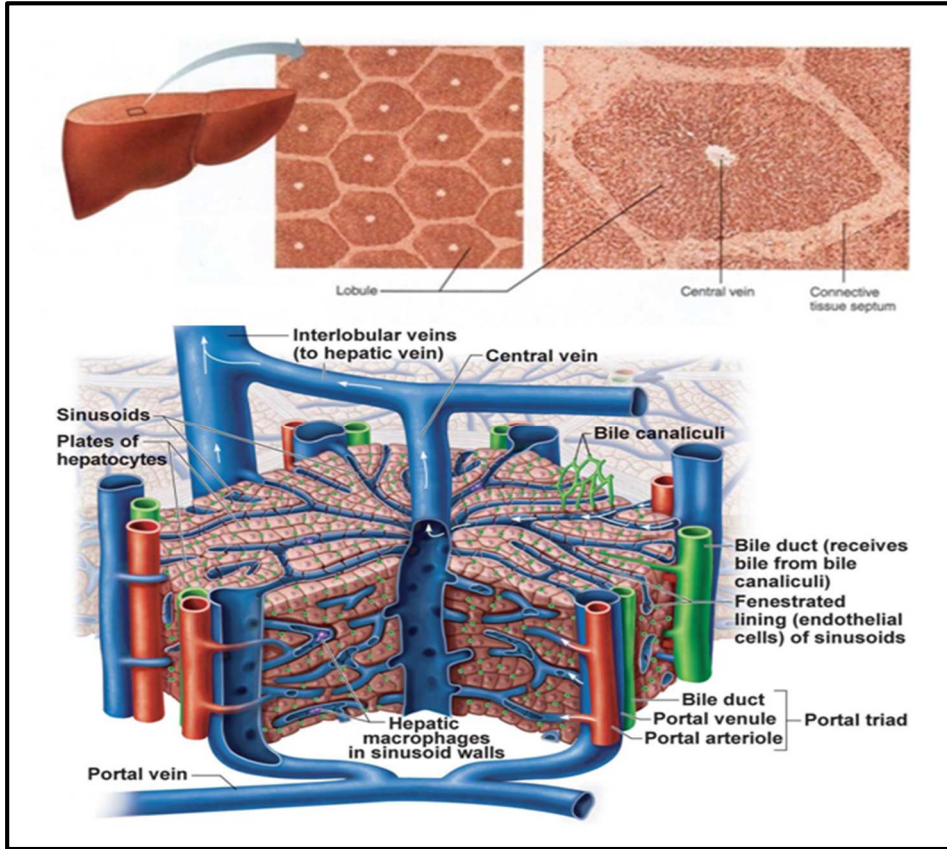


صورة (1-2) : مظهر أمامي ومظهر خلفي للكبد (McCarthy, Lecture Outline)

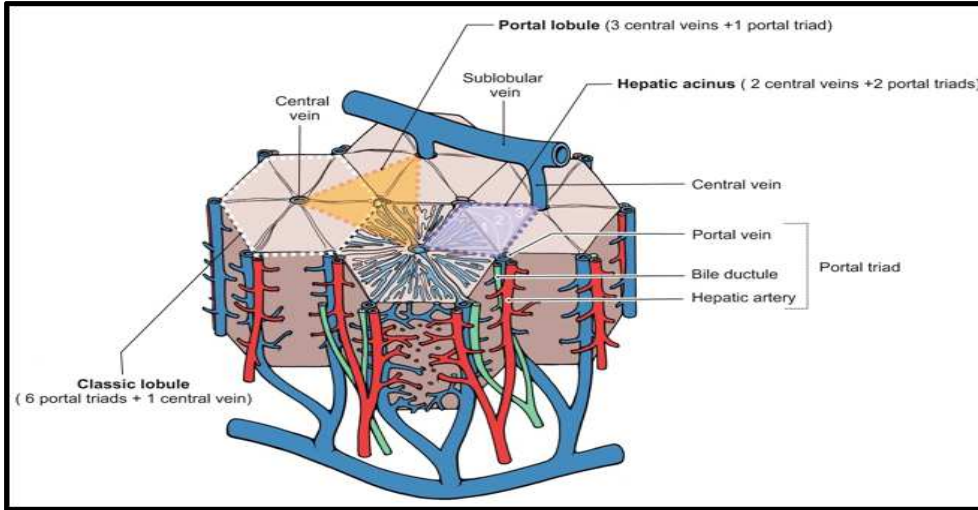
وأن الوحدة الهيكلية والوظيفية للكبد هي فصيصات الكبد Liver lobules ، إذ تظهر الفصيصات في المقاطع العرضية كمناطق متعددة الأضلاع (صورة 2-2). ويمر الوريد المركزي Central vein في وسط الفصيص ، وأن كل فصيص منها يحتوي على ملايين من الخلايا الكبدية البرنكيمية Hepatocytes والتي هي خلايا الأيض الأساسية إذ تتجمع هذه الخلايا بهيئة شرائط طويلة من الأنسجة لتكون لوحات الكبد Liver plates ، والتي تشع من المحيط نحو الوريد المركزي للفصيص (Kiernan, 1833). وتمر الشعيرات الدموية بين لوحات الكبد لتكوّن الجيوب الكبدية Liver sinusoids إذ إنّ هذه الشعيرات تزود خلايا الكبد بالدم من جانبيين على الأقل (Kuehnel, 2003). وتحمل الفصيصات عن طريق نسيج هلالى دقيق والذي يمتد إلى تركيب الكبد بواسطة القنوات والأعصاب المصاحبة للأوعية الدموية

(الأوردة والشرايين) من بوابة الكبد ، لتتكون كبسولة ليفية تدعى بكبسولة غليسون Glisson's capsule وهي التي تحمي الكبد (Dorland's, 2012).

وتوجد ثلاثة أنواع من فصيصات الكبد هي الفصيصات الكلاسيكية Classical lobules ، والفصيصات البابية Portal lobules ، وعنبيات الكبد Hepatic acinus. وتكون الفصيصات الكلاسيكية ذات هيئة منشور سداسي ذو قطر واحد ملم وطول 2 ملم ، وتكون محددة من قبل النسيج الضام بين الفصيصات وتحتوي في زواياها على القنوات البابية Portal triads والتي تصرف الدم إلى الوريد المركزي ، بينما الفصيصات البابية تزود بالدم وتستنزفه عن طريق القناة البابية. في حين إن عنبيات الكبد هي أصغر و أكثر المناطق الفقيرة بالأوكسجين في الأنواع الثلاثة إذ تستنزف وتزود بالدم عن طريق الفروع الطرفية لأوعية القناة البابية وليس القناة البابية نفسها (Slomianka, 2009) (صورة 2-3).



صورة (2-2) : تشريح فصيص الكبد (Marieb and Hoehn, 2012)



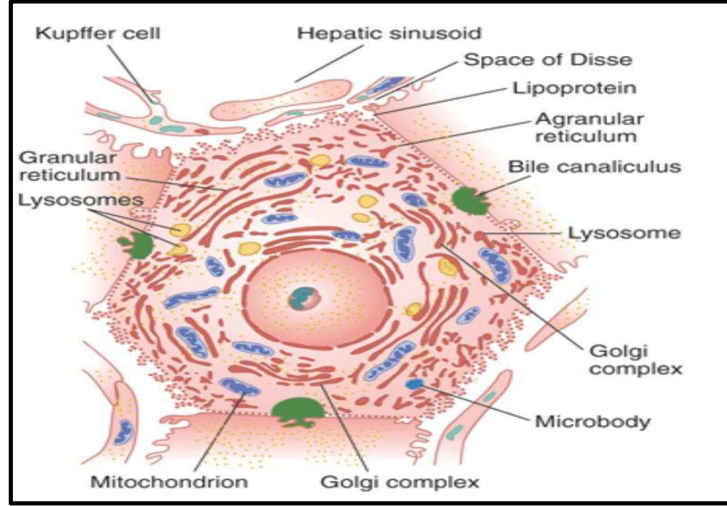
صورة (2-3): أنواع فصيصات الكبد الثلاث (Omar, 2012)

إن القناة البابية أو ما تسمى بباب الكبد Portal triad هي ترتيب مميز في الكبد ، وسميت بهذا الاسم لهيأتها الثلاثية والتي تتكون من ثلاثة أنابيب رئيسية : فروع الشريان الكبدي التي تحمل الدم المؤكسج إلى خلايا الكبد إذ تحصل العديد من الوظائف الأيضية ، وفروع الوريد البابي التي تحمل الدم مع المواد الغذائية من الأمعاء الدقيقة إلى الكبد ، وأخيرا القناة الصفراوية التي تحمل منتجات الصفراء بعيداً عن خلايا الكبد إلى القنوات الكبيرة والمرارة ، ثم يصرف الدم من الكبد عبر الوريد الكبدي مما يجعله يحمل معظم الدم غير المؤكسج إذ يغذي حوالي 75 % من الدم للكبد بينما يحصل الكبد على 25 % من الدم المؤكسج عن طريق الشريان الكبدي ، وأن أنسجة الكبد لا تحمل الدم بواسطة شبكة من الشعيرات الدموية كما هو الحال مع معظم الأجهزة الأخرى ، ولكنها تتكون من دم يملأ الجيوب المحيطة بالخلايا الكبدية (Said, 2013).

ويظهر نوعان رئيسيان من خلايا الكبد : خلايا برنكيمية Hepatocytes والتي تمثل 60-80 % من نسيج الكبد ، وما تبقى هي خلايا غير برنكيمية والتي تمثل 20-40 % من النسيج وهي: الخلايا البطانية Endothelial cells و خلايا كفر Kupffer cells اللتين يبطنان الجيوب الكبدية ، والخلايا اللمفاوية Lymphocytes الموجودة في التجويف الجيبي داخل الكبد ، والخلايا الصفراوية Biliary cells والخلايا النجمية الكبدية Hepatic stellate cells التي توجد في الفراغ بين البطانة الجيبيه وخلايا الكبد (Pocock and Richards, 2006). وتعد خلايا كفر خلايا بلعمية متخصصة توجد في الكبد وتبطن جدران جيب الكبد وتقوم بتصفية السموم الداخلة مع الدم وإبتلاع الحطام والكائنات الحية الدقيقة وتمثل حوالي 20 % من الخلايا غير البرنكيمية في الكبد (Mackay, 2002).

وأن خلايا الكبد البرنكيمية Hepatocytes (صورة 2-4) هي خلايا مكعبة متعددة السطوح تمتلك واحد أو اثنين من النوى كروية المظهر وذات موقع مركزي ، وتحتوي على واحد أو أكثر من الأنوية وكروماتين متناثر ، وذات سايتوبلازم حامضي يحتوي على حبيبات قاعدية التي تمثل الشبكة الإندوبلازمية الخشنة Rough endoplasmic reticulum (RER) والرايبوسومات وتحتوي على شبكة ناعمة وفيرة Smooth endoplasmic reticulum (SER) أكثر من باقي خلايا الجسم ، وعلى كثير من الميتوكوندريا Mitochondria ، والجسيمات الحالة

Lysosomes ، وجهاز كُولجي Golgi apparatus ، وحببيبات Lipofuscin البنية ، والكلايكوجين Glycogen ، وصبغة الحديد Iron pigment ، والنحاس Copper. وأن متوسط العمر الافتراضي للخلية الكبدية هو خمسة أشهر ، وهي قادرة على التجدد (Celton-Morizur *et al.*, 2010) Regeneration.



صورة (2-4) : الخلية الكبدية البرنكيميية Hepatocytes (Dino, 2013)

وللكبد عدة وظائف منها ؛ ما يكون متصلاً بالهضم والتمثيل الغذائي Digestive and metabolic functions ومنها ما يكون له مهام أخرى غير متصلة بالهضم Non-digestive functions. إذ يعمل الكبد على أيض الكربوهيدرات Carbohydrate metabolism عن طريق تكوين الكلايكوجين Glycogenesis وتكوين السكر Gluconeogenesis (Marieb and Hoehn, 2012). ويعمل أيضاً على أيض الدهون Lipid metabolism وإزالة السموم Detoxification ويقوم بتركيب وإفراز الصفراء Bile ويقوم بتخزين إحتياطي للحديد وتحويل الأمونيا إلى يوريا وتركيب الكولسترول وتخزين وتحويل العديد من الفيتامينات (A، D و K) ويعدل تركيب ووظيفة العديد من الهرمونات (الثايروكسين Thyroxine، وهرمون النمو Growth hormone، والإنسولين Insulin والكلوكاجون Glucagon) وبلعمة خلايا الدم الحمراء التالفة وتخزين الدم وتركيب عوامل التخثر وينتج معظم بروتينات البلازما المنتشرة في جهاز الدوران Protein synthesis (مثل الألبومينات Albumins ، والبروتينات السكرية Glycoproteins ، والبروتين الدهني منخفض الكثافة Very low-density Lipoprotein (VLDL) ، والبروثرومبين Prothrombin والفيبرينوجين Fibrinogen) (Rafferty *et al.*, 2016).

3-2 سرطان الكبد Liver cancer

إن سرطان الكبد هو سادس أكثر السرطانات إنتشاراً في العالم (World Cancer Report, 2014) . وأن نسبة الأصابة بسرطان الكبد في العراق تكون 6.02 % ، ويعد السبب الخامس للوفيات المرتبطة بالسرطان في العراق (Mubarak *et al.*, 2009). وهو السرطان الأكثر شيوعاً في الرجال عنه في النساء (Damjanov, 2009). وتحدث المعدلات العالية من سرطان الكبد لدى مرضى التهاب الكبد

الفيروسى الوبائى Viral hepatitis من النوعين B و C لأنه أكثر عوامل الخطر التى تتسبب عند تطورها بسرطان الكبد، كما فى شرق آسيا وجنوب الصحراء الكبرى فى أفريقيا (Jemal *et al.*, 2011). وكذلك المرضى الذين يعانون من تليف الكبد Cirrhosis هم الأكثر عرضة لخطر الإصابة بهذا المرض الخبيث أو بسبب إدمان الكحول Alcoholism (Bosetti *et al.*, 2014).

وفى العادة ، إن الخلايا فى الجسم تنمو وتنقسم لتحل محل الخلايا القديمة أو التالفة ، فعندما تنمو الخلايا الطبيعية وتحل محل القديمة فإنها ستتوقف عن الإنقسام. لكن تحدث الأورام عندما يكون هنالك خطأ فى هذا التنظيم أى خلل فى عملية النسخ Replication مثلاً فهذا يؤدي إلى إستمرار الخلايا فى النمو غير المنضبط ، بما فى ذلك خلايا الكبد البرنكيميية نفسها (Hepatocytes) ، أو خلايا القناة الصفراوية أو الأوعية الدموية داخل الكبد (Sakata *et al.*, 1996).

1-3-2 تصنيف أورام الكبد Classification of liver tumors

يمكن تصنيف أورام الكبد بصورة عامة تبعاً للنقاط الآتية: إما أن تكون أولية Primary أو إنتقالية Metastatic ، حميدة Benign أو خبيثة Malignant ، ذات طبيعة ظهارية Epithelial أو ذات طبيعة وسيطة Mesenchymal ، أورام مشتقة من خلايا الكبد Derived from hepatocytes أو من القنوات الصفراوية Derived from bile ducts ، أورام متكررة الحدوث Frequent tumors أو نادرة الحدوث Rare tumors وأورام مختلطة Mixed tumors ، وتساعد معرفة تصنيف أورام الكبد على التأكد من الأورام الأكثر شيوعاً ، وبعدها معرفة أكثر نوع مهم سريرياً (Head *et al.*, 2003). كذلك يمكن تصنيف أورام الكبد نسجياً إلى أورام ظهارية وأورام وسيطة وأورام مختلطة (Pack and Islami, 1970) ؛ على النحو الآتى:

1-1-3-2 الأورام الظهارية الكبدية Epithelial liver tumors

هى الأورام التى تشتق من الخلايا الظهارية Epithelial cells ، وتكون على قسمين (أورام حميدة وأورام خبيثة) ، إذ إن الأورام الظهارية الكبدية الحميدة Benign epithelial liver tumors عندما تشتق من خلايا الكبد فإنها سوف تدعى بالأورام الحميدة لخلية الكبد Hepatocellular adenoma (HCA) ، وتتميز بوجودها فى النساء بنسبة 90 % وإن أغلب المصابين بهذه الأورام يبلغون من العمر 20-39 سنة (Kanel and Korula, 2011). ويمكن أن تنشأ هذه الأورام من تلقاء نفسها أو فى بعض الأحيان يمكن أن تكون ذات صلة بأمراض أخرى مثل تخزين الجليكوجين أو مرض السكري. ويمكن لهذه الأورام أن تكون كبيرة جداً (5-20 سم). وفى معظم الحالات فإن 75 % منها تكون محاطة بغشاء رقيق جداً (Bosman *et al.*, 2010). وتتكون هذه الأورام من خلايا كبدية تترتب بهيأة حويجزات (ترايبق) Trabeculae رقيقة ، ويمكن تمييز الخلايا الورمية عن خلايا الكبد الطبيعية بأنها ذات حجم أكبر ، وفرط الانصبغ النووي ، ووجود نويات بارزة ، وغشاء يحيط بالورم ، وعدم إحتوائها على الثالث الحاوي على القنوات البابية (Kanel and Korula, 2011). وعندما يحصل تكاثر حميدي للخلايا الظهارية للقنوات الصفراوية البابية الموجودة تحت الغشاء الكبدى ،

ستدعى بهذه الحالة بالأورام الحميدة للقناة الصفراوية (BDA) Bile duct adenomas ، وغالباً ما تتواجد بوضع عرضي أثناء الجراحة أو أثناء تشريح جثة المريض (Johannesen *et al.*, 2014). وأن معظم هذه الأورام تكون صغيرة (أقل من 1 سم) و فردية تحت غشاء الكبد (Kanel and Korula, 2011).

ويمكن أن تنقسم الأورام الظهارية الكبدية الخبيثة Malignant epithelial liver tumors على قسمين حسب نوع النسيج التي نشأت منه ؛ إذ إن الورم عندما ينشأ من الخلايا البرنكيميائية الرئيسية المكونة للكبد Hepatocytes سيُدعى بسرطان الخلايا الكبدية Hepatocellular carcinoma (HCC) ، ويدعى أيضاً Hepatoma أو Hepatocarcinoma ، وهو الورم الخبيث الأولي الأكثر شيوعاً ؛ إذ يشكل 80-85 % من سرطانات الكبد الأولية ، ويظهر تمايز الخلايا الكبدية ويرتبط مع خصائص مختلفة مثل الطفرات الوراثية والالتهابات الفيروسية (Walther and Jain, 2011). وأن ورم HCC لا يعطي أعراضاً واضحة إلا في وقت متأخر من الإصابة (Kim *et al.*, 2016). وأن معدلات الإصابة بهذا النوع من الأورام تكون في الذكور أكثر من الإناث ، إذ وجد في العراق أن نسبة الإصابة في الذكور 1.79 لكل 100,000 شخص من السكان بينما في الإناث تكون 1.45 لكل 100,000 شخص لعام 2009 (Mubarak *et al.*, 2009). ويعد سرطان الخلايا الكبدية عملية معقدة لأنه يكون نتيجة لعوامل جزيئية متعددة منها الانحرافات والتغيرات الجينية والتعديلات في التعبير الجيني وغيرها من العوامل (Chappell *et al.*, 2016).

وسريرياً ، تظهر أعراض معينة عند نمو ورم HCC كآلم في الجانب الأيمن من البطن أو الشعور بالإملاء عند تناول الطعام ، وقد يكون لبعض المرضى تقاوم أعراض لمرض مزمن في الكبد أو تليف الكبد ، والتي غالباً ما تسبق الإصابة بسرطان الكبد . على سبيل المثال ، قد يشتكى المريض من فقدان الوزن غير المبرر ، وقلة الشهية ، وزيادة تورم القدمين والبطن ، وتورم الساقين ، وإصفرار العينين والجلد (اليرقان) (Czuderna and Perilongo, 2004). ويمكن تقييم عدد وحجم الكتل الورمية عن طريق إستعمال الموجات فوق الصوتية لفحص الورم أو عن طريق عمل خزعة لتأكيد الفحص (Badea and Ioanitescu, 2012). وعلى الرغم من أن الدعامة الأساسية لعلاج سرطان الخلايا الكبدية HCC هو الإستئصال الجراحي ، إلا أن الأغلبية العظمى من المرضى يكونون غير مؤهلين للإستئصال بسبب مدى الورم أو الخلل الوظيفي الأساسي في الكبد (Bruix and Llovet, 2002). وتتوفر العديد من طرق العلاج الأخرى مثل زرع الكبد في الأشخاص المتقدمين في العمر ، والإجنتاث بالموجات الدقيقة وحمض الخليك والإيثانول عن طريق الجلد ، وأن العلاج المعتمد الوحيد للمرضى ذوي الأمراض المتقدمة هو Sorafenib (Raza and Sood, 2014).

ومن الأورام الظهارية الخبيثة الأولية الأخرى في الكبد هو سرطان الأوعية الصفراوية Cholangiocarcinoma (CC) ، إذ ينشأ هذا النوع من الأورام من تحور وتمايز الخلايا الظهارية التي تبطن نظام القناة الصفراوية داخل الكبد أو خارجه والتي تنتهي في أمبولة فاتر (Banales *et al.*, 2016). ويمثل حوالي 15 % من سرطانات الكبد الأولية. وهو ورم نادر يصنف نسجياً على أنه غدي Adenocarcinomas (أي إنه ينشأ الغدد أو يفرز كميات كبيرة من mucins) (Patel, 2002). وأن غالبية هذه الأورام (حوالي 60-70 %) تظهر في المنطقة

المحيطة بالنقير Perihilar region في حين إن 25 % منها تنشأ في النظام القنوي القاصي Distal ductal system ، بينما 5-10 % من الأورام توجد في نظام الأقنية داخل الكبد (Amini and Gamblin, 2014). وعندما توجد هذه الأورام في نقطة التقاء الأقنية اليمنى واليسرى لتكوين القناة الصفراوية الجامعة ستسمى بسرطان الأوعية الصفراوية النقيري Klatskin tumors نسبة إلى مكتشفها الدكتور Gerald klatskin (Fenster,1979) ، وتحديث هذه الأورام في كبار السن (فوق سن ال65) مع معدلات علاج منخفضة (Amini and Gamblin, 2014).

2-1-3-2 الأورام الوسيطة Mesenchymal tumors

هي الأورام التي تشتق من أنسجة الأديم المتوسط Mesoderm tissues ، وتحتوي على أورام ليفية وعصبية ووعائية ودهنية ، وتكون حميدة أو خبيثة (Morgan, 2009).

3-1-3-2 الأورام المختلطة Mixed tumors

وتدعى هذه الأورام بالمختلطة لأنها تتكون من نوعين من الأورام وتكون نادرة الحدوث إذ تمثل أقل من 5 % من سرطانات الكبد الأولية (Murakami and Tsurusaki, 2014).

2-3-2 عوامل خطر الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية Risk factors of HCC

إن الإصابة بسرطان الخلية الكبدية ترتبط بتفاعل عدة عوامل خطر يتغير توزيعها بين مرضى HCC بدرجة كبيرة اعتمادا على المنطقة الجغرافية أو الجماعة العرقية ، وتكون هذه العوامل على النحو الآتي:

- تليف الكبد Cirrhosis: هو عامل خطر بيئي موجود في 70 % إلى 90 % من المصابين بسرطان الكبد الأولي HCC ، ويعد أكبر عامل خطر في تطوير هذا النوع من الأورام (El-Serag and Rudolph, 2007). ويحدث التليف نتيجة لندبة في الكبد لكن المسبب الأكثر شيوعا له هو تعاطي الكحول المزمن (إدمان الكحول Alcoholism) (Wei, 2014).
- العدوى المزمنة بالتهاب الكبد الفيروسي الوبائي من النوع Hepatitis B virus (HBV) أو من النوع Hepatitis C virus (HCV): إن العدوى المزمنة بهذه الفيروسات تمثل عامل خطر بيئي ، وإن HBV يمثل حوالي 50 % من جميع حالات سرطان الكبد ، وهو أحد مسببات تليف الكبد أيضا. وإن خطر الإصابة بالسرطان للمرضى الذين يعانون من HBV يزداد عند الذكور وكبار السن أو المتعرضين للإصابة بالعدوى لأوقات طويلة (Chen et al., 2009). ويمثل HCV المرتبط بتليف الكبد أحد أسباب حدوث سرطان الكبد ، مع حدوث سنوي ل HCC يقدر ب 2-8 % (Bruix and Sherman, 2011).
- التسمم بـ Aflatoxin B1 (AFB1) : وهو عبارة عن مادة سامة تنتجها الفطريات وتوجد في مصل مرضى HCC ، وإن التلوث الحاصل للمواد الغذائية مع هذه السموم قد يتطور إلى الإصابة بسرطان الكبد (Abdel-Wahab et al., 2008).

- إستهلاك الكحول Alcohol consumption: إن إدمان الكحول Alcoholism بصورة مفرطة يؤدي إلى خطر الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية وتليف الكبد أيضا ، لأنه يمكن أن يؤدي إلى امتصاص أقل لحمض الفوليك Folic acid (Persson et al., 2013).
- تدخين التبغ Tobacco: قد درست العلاقة بين التدخين وHCC على نطاق واسع ، لأنه عمل خطر مستمر ودائم (El-Zayadi, 2006).
- متلازمات الأيض Metabolic syndromes: مثل السمنة Obesity ، وداء السكري Diabetes mellitus والحديد الزائد Iron overload ، إذ وجدت دراستين أجريت على نطاق واسع في الولايات المتحدة الأمريكية ، أن متلازمات التمثيل الغذائي تزيد من خطر الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية (Borena et al., 2012; Welzel et al., 2011).

4-2 خطوط الخلايا السرطانية Tumor cell lines

تتطلب دراسة خطوط الخلايا السرطانية خارج جسم الكائن الحي *In vitro* توافر جميع المتطلبات الغذائية مع عوامل النمو Growth factor التي تساعدها على الإستمرار بالإنقسام و النمو كما لو كانت داخل الجسم الحي *In vivo* (Nyga et al., 2011). وأن نجاح دراسة الخطوط الورمية يخدم كثيرا في إكثار هذه الخطوط والتي تمثل أنظمة إختبارية جيدة ، لاسيما في مجال وصف الخلايا الكبدية السرطانية من عدة جوانب ، إذ تستعمل خطوط الخلايا المدروسة في المختبر على نطاق واسع في البحوث الطبية الحيوية لأنها تشبه عن كثب خصائص الورم الأصلي داخل جسم الكائن الحي (Cheung et al., 2014).

وأن أول خط ورمي كبدي تم زراعته هو خط الخلايا الكبدية البشري غير المتميز Hepatoma cell line (HLE) من قبل الباحث Doi وآخرين (1975) لمريض ياباني مصاب بسرطان الخلايا الكبدية HCC ، إذ إمتاز هذا الخط بعدم تمايز العوامل البايولوجية الموجودة داخل خلاياه ، وبعده تم إكتشاف العديد من الخطوط البشرية المتميزة للورم ومثال عليها خط الخلايا الكبدية البشري (داء ترسب الأصبغة الدموية) Human hemochromatotic cell line (Huh-7) (Huh-7) ، وتم إكتشافه من قبل الباحث Nakabayashi وآخرين (1982) عن طريق إجراء جراحة لورم سرطان الكبد HCC لذكر ياباني ويمتاز هذا الخط بالتمايز بواقع كبير إذ يمكنه إفراز 15 بروتين متنوع في البلازما ، وتمتاز خلاياه بإنها تستطيع النمو في وسط زرعي خالٍ من المصل أو في وسط كيميائي حاوي على كميات ضئيلة من السيلينيوم بدل المصل أكثر من قدرة نموها في وسط حاوي على المصل، على عكس الخطوط الكبدية البشرية الأخرى (Krelle et al., 2013). وقد تبين أن خلايا Huh-7 تفرز المادة الكيميائية Mitogen المشتقة من الكبد والتي تشجع الخلايا على بدء الانقسام مما يسمح لها بأن لا تعتمد على عوامل النمو الموجودة في مصل الدم (Everett et al., 2011).

ومن خطوط الخلايا الكبدية البشرية المتميزة الأخرى هو خط PLC/PRF/5 وسمي بأسم Alexander hepatoma cell line نسبة إلى مكتشفه الباحث Alexander وآخرين (1976)

والمشتق من نسيج ورمي مأخوذ من ذكر مريض مصاب بسرطان الكبد الاولي ذو عمر 24 سنة، إذ إن الفحص النسجي لهذا الخط بين وجود تليف في نسيج الكبد للمريض مع ميزات لخط الخلايا الورمية شبيهة بخلايا الكبد البشرية الطبيعية (Zaghloul *et al.* 2013). وتم إكتشاف الخط البشري Human hepatoma cell line (Hep 3B) من قبل الباحث Aden وآخرين (1979) ، عن طريق عمل خزعة لورم كبدي موجود في ذكر أسود من الولايات المتحدة الأمريكية ذو عمر 8 سنوات مصاب بسرطان HCC ، وأن هذا الخط متميز بوضع جيد ، وتنمو خلايا هذا الخط بصورة مستعمرة واحدة كبيرة.

وتعد النماذج الحيوانية أدوات حاسمة في دراسة سرطان الكبد ، بسبب التشابه الفسيولوجي والجيني بين القوارض والبشر والقدرة على التكاثر (Llovet *et al.*, 2003). وأن سرطان الخلايا الكبدية HCC نادراً ما يحدث بشكل عفوي في البشر ، على النقيض من سلالات معينة من الفئران التي لديها نسبة عالية من تشكيل الورم بشكل تلقائي (Diwan *et al.* 1986). وأن الفئران هي من أكثر السلالات الحيوانية التي يحصل فيها سرطان الكبد تلقائياً ، وقد وضعت هذه النماذج للحث على تشكيل سرطان الخلايا الكبدية (Lee, 2000). ومن خطوط الخلايا الكبدية السرطانية للفئران هما خط Hepa 1-clc7 وخط Hepa 1-6 واللذان يكون منشأهما من نسيج كبد الفأر C57L المصاب إصابة تلقائية بسرطان الكبد Hepatoma BW7756 (Lacoste *et al.*, 2017). وكذلك خط سرطان الخلايا الكبدية H22 الناشئ من الفأر BALB/c المصاب تلقائياً بالورم (Zhao *et al.*, 2014).

1-4-2 خط سرطان الخلايا الكبدية Hepatic Cancer Ahmed Majeed cell line (HCAM)

تم إكتشاف و زراعة هذا الخط من قبل الأستاذ المساعد الدكتور أحمد مجيد الشمري لعام 2014 في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، والمأخوذ من ورم كبدي لذكر فأر أبيض مصاب إصابة تلقائية بسرطان الخلايا الكبدية Spontaneous hepatocellular carcinoma ، والمزروع مختبرياً داخل الوسط الزرع RPMI 10% FBS والذي يصل إلى أكثر من 60 تمريرة.

2-4-2 خط سرطان الغدد اللبنية Ahmed-Mohammed-Nahi-2003 cell line (AMN3)

تم إكتشاف هذا الخط من قبل الباحث Al-Shammary (2003) في المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية ، والمأخوذ من ورم الغدد اللبنية لفأرة أنثى مسنة مصابة تلقائياً بسرطان الغدد اللبنية Spontaneous mammary adenocarcinoma ، والمزروع مختبرياً داخل الوسط الزرع RPMI 10% FBS والذي يصل إلى 122 تمريرة.

3-4-2 خط سرطان عنق الرحم (HeLa) Henrietta Lacks cell line

تم إكتشاف هذا الخط من قبل الباحث George Otto Gey بالقرب من بالتيمور في ولاية ميريلاند الأمريكية وفي عام 1951 ، والمأخوذ من ورم عنق الرحم لأمرأة من الطبقة العاملة

مصابة تلقائياً بسرطان عنق الرحم Cervical cancer ، والمزروع مختبرياً داخل وسط زرعى RPMI 10% FBS (Hyman and Simons, 2011).

5-2 وظائف الكبد Liver functions

1-5-2 الوظائف الكيمياحيوية لإنزيمات الكبد Biochemical functions of liver enzymes

تُعرف الإنزيمات على أنها بروتينات موجودة في الجسم تعمل على تسريع بعض التفاعلات الكيمائية وهي مواد عضوية لا تتواجد بالكبد فحسب ، وإنما في العضلات والقلب والهيكلي العظمي وخلايا الدم الحمراء (Stryer *et al.*, 2002). وأن ارتفاع إنزيمات الكبد تشير إلى وجود التهاب أو تلف في خلايا الكبد ، إذ إن خلايا الكبد الملتهبة أو المصابة تعمل على تسريب كميات من إنزيمات الكبد في مجرى الدم أعلى من الطبيعي ، مما يؤدي إلى ارتفاع مستوى فعالية إنزيمات الكبد في فحوصات الدم (Lee *et al.*, 2012). وأثبتت بعض الدراسات وجود ارتباط بين ارتفاع مستويات الإنزيمات وزيادة عدوانية HCC من حيث قطر الورم ، وغزو الورم لباب الكبد ، وتعدد بؤر الورم ومستويات البروتينات المصلية في الكبد (Carr and Guerra, 2016).

ومن الأنزيمات الموجودة في الكبد هو إنزيم Alanine transaminase (ALT) ، والذي يتم إنتاجه في الخلايا الكبدية Hepatocytes ويستعمله الجسم لأيض البروتين ، وقد يحدث ارتفاع له مع إستعمال بعض الأدوية أو في أوقات ممارسة التمارين الرياضية (Hall and Cash, 2012) . ويقوم بتحفيز نقل مجموعة أمين من Alanine (ليتمثل إلى pyruvate) إلى 2-Oxoglutarate (ليقوم بتمثيل Glutamate) ، وهو إنزيم أساسي في إستحداث السكر Gluconeogenesis ويتواجد في بلازما الخلايا الكبدية (Qian *et al.*, 2015).

ومن الأنزيمات الأخرى الشائعة في الكبد هو إنزيم Aspartate aminotransferase (AST) ، ويزداد إطلاقه إلى مجرى الدم في حالة وجود تلف في نسيج الكبد (Fischbach and Dunning, 2009) . وأن مستويات المصل لهذا الإنزيم توازي مدى الضرر الحاصل لنسيج الكبد لذا يتم إختباره لمراقبة وظائف الكبد في حال فشل الكبد وسرطان الخلايا الكبدية (Wei *et al.*, 2014). ويقوم بتحفيز نقل عكسي لمجموعة أمين من Glutamate إلى Oxaloacetate ، في حين يتم إستبدال مجموعة أمينية من Glutamate بمجموعة كاربونيل Carbonyl group (Thapa and Walia, 2007). وبعد ALT الإنزيم الأكثر ارتباطاً بالكبد في حين يكون القلب هو المصدر الأساس لإنزيم AST. ويعمل كلا الأنزيمين على توليد حوامض Pyruvic و Oxalacetic على التوالي والتي تساهم في دورة حامض الستريك (Huang *et al.*, 2006) ، أي بمعنى أن ALT و AST يعملون على هدم وتكسير الأحماض الأمينية والسماح لهم بالدخول إلى دورة حمض الستريك ، وأن المستويات الطبيعية من ALT و AST تختلف قليلاً اعتماداً على مصدر القيم المختبرية الفردية (Giannini *et al.*, 2005).

وأن الإنزيم الثالث الشائع في الكبد هو إنزيم Gamma glutamyl transferase (GGT) إذ يوجد في أغشية خلايا العديد من الأنسجة بصورة رئيسية في الكبد والكلية والبنكرياس. وأن أعلى تركيز له في الكلية لكن يعتبر الكبد مصدراً لنشاط الإنزيم الطبيعي ، وأن مستوى هذا الإنزيم هو 0-30 وحدة/لتر ، وأثبتت معظم الدراسات أن الذكور والإناث لديهم مستويات متساوية من هذا الإنزيم (Ghadban and Staros, 2013). وأن GGT له أثر هام في المساعدة على أيض الأدوية في الكبد والسموم الأخرى ، وأن مستوياته المرتفعة في الدم تظهر عادة عند تلف الكبد ، كما يتم التنبؤ بمخاطر HCC لدى مرضى التهاب الكبد الفايروسي الوبائي HBV عند وجود إنزيم GGT في المصل (Hann *et al.*, 2012).

ويعد إنزيم Lactic dehydrogenase (LDH) Lactate dehydrogenase الحالة للسكر Glycolytic enzyme علامة غير مباشرة للكشف عن وجود الورم ونقص الأكسجة للورم Tumor hypoxia ، إذ يتكون من أربع سلاسل متعددة الببتيد وكل سلسلة منها تشفر بواسطة جين منفصل ، وإن عمل هذا الإنزيم الرئيسي هو تحويل البيروفات Pyruvate إلى اللاكتات Lactate في الظروف اللاهوائية (Scartozzi *et al.*, 2012). وأن حدوث ورم الخلايا الكبدية سيعمل على تنشيط غير طبيعي لعامل نقص الأكسجة 1 Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) ، وبعدها سوف يؤثر هذا العامل على مستويات ال LDH (Sadri and Zhang, 2013).

ومن المواد التشخيصية الأخرى للكشف عن وجود سرطان الكبد هو C-reactive protein (CRP) ، إذ يكون عبارة عن بروتين ذو تركيب ببتيدي يرتبط مع مجموعة متنوعة من الروابط الخارجية والداخلية للخلاية الكبدية (Franc, 2013). وينتج فقط في الخلايا الكبدية Hepatocytes إذ تزداد مستوياته مئات الأضعاف إستجابة للعدوى والالتهاب الكبدي بوضع عام وسرطان الخلايا الكبدية بوضع خاص (Pepys and Hirschfield, 2003). ويعد إفراز CRP إلى الدم المحيط بالكبد جزء من نظام المناعة الفطري لأن له أثراً مهماً كمنظم جزئي ناقل (Zheng *et al.*, 2013).

2-5-2-2 المعلامات الورمية للكبد Liver tumor markers

وفقاً للمعهد الوطني للسرطان ، أن المعلامات الورمية المناعية هي جزيئات بيولوجية موجودة في الدم وسوائل الجسم الأخرى أو الأنسجة ، والتي تكون نتيجة لعملية طبيعية أو غير طبيعية (Lynn and Daniel, 2012) ، وأن معظم معلامات الورم هي بروتينات سكرية بيوكيميائية قابلة للقياس ، ويمكن أن تكون بمثابة أداة مفيدة لتشخيص أنواع مختلفة من السرطان وكذلك لتوجيه علاج أكثر تحديداً (Malati, 2007). ويتم تشخيص سرطان الكبد عادة بإستعمال العلامة المصلية الفا فيتوبروتين (AFP) Alpha-fetoprotein وغيرها من المعلامات مثل (CEA) Carcinoembryonic antigen و (CA19-9) Carbohydrate antigen (Zhao *et al.*, 2013).

يعد AFP بروتين سكري ينتج بوضع طبيعي أثناء الحمل من كبد الجنين وكيس الصفار ، يتكون من 591 من الأحماض الأمينية و 4 % من بقايا الكربوهيدرات ، ويشفر عن طريق الجينات الموجودة على الكروموسوم 4q11-q13 (Wong *et al.*, 2013). وهو علامة مصلية

تزداد مستوياته في المصل بواقع ملحوظ في مرضى HCC ، ويعد مؤشر ورمي قياسي ذهبي لـ HCC وأول إختبار للكشف السريري ومتابعة المرضى (Negahdary *et al.*, 2015).

وأنَّ CEA بروتين موجود بوضع طبيعي في أنسجة الجهاز الهضمي للجنين في الرحم أثناء التطور الجنيني ولكن يتوقف الإنتاج قبل الولادة ، وأن مستويات هذا البروتين في الدم تختفي أو تصبح منخفضة جدا بعد الولادة ، وفي البالغين قد يكون هناك مستوى غير طبيعي لل CEA دليل لوجود السرطان (Franklin *et al.*, 2014). وأن وظيفة هذا المستضد بأنه مجموعة من البروتينات السكرية مرتبطة بحالة وثيقة وتشارك بالتصاق الخلية ويوجد بمستويات منخفضة في دم الأصحاء لكن ترتفع مستوياته عن المصابين بالسرطان كعلامة للورم (Boehm and Perkins, 2000).

وأنَّ CA19-9 عبارة عن بروتين سكري موجود بكميات صغيرة جدا على سطح خلايا سرطانية معينة (Fischbach and Dunning, 2015). وقد يوجد بكميات ضئيلة في البنكرياس والكبد والمرارة والرئتين في البالغين الأصحاء ويزداد عند البالغين المصابين بالسرطان ، وقد يكون موجوداً في دم الاصحاء والمصابين بأورام حميدة وخبيثة بمستويات مرتفعة (Wu *et al.*, 2013).

6-2 الدراسة الكيميانسجية المناعية لسرطان الخلايا الكبدية Immunohistochemistry for HCC

إن صبغة Hematoxylin & eosin وحدها لاتعطي معلومات كافية لتشخيص أورام الكبد نهائياً ؛ لذلك تم إعتقاد دراسات إضافية ومنها الدراسات الكيميانسجية المناعية Immunohistochemistry (IHC) ، والتي لها أثر حاسم في التمييز بين الأورام الكبدية المختلفة عن طريق دراسة المستقبلات المناعية Immunohistochemical markers (Chan and Yeh, 2010). كذلك إهتم العديد من الباحثين في دراسة البيئة المناعية داخل الخلايا الكبدية الورمية إذ أثبتوا أن لها صلة بالعوامل الإلتهابية ومستقبلاتها (Zhang *et al.*, 2011).

وتستعمل تقنية IHC لتشخيص أورام الكبد وتسهيل دقة تصنيف الورم (Krasinskas and Goldsmith, 2014). وهناك نوعان من الأهداف العملية: الأول هو تأكيد تشخيص الورم عن طريق التعرف على أكثر الأنسجة والأعضاء المسؤولة عن منشأ حالات السرطان الإبتدائية أو الإنتقالية (Bellizzi, 2013). والهدف الآخر هو لتوفير المعلومات التنبؤية الهادفة للعلاج بالأدوية الكيمائية (Hechtman and Polydorides, 2012). وأن من الصعب التفريق بين سرطان الخلايا الكبدية (HCC) والسرطان الغدي الإنتقالي Metastatic adenocarcinoma (MA) ، فلذلك تم إستعمال تقنية IHC كوسيلة قوية لتوطين مستضدات معينة في الأنسجة المثبتة بالفورمالين مع البارافين ، إعتقاداً على التفاعل الحاصل بين المستضد (المستقبل) antigen والجسم المضاد antibody في الخلايا الكبدية. وتستمر تطبيقاتها بسبب سهولة إستعمالها وموثوقيتها وبراعتها (Schachtm and Kern, 2015).

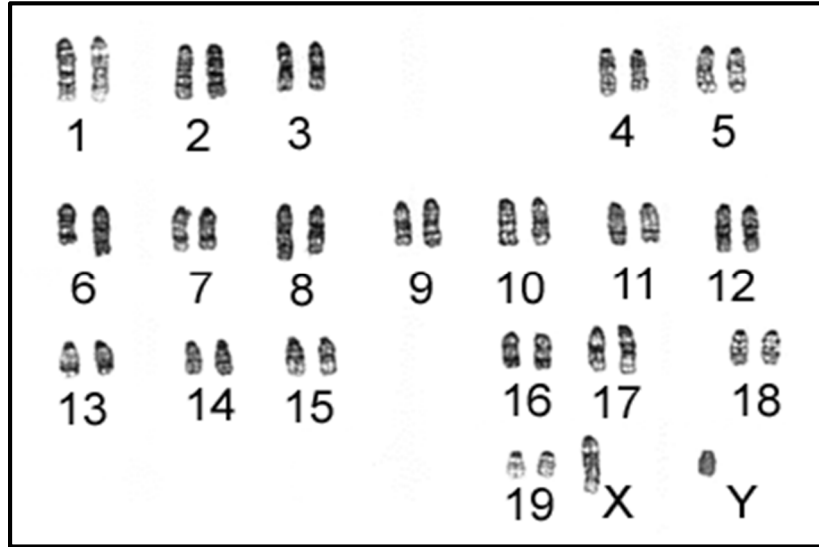
وأن المرحلة الرئيسية للتخلص من السموم هي عن طريق مجموعة إنزيمات عائلة Glutathione-S-transferase (GST) ، إذ تعد أفراد هذه العائلة مرشحات مهمة للمشاركة في إحداث صور الورم ، لأنها يمكن أن تنظم قدرة الفرد على أيض المواد المسرطنة البيئية و تشارك في إزالة سموم المواد المسببة للسرطان ، وإن فعالية أو مستوى إنزيمات GST الطبيعية أو الزائدة يحمي الأنسجة الحساسة من الطفرات الجسمية للحامض النووي عن طريق التخلص من المواد المسرطنة المحبة للماء الموجودة على غشاء الخلايا الكبدية السرطانية (Li *et al.*, 2000) ، كذلك تعمل على تسهيل وتحفيز إقتران الجلوتاثيون ثلاثي الببتيد (GSH) Glutathione مع مجموعة واسعة من المواد المحبة للماء في غشاء الخلايا الكبدية لغرض إزالة السموم (Emma and Pierre, 2014) ، وتوجد إنزيمات هذه العائلة في العصارة الخلوية ، والميتوكوندريا (Sherratt *et al.*, 2002). ومن الإنزيمات المهمة والموجودة في العصارة الخلوية الكبدية هما إنزيمي Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1) و Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) اللذان يلعبان دوراً هاماً في المرحلة الثانية من التحول الأحيائي (Kirk *et al.*, 2005).

يعد إنزيم GSTM1 عبارة عن بروتين مرتبط بغشاء الخلايا الكبدية وله أثر حاسم في إزالة سموم الأدوية والمواد المسرطنة البيئية وله أثر مهم في الكشف عن سرطان الخلايا الكبدية ، وأن نقص هذا الإنزيم يضعف من عملية التخلص الأيضي من المركبات المسرطنة في الجسم ، وبعدها يزيد خطر الإصابة بالسرطان (Wu *et al.*, 2011) . والنوع الآخر من المستقبلات المرتبطة بخطر الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية هو إنزيم GSTT1 ، إذ يرتبط بغشاء الخلايا الكبدية و يتكون من 240 حامض أميني (Sui *et al.*, 2014).

ومن البروتينات الأخرى التي ترتبط بسرطان الخلايا الكبدية هو البروتين الكابح للأورام P53 ، إذ إنه يشترك في عملية إصلاح جزيئة الـ DNA (El Azm *et al.*, 2013) ، ويعمل بروتين P53 أيضاً على قمع الورم السرطاني عن طريق إيقاف دورة الخلايا ، وموت الخلايا المبرمج ، وشيخوخة الخلايا الكبدية (Muller and Vousden, 2013). ويعمل كذلك عمل منظم إيجابي لتخليق بروتين Cytochrome C oxidase 2 الذي يكون مطلوباً لتركيب إنزيم الفسفرة التأكسدية وينظم سلبياً إنزيم Phosphoglycerate mutase والذي يعد إنزيماً رئيسياً حالاً للسكر (Kondoh *et al.*, 2005).

7-2 الدراسة الوراثية الخلوية Cytogenetic study

تعد الخريطة الكروموسومية أو النمط النووي Karyotype العلامة الأساسية لعدد ومظهر الكروموسومات في نواة الخلية حقيقية النواة ، وتختلف حسب أنواع الكائنات الحية (O'Connor, 2008). إذ إن النمط النووي للفأر المختبري العادي يتكون من 40 كروموسوم ، وأن جميع كروموسومات الفئران البيضاء المختبرية تكون من نوع Acrocentric ، وتحتوي على 19 زوج من الصبغيات الجسمية وعلى زوج من الصبغيات الجنسية (X و Y) (Guénet *et al.*, 2015) كما في صورة (2-5).



صورة (2-5): الخريطة الكروموسومية للفأر الأبيض (Rambau and Robinson, 2003)

ويعتقد بأن تطور السرطان يأتي من تراكم الإنحرافات الجينية المتعددة ، وهذه الإنحرافات تتراوح بصورة عامة بين طفرات نووية مفردة لأعداد الكروموسومات وبين التعديلات الهيكلية للكروموسومات (Soili *et al.*, 2000). وأن تطور وتقدم سرطان الخلايا الكبدية HCC يكون مرتبطاً مع تراكم التغييرات الجينية التي تشارك بها الجينات المسرطنة Oncogenes والجينات الكابتة للورم Tumor suppressor genes والعديد من الجينات الأخرى (Imbeaud *et al.*, 2010).

الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل

Chapter Three
Materials & Methods

3- مواد و طرائق العمل Materials and methods

1-3 المواد Materials

1-1-3 الأجهزة و الأدوات المستعملة Apparatus and equipment

جدول (1-3) : الأجهزة و الأدوات المختبرية

الرقم	أسم الأجهزة و الأدوات	الشركة المصنعة	المنشأ
1	مجهر ضوئي Light microscope	Micros	النمسا Austria
2	مجهر مقلوب Inverted microscope	Olympus	اليابان Japan
3	إسطوانة مدرجة Graduated cylinder	Silber brand	المانيا Germany
4	محرك مغناطيسي Magnetic stir bar	Science lab	الولايات المتحدة الأمريكية USA
5	ماء مقطر Distilled water	Running waters	الولايات المتحدة الأمريكية USA
6	ماء مقطر ثلاثي Double distilled water	Running waters	الولايات المتحدة الأمريكية USA
7	قناني زرع نسجي بلاستيكية Plastic tissue culture flasks (50 cm ²)	Bio basic Canada	كندا Canada
8	حقن معقمة استعمال مرة واحدة Disposable sterile syringes (5 ml)	Changzhou kangfulai	الصين China
9	حقن معقمة استعمال مرة واحدة Disposable sterile syringes (1 ml)	Cellotoron corporation	ماليزيا Malaysia
10	حمام مائي Water bath	Memmert	المانيا Germany
11	حاضنة Cooled incubator	Gallenkamp	إنكلترا England
12	هزاز Shaker	Cyan	كوريا Korea
13	محرض مغناطيسي Magnetic stirrer	Cyan	كوريا Korea
14	ميزان حساس Sensitive balance	OHAUS	سويسرا Switzerland
15	ماصة دقيقة Micropipette (2-20 µl)	Dragon lab	الصين China
16	ماصة دقيقة Micropipette (10-100 µl)	Dragon lab	الصين China
17	ماصة دقيقة Micropipette (100-1000 µl)	Dragon lab	الصين China
18	خرائطيش معقمة Disposable tips	Lypress	بلجيكا Belgium
19	وعاء معدني للتعقيم Autoclave	GSL	تركيا Turkey
20	كابينة الزرع النسجي Laminar airflow cabinet	Nüve	تركيا Turkey
21	رفائق الألمنيوم Aluminum foil	Science lab	الصين China

الولايات المتحدة الأمريكية USA	Bemis	Para film	بارافيلم	22
العراق Iraq	Eshtar	Refrigerator	ثلاجة	23
كندا Canada	Simport	Cryotube	أنابيب البرد	24
اليابان Japan	Olympus	Tissue culture tubes (50 ml)	أنابيب الزرع النسجي	25
اليابان Japan	Olympus	Tissue culture tubes(15 ml)	أنابيب الزرع النسجي	26
		Dropper	قطارة	27
المانيا Germany	Hettich	Cooled centrifuge	جهاز الطرد المركزي	28
المملكة المتحدة UK	Gallenkamp	pH meter	مقياس الرقم الهيدروجيني	29
المانيا Germany	Ilmabor	Beaker	إناء (بيكر)	30
الولايات المتحدة الأمريكية USA	Santa Cruze	Glass tissue culture Petri dishes	أطباق بتري الزجاجية للزرع النسجي	31
الدنمارك Denmark	Nunc	Plastic tissue culture Petri dishes	أطباق بتري البلاستيكية للزرع النسجي	32
كوريا الجنوبية S. Korea	K&K	Electrical oven	فرن كهربائي	33
الصين China	Apel	Cover slips (22*22 mm)	قصاصات مغطية	34
الصين China	Afco	Microscope glass slides	شرائح مجهر زجاجية	35
تركيا Turkey	Nuve	Deep freeze (80-°C)	تجميد عميق	36
النمسا Austria	Micros	Light microscope digital camera	كاميرا رقمية للمجهر الضوئي	37
المانيا Germany	Geriner bio one	Disposable sterile cell scraper	مكشطة خلية معقمة	38
المانيا Germany	Assistent	Counting chamber	غرفة العد	39
الصين China	SnibeCo.,Ltd	Maglumi - Snibe	جهاز حساب وظائف الكبد	40
الولايات المتحدة الأمريكية USA	What man	What man filter papers No.1	أوراق ترشيح	41
الولايات المتحدة الأمريكية USA	Union carbide	Liquid nitrogen container	حاوية النيتروجين السائل	42
الصين China	UNICO	Spectrophotometer	جهاز مقياس الطيف الضوئي	43

2-1-3 المواد الكيميائية المستعملة Chemicals Materials

جدول (2-3) : المواد الكيميائية

الرقم	المواد الكيميائية	الشركة	المنشأ
1	مضاد حيوي Streptomycin	Megental	إيطاليا Italy
2	مضاد حيوي Ampicillin	PAN	فرنسا France
3	كحول الإيثانول Ethanol alcohol 70%	Ameyafze	الولايات المتحدة الأمريكية USA
4	مصل جنين البقر Fetal bovine Serum	Capricornscientific	ألمانيا Germany
5	تربسين- فيرسين Trypsin-Versene	US Biological	الولايات المتحدة الأمريكية USA
6	تربسين Trypsin	US Biological	الولايات المتحدة الأمريكية USA
7	كلوريد الصوديوم Sodium chloride(NaCl)	Thomas baker	الهند India
8	كلوريد البوتاسيوم potassium chloride(KCl)	BDH	المملكة المتحدة UK
9	فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية (KH ₂ PO ₄) Potassium dihydrogen phosphate	BDH	المملكة المتحدة UK
10	بيكربونات الصوديوم Sodium bicarbonate(NaHCO ₃)	VWR international	الولايات المتحدة الأمريكية USA
11	فوسفات الصوديوم الهيدروجينية (Na ₂ HPO ₄) Disodium hydrogen phosphate	Qualikems	الهند India
12	فورمالديهايد Formaldehyde	Santa Cruze	الولايات المتحدة الأمريكية USA
13	هيماتوكسلين Hematoxylin	BDH	المملكة المتحدة UK
14	ايوسين Eosin	BDH	المملكة المتحدة UK
15	كمزرا Giemsa	BDH	المملكة المتحدة UK
16	زايلين Xylene	Scharlau	أسبانيا Spain
17	حمض الخليك الثلجي Glacial acetic acid	Scharlau	أسبانيا Spain
18	بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Locally market	العراق Iraq
19	محلول العد الدائم (DPX) Distyrene plasticizer xylene solution	CDH	الهند India

الولايات المتحدة الأمريكية USA	Ameyafze	Methanol	ميثانول	20
أسبانيا Spain	Scharlau	Colcemid	كولسيمايد	21

3-1-3 الأوساط الغذائية الزرعية المستعملة Tissue Culture Media

جدول (3-3) : الأوساط الغذائية

الرقم	الوسط الغذائي	الغرض من إستعماله	الشركة المصنعة و المنشأ
1	Rosswell Park Memorial Institute, (RPMI- 1640) Media with L-glutamine and HEPES buffer without sodium bicarbonate	لتنمية خط خلايا سرطان الكبد HCAM ولإستعماله في تقدير نمو هذه الخلايا	Capricorn scientific (المانيا Germany)

4-1-3 العدّد Kits

جدول (4-3) : العدّد المستعملة في هذه الدراسة

الرقم	اسم العدة	الشركة المصنعة و المنشأ
1	CYANsmart semi-automated biochemistry analyzer (ALT)	Cypress Diagnostics (Belgium)
2	CYANsmart semi-automated biochemistry analyzer (AST)	Cypress Diagnostics (Belgium)
3	CYANsmart semi-automated biochemistry analyzer (GGT)	Cypress Diagnostics (Belgium)
4	CYANsmart semi-automated biochemistry analyzer (LDH)	Cypress Diagnostics (Belgium)
5	Maglumi 800, CRP	SnibeCo.,Ltd, (China)
6	Maglumi 800, AFP	SnibeCo.,Ltd, (China)
7	Maglumi 800, CEA	SnibeCo.,Ltd, (China)
8	Maglumi 800, CA19-9	SnibeCo.,Ltd, (China)
9	Immunohistochemistry kit	US Biological (USA)
10	ImmunoCruz mouse ABC staining system	Santa Cruz (USA)
11	ImmunoTek™ DAB buffer (10X)	US Biological (USA)
12	KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (2X)	Kapabiosystems (USA)

Kapabiosystems (USA)	KAPA Express Ladder Kits	13
RBC Bioscience Corp (Taiwan)	104 MagCore Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit	14
US Biological (USA)	GSTM1 Primary antibody	15
US Biological (USA)	GSTT1 Primary antibody	16
US Biological (USA)	P53 Primary antibody	17

5-1-3 البادئات Primers

تم تحضير هذه البادئات وفقا إلى بروتوكول الشركة المصنعة لهم بواسطة إضافة الحجم المثبت من قبل الشركة إلى ربع حجم من الماء المقطر للحصول على تركيز 100 mM، وقد تم تجهيز بادئ Mouse GAPDH من قبل شركة Bio Corp الأمريكية، وتم تجهيز البادئ الآخر Human GAPDH من قبل شركة (IDT) Integrated DNA technologies الأمريكية كما في جدول (5-3).

جدول (5-3) : بادئات الدنى Mouse GAPDH (Mohammad, 2015) و Human GAPDH (Ahmed, 2016) وتسلسل قواعدها النتروجينية وعددها المستعملة في فحص Conventional PCR

النسبة المئوية للقواعد النتروجينية GC (%)	درجة حرارة التلدن للبادئ Tm (°C)	حجم نواتج تضخيم PCR (pb)	تسلسل القواعد النتروجينية DNA Sequences (5' → 3')	أسم البادئ Primer
60.00	59.14	20	GGA GAG TGT TTC CTC GTC CC	F
50.00	58.81	20	TTT GCC GTG AGT GGA GTC AT	R
54.50	59.10	22	ATC ACT GCC ACC CAG AAG ACT G	F
50.00	58.70	24	AGG TTT TTC TAG ACG GCA GGT CAG	R

F: البادئ الأمامي Forward

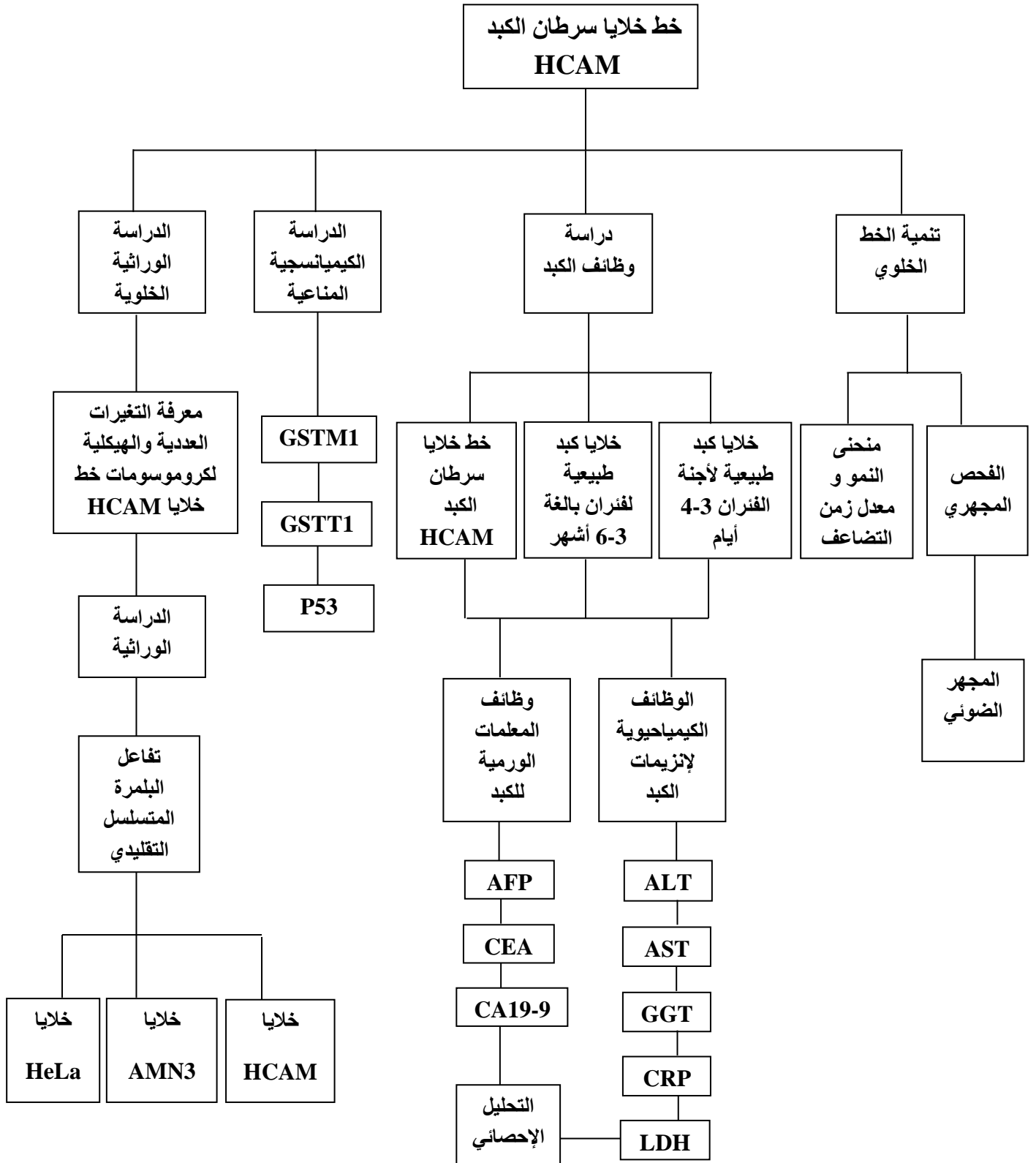
R: البادئ الخلفي Reverse

6-1-3 المواد الكيميائية الخاصة بعمل تفاعل البلمرة المتسلسل Conventional PCR

جدول (6-3) : المواد الكيميائية المستعملة

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم المادة الكيميائية	الرقم
الولايات المتحدة الأمريكية USA	KAPA biosystems	Master mix مادة تفاعل البلمرة المتسلسل (2X)	1
	Bio corp	Mouse GAPDH مورث	2
	Integrated DNA Technologies (IDT)	Human GAPDH مورث	3
	US Biological	TBE buffer المحلول العازل	4
	KAPA biosystems	Loading dye صبغة التحميل	5
	US Biological	Ethidium bromide صبغة بروميد الاثيديوم	6
	US Biological	Agarose gel هلام الأكاروز	7
	KAPA biosystems	DNA Ladder سلم الحامض النووي	8

7-1-3 تصميم الدراسة Study design



مخطط (1-3) : تصميم تجربة الدراسة

2-3 طرائق العمل Methods**1-2-3 المحاليل المستعملة Solutions****1-1-2-3 محاليل زرع الخلايا Solutions for cells cultures****1-1-1-2-3 المضادات الحيوية Antibiotics**

تم إذابة عبوة من البنسلين Benzyl penicillin بسعة 1000 وحدة دولية (IU) في 5 مل من الماء المقطر ثم يؤخذ منه 0.5 مل تضاف إلى لتر واحد من الوسط الزرعوي وتحفظ في -20 درجة مئوية ، و تم إذابة 1 غم من الستربتومايسين Streptomycin في 5 مل من الماء المقطر ، ثم يؤخذ منه 0.5 مل تضاف إلى لتر واحد من الوسط الزرعوي تخزن في -20 درجة مئوية (الشمري ، 2003).

2-1-1-2-3 بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate

تم إذابة 4.4 غم من مسحوق البيكاربونات NaHCO_3 في 100 مل من الماء المقطر (D.D.W) Double distilled water ، و عقم بالموصدة وخن في 4 درجة مئوية (الشمري ، 2003).

3-1-1-2-3 محلول دارى الفوسفات PBS Phosphate Buffer Saline (pH 7.2)

تمت إذابة 10 غم من مسحوق PBS والمكون من (8 غم من NaCl ، 0.2 غم من KCl ، 0.2 غم من KH_2PO_4 و 0.15 غم من Na_2HPO_4) في 1000 مل من D.D.W ، وحركت باستمرار على محرك هزاز Shaker بدرجة حرارة الغرفة ثم تم تعقيم المحلول بالموصدة ، و تم حفظه في درجة حرارة الغرفة (الشمري ، 2003).

4-1-1-2-3 مصل جنين البقر (FBS) Fetal bovine Serum

إنَّ المصل جاهز للإستعمال ، وتم حفظه بظروف معقمة في درجة حرارة -20 درجة مئوية لحين الاستعمال (Al-shami, 2014).

5-1-1-2-3 التربسين Trypsin

تم تحضيره بإذابة 1 غم من مسحوق التربسين في 100 مل من PBS وعقم بالترشيح بإستعمال فلتر تعقيم (0.22 مايكرو متر) وتم حفظه عند -20 درجة مئوية (الشمري ، 2003).

6-1-1-2-3 التربسين-فيرسين Trypsin-Versene

تم تحضيره بإذابة 1 غم من مسحوق التربسين-فيرسين في 100 مل من D.D.W جيداً ثم عقم بالترشيح بإستعمال فلتر تعقيم (0.22 مايكرو متر)، ووضع لمدة 24 ساعة في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وتم حفظه في 4 درجة مئوية (Al-shami, 2014).

Rosswell Park Memorial Institute, (RPMI-1640) الوسط الزراعي 7-1-1-2-3 مع 10% مصّل جنين البقر

تم تحضير الوسط الزراعي عبر خلط المواد الآتية:

10.4- غم من مسحوق الوسط الزراعي RPMI-1640 الحاوي على HEPES buffer و L-glutamine.

4.4- غم من مسحوق بيكربونات الصوديوم Sodium Bicarbonate للوصول إلى الأس الهيدروجيني pH (7.2).

0.5- مل من البنسلين Benzyl Penicillin.

0.5- مل من الستربتومييسين Streptomycin.

10- % من مصّل جنين البقر FBS (أي 100 مل من المصل/ 1000 مل من الوسط الزراعي).

وكمل الحجم إلى 1000 مل (1 لتر) من D.D.W ، و تم تعقيم الوسط الزراعي بالترشيح بواسطة فلتر الترشيح الدقيق (0.22 مايكرو متر) ، ووضع في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ثم تم حفظه بدرجة 4 درجة مئوية (الشمري ، 2003).

Maintenance media الوسط الزراعي الحافظ 8-1-1-2-3

تم تحضير هذا الوسط بإضافة جميع مكونات الوسط الزراعي RPMI-1640 للنمو المبينة في 7-1-1-2-3 ما عدا المصل البقري (الشمري ، 2003).

pH maintenance solutions محاليل المحافظة على درجة حموضة الوسط 9-1-1-2-3

1-9-1-1-2-3 هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)

تم تحضيره بإذابة 4 غم من مسحوق هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر ، ثم تم استعماله مباشرة أو يتم حفظه في درجة 4 درجة مئوية لحين استعماله وقت الحاجة (Mohammad, 2015).

2-9-1-1-2-3 حامض الهيدروكلوريك (Hcl)

تم تحضيره بإضافة 8.3 مل من Hcl في 100 مل من الماء المقطر ، ثم تم استعماله مباشرة أو يتم حفظه في درجة 4 درجة مئوية لحين استعماله وقت الحاجة (Mohammad, 2015).

Solution for dyes محاليل الصبغات 2-1-2-3

Hematoxylin صبغة الهيماتوكسلين 1-2-1-2-3

إن محلول الصبغة كان جاهز للإستعمال.

2-2-1-2-3 صبغة الأيوسين Eosin

تم تخفيف الأيوسين بنسبة 1:1 مع الإيثانول وتمت بعد ذلك إضافة 2-3 قطرات من حمض الخليك الثلجي (Al-shami, 2014) Glacial acetic acid.

3-1-2-3 المكونات الخاصة بالدراسة الكيمياءسجية المناعية**Solution for Immunohistochemistry preparations****1-3-1-2-3 المصل العازل Blocking serum albumin**

تم مزج 75 مايكرو لتر من مخزون المصل العازل Blocking Serum الموجود في العدة مع 5 مل من PBS.

2-3-1-2-3 الأجسام المضادة الأولية Primary antibody

تم تحضير الجسم المضاد الأولي GSTM1، GSTT1 و P53 بواسطة مزج 1 مايكرو لتر من الجسم المضاد مع 999 مايكرو لتر من المصل العازل BSA (الذي تم تحضيره في 1-3-1-2-3)، ثم تم استعمالها مباشرة في التجربة المناعية.

3-3-1-2-3 الأجسام المضادة الثانوية المرتبطة بالبايوتين Biotinylated secondary antibody

تم مزج 75 مايكرو لتر من مخزون المصل العازل BSA مع 5 مل من PBS و 25 مايكرو لتر من مخزون Biotinylated secondary antibody المحدد لكل جسم مضاد كما في جدول (7-3)، وأستعمل مباشرة.

4-3-1-2-3 الأنزيم الكاشف AB Enzyme reagent

تم مزج 50 مايكرو لتر من Reagent A (avidin)، 50 مايكرو لتر من Reagent B والذي هو Biotinylated horseradish peroxidase (Biotinylated HRP) و 2.5 مل من PBS. إذ مزجت جميعها وأستعملت مباشرة.

5-3-1-2-3 مادة البيروكسيد Peroxidase substrate

تم مزج 1.6 مل من الماء المقطر، 5 قطرات من 10x substrate buffer، 10 قطرة من 50x Peroxidase substrate إذ إن هذه الكمية تكون كافية ل 15-20 سلايد وكان هذا التحضير ضمن شروط معتمدة الإضاءة.

6-3-1-2-3 المحلول الدارئ DAB buffer

تم مزج 5 مل من مادة 10x DAB buffer، 100 مايكرو لتر من 50x DAB substrate و 100 مايكرو لتر من Hydrogen Peroxide.

4-1-2-3 المكونات الخاصة بالدراسة الوراثية بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل**Solutions for PCR preparations****Master mix (2X) مادة 1-4-1-2-3**

إن المادة جاهزة للاستعمال ، وحفظت في درجة حرارة -20 درجة مئوية.

2-4-1-2-3 المورثات Mouse and human GAPDH primers

وتعني Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antagonists ، تم تخفيف المورثات المستعملة من تركيز 100 mM إلى تركيز 10 mM بماء مقطر لكل من المورثات الأمامية والخلفية الخاصة بهم Forward & reverse primer كما في جدول (3-5) ، وتم استعمالهم أو حفظهم في درجة حرارة -20 درجة مئوية لحين الإستعمال.

3-4-1-2-3 المحلول الدائري TBE buffer

تم مزج 5.5 غم من Boric acid ، 10.78 غم من Tris base و 0.74 غم من EDTA وتمت إذابة جميع المكونات في لتر من D.D.W وحفظت بدرجة حرارة الغرفة.

4-4-1-2-3 صبغة التحميل Loading Dye (6X)

لتحضير 1X من محلول الصبغة تم مزج 100 مايكرو لتر من الصبغة مع 500 مايكرو لتر من المحلول العازل TBE buffer (الذي تم تحضيره في 3-4-1-2-3) ، وتم إستعمالها مباشرة أو تحفظ في 4 درجة مئوية لحين إستعمالها.

5-4-1-2-3 صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium bromide dye

إن الصبغة جاهزة للإستعمال ، و محفوظة في درجة حرارة 4 درجة مئوية.

6-4-1-2-3 هلام الأكاروز Agarose gel

إن نسبة الهلام المستعمل في هذا التفاعل هو 1 % ، وتم تحضيره بإذابة 1 غم من هلام الأكاروز في 100 مل من المحلول العازل TBE buffer (الذي تم تحضيره في 3-4-1-2-3) ، وتم وضع المحلول في المايكروويف لدرجة الغليان ولمدة دقيقة ونصف لغرض ذوبان الهلام جيدا ، ثم بعد ذلك تم تبريد الهلام إلى درجة حرارة 60 درجة مئوية وتمت إضافة صبغة بروميد الأثيديوم له ومزجها مع المحلول ، وبعدها أصبح الهلام جاهز لعملية الصب.

7-4-1-2-3 سلم الحامض النووي DNA Ladder

يحتوي هذا السلم على سبع قطع من الحامض النووي DNA : 100 ، 200 ، 400 ، 800 ، 1600 ، 4000 و 8000. وهو محلول جاهز للإستعمال ، مخزون بدرجة حرارة -20 درجة مئوية.

5-1-2-3 المكونات الخاصة بالدراسة الوراثية الخلوية Solutions for cytogenetic study

1-5-1-2-3 تحضير محلول التثبيت Fixation solution

تم مزج مادة Glacial acetic acid مع مادة الميثانول Methanol بنسبة 3:1 (أي إضافة 10 مل من الحامض إلى 30 مل من الميثانول لإكمال الحجم إلى 40 مل ، وعند إضافة 20 مل من الحامض إلى 60 مل من الميثانول لإكمال الحجم إلى 80 مل وهكذا) (Yaseen, 1990).

2-5-1-2-3 تحضير صبغة كَمزا Giemsa stain

تم مزج 2 غم من مسحوق الصبغة Giemsa powder مع 100 مل من الميثانول Methanol ، وبقي المحلول على جهاز Stirrer لمدة أسبوع ثم تم فلتره المحلول بواسطة ورق الترشيح What man filter papers ، وبعد أن تم تحضير الصبغة تم تخفيفها مع البفر Buffer بنسبة 4:1 واستعملت في الحال (Yaseen, 1990).

2-2-3 الزرع الخلوي Cell culture

1-2-2-3 تخزين خط الخلايا في المختبر In-Vitro cell line storage

تم الحفاظ على الخلايا المزروعة بواسطة أساليب للحفاظ منها الخزن بالنتروجين السائل. تم فصل الخلايا في قارورة الزرع النسجي بواسطة Trypsinization وعلقت في 0.9 مل من الوسط الزرع RPMI حاوي على 40 % من FBS ، ثم تمت إضافة 0.1 مل من Dimethyl sulphoxid (DMSO) للخلايا. وتمت إضافة DMSO قطرة بعد قطرة وتم مزجها بلطف مع محلول الخلايا. ثم تم وضع محلول الخلايا في أنبوب مبرد معقم. وحُضِنَ الأنبوب المبرد في تجميد قوي Deep freeze لمدة 24 ساعة ، ثم نُقِلَ إلى اسطوانة من الفولاذ (علبة اسطوانية) ، موضوعه بمحتوى نتروجيني سائل حسب تدرج الاسطوانة والتي تحفظ الخلايا بدرجة حرارة -196 درجة مئوية . ولإعادة زرع الخلايا المجمدة ، تم نقل الأنبوب المجمد إلى الحمام المائي حتى ذوبان الجليد لمحلول الخلايا ، ثم تم نقل المحلول إلى قارورة الزرع النسجي وتم إضافة وسط زرع جديد إلى الخلايا وحضنها بدرجة حرارة 37 درجة مئوية (Al-Shammari, 2003).

2-2-2-3 Primary culture of normal liver cells الزرع الأولي لخلايا الكبد الطبيعية

إن مصدر الخلايا المزروعة كانت من أنسجة الكبد لأجنة الفئران الطبيعية (3-4 أيام) وأنسجة الكبد لفئران بالغة طبيعية (3-6 أشهر). حيث تمت إزالة أنسجة الكبد عن طريق أدوات تشريح تحت ظروف معقمة وغسلها مرتين بمحلول PBS ، ومن ثم نقل أنسجة الكبد إلى قوارير معقمة. تم تقطيع الأنسجة إلى قطع صغيرة عن طريق التقطيع الميكانيكي ، يليها تقطيع إنزيمي بمادة التربسين Trypsin ولمدة 10-15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ، ثم تمت تصفية الخلايا المفككة بقطعة شاش في قارورة معقمة مع 2-3 مل من الوسط الزرع RPMI 10% ونقلها إلى أنابيب الطرد المركزي عند 37 درجة مئوية و 1000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق لترسب الخلايا الكبدية. بعد أن تمت إضافة محلول PBS لغسل الخلايا لتكون خالية من الحطام ، تم

استخدامها بعد ذلك في اختبارات وظائف الكبد بعد عد الخلايا تحت المجهر الضوئي باستخدام شريحة العد (Al-Shammari, 2015) Neubauer chamber slide.

3-2-2-3 Secondary culture of HCAM cells لزراعة خلايا سرطان الكبد (Sub culture)

عندما أصبحت الخلايا السرطانية أحادية الطبقة وكثيفة في النمو ، تم القيام بالزرع الثانوي لأنه ضروري في الحفاظ على الخلايا بشكل سليم. تم سكب الوسط الزرع RPMI وغسل الخلايا مرتين مع 2 مل من محلول الفوسفات العازل (PBS) ، ثم إضافة 1 مل من التريسين-فيرسين Trypsin-Viersen إلى قارورة الزرع وحضنت لمدة 1-2 دقائق عند 37 درجة مئوية. بعد أن تم تفكك الخلايا إلى خلايا مفردة ، تم تخفيفها مع 7-10 مل من RPMI مع 10% من مصل جنين البقر (FBS) ونقلها إلى اثنين من أوعية زرع جديدة ، وحضنت عند 37 درجة مئوية حيث أنها سوف تعلق و تنمو مرة أخرى (Al-Shammari, 2015).

3-2-3 تنمية الخط الخلوي لسرطان الكبد HCAM Cell line culture

1-3-2-3 تصبغ الهيماتوكسلين والأيوسين Hematoxylin and eosin staining (H&E)

تمت زراعة خلايا سرطان الكبد ذات التميريرة الثامنة على Cover slips داخل ثلاثة أطباق بتري وحضنت الأطباق لأوقات مختلفة (24 - 48 - 72 ساعة) ، وتم التخلص من الوسط الأزرق القديم RPMI لكل طبق والقيام بالخطوات الآتية:

- تم تثبيت الخلايا المزروعة بالفورمالين 4 % PBS لمدة 24 ساعة.
- غسلت الخلايا بال PBS ثلاث مرات للتخلص من الفورمالين.
- تم إجراء عملية سحب الماء كآلاتي: كحول مطلق 100 % مرتين لكل مرة 1 دقيقة، 90 % مرة واحدة لمدة 1 دقيقة ، 70 % مرة واحدة لمدة دقيقة واحدة .
- غسلت بالماء المقطر لمدة دقيقة واحدة .
- تمت إضافة صبغة الهيماتوكسلين لمدة 10-15 دقيقة .
- غسلت عدة مرات بماء الحنفية لتثبيت الصبغة داخل الخلايا وإزالة الزائد منها .
- فحصت الخلايا تحت المجهر الضوئي للتأكد من أخذ النواة اللون الأزرق البنفسجي .
- تمت إضافة صبغة الأيوسين لمدة 5-10 دقائق وغسلت بالماء المقطر.
- تم إضافة قطرة من محلول العد الدائم DPX على سلايد ووضع عليه Cover slip بوضع مقلوب للمحافظة على هيئة الخلايا و تم فحص الخلايا تحت المجهر الضوئي (Al-shami, 2014) .

2-3-2-3 2-3-2-3 منحنى النمو ومعدل زمن التضاعف (PDT) doubling time

- تم دراسة منحنين نمو لخط خلايا سرطان الكبد في التمريرة 26 من الزرع النسيجي ، حيث تم زرع عشرة أطباق بتري (3 مل) في المنحنى الأول وكل الأطباق حاوية على العدد نفسه من الخلايا (10000 خلية / 2 مل) ، وحضنت في 37 درجة مئوية ، وفي المنحنى الثاني تم عمل الخطوات نفسها وزرعت عشرة أطباق أيضاً لكن عدد الخلايا في كل منها كان (100000 خلية / 2 مل).

- تم التخلص من الوسط الزرعي الموجود على الخلايا المعلقة المزروعة داخل طبق بتري كل 24 ساعة ، و تم فصل الخلايا بواسطة 0.5 مل من التربسين-فيرسين ثم تم إكمال محلول الخلايا بعد فصلها بواسطة 2 مل من وسط زرعي RPMI جديد.

- تم نقل 10 مايكرون من الخلايا المفصولة إلى شريحة عد خلايا الدم Neubauer haemocytometer والتي تغطي بواسطة Cover slip .

- تم حساب منحنى النمو لمدة عشرة أيام بين أعداد الخلايا لكل 24 ساعة.

- تم حساب معدل زمن التضاعف (PDT) Population doubling time ، بإستعمال المعادلة الآتية :

$$\text{Population doubling time (h)} = 0.693 (t-t_0) / \ln (N_t/N_0)$$

إذ إن t_0 هو الوقت الذي يبدأ فيه الطور اللوغارتمي ، t هو الوقت الذي ينتهي في الطور اللوغارتمي ، N_0 هو عدد الخلايا في الوقت t_0 و N_t هو عدد الخلايا في الوقت t (Doyle and Griffiths, 2000) .

4-2-3 قياس مستويات وظائف الكبد Liver function analysis

تم إستعمال 100000 خلية من الخلايا السرطانية و الطبيعية المتحللة وللمريرة الثامنة لقياس مستويات فعالية إنزيمات الكبد كمؤشر لمدى تلف الخلايا و دراسة الإختلافات بين خط الخلايا السرطانية الجديد والخلايا الكبدية الطبيعية الجنينية والبالغة. وكانت الإختبارات: alanine aminotransferase (ALT) ، aspartate aminotransferase (AST) ، γ -glutamyltransferase (GGT) ، Lactate dehydrogenase (LDH) و C-reactive protein (CRP) ، إذ تم قياسها في الخلايا الكبدية المتحللة بواسطة عدة CYANsmart (Cypress diagnostics, Langdorp,) semi-automated biochemistry analyzer (Belgium).

1-4-2-3 الإختبارات الكيمياحيوية لأنزيمات الكبد Liver biochemical enzymes tests

1-1-4-2-3 إختبارات فعالية إنزيمات ALT, AST and GGT tests

تم قياس فعالية إنزيمات الخلايا الطبيعية والسرطانية المتحللة في هذا الإختبار بإستعمال عدة CYANsmart semi-automated biochemistry analyzer (Cypress diagnostics, Langdorp, Belgium). وتم مزج 1 مل من كاشف العمل working reagent مع 0.1 مل من العينات داخل Cuvette (مسار الضوء فيه 1 سم) ، وتم الانتظار لمدة دقيقة واحدة ، ثم تم إعداد ساعة توقيت لحساب الامتصاصية لكل دقيقة ولمدة 3 دقائق إذ تم القياس بإستعمال جهاز مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer ولأطوال موجية مختلفة (340 نانومتر لإنزيمات ALT و AST و 405 نانومتر لأنزيم GGT) عند 37 درجة مئوية ، وبعدها تم حساب الفرق بين الإمتصاصية ومتوسط إختلافات الإمتصاص في الدقيقة الواحدة ($\Delta\text{abs./min}$)، وفقا للمعادلات الآتية:

$$\text{ALT or AST (IU)} = \Delta\text{abs./min} \times 1750$$

$$\text{GGT (IU)} = \Delta\text{abs./min} \times 1190$$

2-1-4-2-3 إختبار فعالية إنزيم LDH test

تم قياس فعالية الإنزيم لنفس الخلايا المتحللة بإستعمال العدة السابقة نفسها المستعملة في 1-1-4-2-3، إذ تم مزج 1 مل من كاشف العمل مع 20 مايكرو لتر من العينات داخل Cuvette (مسار الضوء فيه 1 سم) وحضنت لمدة 25 ثانية ، وبعدها تم قياس تغيير الإمتصاصية في الدقيقة الواحدة ($\Delta\text{abs./min}$) خلال 3 دقائق عن طريق جهاز Spectrophotometer و للطول الموجي 340 نانومتر في 37 درجة مئوية، وفقا للمعادلة الآتية:

$$\text{Activity (IU)} = \Delta\text{abs./min} \times 8095$$

3-1-4-2-3 إختبار مستويات CRP

تم القيام بهذا الإختبار بإستعمال عدة automatic electrochemical immuno-analyzer (Maglumi 800, SnibeCo.,Ltd, Shenzhen, China). إذ تم تخفيف الخلايا الكبدية المتحللة مع المحلول العازل TRIS buffer بنسبة 20:1 (أي، أضيف 10 مايكرو لتر من عينة الخلايا إلى 190 مايكرو لتر من المحلول العازل). وتم مزج 10 مايكرو لتر من العينة المخففة مع 100 مايكرو لتر من Fluorescein isothiocyanate Label (FITC Label) و 20 مايكرو لتر من مادة Nano magnetic microbeads ، وبعدها حضنت لمدة خمس دقائق وغسلت بالمحلول العازل (دورة غسل بإستخدام 400 مايكرو لتر من المحلول)، وأضيف 200 مايكرو لتر من N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol (ABEI) وحضنت لمدة 10 دقيقة ، وغسلت بدورة غسل مع 400 مايكرو لتر من المحلول العازل وأخيرا تم قياس عينات الإختبار عن طريق جهاز Maglumi-Snibe ، وتم قياس هذا الإختبار بوحدته قياس IU.

2-4-2-3 إختبارات المعلمات الورمية للكبد Liver tumor marker proteins tests

تم إستعمال الخلايا المتحللة التي أعدت سابقا في 4-2-3 لقياس بعض المعلمات الورمية ، و لدراسة طبيعة التحول بين خط الخلايا السرطانية HCAM والخلايا الكبدية الطبيعية الجنينية والبالغة. وكانت الإختبارات: Alpha-fetal protein (AFP)، carcino-embryonic antigen (CEA) و Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9) ، إذ تم قياسها في الخلايا الكبدية المتحللة بواسطة عدة automatic electrochemical immuno-analyzer (Maglumi 800, SnibeCo.,Ltd, Shenzhen, China).

1-2-4-2-3 إختبارات مستويات بروتينات AFP and CEA tests

تم قياس مستويات بروتينات الخلايا التي تم تحضيرها في 4-2-3 عن طريق استعمال عدة automatic electrochemical immuno-analyzer (Maglumi 800, SnibeCo.,Ltd, Shenzhen, China) مع 20 مايكرو لتر من nano magnetic microbeads و 40 مايكرو لتر من العينات المتحللة و حضنت لمدة 10 دقائق ، ثم تم القيام بدورة غسل بإستعمال 400 مايكرو لتر من 0.9% كلوريد الصوديوم ، وأضيف 200 مايكرو لتر من ABEI و حضنت لمدة 10 دقائق ، وبعدها غسلت مع 400 مايكرو لتر من مادة NaCl وقيست العينات بإستعمال جهاز Maglumi-Snibe ، وإن الوحدة القياسية المستعملة لهذه الإختبارات المناعية هي IU/ml.

2-2-4-2-3 إختبار مستوى بروتين CA19-9 test

أستعملت عينات الخلايا المتحللة المحضرة في 4-2-3. وتم إختبارها بعدة automatic electrochemical immuno-analyzer (Maglumi 800, SnibeCo.,Ltd, Shenzhen, China) و مُزجَ 20 مايكرو لتر من nano magnetic microbeads مع 100 مايكرو لتر من المحلول العازل buffer و 50 مايكرو لتر من عينات الخلايا و حضنت لمدة 10 دقائق ، و غسلت بإستعمال 400 مايكرو لتر من مادة كلوريد الصوديوم المخففة بنسبة 0.9% ، وتمت إضافة 200 مايكرو لتر من مادة ABEI و حضنت لمدة 10 دقائق ، وتم غسلها بإستعمال 400 مايكرو لتر من NaCl وقيست عينات الإختبار بإستعمال جهاز Maglumi-Snibe ، وإن الوحدة القياسية المستعملة لهذا الإختبار المناعية هي IU/ml.

5-2-3 الدراسة الكيميانسجية المناعية Immunohistochemistry study

تم القيام بالدراسة المناعية لخط خلايا سرطان الكبد HCAM التي نمت في التمريرة الخامسة للكشف عن المستقبلات المناعية GSTM1، GSTT1، و P53 الموجودة في الخلايا الورمية ، إذ تم فصل الخلايا عن قارورة الزرع النسيجي بواسطة محلول ترابين-فيرسين وإضافة الوسط الزرعي RPMI-1640 مع 10% من المصل البقري لها وتمت إعادة زراعة هذه الخلايا على Cover slips داخل خمسة أطباق بتري (يكون حجم كل طبق هو 3 مل) ، وتمت إضافة وسط زرعي جديد لها و حضنت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ، وبعد نمو الخلايا تمت إزالة الوسط الزرعي وتم إستعمال العدد الآتية عليها:

- أُستعملت عدة ImmunoCruz mouse ABC staining system للكشف عن المستقبلات المناعية GSTM1 و GSTT1 ، وتمت الطريقة بالشكل الآتي:
- تم تثبيت الخلايا بواسطة PBS 4 % من محلول الفورمالين لمدة عشر دقائق.
 - تم غسل الخلايا بال PBS لمدة دقيقتين (2-3 مرات).
 - حضنت جميع العينات الثلاث لمدة ساعة في 1.5 % من المصل العازل Blocking serum (الذي تم تحضيره في 3-1-2-3)، ثم غسلت في PBS.
 - تم إضافة 1 مل من المصل العازل على عينة السيطرة ، وتمت إضافة 1 مل من الأجسام المضادة الأولية GSTM1 & GSTT1 (التي تم تحضيرها في 3-1-2-3) على العينتين المتبقيتين ، وحضنت العينات لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية، ثم غسلت مرتين بال PBS لمدة دقيقتين.
 - تم حضن الخلايا لمدة 30 دقيقة في 3-1 قطرات من Biotinylated secondary antibody (الذي تم تحضيره في 3-3-1-2-3) وغسلت في PBS مرتين لمدة دقيقتين .
 - حضنت العينات لمدة 30 دقيقة مع AB enzyme reagent (الذي تم تحضيره في 4-3-1-2-3) ، وغسلت بال PBS مرتين لمدة دقيقتين.
 - حضنت العينات في 3-1 قطرات من Peroxidase substrate (الذي تم تحضيره في 5-3-1-2-3) ، لمدة 10-20 دقيقة.
 - بعد ذلك تم غسل العينات بال PBS ، وتمت إضافة صبغة Hematoxylin لمدة 5-10 ثواني وغسلت بال PBS.
 - وبسرعة تمت إضافة 2-1 قطرات من DPX على السلايد وتمت تغطيته بـ Cover slip ، وتم فحص وملاحظة العينات بواسطة المجهر الضوئي.
 - وأُستعملت عدة Immunohistochemistry kit للكشف عن المستقبل المناعي P53 وبالتقنية نفسها أعلاه.

6-2-3 الدراسة الوراثية الخلوية Cytogenetic study

إنّ دراسة الكروموسومات في حالة سرطان الكبد HCC كانت بإستعمال خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة 12 ، وأن أفضل فحص لهذا الخط كان عند الطور الإستوائي Metaphase ، وكانت طريقة عمل التحليل الوراثي الخلوي حسب طريقة Yaseen (1990) وتم تعديلها من قبل مختبر الوراثة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية كالاتي:

1-6-2-3 حصاد الخلايا Cells Harvesting

- تم فحص ثلاث قوارير زرع نسجي لخط خلايا HCAM بالمجهر المقلوب لمعرفة ما إذا كانت الخلايا جاهزة للتجربة الوراثية الخلوية (أي إما تكون ذات طبقة واحدة Monolayer أو أكثر

نمو (Over growth) ، وتم تنشيط الخلايا Cells refreshment بتغيير الوسط الزرعى Change media لقوارير الزرع النسيجي داخل أجواء معقمة لمدة 4-6 ساعات.

- وتم التخلص من الوسط الزرعى وتم إضافة الكولسيمايد Colcemid لقوارير الزرع (إذا كان حجم الوسط الزرعى 5 مل فيتم إضافة 0.1 مل من الكولسيمايد و إذا كان حجم الوسط الزرعى 10 مل فيتم إضافة 0.2 مل من الكولسيمايد وهكذا) ولمدة ثلاث أوقات (30 دقيقة و 45 دقيقة وساعة واحدة) لمعرفة الوقت المناسب لمعاملة الخلايا بالكولسيمايد وتم إرجاع قوارير الزرع إلى الحاضنة لمدة دقيقة ونصف تقريبا.

- وبعد إنتهاء وقت الكولسيمايد تم سكب الوسط الزرعى في أنابيب زجاجية وأضيفَ ترابين-فيرسين الذي تم تحضيره في 3-2-1-1-6 بمقدار نصف مل إلى القوارير وأرجعت إلى الحاضنة لمدة دقيقة ونصف إلى دقيقتين.

- وضربت القوارير برفق لفصل الخلايا منها ثم تم إرجاع الوسط الزرعى RPMI إلى الخلايا، إذ وضع مزيج كل قارورة في أنابيب منفصلة وأدخلت إلى جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق و 1500 دورة/دقيقة وبعدها تم التخلص من الرائق وإبقاء الراسب وإضافة KCl لمدة 45 دقيقة وأدخلت بعد ذلك إلى جهاز الطرد المركزي بالوقت نفسه وعدد الدورات نفسها.

2-6-2-3 التثبيت Fixation

بعد إضافة KCl وبعد الطرد المركزي ، تم التخلص من الرائق وإبقاء الراسب وأضيف المثبت Fix (ميثانول : حامض الخليك الثلجى) الذي تم تحضيره في 3-2-1-5-1 بهيأة قطرة قطرة على جدار الأنبوب حتى أكتمل الحجم إلى 5 مل ، وبعدها وضعت لمدة 10 دقائق في درجة حرارة -20 درجة مئوية وبعده في جهاز الطرد المركزي وبنفس التعليمات أعلاه ، ثم تم التخلص من الرائق وإضافة المثبت Fix بشكل مباشر على الراسب المتبقي في الأنبوب وليس بشكل قطرات حتى تم إكمال الحجم إلى 5 مل وبعده وضع بدرجة حرارة -20 درجة مئوية وبعده في جهاز الطرد المركزي وهكذا تمت إعادة عملية التثبيت مرتين إضافيتين ليكون مجموع إعادة التثبيت هو أربع مرات.

3-6-2-3 تحضير السلايدات Slide preparation

بعد المرة الرابعة من التثبيت والطردي المركزي ، تم التخلص من الرائق وإبقاء قليلا منه على الراسب لتحضير السلايدات بطريقة التقطير ، وبإستعمال الماصة تم تقطير 3-4 قطرات من معلق الخلايا من مسافة بعيدة عن السلايد (كلما أبتعد السلايد عن القطارة كلما كان التقطير أفضل) ، ووضعت السلايدات بدرجة حرارة الغرفة حتى جفت ، بعدها تم تصبيغها بصبغة كزما Giemsa stain التي تم تحضيرها في 3-2-1-5-2 لمدة دقيقتين ونصف وبعدها تم غسل السلايدات بواسطة محلول بفر Buffer حتى جفت وتم فحصها بالمجهر المقلوب لمعرفة أعداد الكروموسومات وملاحظة الطور الإستوائى Metaphase.

7-2-3 Polymerase chain reaction الدراسة الوراثية لتفاعل البلمرة المتسلسل study

تم إجراء فحص البلمرة المتسلسل التقليدي PCR لعينات الـ DNA لمجاميع التجربة وكذلك بإستعمال عدة KAPA2G™ Fast Hot Start Ready Mix (2X) الأمريكية Kapabiosystems ، للدلالة على وجود التعبير الجيني لمورثات Mouse Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase و Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase التي تتفاعل مع جزيئات الحامض النووي للعينات المستعملة على النحو الآتي:

1-7-2-3 إستخلاص جزيئة الحامض النووي (الذني) DNA extraction

تم أخذ ثلاث أنواع من الخطوط الخلوية : خط خلايا سرطان الكبد لفأر أبيض HCAM بالتمريرة الخامسة و خط خلايا سرطان الغدد اللبئية لفأرة أنثى مسنة Amn3 بالتمريرة 37 ، وخط خلايا سرطان عنق الرحم لإمرأة من أصل أفريقي HeLa بالتمريرة 30 ، وتمت إضافة 1 مل من PBS على كل نوع من الخلايا وفصله عن قارورة الزرع النسيجي بواسطة مكشطة Scraper ، ثم تم وضع كل نوع من الخلايا مع الـ PBS في أنبوبة صغيرة. وتمت إضافة Proteinase K إلى كل عينة بمقدار 1 % وأدخلت العينات إلى جهاز استخلاص الـ DNA (104 MagCore Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit) مع عدة الاستخلاص للحصول على عينات الـ DNA ، خزنت العينات بعد ذلك في درجة حرارة -20 درجة مئوية لغرض إستعمالها وقت الحاجة.

2-7-2-3 تحضير مزيج تفاعل PCR للمورث الهدف Mouse GAPDH

تم تحضير مزيج عينات الذني مع مورث Mouse Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase كما في جدول (7-3) .

جدول (7-3) : مكونات مزيج تفاعل PCR للمورث Mouse GAPDH

Volume	PCR
1.5 μ	DNA template
1 μ	Mouse GAPDH gene forward primer
1 μ	Mouse GAPDH gene reverse primer
12.5 μ	2X KAPA2G™ Fast Hot Start Ready mix
9 μ	Distilled water
25 μ	Total

3-7-2-3 تحضير مزيج تفاعل PCR للمورث الهدف Human GAPDH

تم تحضير مزيج عينات الذني مع مورث Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase كما في جدول (8-3) .

جدول (8-3) : مكونات مزيج تفاعل PCR للمورث Human GAPDH

Volume	PCR
1.5 μ	DNA template
1 μ	Human GAPDH gene forward primer
1 μ	Human GAPDH gene reverse primer
12.5 μ	2X KAPA2G™ Fast Hot Start Ready Mix
9 μ	Distilled water
25 μ	Total

أضيفت المكونات التي ذكرت في جداول (7-3) و (8-3) إلى أنابيب تفاعل البلمرة المتسلسل الخاصة ، ومن ثم وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق ، وبعدها نقلت إلى جهاز التفاعل PCR Thermal Cycler, USA وتم تطبيق الظروف الحرارية للمورثات حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول (9-3).

جدول (9-3) : الظروف الحرارية المثلى لمراحل PCR للمورثات Mouse GAPDH و Human GAPDH

Repeat cycle	Time	Temperature	PCR step
40 cycle	2 Min	95 °C	Initial Denaturation
	15 Sec	95 °C	Denaturation
	15 Sec	(55-60) °C	Annealing
	10 Sec	72 °C	Extension
	1 Min	72 °C	Final extension

4-7-2-3 الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز Gel electrophoresis

بعد إكمال تفاعل البلمرة ، تم تحضير هلام الأكاروز Agarose بنسبة 1غم/100مل من TBE buffer (الذي تم تحضيره في 3-4-1-2-3) ، ثم تم صب الهلام في جهاز الترحيل مع تثبيت الأمشاط جيدا وترك ليتصلب 30 دقيقة تقريبا ، وبعد تصلب الهلام تم رفع الأمشاط وتم وضع 10 مايكرو لتر من DNA Ladder (الذي تم تحضيره في 7-4-1-2-3) في حفرة الترحيل الأولى ثم وضعت عينات الحامض النووي الكاملة في حفر الترحيل الأخرى ، إذ أن حجم عينة الحامض النووي هي 25 مايكرو لتر مع 2.5 مايكرو لتر من صبغة التحميل Loading dye ، ثم تم صب TBE buffer على الهلام المتصلب والعينات (بمقدار عمق 1 ملم) و تم ترحيل عينات الـ DNA الموضوعة في حفر الهلام من القطب السالب إلى القطب الموجب بجهد كهربائي مقداره 100 فولت لمدة نصف ساعة ، وبعد ذلك تم وصول صبغة

التحميل إلى النهاية وتوقف جهاز الترحيل ووضعت العينات بعد ترحيلها في جهاز التصوير بالأشعة فوق البنفسجية لفحص حزم الـ DNA.

8-2-3 الحيوانات المختبرية Laboratory animals

أستعملت في هذه الدراسة أجنة بعمر 3-4 أيام مع ذكور بعمر 3-6 أشهر من الفئران البيضاء السويسرية White swiss albino male mice المجهزة من قبل البيت الحيواني للمركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية.



صورة (6-2) : فئران بيضاء سويسرية في البيت الحيواني للمركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية

9-2-3 التحليل الإحصائي Statistical analysis

حللت بيانات وظائف الكبد إحصائياً بإستعمال طريقة تحليل التباين (ANOVA) ، باتجاه واحد ، وقورنت المتوسطات و الخطأ القياسي (Std. Error) وتحليل التباين بإستعمال اختبار أقل فرق معنوي (LSD) Least significant difference عند مستوى احتمال ($P \leq 0.05$).

الفصل الرابع
النتائج و المناقشة

Chapter Four
Results & Discussion

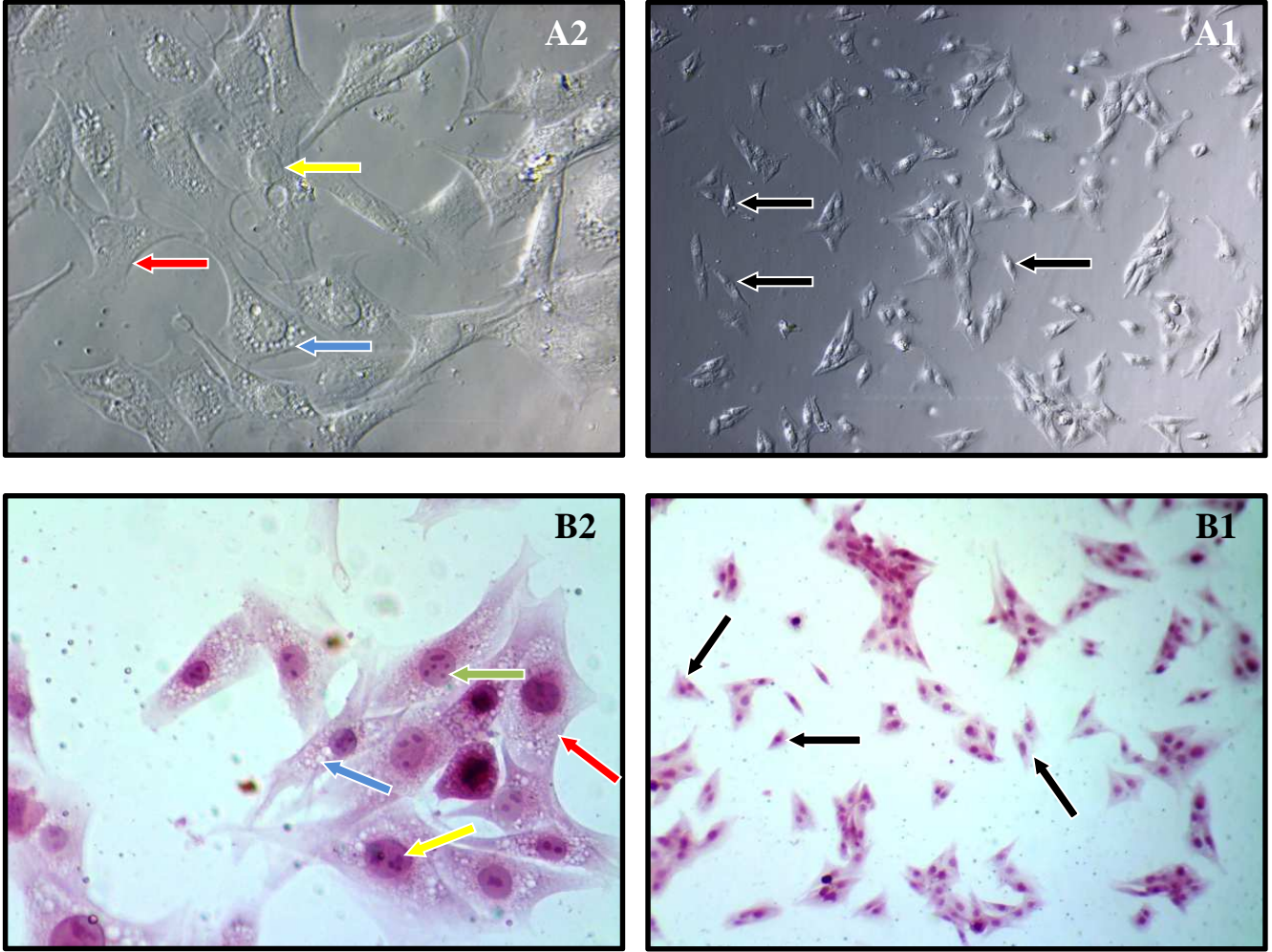
4- النتائج والمناقشة Result and discussion

1-4 تنمية الخط الخلوي HCAM Cell line development

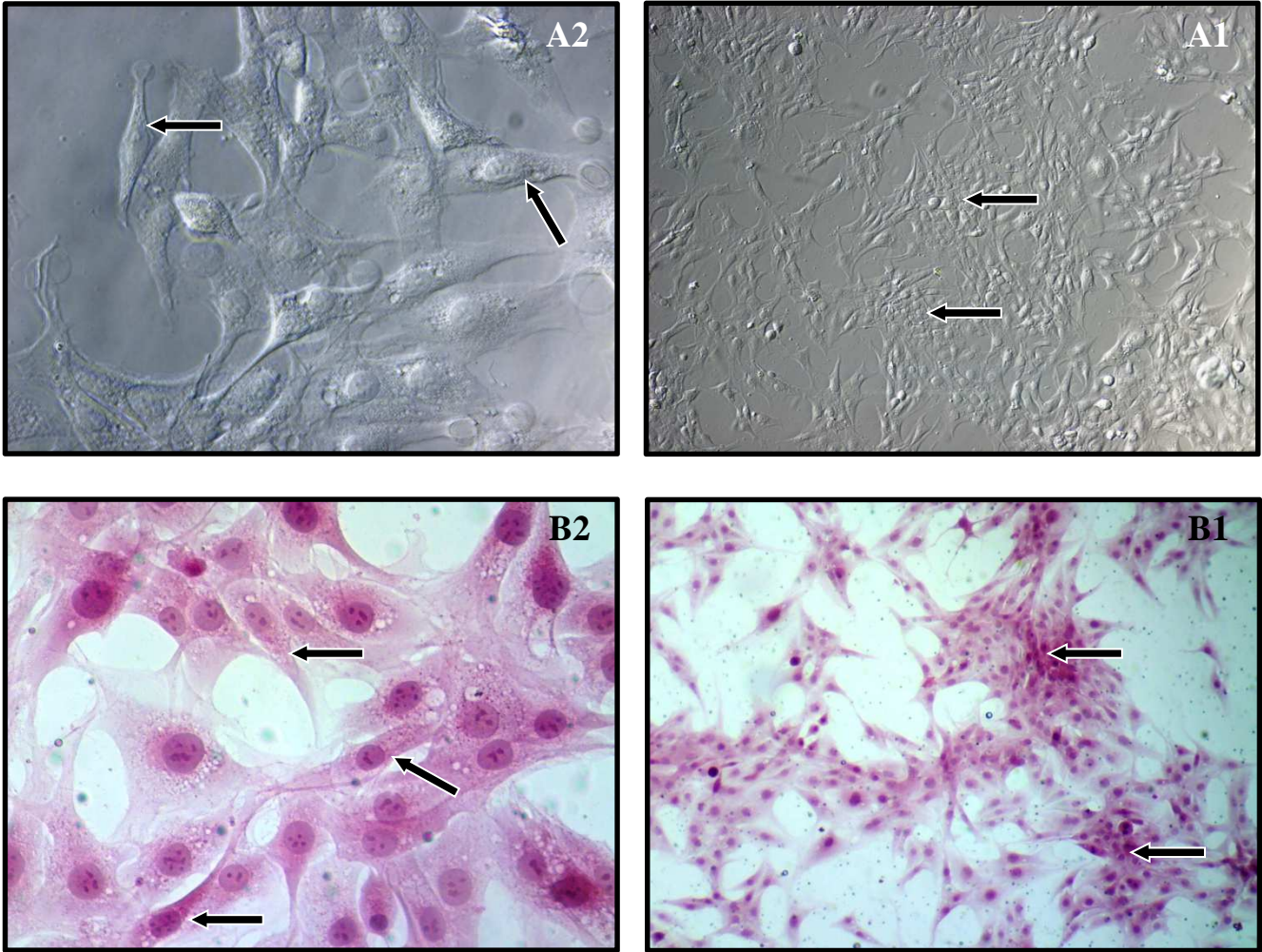
1-1-4 الفحص المجهرى لخط خلايا سرطان الكبد Microscopic examination of HCAM

أظهرت النتائج بعد 24 ساعة من الزرع النسيجي لخط خلايا سرطان الكبد للفأر الأبيض HCAM وللتمريرة الثامنة ؛ أن الخلايا السرطانية الكبدية المزروعة قد التصقت بقارورة الزرع النسيجي وشكلت خلايا مفردة مع وضوح حدودها كما في صورة (A1 1-4 , B1) ، وظهرت خلايا الكبد الورمية بشكل مضلع متعدد السطوح مع أنوية بارزة مركزية الموقع ذات هيئة كروية إلى بيضوية حاوية على أكثر من نوية ، ووجود فجوات في سايتوبلازم الخلايا وظهور بعض البروزات والإمتدادات من سطح الخلايا كما في صورة (A2 1-4 , B2). بعدها تمت ملاحظة أن الخلايا السرطانية قد بدأت بتكوين تجمعات صغيرة بعد 48 ساعة من الحضانة ؛ إذ إنها نمت بوضع متقارب مع بعضها بعضاً وكونت مستعمرات مفردة كما في صورة (A1 2-4 , B1) ، مع إستطالة بعض الخلايا و المحافظة على مكوناتها الداخلية كما في صورة (A2 2-4 , B2) ، وإستمرت الخلايا بعد ذلك بالتكاثر وإزداد عددها عند 72 ساعة من الزرع النسيجي ، إذ توسعت التجمعات الخلوية (المستعمرات) في الحجم وتقاربت من بعضها بعضاً حتى وصلت إلى الطبقة الأحادية إذ حصل نمو للخلايا السرطانية على سطح قارورة الزرع بالكامل كما في صورة (A1 3-4 , B1 , A2 , B2).

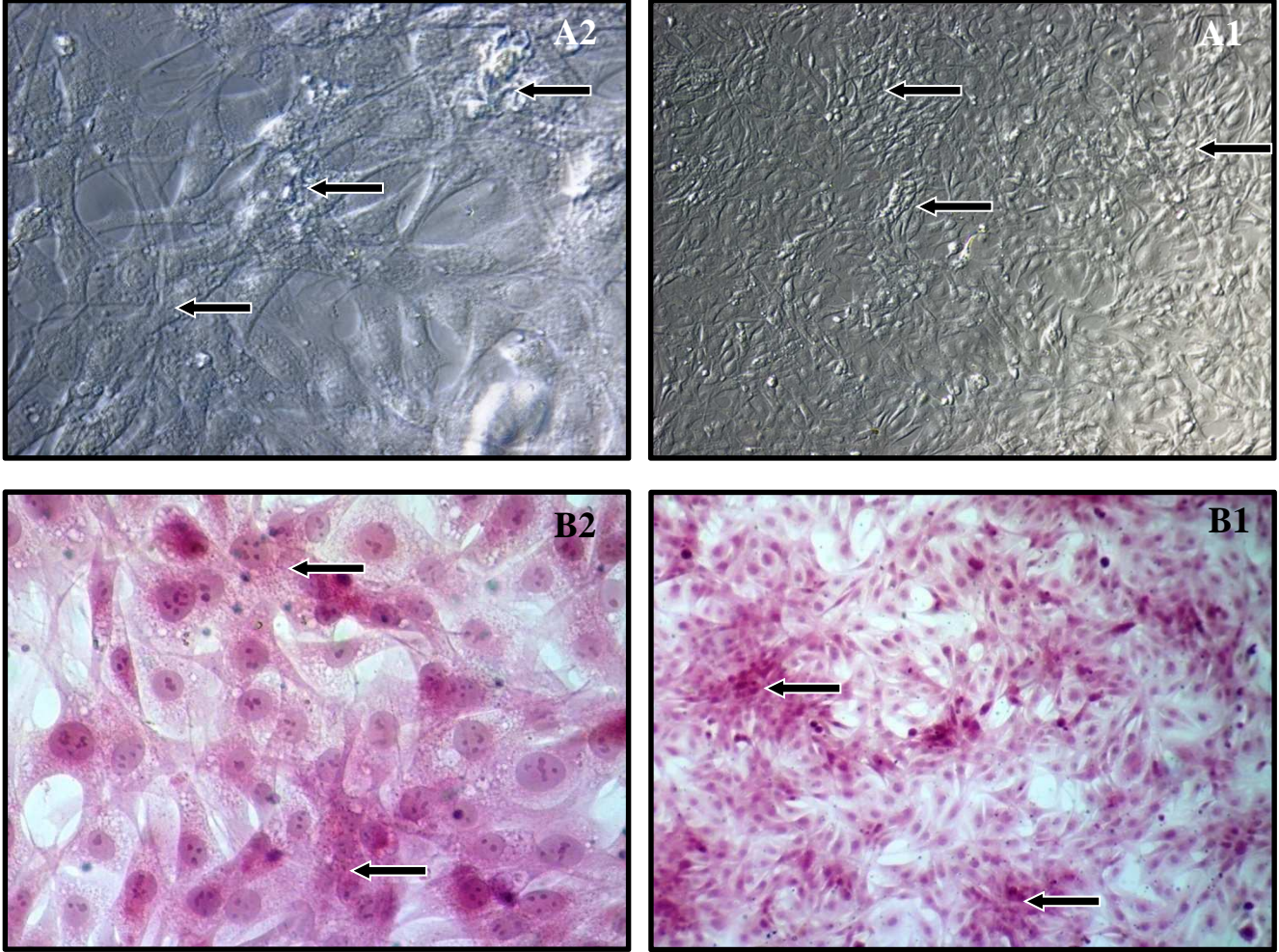
ودرست العديد من الأبحاث الصفات المظهرية لخطوط خلايا سرطان الكبد HCC ، إذ بينت دراسة لثمانية خطوط سرطانية كبدية لمرضى كوريين أن جميع الخطوط أظهرت إتصاقها بالمادة الأساسية للزرع النسيجي ووصلت إلى تكوين طبقة واحدة من الخلايا المتضاعفة في 34-72 ساعة من الحضانة ، وأن معظم الخلايا المزروعة حافظت على العديد من الخصائص المظهرية للأورام الأصلية التي اشتقت منها ، وأن هذه الخطوط الخلوية تمثل أدوات مفيدة للدراسات المختبرية المتعلقة بسرطان الكبد (Park *et al.*, 1995). وبين الباحث Ejiri وآخرون (2011) أن وصول الخلايا السرطانية المزروعة في صفيحة زرع نسيجي مختبرية إلى طبقة أحادية كثيفة في اليوم الثالث إلى اليوم الخامس من الحضانة ، سيظهر الخلايا بهيئات مظهرية متعددة وتفقد وظائفها تلقائياً على عكس الخلايا الورمية الموجودة داخل جسم الكائن الحي لصغر مساحة تكاثرها ، وظهرت خلايا الكبد السرطانية التي إستعملها هؤلاء الباحثين بوضع متعدد السطوح إلى ظاهري مغزلي مع نواة مركزية وعدة نويات وبروزات غير نظامية من سطح الخلايا. وفي دراسة لخط خلايا HCC21 المشتق من كبد أنثى صينية مصابة بسرطان الخلايا الكبدية في المرحلة الثانية من الورم ؛ بين الباحثون أن خط الخلايا الورمية هذا ينمو على هيئة طبقة أحادية ظهارية المظهر في الزرع النسيجي ، وأن الخلايا محافظة على صورتها طول مدة تمريراتها في المختبر (Cheung *et al.*, 2014).



صورة (1-4) : خط خلايا سرطان الكبد HCAM ذات التمريرة الثامنة بعد 24 ساعة من الحضانة داخل المختبر في الوسط الزرعى FBS 10% RPMI بعد إجراء عملية Sub culture ، الخلايا الكبدية الورمية تحت المجهر الضوئى إذ بين المؤشر ← نمو الخلايا بصورة مفردة 100x ، (A2) الخلايا الكبدية الورمية تحت المجهر الضوئى حيث بين المؤشر ← وضوح حدود الخلايا المضلعة وبين المؤشر ← بروز النواة مركزية الموقع ، وبين المؤشر ← وجود الفجوات في الساييتوبلازم 400x ، (B1) الخلايا الكبدية الورمية بصبغة H&E إذ بين المؤشر ← نمو الخلايا بصورة مفردة داخل الزرع النسيجي 100x ، (B2) الخلايا الكبدية الورمية بصبغة H&E وبين المؤشر ← وضوح حدود الخلايا المضلعة ، وبين المؤشر ← بروز النواة مركزية الموقع ، وبين المؤشر ← وضوح تعدد النويات ، وبين المؤشر ← وجود الفجوات في الساييتوبلازم 400x



صورة (2-4) : خط خلايا سرطان الكبد HCAM ذات التمريرة الثامنة بعد 48 ساعة من الحضان داخل المختبر في الوسط الزرعى RPMI 10% FBS ، (A1) الخلايا الكبدية الورمية تحت المجهر الضوئى إذ بين المؤشر ← بداية نمو الخلايا وتكوين تجمعات خلوية 100x ، (A2) الخلايا الكبدية الورمية تحت المجهر الضوئى وبين المؤشر ← بداية تكوين تجمعات الخلايا مع بداية استطالة حدود الخلايا 400x ، (B1) الخلايا الكبدية الورمية بصبغة H&E وبين المؤشر ← بداية تكوين تجمعات خلوية 100x ، (B2) الخلايا الكبدية الورمية بصبغة H&E وبين المؤشر ← بداية تكوين تجمعات الخلايا مع بداية استطالة حدود الخلايا والمحافظة على مكوناتها الداخلية 400x



صورة (3-4) : خط خلايا سرطان الكبد HCAM ذات التمريرة الثامنة بعد 72 ساعة من الحضانة داخل المختبر في الوسط الزرع RPMI 10% FBS ، (A1) الخلايا الكبدية الورمية تحت المجهر الضوئي وبين المؤشر ← التجمعات الخلوية بصورة مستعمرات متقاربة من بعضها البعض وتكوين طبقة أحادية من الخلايا 100x ، (A2) الخلايا الكبدية الورمية تحت المجهر الضوئي وبين المؤشر ← نمو الخلايا الكثيف لتكوين الطبقة الأحادية 400x ، (B1) الخلايا الكبدية الورمية بصبغة H&E وبين المؤشر ← التجمعات الخلوية بهيأة مستعمرات متقاربة من بعضها بعضاً وتكوين طبقة أحادية من الخلايا 100x ، (B2) الخلايا الكبدية الورمية بصبغة H&E وبين المؤشر ← نمو الخلايا الكثيف لتكوين الطبقة الأحادية 400x

وأتفقت نتائجنا مع النتائج التي توصل إليها الباحث Nakabayashi وآخرين (1982) إذ قاموا بتوصيف خط خلايا سرطان الكبد Human hemochromatotic cell line (Huh-7) ، ووجدوا أن هذا الخط يمتاز بترتيب للخلايا شبيه بالأرصفة عند نموه كطبقة على قارورة الزرع النسيجي وأن خلاياه تشبه خلايا الكبد الطبيعية Hepatocyte بدرجة كبيرة ، إذ تبدو مسطحة ومتعددة الأضلاع وتمتلك حبيبات دقيقة وفجوات في الساييتوبلازم ، مع وجود نواة واضحة ، وعند زرع هذا الخط مختبرياً فإن هيأته تكون شبيهة بالورم الأصلي الذي أخذ منه (Ghanekar *et al.*, 2013). وبينت دراسة مماثلة للمميزات المظهرية لخط الخلايا الكبدية Hepatoma cell line (HLE) أن خلاياه تكون ظهارية المظهر مع تنوع في حجم

السايتوبلازم و وجود نواة بارزة بيضوية إلى كروية المظهر مع واحدة أو أكثر من الأنوية ، وتكون الخلايا بهيأة تجمعات شبيهة بالورم الكبدي الأصلي عند زرعها مختبرياً (Doi et al., 1975).

وعند دراسة المظهر الخارجي لخط خلايا كبدية سرطانية لذكر كلب مصاب إصابة تلقائية بالسرطان Canine hepatocellular carcinoma (cHCC) ظهرت خلاياه بصورة مفعمة بالحويوية وعلى هيئة مجاميع في الزرع وليس بصورة مفردة ، وذات مظهراً مضلعاً متميزاً مع وجود إمتدادات في محيطها وفجوات في السايتوبلازم ونواة كبيرة مركزية الموقع مع نويات بارزة كبيرة و متعددة (Boomkens et al., 2004). كذلك يمتاز خط الخلايا الكبدية البشري Alexander hepatoma cell line (PLC/PRF/5) بخلايا ذات هيئات متعددة الأضلاع مع حدود خلايا واضحة جدا ، ويمتاز أيضاً بوجود نواة كبيرة خالية من الكروماتين والعديد من النويات ، ويكون ترتيب خلاياه داخل الزرع النسجي بصورة مستعمرات وتجمعات لتكوّن بعد ذلك طبقة واحدة من الخلايا (Alexander et al., 1976).

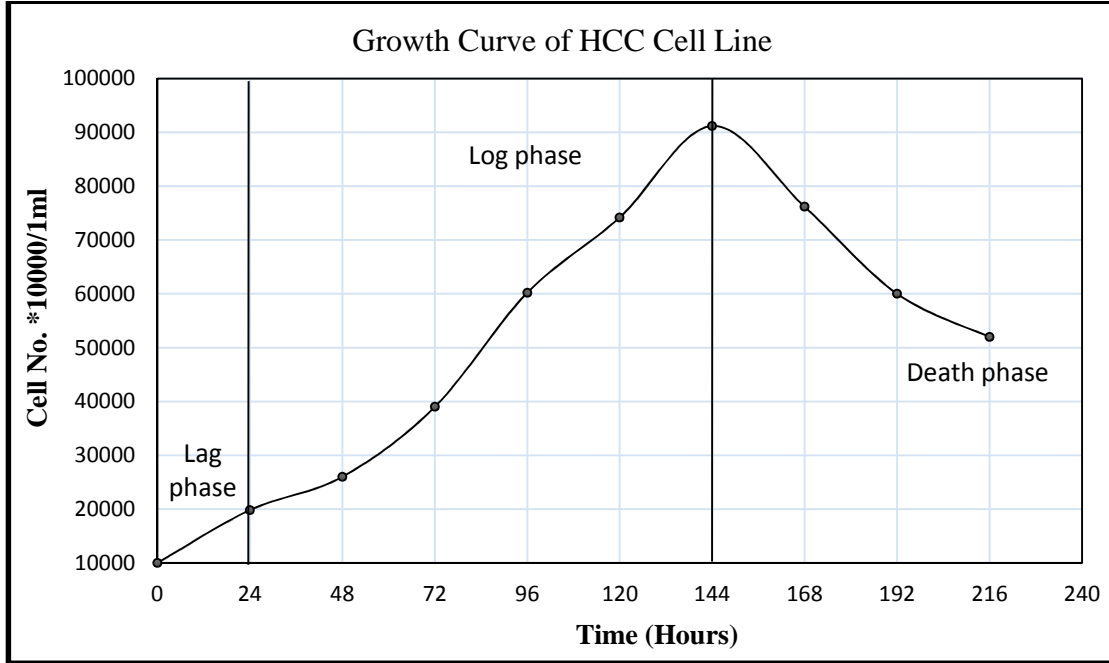
وأظهرت دراسة مظهرية لخط الخلايا السرطانية (MHCC97) Metastatic HCC مع إمكانية الإنتقالية الكبيرة إذ يصل إلى أكثر من 90 تمريرة في 18 شهر ، أن خلايا هذا الخط تنمو بصورة مستعمرات وتكوّن طبقة أحادية من الخلايا ظهارية المظهر مغزلية متطاولة مع نواة بارزة مع حدود واضحة للخلايا ، وكشفت معظم الخلايا الفردية على نسبة كبيرة من الأنوية غير النظامية البارزة (Tian et al., 1999). كذلك تمت دراسة خط الخلايا الكبدية Human hepatoma cell line (Hep 3B) من قبل الباحث Hay و آخرين (2013) ، إذ أن الخصائص المظهرية لخلايا هذا الخط شبيهة بخلايا الكبد البرنكيميية Hepatocytes.

و درس الباحث Lacoste وآخرون (2017) خط الخلايا السرطان الكبدي الفأري Hepa 1-6 ، وبينوا أن خلاياه تمتاز بالصورة الظهارية عند زرعها مختبرياً ؛ بالإضافة إلى ذلك أن نمو خلايا هذا الخط يكون بصورة تجمعات متقاربة عن بعضها بعضاً. وكذلك يتميز الخط السرطاني الفأري H22 بأن خلاياه تكون شبيهة بالخلايا الكبدية البرنكيميية الطبيعية وهذا ما يتفق مع النتائج التي توصلنا إليها (Zhao et al., 2014).

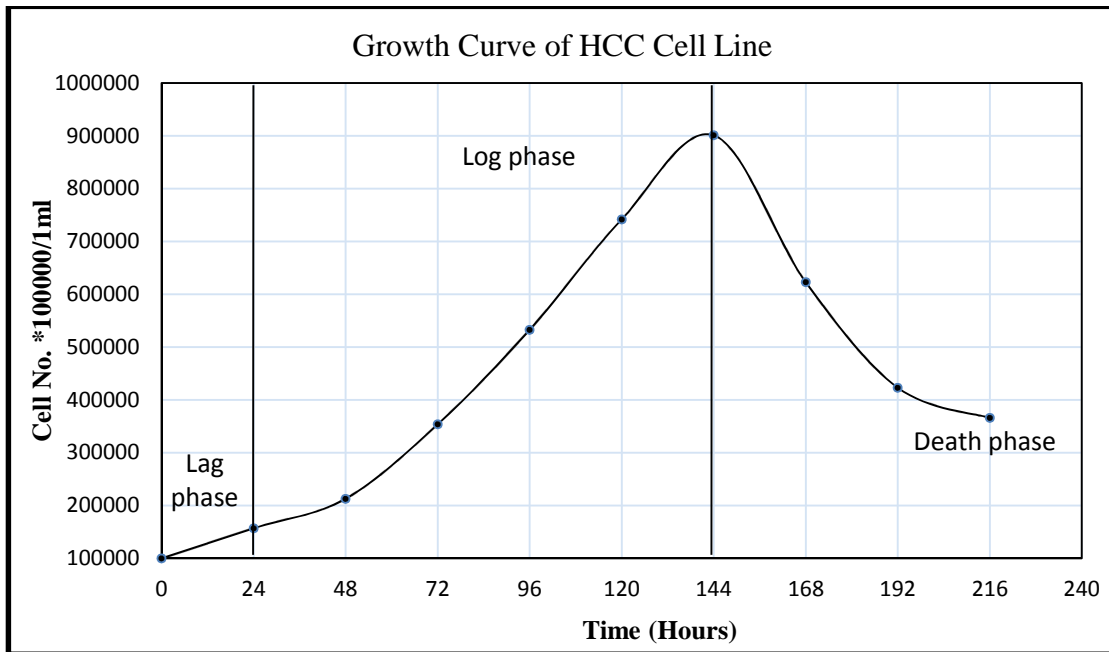
2-1-4 منحنى النمو ومعدل زمن التضاعف Growth curve and Population doubling time

تم تطبيق منحنيات النمو (مخطط 1-4 ومخطط 2-4) على خط خلايا سرطان الكبد HCAM للفأر الأبيض وللمريرة 26 لأعداد الخلايا 10000 و 100000 خلية/1 مل وذلك لتقييم خصائص نموها والتي تظهر مباشرة بعد الزرع النسجي ، إذ إنّ الخلايا السرطانية تمر بأطوار مختلفة عبر نموها في المزرعة الخلوية ، وهي ما تسمى بدورة الخلية Cell cycle أو دورة الإنقسام Division cycle ، وتعد دورة الخلية واحدة من العوامل الحيوية المهمة في مجال أبحاث السرطان ، وكلما قصرت هذه الدورة كلما ضعف بقاء مرض السرطان على قيد الحياة (Daukste et al., 2012). وأظهرت النتائج وجود أطوار مختلفة لنمو خلايا الخط الورمي HCAM وأنّ أطوار منحنيات النمو تمثل طريقة لمعرفة مدى استجابة الخلايا للتغيرات

في الظروف المحيطة بها (Mohammad *et al.*, 2015) ، كذلك تم ملاحظة وجود فروق بين معدلات زمن تضاعف الخلايا (PDT) Population Doubling Time) للمنحنيين.



مخطط (1-4) : منحنى النمو لخط خلايا سرطان الكبد HCAM 10000 خلية/1مل



مخطط (2-4) : منحنى النمو لخط خلايا سرطان الكبد HCAM 100000 خلية/1مل

وبينت النتائج التي توصلنا إليها أن جميع الخلايا متماثلة عند طور السكون Lag phase (24 ساعة) عند أعداد 10000 خلية/1مل في المخطط (1-4) وأعداد الخلايا 100000 خلية/1مل في المخطط (2-4) ، ولا تحصل زيادة لأعداد الخلايا في هذا الطور وإنما تتعلق هذه المرحلة بالتصنيع الخلوي لعوامل نمو الخلايا التي تتطلبها وبعدها تهيئة الخلايا للإنقسام إذ هو

الوقت المتطلب لتعافي الخلايا من عملية التعرض للتريبسين Trypsinization ، وإعادة بناء الهيكل الخلوي لها (Freshney, 2010). وبين الباحث Rolfe وآخرون (2012) أن طول هذا الطور يعتمد على الوسط الغذائي والتراكيز الأولية للخلايا المزروعة ، وأن هذه المدة قصيرة بالمقارنة مع بقية الأطوار إذ بدأت من نقطة الصفر عند كلا المنحنيين إلى 24 ساعة. وتتكيف الخلايا السرطانية في طور السكون من حيث التصاقها وانتشارها وتكوين شريط جديد من الحامض النووي DNA وكذلك تكوين العديد من البروتينات التركيبية ؛ وكل ما تم ذكره أعلاه سيمكن الخلايا من الدخول بدورة جديدة (Iloki et al., 2013). وقد توصل الشمري (2003) إلى أن قوة التصاق الخلايا تزداد مع إزدياد تركيز المصل والذي يكون بداية إنتشار و إتصال و نمو الخلايا و تكاثرها فكلما كان الإلتصاق قليلاً كان معدل النمو قليلاً ، إذ تكون إحتياجات خلايا سرطان الكبد المثالية من المصل هي 10 % وعند عدم إستعمال المصل تبقى أغلب الخلايا طافية كعالق خلوي.

ولاحظنا أن مدة الطور اللوغارتمي Log phase طويلة مقارنة ببقية الأطوار إذ يتراوح طوله في المنحنيين من 24 ساعة إلى 144 ساعة مخطط (1-4) و (2-4) ، ودخل خط خلايا HCAM بمرحلة الزيادة الأسية في الأعداد الخلوية ، إذ تبدأ الخلايا المفردة بالإنقسام للوصول إلى أعلى معدل لإنقسام الخلايا وهو ما يسمى بمعدل زمن التضاعف (PDT) وبعدها يتم حصول زيادة في تراكيز الخلايا (Freshney, 2005) ، وتحصل كذلك زيادة في الكثافة الخلوية بصورة تتناسب طردياً مع مرور الوقت المناسب للنمو (Ding et al., 2016) ، وأن أهمية الطور اللوغارتمي هو في التعرف على إستجابة الخلايا لمختلف المثبطات والظروف المحفزة للنمو والعقاقير والمواد الكيميائية ، ويعد مؤشراً جيداً لملاحظة الخلايا المزروعة بمرور الوقت إذ بالإمكان حساب منتجات الخلايا العديدة في هذا الطور ، ويستعمل أيضا في قياس معدل إنقسام الخلايا (Iloki et al., 2013).

وعبر دراستنا لأطوار نمو خط خلايا سرطان الكبد ؛ لم يتم تحديد طور الإستقرار Stationary phase بسبب سرعة نمو الخلايا الورمية. وبين الباحث Mohammad وآخرون (2015) حصول تداخل بين الطور اللوغارتمي و طور الثبات في الخطوط الخلوية السرطانية لذا من الصعب تحديده في منحنى النمو. وتحصل زيادة في تراكيز الخلايا المزروعة في هذا الطور نتيجة لإستهلاك الوسط الزرعى أو تراكم المنتجات الأيضية أو تكون طبقة أحادية تغطي الخلايا.

وإمتد طور الإنحدار Decline phase في دراستنا من 144 ساعة في المنحنيين لغاية 240 ساعة وهو الوقت قيد الدراسة مخطط (1-4) ومخطط (2-4) على التتالي. وبين الباحث Nyström (2007) أن وجود هذا الطور يكون نتيجةً لموت الخلايا ؛ إذ تحدث زيادة في أعداد الخلايا الميتة على حساب الخلايا الناتجة من الإنقسام الخلوي وبعدها تقل تراكيز الخلايا وتدخل مرحلة الشيخوخة.

وعبر دراستنا لمعدل زمن التضاعف PDT في الطور اللوغارتمي للمنحنيين ؛ تمت ملاحظة وجود فروقات بين معدلات زمن التضاعف لخط الخلايا الورمية HCAM ، إذ كان معدل PDT لأعداد الخلايا 10000 خلية/1مل هو 54 ساعة بينما كان لأعداد الخلايا 100000 خلية/1مل هو 47 ساعة. ويعد معدل زمن التضاعف هو المدة الزمنية اللازمة للحصول على

كمية من الخلايا السرطانية تتضاعف في الحجم أو الكتلة (Chu *et al.*, 2011) ، ويعد المقياس الأكثر دقة لزم من تضاعف الخلايا الورمية المزروعة مختبرياً (Stacey and Davis, 2007). ويختلف PDT بحسب أنواع خطوط الخلايا السرطانية وحسب قابلية نموها ، إذ درست العديد من الدراسات هذا المعدل لخطوط خلايا مختلفة (Cheung *et al.*, 2014 ; Hay *et al.*, 2013). وإتفقت النتائج التي حصلنا عليها مع دراسة الباحث Nakabayashi وآخرين (1982) لخط الخلايا الكبدية السرطانية Huh7 ، إذ إن معدل تضاعف خلايا هذا الخط عند نموه في وسط زرعي كيميائي هو 44-56 ساعة. وأفادت العديد من الأبحاث تأثير البيئة الذي تعد واحداً من أخطر العوامل التي تؤثر على طبيعة السرطان ، بالإضافة إلى وجود الطفرات الجينية (Roger, 2000).

2-4 وظائف الكبد Liver functions

1-2-4 الوظائف الكيمياحيوية لإنزيمات الكبد Liver biochemical tests

أظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً ($P \leq 0.05$) في مستويات فعالية الإنزيمات الكبدية (ALT ، AST ، GGT ، LDH و CRP) وحدة/لتر كما في جدول (1-4) ، إذ لوحظ إن مستويات هذه الإنزيمات أرتفعت في خط خلايا سرطان الكبد HCAM وللتمريرة الثامنة بالمقارنة مع الخلايا الكبدية الطبيعية الجنينية وخلايا الفئران الطبيعية البالغة.

جدول (1-4) : الوظائف الكيمياحيوية لأنزيمات الكبد

المعدل ± الخطأ القياسي لخط خلايا سرطان الكبد HCAM (التمريرة الثامنة) بوحدّة قياس IU/l	المعدل ± الخطأ القياسي لخلايا كبد طبيعية للفئران البالغة (3-6 أشهر) بوحدّة قياس IU/l	المعدل ± الخطأ القياسي لخلايا كبد طبيعية لأجنة الفئران (3-4 أيام) بوحدّة قياس IU/l	إنزيمات الكبد
c 52.94 (± 0.76)	b 18.90 (± 0.64)	a 07.35 (± 0.50)	ALT
c 53.06 (± 0.47)	b 26.23 (± 0.72)	a 16.27 (± 0.37)	AST
c 63.63 (± 0.48)	b 37.67 (± 0.97)	a 09.07 (± 0.69)	GGT
b 390.67 (± 1.46)	a 136.77 (± 1.22)	a 133.33 (± 1.86)	LDH
c 10.50 (± 1.47)	b 01.93 (± 0.40)	a 00.25 (± 0.02)	CRP

المعدل ± الخطأ القياسي

الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية $P \leq 0.05$

الحروف المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية $P \leq 0.05$

كشفت نتائج العمل الحالية إن الإرتفاع في مستويات إنزيمات الكبد هي واحدة من المؤشرات الأكثر شيوعا في الممارسة السريرية لمرضى سرطان الكبد (Giannini *et al.*, 2005). عند قيامنا بقياس فعالية الإنزيمات في خلايا الكبد المتحللة ، وجدنا أن هناك إرتفاع معنوي في إنزيمي ALT و AST مقارنة مع نفس العدد من خلايا الكبد المتحللة الطبيعية والمأخوذة من الأجنة والفئران البالغة الطبيعية. إذ يتم إطلاق إنزيمي ALT و AST بكميات كبيرة من خلايا الكبد التالفة إلى الدم ، وتم ملاحظة أن أنشطة هذه الإنزيمات تعد كأدوات فعالة للكشف عن سرطان الخلايا الكبدية على نطاق واسع (Prati *et al.*, 2002). وترتفع مستويات هذه الإنزيمات بسبب زيادة (vitamin B6) pyridoxal-5'-phosphate (Rossouw *et al.*, 1978). أن نسبة إنزيمي ALT/AST في خط خلايا HCAM كانت تمثل واحد بينما كانت في الخلايا العادية أعلى من واحد (2.2 للأجنة و 1.3 لخلايا الكبد البالغة)، ووجد Liu وآخرين (2007) ، أن نسبة ALT/AST تتخفف بشكل معنوي عند المرضى الذين يعانون من سرطان الخلايا الكبدية HCC أكثر من الذين لا يعانون من هذا المرض ، وجاءت هذه النتائج لتؤكد النتائج التي توصلنا إليها. وأشار كل من Limdi و Hyde (2003) أن الإطلاق المفاجئ لخزانات ال aminotransferases داخل الخلايا الورمية و قصر دورة حياتها short half life التي تتراوح 1-2 أيام هما السبب الذي يجعل مستويات AST و ALT تستجيب إستجابة سريعة وترتفع بسرعة عند تعرض الخلايا الكبدية للإصابة.

وقد لوحظت زيادة كبيرة في مستوى فعالية إنزيم الكبد GGT في خط الخلايا الجديد (HCAM). إذ إن التعبير العالي لهذا الإنزيم (والذي غالبا ما يتواجد في الأورام) له أثرا واضحا في تطور وغزو الورم ومقاومة الورم للأدوية ، كما أن إنزيم سطح الخلايا GGT يشارك في توازن الجلوتاثيون الخلوي cellular glutathione homeostasis (Pompella *et al.*, 2006). وإتفقت النتيجة التي توصلنا إليها في دراستنا مع دراسة Van Hemelrijck وآخرين (2011) ، إذ أثبتوا أن إرتفاع هذا الإنزيم يعد مؤشرا خطرا للإصابة بسرطان الخلايا الكبدية. ويقع GGT على الجانب الخارجي من الغشاء البلازمي لخلايا الكبد والذي غالبا ما يطلق بمستويات عالية في مجرى الدم عند وجود الأورام الكبدية (Whitfield, 2001). وبين كل من Miermans و Van Oyen (2002) أن إرتفاع مستوى فعالية GGT في الكبد يكون نتيجة للضرر الملحق بأغشية خلايا الكبد أو بواسطة زيادة نمو و تجديد الخلايا نتيجة للنظام الإنزيمي الحيوي.

وأظهرت نتائجنا زيادة ملحوظة في مستوى فعالية إنزيم LDH في خط الخلايا السرطانية الكبدية مقارنة مع خلايا الكبد الطبيعية. وبين الباحثين أن الأنسجة الكبدية الطبيعية لديها مستوى نشاط واضح للإنزيم اعتمادا على وظيفته ، لكن يزداد مستواه إستجابة لإصابة الأنسجة الكبدية بالسرطان (Kubackova *et al.*, 2015). و يعد سبب إطلاق هذا الإنزيم بكميات عالية هو أن الخلايا السرطانية تعتمد على التنفس اللاهوائي لتحويل الكلوكوز glucose إلى اللاكتات lactate حتى في ظل ظروف كافية من الأوكسجين (Augoff *et al.*, 2015) ، وإن

LDH له أثرا رئيسيا في تنظيم تحلل السكر عن طريق تحفيز الخطوة النهائية من التحلل السكري اللاهوائي ، وأن زيادته سوف تسهل من كفاءة التحلل اللاهوائي في الخلايا السرطانية وتقلل من اعتمادها على الأوكسجين (Miao *et al.*, 2013). وكشفت الدراسات إن هناك خمس أنواع لإنزيم LDH في أنسجة الكائنات الحية ، وكل منها عبارة عن إنزيم إستقلاب رباعي يتكون من وحدتين رئيسيتين هما M و H (رسميا A و B) ، وعندما تكون سلاسل A أكثر من سلاسل B ، فإن إنزيم LDH يصبح أكثر كفاءة في تحفيز تحويل البيروفات إلى اللاكتات في النوع LDHA ، وبعدها يزداد هذا النوع من الإنزيم في الخلايا السرطانية. ويعد LDHA النوع الأكثر وجودا كعلامة بيولوجية لكثير من الأورام الخبيثة بما في ذلك سرطان الخلايا الكبدية ، كذلك ثبت اعتماد الخلايا السرطانية على LDHA في نماذج الفئران (Augoff *et al.*, 2004 ; Sola-Penna, 2008).

وتم التوصل من خلال نتائجنا إلى وجود إختلافات في مستوى فعالية CRP بين خط خلايا سرطان الكبد وخلايا الكبد الطبيعية ، وتم إيجاد المستوى العالي من هذا الإنزيم في الخلايا السرطانية الكبدية. وأن مستويات فعالية CRP تزداد مئات الأضعاف كاستجابة للعدوى والالتهابات ، وخاصة في حال وجود السرطان. وتعد مستوياته علامة تشخيصية واضحة لوجود ورم HCC (Dufour, 2013). ويرتبط المستوى العال لإنزيم CRP إرتباطاً كبيراً مع وجود غزو الورم للأوعية الدموية ومع كبر حجم الورم في مرضى سرطان الكبد (Lim *et al.*, 2011). وأن أحد التفسيرات المحتملة لتوضيح الآلية الجزيئية لإرتفاع هذا البروتين عند مرضى سرطان الكبد، هو أن مادة Interleukin-6 (IL-6) المفروزة من الجهاز المناعي والتي تعد المنظم الرئيسي لإنزيم CRP إزداد وجودها حول الورم السرطاني مشيرة إلى بداية حدوث الالتهاب وإرتفاع البروتين في الخلايا الكبدية وبالتالي تطور الورم (Park *et al.*, 2010).

2-2-4 مستويات بروتينات المعلمات الورمية للكبد Liver tumor marker proteins levels

أظهرت الخلايا السرطانية HCAM وللتمريرة الثامنة مستويات بروتينات عالية معنوياً ($P \leq 0.05$) للمعلمات الورمية (AFP ، CEA و CA19-9) وحدة/مل كما في جدول (2-4) ، بالمقارنة مع الخلايا الجنينية والبالغة للفئران الطبيعية.

جدول (2-4) : وظائف المعلمات الورمية للكبد

المعلمات الورمية	المعدل \pm الخطأ القياسي لخلايا كبد طبيعية للفئران البالغة (3-6 أشهر) بوحددة قياس IU/ml	المعدل \pm الخطأ القياسي لخط خلايا سرطان الكبد HCAM (التمريرة الثامنة) بوحددة قياس IU/ml
AFP	a 00.71 (\pm 0.02)	b 24.23 (\pm 0.77)
CEA	a 01.25 (\pm 0.03)	b 15.26 (\pm 0.61)
CA19-9	a 01.14 (\pm 0.07)	b 15.54 (\pm 0.94)

المعدل \pm الخطأ القياسي

الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية $P \leq 0.05$

الحروف المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية $P \leq 0.05$

عند قيامنا بفحص مستوى تعبير العلامة الورمية ألفا فيتو بروتين AFP ، تمت ملاحظة وجود تعبير عالٍ لها في خلايا الخط السرطاني HCAM مقارنة مع إنخفاضها في الأجنة والفئران البالغة الطبيعية. وأظهرت العديد من الدراسات أن المستويات المرتفعة من تعبير AFP هي عامل خطر مستقل لتطویر سرطان الكبد ، وتم إثبات أن مستويات هذا البروتين قد أنخفضت تدريجيا بعد الولادة ، ووصلت إلى مستويات منخفضة في البالغين الطبيعيين ، وهذا ما يتفق مع النتائج التي توصلنا إليها (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2007). وعلى الرغم من أن بروتين AFP لا يزال المعيار الذهبي بين العلامات التشخيصية لسرطان الخلايا الكبدية ، إلا إن قيمته التشخيصية يكون مشكوكا بها ، وذلك بسبب ضعف حساسية وخصوصية الفحص (Jirun *et al.*, 2011). وقد أشار العديد من الباحثين إلى أن إرتفاع مستوى تعبير AFP لا يكون مؤشرا محتما و أكيدا لوجود سرطان الكبد وإنما يكون إرتفاعا موحيا فقط ، لذا يجب تحسين قيمة هذا الإختبار عن طريق حساب علامات تشخيصية أخرى (Kim *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2006). وغالبا ما ترتبط مستويات تعبير AFP مع حجم الورم في سرطان الخلايا الكبدية ، وإن زيادة هذه العلامة تشير إلى نمو الورم (Ertle *et al.*, 2013).

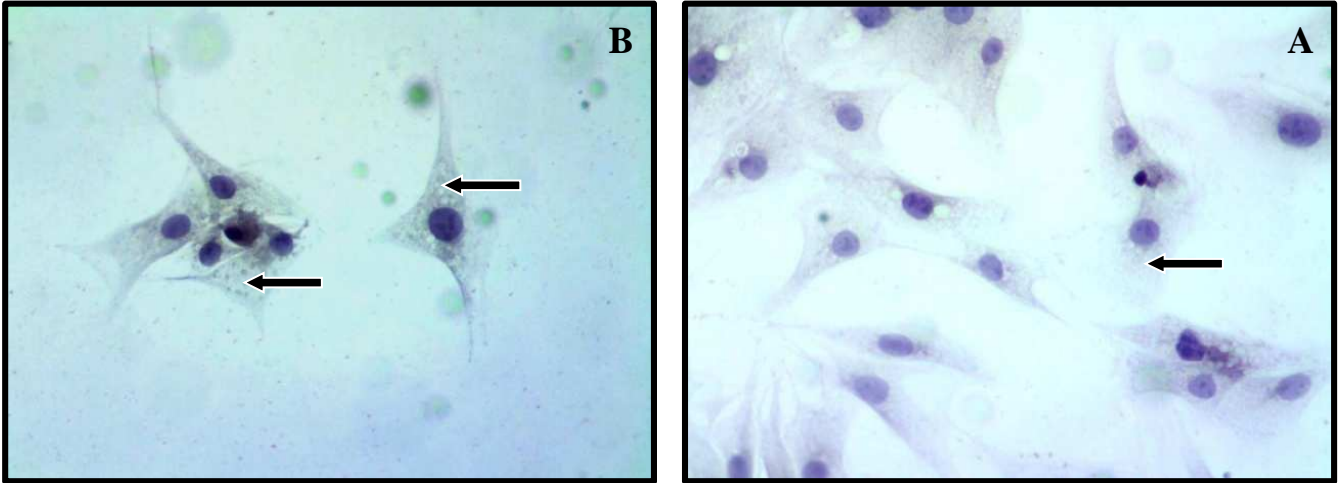
ولاحظنا زيادة في مستوى تعبير العلامة CEA في خط الخلايا السرطانية الكبدية. وأن هذا الإرتفاع يرتبط مع البقاء على قيد الحياة لمرضى سرطان الكبد ، ويعد إرتفاع مستوى تعبير CEA كعامل تشخيصي مستقل لسرطان الخلايا الكبدية (Zhao *et al.*, 2014). وبين مجموعة من الباحثين إن مستويات CEA في المرضى الذين يعانون من سرطان الكبد أعلى بكثير من

المجموعة التي لا تعاني من هذا المرض (Attallah *et al.*, 2006). وإتفقت النتيجة التي توصلنا إليها مع دراسة Kakar وآخرين (2007) ، إذ بينوا إن البروتين السكري CEA يوجد في الخلايا الظهارية الكبدية الجنينية البالغة الطبيعية بكميات قليلة ، وعند تعرض الخلايا للورم سيزداد البروتين وينتشر في السائتوبلازم بنسبة عالية. وأن إرتفاع مستوى CEA يكون راجعا إلى إطلاقه من الخلايا الورمية إلى الأوعية الدموية ، وأن الخلايا الكبدية البرنكيمية الطبيعية تقوم بتحليل CEA ، وعند تعرض هذه الخلايا إلى الورم سيحصل تدهور في عملها وبعدها لا يحصل تحلل لهذا البروتين ويزداد في الخلايا السرطانية ؛ ونتيجة لذلك تحصل له زيادة في مجرى الدم (Thomas *et al.*, 1990). وأعتقد Carpelan-Holmstrom وآخرون (2002) أن مستويات CEA المرتفعة تكون بسبب حساسيته المختلفة للأورام.

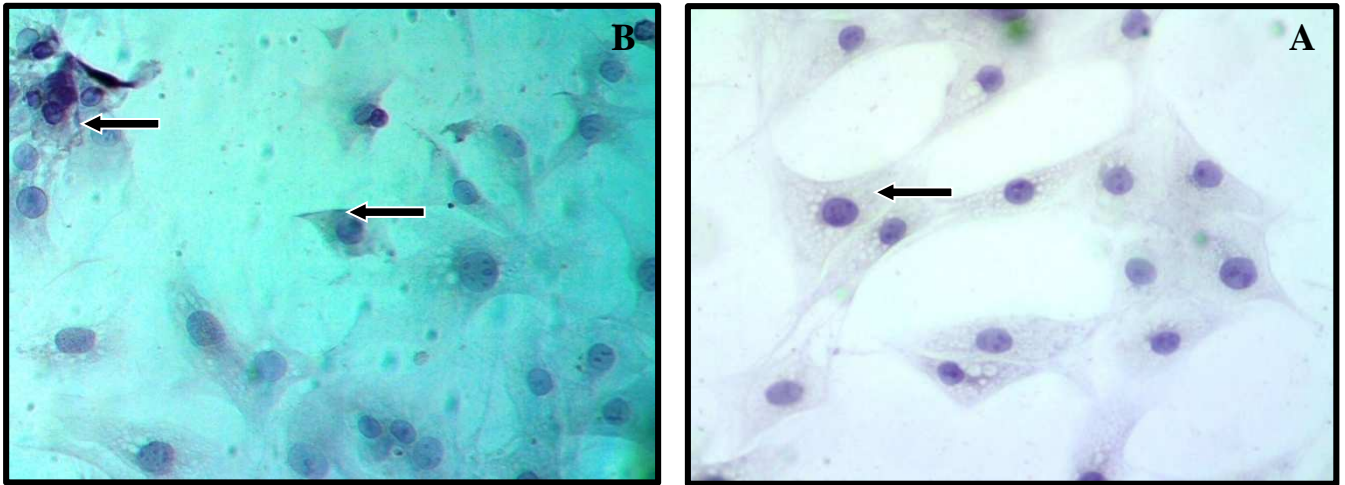
وكذلك تم تحقيق قيم مرتفعة معنويا في دراستنا من مستوى تعبير العلامة الورمية CA 19-9 في الخط الكبدى الورمي HCAM ، بالإضافة إلى ملاحظتنا لمستوياته المنخفضة في خلايا الكبد الطبيعية. إذ إرتبطت الزيادة في مستوى تعبير CA19-9 مع زيادة معدل الوفيات في المرضى الذين يعانون من سرطان الكبد (Kim *et al.*, 2009). ويعد السبب في إرتفاع مستوى CA19-9 هو إنسداد القناة الصفراوية (Strom *et al.*, 1989) ، إذ يتم تصنيع هذا البروتين بواسطة الخلايا الظهارية الصفراوية الطبيعية (Yuan *et al.*, 2011). وعند تكون الورم في الكبد ، ينشأ ضغط على الشجرة الصفراوية من قبل الكتلة الورمية و يسبب إنسداد القنوات الصفراوية الصغيرة ، وبعدها تنتج زيادة في مستواه في المصل (Lu *et al.*, 2011).

3-4 الدراسة الكيميانسجية المناعية لخط خلايا سرطان الكبد Immunohistochemistry study for HCAM cell line

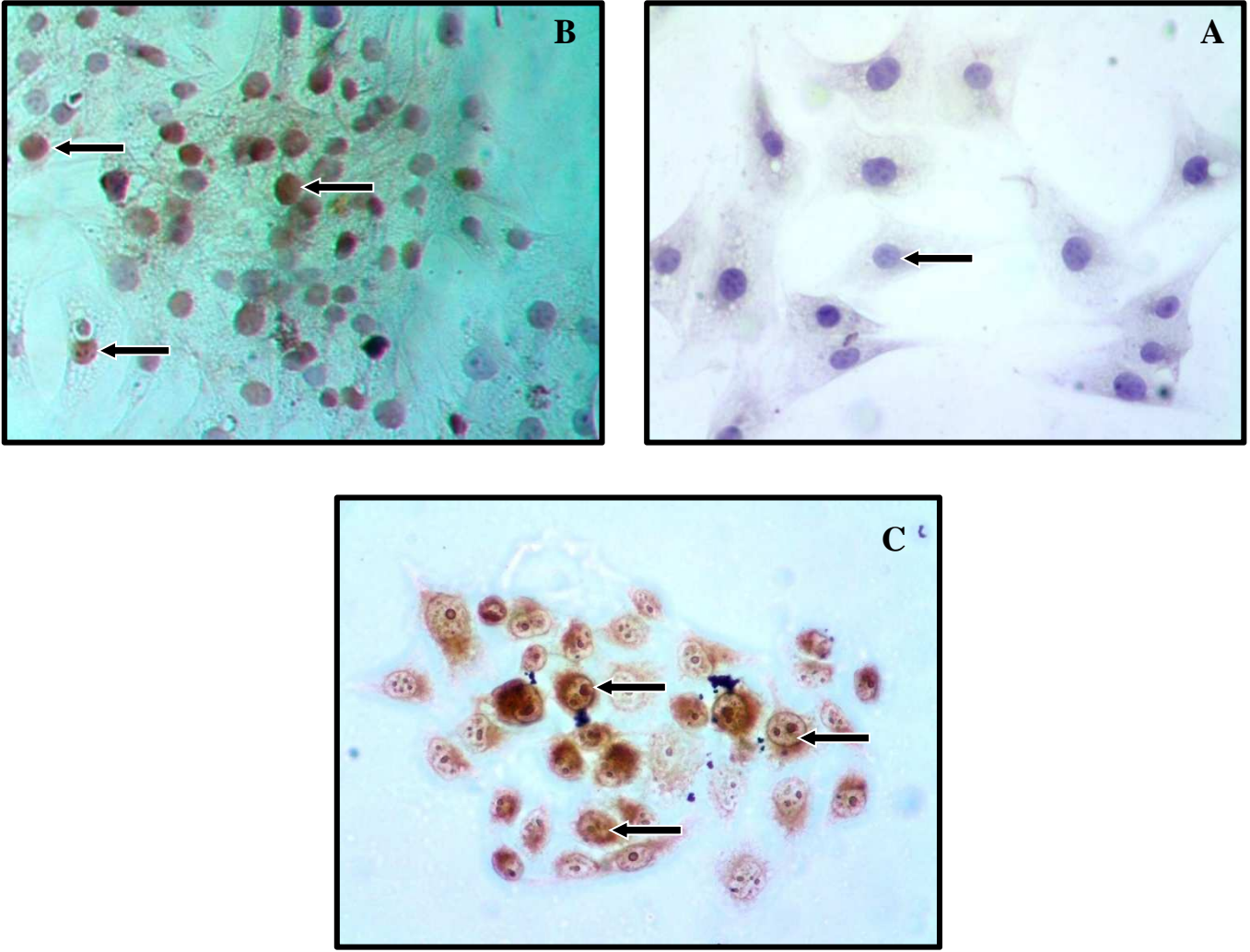
يوجد العديد من الإنزيمات المناعية داخل خلايا الكبد إذ تتأثر هذه الإنزيمات عند تعرض الخلايا الكبدية إلى السرطان ، وبينت الدراسة التي توصلنا إليها تغير بعض الإنزيمات داخل خط خلايا سرطان الكبد HCAM وللتمريرة الخامسة ، ولوحظ من الصورة (B 4-4) التعبير السالب للإنزيم المناعي GSTM1 لخط خلايا سرطان الكبد HCAM مقارنة مع عينة السيطرة السالبة للخط نفسه كما في صورة (A 4-4) ، كما أظهر خط خلايا سرطان الكبد HCAM التعبير الضعيف الموجب للإنزيم المناعي GSTT1 في سائتوبلازم الخلايا الكبدية الورمية كما في صورة (B 5-4) مقارنة مع عينة السيطرة السالبة لهذا الإنزيم كما في صورة (A 5-4) ، و لوحظ في صورة (B 6-4) التعبير الموجب للبروتين المناعي P53 في أنوية خط خلايا سرطان الكبد مقارنة بعينة السيطرة السالبة له كما في صورة (A 6-4) ، ومقارنة بعينة السيطرة الموجبة لبروتين ال P53 في أنوية و سائتوبلازم خلايا سرطان عنق الرحم HeLa للتمريرة 30 (C 6-4).



صورة (4-4) : (A) السيطرة السالبة لمستوى فعالية إنزيم GSTM1 ← في خلايا سرطان الكبد
 للتمريرة الخامسة بقوى تكبير 400x ، (B) مستوى الفعالية السالبة لإنزيم GSTM1 ← في خط
 خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة نفسها بقوى تكبير 400x



صورة (5-4) : (A) السيطرة السالبة لمستوى فعالية إنزيم GSTT1 ← في خلايا سرطان الكبد
 للتمريرة الخامسة بقوى تكبير 400x ، (B) المستوى الضعيف الموجب لإنزيم GSTT1 ← في
 سايوتوبلازم خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة نفسها بقوى تكبير 400x



صورة (4-6): (A) السيطرة السالبة لتعبير بروتين P53 ← لأنوية خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة الخامسة بقوى تكبير 400x ، (B) التعبير الموجب للبروتين P53 ← لأنوية خط خلايا سرطان الكبد HCAM للتمريرة نفسها بقوى تكبير 400x ، (C) السيطرة الموجبة لتعبير بروتين P53 ← لأنوية خط خلايا سرطان عنق الرحم HeLa للتمريرة 30 بقوى تكبير 400x

عند قيامنا بدراسة مستويات فعالية الإنزيمات المناعية داخل خلايا الكبد المزروعة والمأخوذة من خط خلايا سرطان الكبد HCAM ، وجدنا أن هناك مستوى فعالية سلبية للإنزيم المناعي GSTM1 ومستوى فعالية إيجابية ضعيفة للإنزيم المناعي GSTT1 مقارنة مع عينات السيطرة لهما. وأظهرت بعض الدراسات أن زيادة مستويات إنزيمات GSTM1 و GSTT1 تؤدي إلى أيض مادة الأفلاتوكسين Aflatoxin B1-epoxide (AFB1-epoxide) الناقل المسرطن إلى مادة غير مسرطنة قابلة للذوبان بشكل كبير إذ يمكن إفرازها من الجسم ، مما يقلل من مخاطر سرطان الكبد HCC والعكس صحيح (Kirk et al., 2005) ، كما بين Bhattacherjee وآخرون (2013) أن قلة مستويات هذه الإنزيمات لدى مرضى HCC يؤدي إلى غياب كامل للنشاط الإنزيمي ، وأن سبب إنخفاضها في الخلايا الكبدية الورمية يكون بسبب التدفق الخلوي إذ تعمل هذه الإنزيمات على عدم توازن العوامل المؤكسدة والمضادة للأكسدة الموجودة على سطح الخلايا الكبدية لدى مرضى سرطان الكبد. ووجدت دراسة أن إنخفاض

مستوى فعالية إنزيم GSTM1 في مختلف أنواع السرطانات وخاصة في سرطان الخلايا الكبدية أعطى مؤشراً واضحاً إلى عدم قدرة الخلايا على إزالة السموم بوضع جيد وبعدها يؤدي إلى تعرض الخلايا الكبدية للسرطان ، وهذا ما يتفق مع النتائج التي توصلنا إليها (Li *et al.*, 2012). بالإضافة إلى ذلك ، إن هذا الانخفاض يمكن أن يؤدي إلى وجود مستوى عال من الأفلاتوكسين (Zhang *et al.*, 2005).

لاحظنا أيضاً إيجابية تعبير البروتين الكابح للأورام P53 لخط الخلايا الكبدية السرطانية مقارنة بعينة السيطرة ، وأن التعبير العالي لهذا البروتين في المصل أو النسيج الكبدي لمرضى HCC يكون مرتبطاً مع تشخيص الورم وبقاء المريض على قيد الحياة لأوقات أقصر (Liu *et al.*, 2012). ويزداد نشاط بروتين P53 في حالة وجود ورم في الكبد لأن واحدة من أهم السمات المميزة لسرطان الخلايا الكبدية HCC هي اضطراب عملية الأيض و حصول تغيرات ملحوظة في الطاقة الحيوية ، وأن هذا البروتين يكون مسؤولاً عن التغيرات الأيضية التي تنشأ في الخلايا الكبدية الورمية أي يمتلك قدرة على تنظيم عملية التمثيل الغذائي ويشارك أيضاً في إصلاح الحمض النووي DNA داخل الخلايا الكبدية (Kim *et al.*, 2016). وأن تنظيم بروتين P53 في الفئران يأتي من قبل Murine Double Minute 2 (MDM2) إذ إن MDM2 يعمل عملاً مثبطاً لبروتين P53 عن طريق منع نشاطه النسخي وتعزيز تصديره إلى النواة (Manfredi, 2010) ، وأن التوازن بين MDM2 و P53 يكون موجود في خلايا الكبد الطبيعية ، لكن عند تعرض خلايا الكبد للسرطان سيتعطل هذا التوازن وهذا سيؤدي إلى منع ارتباط MDM2-p53 ، و يقود إلى إعادة نشاط تعبير بروتين P53 وزيادته داخل الخلايا السرطانية الكبدية (Brown *et al.*, 2011). ويمكن تفسير وجود مستوى تعبير بروتين P53 بشكل متزايد بسبب حدوث تفاعلات كيميائية للمواد المسرطنة ، ووجود إختلافات وراثية داخل الخلايا الورمية (Zhang, 2010). وقد تم التوصل من خلال دراستنا إلى أن بروتين P53 يمتلك تعبيراً إيجابياً لخط خلايا عنق الرحم السرطانية HeLa cell line (السيطرة الموجبة) ، وأن هذا التعبير يكون ناجماً عن مستويات تعبير p53 المتزايدة في الأنسجة الورمية مقارنة بالأنسجة الطبيعية البشرية لعنق الرحم (Kong *et al.*, 2015). وفي دراسة للباحث Artanti وآخرين (2017) تم فيها تقييم تعبير بروتين p53 بواسطة الدراسة الكيميائية المناعية على خط خلايا HeLa البشرية ، إذ ظهر هذا البروتين بشكل واسع داخل الخلايا الورمية وبتصنيف بني اللون للنواة والسيتوبلازم نتيجة للورم.

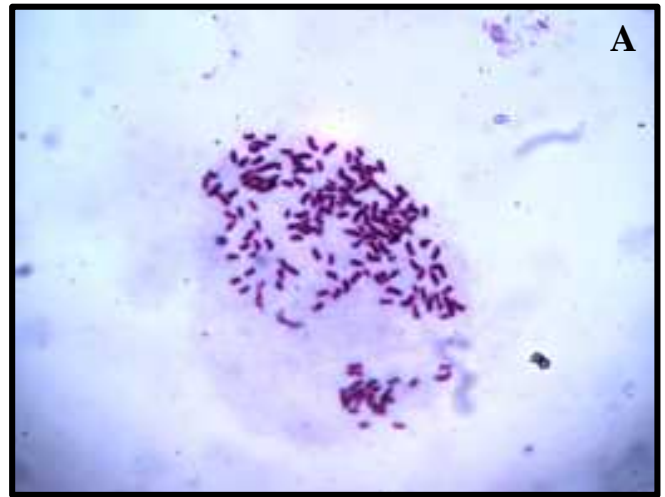
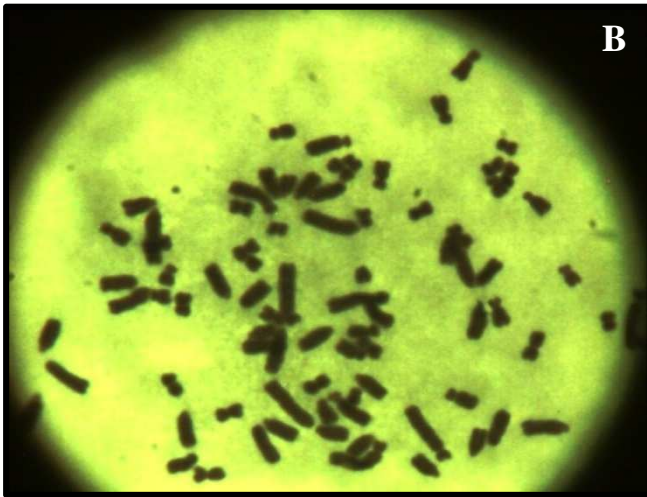
4-4 الدراسة الوراثية الخلوية لخط خلايا سرطان الكبد Cytogenetic study for HCAM cell line

أظهرت نتائج الدراسة الوراثية التي حصلنا عليها من خلال دراستنا للخريطة الكروموسومية للخلايا الكبدية السرطانية للخط الفأري HCAM وللتمريرة 12 وبالساعة الواحدة لوقت الكولسيميد وجود تغيرات عديدة في الكروموسومات ، إذ بين Shahrour وآخرون (2016) أن الخلايا الكبدية الطبيعية للفأر السويسري الأبيض تحتوي على 40 كروموسوم وهو العدد الأصلي للصبغيات في الفئران المختبرية كما في صورة (4-7) ، بينما توصلنا في هذه الدراسة إلى أعداد مضاعفة من الكروموسومات تتراوح بين 83-155 كروموسوم كما في صورة (8-4 A , B). بالإضافة إلى ذلك لاحظنا وجود تغيرات تركيبية

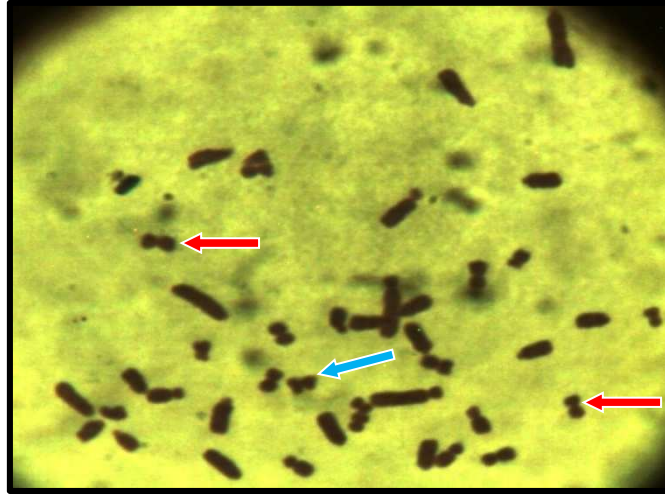
مختلفة Multi structural changes في العديد من الصبغيات ، مثل وجود Metacentric chromosome وظهور تكسر في الأذرع الكروموسومية إذ يظهر الكروموسوم بهيأة مفتوحة الأطراف كما في صورة (4-9) ، كما تمت ملاحظة أن العديد من الكروموسومات ذات طول غير طبيعي عند مقارنتها بالكروموسومات الأصلية كما في صورة (4-10). وأن هذه التغيرات الهيكلية غير الطبيعية ومن أصل غير معروف تعطي الكروموسومات تسمية .Marker chromosomes



صورة (4-7) : العدد الطبيعي (40) لكروموسومات الخلايا الكبدية للفأر الأبيض السويسري (Shahrour et al., 2016)



صورة (4-8) : (A) زيادة أعداد الكروموسومات إلى 155 كروموسوم في خلية كبدية ورمية لخط خلايا سرطان الكبد HCAM وبقوى تكبير 100x ، (B) زيادة أعداد الكروموسومات إلى 83 كروموسوم في خلية كبدية ورمية لخط الخلايا الورمي HCAM وبقوى تكبير 400x



صورة (4-9) : التغيرات التركيبية في كروموسومات خلية ورمية لخط HCAM ، إذ يبين المؤشر ← وجود كروموسومات من نوع Metacentric ، ويبين المؤشر ← وجود تكسر كروماتيدي وظهور الكروموسوم بهيأة مفتوحة الأطراف وبقوى تكبير 400x



صورة (4-10) : التغيرات التركيبية في كروموسومات خلية ورمية لخط HCAM ، إذ يبين المؤشر ← وجود العديد من الكروموسومات ذات الطول غير الطبيعي

كشفت النتائج التي تمت ملاحظتها في دراستنا لأعداد الكروموسومات في خط خلايا سرطان الكبد HCAM أن هناك أعداد مضاعفة وكبيرة من الصبغيات ، إذ أن الكائنات الحية حقيقة النواة عادة ما تحتوي على مجموعتين كاملتين من الكروموسومات المتماثلة والتي تسمى Haploid (1n) ، وعندما تتكاثر هذه المجموعتين جنسياً نحصل على عدد متكامل للكروموسومات في الكائن الحي والتي تدعى بإسم Diploid (2n) (Gentric and Desdouets, 2014) ، لكن عندما يحدث إنقسام غير طبيعي للخلايا خلال أطوار الإنقسام المختلفة وخاصة الطور الإستوائي سيؤدي ذلك إلى تغير عددي في مجموعة كاملة من الصبغيات ويطلق على هذه الحالة بتعدد الصبغيات Polyploidy (على سبيل المثال ، 4n أو 8n) (Shier, 2017).

وفي حالة سرطان الخلايا الكبدية HCC يحدث إختلال الصيغة الصبغية Aneuploidy ويكون شائعاً في هذه الخلايا الورمية ، إذ تحتوي الخلايا على أعداد كروموسومية غير طبيعية نسبة إلى زيادة أو نقصان في أعدادها (Zimonjic *et al.*, 2001). وأتفقت العديد من البحوث مع النتائج التي توصلنا إليها ، إذ قام Ogawa وآخرون (1999) بالكشف عن التغيرات الكروموسومية عن دراستهم للتحليل الوراثي الخلوي إذ كانت الأكثر تكراراً في خطوط الخلايا السرطانية ، ولاحظوا أن هناك أكثر من خط سرطاني كبدي يحتوي على عدد مضاعف من الكروموسومات (أي وجود نسختين أو أكثر من كل كروموسوم). وأن الحصول على صورة من صور عدم إستقرار الكروموسومات من المرجح أن يكون حدثاً مهماً في تنمية الورم ، ويقدم تفسيراً للعديد من الإنحرافات في الأنماط النووية التي غالباً ما نلاحظها في الأورام الخبيثة (Aleksic *et al.*, 2011). كما أشار Teoh وآخرون (2008) أن الخلايا الورمية الكبدية تحتوي على زيادات في الإنحرافات العددية والهيكلية للكروموسومات ، وأن شذوذ الصبغيات المكتشفة في سرطان الخلايا الكبدية في الفئران يلخص العديد من التغيرات الموصوفة في سرطان الخلايا الكبدية البشري (Lee *et al.*, 2004).

ولاحظنا كذلك العديد من التغيرات التركيبية المختلفة للكروموسومات عند تعرض الخلايا الكبدية للورم مثل ظهور تكسر في الكروموسومات ووجود Metacentric chromosomes وازدياد طول الصبغيات ، وبين الباحثين Okuda و Ishak (1987) أن هذه التغيرات غير الطبيعية في تركيب وطول الكروموسومات أدت إلى تسميتها Marker chromosomes ، وجاءت الكثير من الدراسات لتؤكد ما توصلنا إليه إذ بين الباحثين Rothfels و Parker (1959) إن الكروموسومات عادة ما تظهر بهيئة غير متجانسة ومتنوعة في خطوط الخلايا الورمية وتختلف إختلافاً ملحوظاً عن الكروموسومات الطبيعية للفأر الأبيض. كما تمت دراسة التحليل الجيني الخلوي لفئران مصابة تلقائياً بسرطان HCC من قبل Wu وآخرون (2002) ، إذ تم تحديد التغيرات الكروموسومية والتي تشترك بها كروموسومات محددة ومواقع كروموسومية معينة. وبين الباحث Beroukhim وآخرون (2010) أن سرطان الخلايا الكبدية يصيب الجينات الواقعة على كروموسومات الفأر الأبيض عند تعرضه للسرطان ويؤدي إلى حدوث تغيرات جينية داخل الكروموسومات.

وقامت إحدى الدراسات بتحليل التغيرات الكروموسومية في سرطان الخلايا الكبدية للفئران بإستعمال طريقة G-banding ، إذ درسوا التعديلات الخلوية المرتبطة بتطور الورم وكانت جميع الأورام تحتوي على إختلال الصيغة الصبغية مع وجود تعديلات هيكلية وعددية لكروموسومات الخلايا ، كما لاحظوا وجود تكسر كروماتيدي لبعض الكروموسومات مثل 4 و 9 و 14 و X بعد تعرض الخلايا الكبدية للورم ، وتم تحديد وجود نقل Translocation في الخلايا السرطانية الكبدية (Sargent *et al.*, 1999) ، وأن العيوب في مسار إصلاح الحمض النووي (تكسر أجزاء الكروموسوم مثلاً) تشارك في تعطيل دورة الخلايا مما يؤدي إلى عدم إستقرار الكروموسومات وتسارع تطور سرطان الكبد (Teoh *et al.*, 2008).

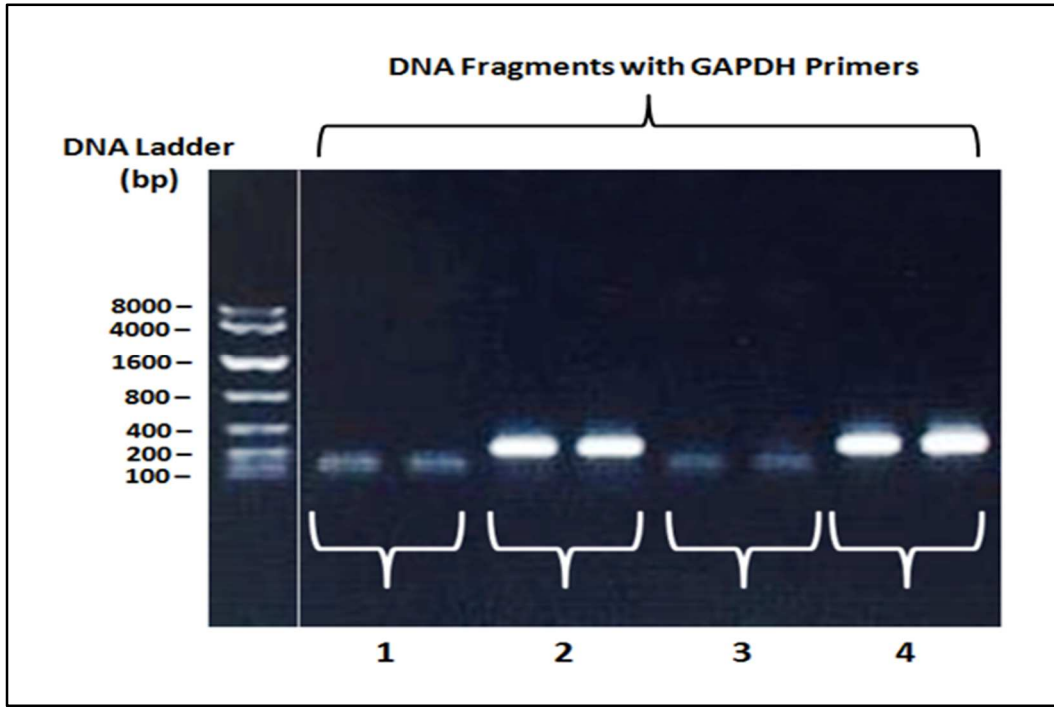
وتم ملاحظة وجود تغيرات تركيبية في طول بعض الكروموسومات إذ إنها تكون أطول بنسبة 40 % من النسخ الأخرى مما يشير إلى وجود زيادة في القطع المستنسخة ، والسبب في ذلك هو وجود عملية نقل Translocation لقطعة صغيرة من كروموسوم معين إلى كروموسوم

آخر (Ogawa *et al.*, 1999). وأن السبب في تحول بعض الكروموسومات إلى Metacentric chromosome يعود إلى وجود حزمة محذوفة قريبة من الموقع المركزي للكروموسوم Centromere ، ووجود تكسر ونقل في بعض الكروموسومات في الخلايا الفأرية المصابة بسرطان الكبد (Sargent *et al.*, 1999).

وبينت إحدى الدراسات أن السبب في التغيرات الكروموسومية على مستوى الجينوم هو وجود جينات مسرطنة (Lau and Guan, 2005) ، إذ إن أكثرها إنتشاراً هي الجينات الكابتة للورم مثل جين TP53 الذي يقع على كروموسوم 17p ، وهو أحد الجينات الأكثر تحوراً في كثير من أنواع السرطان بما في ذلك HCC (Thuy *et al.*, 2011). كذلك توجد جينات ورمية Oncogenes على الكروموسوم 1q تؤدي إلى حصول زيادة في هذا الكروموسوم ، وجينات كابتة للورم على الكروموسوم الذكري Yq تؤدي إلى فقدان الجينات التي تقع على الكروموسوم الذكري ، وهذه التغيرات لها أثر مهم في تطور الورم (Park *et al.*, 2002). وأثبت Park وآخرون (2006) أن فقدان الكروموسوم Y في معظم خطوط الخلايا الورمية قد يكون مسؤولاً عن كثرة الذكور المصابين بالورم.

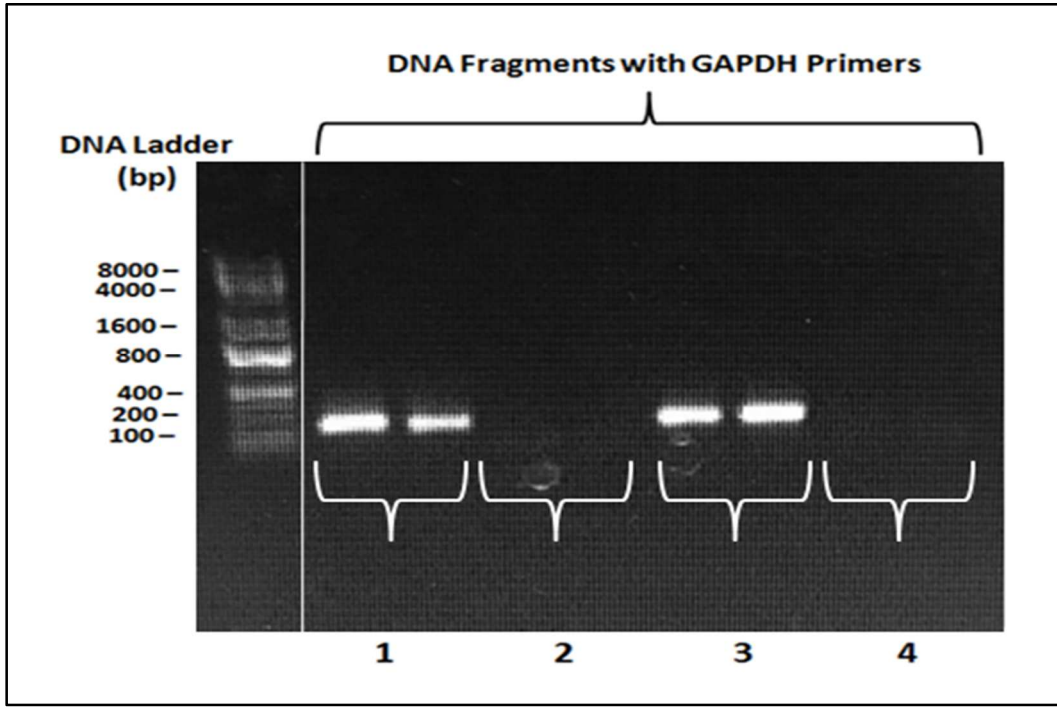
5-4 الدراسة الوراثية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

هناك الكثير من الآليات التي تدرس المورثات الموجودة في خطوط الخلايا السرطانية منها تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي إذ بينت نتائج التفاعل إيجابية لمورث Mouse Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase لخطوط الخلايا الورمية المستعملة (خط خلايا سرطان الكبد HCAM بالتمريرة الخامسة و خط خلايا سرطان الغدد اللبنية AMN3 بالتمريرة 37) وسليبيتها لمورث Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase كما في الصورة (4-11). كذلك أظهر خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بالتمريرة 30 إيجابيته لمورث Human GAPDH وسليبيتها لمورث Mouse GAPDH كما في الصورة (4-12).



صورة (4-11) : تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي لخط خلايا سرطان الكبد HCAM ، تم بيان سلم الحامض النووي لسبع قطع من الحامض النووي DNA (100 ، 200 ، 400 ، 800 ، 1600 ، 4000 و 8000) ، وكذلك قطع الحامض النووي إذ يكون حجم قطعة الدنا للخلايا الفأرية هو أقل من 200 زوج قاعدي بينما حجم قطعة الدنا للخلايا البشرية هو 213 زوج قاعدي ، وكذلك : (1) يمثل خط خلايا سرطان الكبد HCAM بالتمريرة الخامسة السالب لمورث Human GAPDH ، (2) يمثل خلايا HCAM بالتمريرة نفسها الموجب لمورث Mouse GAPDH ، (3) يمثل خط خلايا سرطان الغدد اللمفاوية AMN3 بالتمريرة 37 السالب لمورث Human GAPDH ، (4) يمثل خلايا AMN3 بالتمريرة نفسها الموجب لمورث Mouse GAPDH

وإتفقت النتائج التي توصلنا إليها مع الباحث Ikeguchi وآخرين (2002) إلى أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل مفيدة جدا للكشف عن التعبير الجيني وعن قطع الحامض النووي الموجودة في الخلايا الورمية والتي يمكن الاعتماد عليها في دراسة الخلايا السرطانية. وبينت دراسة معينة أهمية إستعمال مورث GAPDH في الكشف عن تعبير الحامض النووي في سرطان الخلايا الكبدية في الفئران ، إذ تم إثبات أن هذا المورث يكشف عن التعبير المحور أو المتغير في نسيج الكبد بواسطة تفاعل البلمرة على كل الحامض النووي DNA (Tannapfel et al., 2008).



صورة (4-12) : تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي لخط خلايا سرطان الكبد HCAM ، تم بيان سلم الحامض النووي لسبع قطع من الحامض النووي DNA (8000 ، 4000 ، 1600 ، 800 ، 400 ، 200 ، 100) ، وكذلك قطع الحامض النووي إذ يكون حجم قطعة الدنا للخلايا الفأرية هو أقل من 200 زوج قاعدي بينما حجم قطعة الدنا للخلايا البشرية هو 213 زوج قاعدي ، وكذلك : (1) يمثل خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري HeLa بالتمريرة 30 الموجب لمورث Human GAPDH ، (2) يمثل خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري HeLa بالتمريرة نفسها السالب لمورث Mouse GAPDH ، (3) يمثل خط خلايا سرطان الكبد HCAM بالتمريرة الخامسة الموجب لمورث Mouse GAPDH ، (4) يمثل خلايا HCAM بالتمريرة نفسها السالب لمورث Human GAPDH

الإستنتاجات و التوصيات

**Conclusions and
Recommendations**

الإستنتاجات : Conclusions

- 1- إنتاج خط خلوي جديد لسرطان الكبد للفأر الأبيض وأسمه HCAM.
- 2- نستنتج من الدراسة النسجية لخط خلايا سرطان الكبد HCAM أن خلايا هذا الخط تنمو بهيأة طبقة أحادية في اليوم الثالث من الزرع النسجي وأن أشكالها تكون متعددة الأضلاع ، ذات نواة مركزية كروية والعديد من النويات مع وضوح الفجوات في الساييتوبلازم.
- 3- بينت منحنيات النمو لخط خلايا HCAM أن الطور اللوغارتمي أمتد من 24 إلى 144 ساعة، مع ظهور معدل زمن التضاعف لأعداد الخلايا 10000 خلية/2 مل هو 54 ساعة ولأعداد الخلايا 100000 خلية/2 مل يكون 47 ساعة.
- 4- بينت وظائف الكبد إرتفاعاً معنوياً في جميع الإنزيمات والمعلّمت المناعية في خط الخلايا الكبدية الورمية ، مما يشير إلى نشاط عالي يحاكي الطبيعة الورمية لسرطان الكبد.
- 5- أظهرت الدراسة الكيميانسجية المناعية المستوى السلبي للإنزيم المناعي GSTM1 ، والمستوى الإيجابي الضعيف للإنزيم المناعي GSTT1 في ساييتوبلازم الخلايا الورمية ، بينما ظهور التعبير الإيجابي الواضح للبروتين المناعي P53 في انوية الخلايا الورمية مقارنة مع عينات السيطرة السالبة.
- 6- أثبتت الدراسة الوراثية بإستعمال تقنية البلمرة المتسلسل أن خط خلايا سرطان الكبد HCAM هو خط ناشئ من الفأر الأبيض بسبب إيجابيته لمورث Mouse Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase وسليبيته لمورث Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
- 7- أظهرت الدراسة الوراثية الخلوية لكروموسومات الخلايا الكبدية لخط HCAM وجود تغيرات عددية في الكروموسومات ، أي وجود مضاعفة من الصبغيات في الخلايا الورمية تتراوح بين 83-155 كروموسوم ، بالإضافة إلى ذلك ، وجود تغيرات تركيبية مختلفة في العديد من الكروموسومات مثل وجود Metacentric chromosome ، وظهور تكسر في الحزم الكروموسومية والكروماتيدات ، وظهور العديد من الكروموسومات ذات طولاً غير طبيعياً عند مقارنتها بالكروموسومات الأصلية.

التوصيات : Recommendations

- 1- إستعمال هذا الخط في دراسات الأدوية المضادة لأورام الكبد.
- 2- دراسة طبيعة سلوك الخلايا السرطانية الكبدية.
- 3- دراسة نمو وتطور الخلايا للخط الحالي في الفئران.

المصادر

References

المصادر العربية :

- الشمري ، أحمد مجيد حمزة (2003). دراسة تأثير فايروس النيوكاسل في علاج الأورام السرطانية المغروسة في الفئران. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.

المصادر الأجنبية :

A

- **Abdel-Wahab**, M.; Mostafa, M.; Sabry, M.; el-Farrash, M. and Yousef, T. (2008). Aflatoxins as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Egypt, Mansoura Gastroenterology Center study. *Hepatogastroenterol.* 55(86-87):1754-1759.
- **Aden**, D.P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I. and Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Natur.* 282:615–616.
- **Ahmed**, R. (2016). Integrated DNA Technologies. Sequence, GAPDH human.
- **Ahmed**, A.I. and Lobo, D.N. (2009). "Malignant tumours of the liver". *Surg.* (Oxford). 27(1): 30–37.
- **Aleksic**, K.; Lackner, C.; Geigl, J.B.; Schwarz, M.; Auer, M. and Ulz P. (2011). Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatol*, 53:895–904.
- **Alexander**, J.J.; Bey, E.M.; Geddes, E.W. and Lecatsas, G. (1976). Establishment of continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.* 50:2124-2128.
- **Al-shami**, M.A. (2014). Establishment and Characterization of Iraqi Breast Cancer Cell Line. M.Sc. Thesis, College of science, University of Baghdad, Iraq.
- **Al-Shammari**, A.M. (2003). Study of Newcastle Disease virus effect in the treatment of transplanted tumors in mice. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine. University of Baghdad, Iraq.
- **Al-Shammari**, A.M.; Alshami, M.A.; Umran, M.A.; Almukhtar, A.A.; Yaseen, N.Y.; Raad, K. and Hussien, A.A. (2015). Establishment and characterization of a receptor-negative, hormone-nonresponsive breast cancer cell line from an Iraqi patient. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 7:223-230.

- **Amini**, A., and Gamblin, T.C. (2014). Palliation. Treating patients with inoperable biliary tract and primary liver tumors. *Surg. Oncol. Clin. North America*. 23(2):383-397.
- **Artanti**, A.N.; Astirin, O.P.; Prayito, A.; Widiyaningsih, R.F. and Prihapsara, F. (2017). Polyketide Derivatives from *Annona muricata* Linn Leaves as Potencial Anticancer Material by Combination Treatment with Doxorubicin on Hela Cell Line. Series: Materials Science and Engineering, *IOP Conf.* p:176.
- **Arzumanyan**, A.; Reis, H.M. and Feitelson, M.A. (2013). "Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma." *Natur. rev. Cancer*. 13 (2):123–35.
- **Attallah**, A.M.; Al-Ghawalby, N.A.; Abdel Aziz, A.A.F.; El-Sayed, E.A.; Tabll, A.A. and El-Waseef, A.M. (2006). Clinical Value of Serum CEA, CA 19-9, CA 242 and AFP in Diagnosis of Gastrointestinal Tract Cancers. *Int. J. Cancer Res.* 2:50-56.
- **Augoff**, K. and Grabowski, K. (2004). Significance of lactate dehydrogenase measurements in diagnosis of malignancies. *Pol. Merkur. Lekarski*. 17, 644–647.
- **Augoff**, k.; Hryniewicz-Jankowska, A. and Tabola, R. (2015). Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Left*, 358(1):1-7.

B

- **Badea**, R. and Ioanitescu, S. (2012). Ultrasound Imaging of Liver Tumors – Current Clinical Applications. Liver Tumors, Prof. Alexander Julianov (Ed.), p:76-102.
- **Banales**, J.M.; Cardinale, V.; Carpino, G.; Marzioni, M. and Andersen, J.B. (2016). Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13 (5):261-80.
- **Bellizzi**, A.M. (2013). Assigning site of origin in metastatic neuroendocrine neoplasms: a clinically significant application of diagnostic immunohistochemistry. *Adv. Anat. Pathol.* 20(5):285–314.

- **Berenblum**, I. and Shubik, P. (1948). The persistence of latent tumor cells induced in the mouse's skin by a single application of 9:10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Br. J. Cancer*, 3: 384-386.
- **Beroukhim**, R.; Mermel, C.H.; Porter D.; Wei G.; Raychaudhuri S. and Donovan J. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Natur.* 463:899–905.
- **Bhattacharjee**, P.; Paul, S.; Banerjee, M.; Patra, D.; Banerjee, P.; Ghoshal, N.; Bandyopadhyay, A. and Giri, A.K. (2013). Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Sci. Rep.* 3:2704.
- **Boehm**, M.K. and Perkins, S.J. (2000). "Structural models for carcinoembryonic antigen and its complex with the single-chain Fv antibody molecule MFE23". *FEBS Letters.* 475 (1): 11–16.
- **Boomkens**, S.Y.; Spee, B.; IJzer, J.; Kisjes, R.; Egberink, H.F.; Ingh, T.S.; Rothuizen, J. and Penning, L.C. (2004). The establishment and characterization of the first canine hepatocellular carcinoma cell line, which resembles human oncogenic expression patterns. *Comp. Hepatol.* 3:9.
- **Borena**, W.; Strohmaier, S. and Lukanova, A. (2012). Metabolic risk factors and primary liver cancer in a prospective study of 578,700 adults. *Int. J. Cancer.* 131:193-200.
- **Bosetti**, C.; Federica, S.D. and Vecchia, C.L. (2014). Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28(5):753–770.
- **Bosman**, F.T.; Carneiro, F.; Hruban, R.H. and Theise, N.D. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system, Lyon: *Int. Agency Res. Cancer.* 3(3):417.
- **Brown**, C.J.; Cheok, C.F.; Verma, C.S. and Lane, D.P. (2011). Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends Pharmacol Sci.* 32:53–62.
- **Bruix**, J. and Llovet, J.M. (2002). Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatol.* 35:519.
- **Bruix**, J. and Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatol.* 53:1020–1022.

C

- **Carpelan-Holmstrom**, M.; J. Louhimo, U.H.; Stenman, H.; Alfthan, and Haglund, C. (2002). CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res.* 22: 2311-2316.
- **Carr**, B.I. and Guerra, V. (2016). A Hepatocellular Carcinoma Aggressiveness Index and Its Relationship to Liver Enzyme Levels. *Oncol.* 90(4):215-20.
- **Celton-Morizur**, S.; Merlen, G.; Couton, D. and Desdouets, C. (2010). "Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling". *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(3):460–466.
- **Chappell**, G.; Silva, G.O.; Uehara, T. Pogribny, I.P. and Rusyn, I. (2016). Characterization of copy number alterations in a mouse model of fibrosis associated hepatocellular carcinoma reveals concordance with human disease. *Cancer Med.* 5(3): 574–585.
- **Chen**, C.J.; Yang, H.I. and Iloeje, U.H. (2009). Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatol.* 49: 72-84.
- **Cheung**, P.F.; Yip, C.W.; Ng, L.W.; Lo, K.W.; Wong, N.; Choy, K.W.; Chow, C.; Chan, K.F.; Cheung, T.T.; Poon, R.T.; Fan, S.T. and Cheung, S.T. (2014). Establishment and characterization of a novel primary hepatocellular carcinoma cell line with metastatic ability in vivo. *Cancer Cell Int.* 14:103.
- **Choe**, R.; Konecky, S.D. and Corlu, A. (2009). Differentiation of benign and malignant breast tumors by in-vivo three-dimensional parallel-plate diffuse optical tomography. *J. Biomedical. Optics. Department of Physics and Astronomy, University of Pennsylvania, 209 S. 33rd St., Philadelphia, 14(2).*
- **Chu**, V.C.; Bhattacharya, S.; Nomoto, A.; Lin, J.; Zaidi, S.K.; Oberley, T. D.; Weinman, S.A.; Azhar, S. and Huang, T.-T. (2011). Persistent Expression of Hepatitis C Virus Non-Structural Proteins Leads to Increased Autophagy and Mitochondrial Injury in Human Hepatoma Cells. *PLoS ONE.* 6(12).
- **Cotran**, R.S.; Kumar, V.; Fausto, N.; Nelson, F.; Robbins, S. L. and Abbas, A. K. (2005). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. (7th ed.). Philadelphia. *Elsevier Saunders.* p: 878.

- **Czauderna, P.** and Perilongo, G. (2004). Hepatocellular carcinoma. *Orphanet Encycl.* p:1-3.

D

- **Damjanov, I.** (2009). Pathology secrets. *Elsevier health sci.* p:95.
- **Daukste, L.;** Basse, B.; Baguley, B.C. and Wall, D.J. (2012). Mathematical determination of cell population doubling times for multiple cell lines. *Bull Math. Biol.* 74(10):2510-34.
- **Ding, Q. ;** He, K. ; Luo, T. ; Deng, Y. ; Wang, H. ; Liu, H. ; Zhang, J. ; Chen, K. ; Xiao, J. ; Duan, X. ; Huang, R. ; Xia, Z. ; Zhou, W. ; He, J. ; Yu, H. ; Jiao, X. and Xiang, G. (2016). SSRP1 Contributes to the Malignancy of Hepatocellular Carcinoma and Is Negatively Regulated by miR-497. *Mol. Ther.* 24(5): 903–914.
- **Dino, V.** (2013). Secretary Functions of the Liver and Alimentary Tract. Dawson Anatomy Physiology & Pharmacology 702 with Tallant at Wake Forest University, School of Medicine.
- **Diwan, B.A.;** Rice, J.M.; Ohshima, M. and Ward, J.M. (1986). Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57BL / 6NCr, C3H/ HeNCrMTV- and DBA/ 2NCr mice. *Carcinogenesis.* 7:215–220.
- **Doi, I.;** Namba, M. and Sato, J. (1975). Establishment and some characteristics of human hepatoma cell lines. *Gann.* 66:385-392.
- **Dorland's.** (2012). Dorland's Illustrated Medical Dictionary. 32nd ed. *Elsevier.* p:285.
- **Doyle, A.** and Griffiths, J.B. (2000). Cell & tissue culture for medical research. John wiley & Sons. Itd.U.K.
- **Dufour, J.F.** (2013). C-reactive protein, a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Hepatol.* 57(6):2103-5.

E

- **Ejiri**, Y.; Yoshida, A.; Hosoda, M.; Kobayashi, K. and Chiba, K. (2011). Characterization of human hepatocellular carcinoma cell line on micro-space cell culture plate. *J. Bio. Sci. Bioeng.* 111(1): 78-84.
- **El-Azm**, A.R.A.; Yousef, M.; Salah, R.; Mayah, W.; Tawfeek, S.; Ghorabah, H. and Mansour, N. (2013). Serum anti-P53 antibodies and alpha-fetoprotein in patients with non-B Non-C hepatocellular carcinoma. *Springer Plus.* 2:69.
- **El-Serag**, H.B. and Rudolph, K.L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterol.* 132:2557–2576.
- **El-Zayadi**, A. (2006). Heavy smoking and liver. *World J. Gastroenterol.* 12(38): 6098–6101.
- **Emma**, E.R. and Pierre, J.D. (2014). Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front Pharmacol.* 5: 181.
- **Everett**, A.D.; Yang, J.; Rahman, M.; Dulloor, P. and Brautigan, D.L. (2011). Mitotic phosphorylation activates hepatomaderived growth factor as a mitogen. *BMC Cell Biol.* 12:15.
- **Ertle**, J.M.; Heider, D.; Wichert, M.; Keller, B.; Kueper, R.; Hilgard, P.; Gerken, G. and Schlaak, J.F. (2013). "A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma." *Dig.* 87(2):121–31.

F

- **Fenster**, L.F. (1979). "Gerald Klatskin". *Yale J. Biol. Med.* 52(1): 1–3.
- **Fischbach**, F.T. and Dunning, M.B. (2009). Manual of Laboratory and Diagnostic Tests, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. p:1317.
- **Fischbach**, F. and Dunning, M.B. (2015). Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- **Franc**, J. (2013). C-Reactive Protein, a Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma. Department of Clinical Research University of Bern University Clinic of Visceral Surgery and

Medicine Inselspital, University of Bern Bern, Switzerland. *Hepatology*. June. 57(6).

- **Franklin**, W.A.; Aisner, D.L.; Post, M.D.; Bunn, P.A. and Garcia, M.V. (2014). Pathology, biomarkers, and molecular diagnostics. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone: chap. 17.
- **Freshney**, R. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. P:1.
- **Freshney**, R. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed.
- **Friedman**, L.S. and Keeffe, E.B. (2012). *HANDBOOK OF LIVER DISEASE. Elsevier Saunders*. Hepatic tumors. 3th ed. p:355.

G

- **Gavhane**, Y.N.; Shete, A.S.; Bhagat, A.K.; Shinde, V.R.; Bhong, K.K.; Khairnar, G.A. and Yadav, A.V. (2011). Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2(1):1-12.
- **Gentric**, G. and Desdouets, C. (2014). Polyploidization in Liver Tissue. *Liver Pathobiol.* 184(2):322–331.
- **Ghadban**, R. and Staros, E.B. (2013). *Manual of Laboratory & Diagnostic Tests. Gamma-Glutamyltransferase*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Department of Internal Medicine, St Louis University Hospital.
- **Ghanekar**, A.; Ahmed, S.; Chen, K. and Adeyi, O. (2013). Endothelial cells do not arise from tumor-initiating cells in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 13:485.
- **Giannini**, E.G.; Testa, R. and Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 172(3):367-79.
- **Gomaa**, A.I.; Khan, S.A., and Toledano, M.B. (2008). Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 14:4300-4308.

H

- **Hall, P.** and Cash, J. (2012). What is the Real Function of the Liver 'Function' Tests? *Ulster. Med. J.* 81(1): 30–36.
- **Hann, H.-W.;** Wan, S.; Myers, R.E.; Hann, R.S.; Xing, J.; Chen, B. and Yang, H. (2012). Comprehensive Analysis of Common Serum Liver Enzymes as Prospective Predictors of Hepatocellular Carcinoma in HBV Patients. *PLoS One.* 7(10).
- **Hay, R.J.;** Park, J.G. and Gazdar, A. (2013). Atlas of Human Tumor Cell Lines. Miyazaki, M. and Namba, M. (1994). Hepatocellular Carcinoma. Chap. 7. p:185-205.
- **Head, K.W.;** Cullen, J.M.; Dubielzig, R.R.; Else, R.W.; Misdorp, W. and Patnaik, A.K. (2003). Histological classification of tumours of the liver and gallbladder of domestic animals. In K.W. Head, J.M. Cullen, R.R. Dubielzig, R.W. Else, W. Misdorp, A.K. Patnaik, S. Tateyama, I. van der Gaag Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals, 2nd edn Washington, DC: *American Regist. Pathol.* P:119-135.
- **Hechtman, J.F.** and Polydorides, A.D. (2012). HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 136(6):691–697.
- **Huang, X.J.;** Choi, Y.-K.; Im, H.-S.; Yarimaga, O.; Yoon, E. and Kim, H.-S. (2006). Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. Daejeon, South Korea. *Sensors.* 6:756-782.
- **Hyman, A.H.** and Simons, K. (2011). Beyond HeLa cells. *Natur.* 480(34).

I

- **Ikeguchi, M.;** Hirooka, Y. and Kaibara, N. (2002). Quantitative Analysis of Apoptosis-Related Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma. *American Cancer Soc.* 95:1938–45.

- **Iloki**, A.S.; Gil-Salido, A.; Lewis Lujan, L.; Rosas-Durazo, A.; Acosta-Silva, A.; Rivera-Castaneda, E. and Rubio-Pino, J. (2013). Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *Int. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 4(4):60-70.
- **Imbeaud**, S.; Ladeiro, Y. and Zucman-Rossi, J. (2010). Identification of novel oncogenes and tumor suppressors in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 30(1):75-86.

J

- **Jemal**, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E. and Forman, D. (2011). "Global cancer statistics.". *Cancer J. Clin.* 61(2):69–90.
- **Jirun**, P.; Zhang, G.; Kim, H.K.; Ha, S.A.; Zhongtian, J.; Shishi, Q.; Zhuqingqing, C.; Lei, G.; Yoo, J.; Kim, S.; Park, Y.G.; Wang, J.; Yang, Y.; Xu, Z.; Huang, Z.; Lee, Y.K.; Song, E.Y. and Kim, J.W. (2011). Clinical utility of alpha fetoprotein and HCCR-1, alone or in combination, in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Discussion. *Dis. Markers*, 30:307–315.
- **Johannesen**, E.J.; Wu, Z. and Holly, J.S. (2014). Bile Duct Adenoma with Oncocytic Features. *Case Report. Dep. Pathol.* p:3.

K

- **Kakar**, S.; Gown, A.M.; Goodman, Z.D. and Ferrell, L.D. (2007). Best Practices in Diagnostic Immunohistochemistry Hepatocellular Carcinoma Versus Metastatic Neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 131:1650.
- **Kanel**, G.C. and Korula, J. (2011). Atlas of liver pathology. Philadelphia: *Elsevier Saunders*. 3rd ed.
- **Kiernan**, F. (1833). The Anatomy and Physiology of the Liver. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 123:711-770.
- **Kim**, D.Y.; Paik, Y.H.; Ahn, S.H.; Youn, Y.J.; Choi, J.W.; Kim, J.K.; Lee, K.S.; Chon, C.Y. and Han, K.H. (2007). "PIVKA-II is a useful tumor marker for recurrent hepatocellular carcinoma after surgical resection". *Oncol.* 72 Suppl 1: 52–7.

- **Kim, H.R.;** Lee, C.H.; Kim, Y.W.; Han, S.K.; Shim, Y.S. and Yim, J.J. (2009). Increased CA 19-9 level in patients without malignant disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47(6):750–754.
- **Kim, J.U.;** Shariff, M.I.F.; Crossey, M.M.E.; Romero, M.G.; Holmes, E.; Cox, I.J.; Fye, H.K.S.; Njie, R. and Robinson, S.D.T. (2016). Hepatocellular carcinoma: Review of disease and tumor biomarkers. Introduction. *World J. Hepatol.* 8(10): 471-484.
- **Kirk, G.D.;** Turner, P.C.; Gong, Y.; Lesi, O.A.; Mendy, M.; Goedert, J.J.; Hall, A.J.; Whittle, H.; Hainaut, P.; Montesano, R. and Wild, C.P. (2005). Hepatocellular carcinoma and polymorphisms in carcinogen-metabolizing and DNA repair enzymes in a population with aflatoxin exposure and hepatitis B virus endemicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(2):373-9.
- **Kondoh, H.;** Leonart, M.E.; Gil, J.; Wang, J.; Degan, P.; Peters, G.; Martinez, D.; Carnero, A. and Beach, D. (2005). Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* 65:177-185.
- **Kong, L.;** Hao, Q.; Wang, Y.; Zhou, P.; Zou, B. and Zhang, Y. (2015). Regulation of p53 expression and apoptosis by vault RNA2-1-5p in cervical cancer cells. *Oncotarget.* 6(29): 28371–28388.
- **Krasinskas, A.M. and Goldsmith, J.D.** (2014). Immunohistology of the gastrointestinal tract. In: Dabbs DJ, Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications. 4th ed., Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, p:508–539.
- **Krelle, A.C.;** Okoli, A.S. and Mendz, G.L. (2013). Huh-7 Human Liver Cancer Cells: A Model System to Understand Hepatocellular Carcinoma and Therapy. *J. Cancer Therapy,* 4:606-631.
- **Kubackova, K.;** Bortlicek, Z.; Pavlik, T.; Melichar, B.; Linke, Z.; Pokorna, P.; Vyzula, R.; Prausova, J. and Buchler, T. (2015). Prognostic factors in renal cell carcinoma patients treated with sorafenib: results from the Czech registry. *Target Oncol.* 10(3):385-92.
- **Kuehnel, W.** (2003). Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy. 4th ed. University zu Luebeck, Germany. P:317-329.

L

- **Lacoste, B.;** Raymond, V.A.; Cassim, S.; Lapierre, P. and Bilodeau, M. (2017). Highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with cancer stem cell-like properties. *PLoS ONE*. 12(2): e0171215.
- **Lau, S.H. and Guan, X.Y.** (2005). Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta. Pharmacol. Sin.* 26(6):659-65.
- **Lee, G.H.** (2000). Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 28:215-225.
- **Lee, J.S.;** Chu, I.S.; Mikaelyan, A.; Calvisi, D.F.; Heo, J. and Reddy, J.K. (2004). Application of comparative functional genomics to identify bestfit mouse models to study human cancer. *Nat. Genet.* 36:1306-1311.
- **Lee, T.H.;** Kim, W.R.; Poterucha, J.J. (2012). Evaluation of elevated liver enzymes. *Clin. Liver Dis.* 16:183-198.
- **Li, R.;** Boerwinkle, E.; Olshan, A.F.; Chambless, L.E.; Pankow, J.S.; Tyroler, H.A.; Bray, M.; Pittman, G.S.; Bell, D.A. and Heiss, G. (2000). Glutathione S-transferase genotype as a susceptibility factor in smoking-related coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 149(2):451-62.
- **Li, Z.;** Zhang, H.; Yang, J.; Hao, T. and Li S. (2012). Promoter hypermethylation of DNA damage response genes in hepatocellular carcinoma. *Cell Biol. Int.* 36(5):427-32.
- **Lim, K.C.;** Chow, P.K.; Allen, J.C.; Chia, G.S.; Lim, M.; Cheow, P.C.; Chung, A.Y.; Ooi, L.L. and Tan, S.B. (2011). Microvascular invasion is a better predictor of tumor recurrence and overall survival following surgical resection for hepatocellular carcinoma compared to the Milan criteria. *Ann. Surg.* 254(1):108-13.
- **Limdi, J.K. and Hyde, G.M.** (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med. J.* 79: 307-312.
- **Liu, X.E.;** Desmyter, L.; Gao, C.F.; Laroy, W.; Dewaele, S.; Vanhooren, V. and Contreras, R. (2007). N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus. *Hepatol.* 46(5), 1426-1435.
- **Liu, J.;** Ma, Q.; Zhang, M.; Wang, X.; Zhang, D.; Li, W.; Wang, F. and Wu, E. (2012). Alterations of TP53 are associated with a poor

outcome for patients with hepatocellular carcinoma: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer*. 48(15):2328-38.

- **Llovet**, J.M.; Burroughs, A. and Bruix, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 362(9399):1907-17.
- **Lu**, X.; Xi, T. and Lau, W. (2011). "Hepatocellular carcinoma expressing cholangiocyte phenotype is a novel subtype with highly aggressive behavior," *Annals Surg. Oncol*. 18(8):2210–2217.
- **Lynn**, H.N. and Daniel, F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular oncol*. 6:140-146.

M

- **Mackay**, I.R. (2002). Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol Cell Biol*. 80:36–44.
- **Malati**, T. (2007). Tumour markers: an overview. *Indian J. Clin. Biochem*. 22(2): 17-31.
- **Manfredi**, J.J. (2010). The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & Dev*. 24: 1580-1589.
- **Marieb**, E.N. and Hoehn, K.N. (2012). Human Anatomy & Physiology. Books a la Carte Edition. 9th ed. p: 939.
- **McCarthy**, D. Chapter 25 Lecture Outline Copyright (c) The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display. P: 19-25.
- **Merih**, G. and Aysegul, A. (2006). Benign Breast Diseases: Classifications, Diagnosis, and Management. *The Oncologist*. 11:435-449.
- **Miao**, P.; Sheng, S.; Sun, X.; Liu, J. and Huang, G. (2013). Lactate Dehydrogenase A in Cancer. A Promising Target for Diagnosis and Therapy. *Int. U. Biochem. Mol. Biol*. 65(11):904–910.
- **Miermans**, P.J. and Van Oyen, H. (2002). Gezondheidsrapport: een verkenning van de gezondheidssituatie in België aan de hand van sterftecijfers en gezondheidsverwachtingscijfers. Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, Afdeling Epidemiologie. *Brussel: IPH/EPI Reports*. 31:10-37.

- **Mohammad**, M.H. (2015). Molecular characterization of stem cells that induce neurogenesis. M.Sc. Thesis, College of Sciences of women. University of Baghdad, Iraq.
- **Mohammad**, M.H.; Kadhum, H.M.; AL- Shamery, A.M. and Hassan, A.A. (2015). Study the Growth Curve for AMN-3 Cell Line. *Iraqi J. Cancer and Med. Genet.* 3(1):61-64.
- **Monga**, S.P. (2009). Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, Sep 9.
- **Morgan**, M.B. (2009). Benign Mesenchymal Tumors. Atlas of Mohs and Frozen Section Cutaneous Pathology. *Univ. South Florida Coll. Med.* p:153-161.
- **Mubarak**, A. ; Al-mukhtar, M. ; Muzahim, H. ; Husain, K. ; Hameed, I.M. ; Husain, A. ; Mutleg, L. ; Jasim, K. ; Beshar, A. ; Hesoon, M. ; Salih, J. ; Hmood, S. ; Fadhil, A. ; Hasan, K. ; Abdulhadi, H. ; Fadhil, N. ; Abdulwahid, E. ; Jelal, S. ; Qiryaqos, A. ; Kamil, M. ; Ali, S. ; Ali, N. and Muhammad, R. (2009). Iraqi cancer registry. Ministry of Health, *Iraqi Cancer Board*. Baghdad, Iraq.
- **Muller**, P.A. and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* 15:2–8.
- **Murakami**, T. and Tsurusaki, M. (2014). Hypervascular Benign and Malignant Liver Tumors That Require Differentiation from Hepatocellular Carcinoma: Key Points of Imaging Diagnosis. *Liver Cancer.* 3:85–96.

N

- **Nakabayashi**, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T. and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42:3858-3863.
- **Negahdary**, M.; Eftekhari, A.; Mirzaei, S.; Basirizadeh, M. and Ghobadzadeh, S. (2015). Tumor Markers and Hepatocellular Carcinoma. *J. Biol. Today's World.* 4(6):124-131.
- **Nyga**, A.; Cheema, U. and Loizidou, M. (2011). 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J. Cell Commun Signal.* 5(3): 239–248.
- **Nyström**, T. (2007). A bacterial kind of aging. *PLoS Genet.* 3:224.

O

- **O'Connor, C.** (2008). Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Natur. Educ.* 1(1):27.
- **Ogawa, K.; Osanai, M.; Obata, M.; Ishizaki, K. and Kamiya, K.** (1999). Gain of chromosomes 15 and 19 is frequent in both mouse hepatocellular carcinoma cell lines and primary tumors, but loss of chromosomes 4 and 12 is detected only in the cell lines. *Carcinogenesis*, 20(11): 2083-2088.
- **Okuda, K. and Ishak, K.G.** (1987). Neoplasms of the Liver. Chap. 4, Human Hepatoma cell lines by Alexander, J.J. Tokyo, Japan. p:47-56.
- **Oliveira, P.A.; Colaco, A.; Chaves, R.; Guedes-Pinto, H.; De-la-cruz, L.F. and Lopes, C.** (2007). Chemical carcinogenesis. *An Acad. Bras. Cienc.* 79(4): 593-616.
- **Omar, N.** (2012). Histology - GI Glands 2. Histology Block 2 with Moore at Ross University School of Medicine.

P

- **Pack, G.T. and Islami, A.H.** (1970). Tumors of the Liver. Springer-Verlag New York. Heidelberg. Berlin. Chap. 2: The Classification of liver tumors by Herwig Hamper. Pathological Institute, University of Bonn, Germany. 26:4-14.
- **Park, J.G.; Lee, J.H.; Kang, M.S.; Park, K.J.; Jeon, Y.M.; Lee, H.J.; Kwon, H.S.; Park, H.S.; Yeo, K.S.; Lee, K.U.; Kim, S.T.; Chung, J.K.; Hwang, Y.J.; Lee, H.S.; Kim, C.Y.; Lee, Y.I.; Chen, T.R.; Hay, R.J.; Song, S.Y.; Kim, W.H.; Kim, C.W. and Kim, Y.I.** (1995). Characterization of cell lines established from human hepatocellular carcinoma. *Wiley-Liss Inc.* 62(3):276–282.
- **Park, S.J.; Ha, M.J.; Kim, H.C. and Kim, H.J.** (2002). Chromosomal Alterations in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Res. Treat.* 34(3):175-85.
- **Park, S.J.; Jeong, S.Y. and Kim, H.J.** (2006). Y chromosome loss and other genomic alterations in hepatocellular carcinoma cell lines analyzed by CGH and CGH array. *Elsevier Inc.* 166(1):56–64.

- **Park**, E.J.; Lee, J.H.; Yu, G.Y.; He, G.; Ali, S.R.; Holzer, R.G.; Osterreicher, C.H.; Takahashi, H. and Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 140(2):197-208.
- **Patel**, T. (2002). "Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies". *BMC Cancer*. 2:10.
- **Pepys**, M.B. and Hirschfield, G.M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* 111:1805-1812.
- **Perry**, L.J.P.; Jakobiec, F.A.; Zakka, F.R.; Reichel, E.; Herwig, M.C.; Perry, A.; Brat, D.J. and Grossniklaus, H.E. (2013). Reactive Retinal Astrocytic Tumors (So-called Vasoproliferative Tumors): Histopathologic, Immunohistochemical, and Genetic Studies of Four Cases. *Am. J. Ophthalmol.* 155(3): 593–608.
- **Persson**, E.C.; Schwartz, L.M.; Park, Y.; Trabert, B.; Hollenbeck, A.R.; Graubard, B.I.; Freedman, N.D. and McGlynn, K.A. (2013). Alcohol Consumption, Folate Intake, Hepatocellular Carcinoma, and Liver Disease Mortality. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* p: 415.
- **Pocock**, G. and Richards, C.D. (2006). Human Physiology: The basis of medicine. Oxford University Press. 3th ed. p:404.
- **Pompella**, A.; De Tata, V.; Paolicchi, A. and Zunino, F. (2006). Expression of γ -glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem. pharmacol.* 71(3), 231-238.
- **Poon**, D.; Anderson, B.O. and Chen, L.T. (2009). Management of hepatocellular carcinoma in Asia: Consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *Lancet Oncol*, 10:1111-1118.
- **Prati**, D.; Taioli, E.; Zanella, A.; Della Torre, E.; Butelli, S.; Del Vecchio, E.; Vianello, L.; Zanuso, F.; Mozzi, F.; Milani, S.; Conte, D.; Colombo, M. and Sirchia G. (2002). Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann. Intern. Med.* 137(1):1-10.

Q

- **Qian**, K.; Zhong, S.; Xie, K.; Yu, D.; Yang, R. and Gong, D. (2015). Hepatic ALT isoenzymes are elevated in gluconeogenic conditions including diabetes and suppressed by insulin at the protein level. *Diabetes Metab Res. Rev.* 31(6): 562–571.

- **Qiu, Z.;** Zou, K.; Zhuang, L.; Qin, J.; Li, H.; Li, C.; Zhang, Z.; Chen, X.; Cen, J.; Meng, Z.; Zhang, H.; Li, Y. and Hui, L. (2016). Hepatocellular carcinoma cell lines retain the genomic and transcriptomic landscapes of primary human cancers. *Sci. Rep.* 6:27411.

R

- **Rafferty, M.J.;** McMillan, D.C.; Preston, T.; Hamid, R. and Small, A.C. (2016). Reprioritisation of Liver Export Protein Synthesis in Patients with Decompensated Alcoholic Liver Disease. *J. Hepatol. Gastroint Dis.* 2:135.
- **Rambau, R.V.** and Robinson, T.J. (2003) Chromosome painting in the African four-striped mouse *Rhabdomys pumilio*: Detection of possible murid specific contiguous segment combinations. *Res.* 11(2): 91–98.
- **Raza, A.** and Sood, G.K. (2014). Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine. *World J. Gastroenterol.* 20(15):4115-4127.
- **Rodríguez-Díaz, J.L.;** Rosas-Camargo, V.; Vega-Vega, O.; Morales-Espinosa, D.; Mendez-Reguera, A.; Martínez-Tlahuel, J.L.; Gamboa-Domínguez, A. and Arrieta, O. (2007). Clinical and pathological factors associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis virus-related cirrhosis: a long-term follow-up study. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.).* 19(3):197-203.
- **Roger, j.** (2000). Cancer biology. (2nd ed.). Chap. 10. P:146-170.
- **Rolfe, M.D.;** Ricea, C.J.; Lucchini, S.; Pin, C.; Thompson, A.; Cameron, A.D.S.; Alston, M.; Stringer, M.F.; Betts, R.P.; Baranyi, J.; Peck, M.W. and Hinton, J.C.D. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *J. Bacteriol.* 194(3):686-701.
- **Rossouw, J.E.;** Labadarios, D.; Davis, M. and Williams, R. (1978). Vitamin B6 and aspartate aminotransferase activity in chronic liver disease. *South African Med. J.* 53(12), 436-438.
- **Rothfels, K.H.** and Parker, R.C. (1959). The karyotypes of cell lines recently established from normal mouse tissues. *J. Exp. Zool.* 142: 507-520.

S

- **Sadri**, N. and Zhang, P. J. (2013). “Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas,” *Cancers*. 5(2):320–333.
- **Said**, H. (2013). Histology of the liver and gall bladder [compatibility mode]. Assistant Lecturer at Zagazig University. Under Supervision of Prof. Dr. Fadia Khalid. Published in: Health & Medicine, *Technol.*
- **Sakata**, H.; Takayama, H. and Sharp, R. (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ.* 7(11):1513-23.
- **Santhi**, L.; Sarangadhara, A.; Navin, K.; Manoj, K.; Rima, D.; Meena, L.; Abha, S.; Shreshtha, M.; Sheeba, S.; Chintamani, C.; Ravindar, S.; Dinesh, B. and Sunita, S. (2014). Establishment and characterization of two primary breast cancer cell lines from young indian breast cancer patients: mutation analysis. *Cancer Cell Int.* 14:14-29.
- **Sargent**, L.M.; Zhou, X.; Keck, C.L.; Sanderson, N.D.; Zimonjic, D.B.; Popescu, N.C. and Thorgeirsson, S.S. (1999). Nonrandom cytogenetic alterations in hepatocellular carcinoma from transgenic mice overexpressing c-Myc and transforming growth factor-alpha in the liver. *Am. J. Pathol.* 154(4):1047-55.
- **Scartozzi**, M.; Faloppi, L.; Bianconi, M.; Giampieri, R.; Maccaroni, E.; Bittoni, A. ; Del Prete, M.; Loretelli, C.; Belvederesi, L.; Baroni, G.S.i and Cascinu, S. (2012). The Role of LDH Serum Levels in Predicting Global Outcome in HCC Patients Undergoing TACE: Implications for Clinical Management. *PLoS ONE*. 7(3): e32653.
- **Schachtm**, V. and Kern, J.S. (2015). Basics of Immunohistochemistry. Department of Dermatology, Hannover Medical School, Hannover, Germany. *J. Invest. Dermatol.* 135.
- **Shahrour**, A.; Zowail, M. and Sharafeldin, K. (2016). The protective role of honey against cytotoxicity of cadmium chloride in mice. *African J. Biotechnol.* 15(46):2620-2626.
- **Sherratt**, P.J.; Williams, S.; Foster, J.; Kernohan, N.; Green, T. and Hayes, J.D. (2002). Direct comparison of the nature of mouse and human GST T1-1 and the implications on dichloromethane carcinogenicity. *Toxicol and applied pharmacol.* 179:89-97.

- **Shier**, D.N. (2017). Hole's Human Anatomy and Physiology. 11th ed. Chap. 24: Genetics and Genomics.
- **Slack**, J.M.W. (2007). "Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic". *Natur. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(5): 369–378.
- **Slomianka**, L. (2009). Blue Histology. School of Anatomy and Human Biology. The University of Western Australia.
- **Soili**, K.; Jaana, R.; Ann, N.; Ritva, K.; Filip, F.; Jorma, I. and Catharina, L. (2000). Chromosomal Alterations in 15 Breast Cancer Cell Lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Genes, Chromosomes & Cancers.* 28:308-317.
- **Sola-Penna**, M. (2008) Metabolic regulation by lactate. *IUBMB Life* 60, 605–608.
- **Stacey**, G.N. and Davis, J. (2007). Medicines from Animal Cell Culture. *Book of Sci.* p:590-592.
- **Strom**, B.L.; Iliopoulos, D. and Atkinson, B. (1989). "Pathophysiology of tumor progression in human gallbladder: flow cytometry, CEA, and CA 19-9 levels in bile and serum in different stages of gallbladder disease," *J. Nat. Cancer Inst.* 81(20):1575–1580.
- **Stryer**, L.; Berg, J.M. and Tymoczko, J.L. (2002). Biochemistry, 5th ed. San Francisco: W.H. Freeman.
- **Sui**, C.; Ma, J. and He, X. (2014). Interactive effect of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms on hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 35(8):8235-41.

T

- **Tannapfel**, A.; John, K.; Mise, N.; Schmidt, A.; Buhlmann, S.; Ibrahim, S.M. and Putzer, B.M. (2008). Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis.* 29(1):211–218.
- **Taylor**, E.J. (2000). Dorland's Illustrated medical dictionary. 29th ed. Philadelphia: Saunders. p:1038.
- **Teoh**, N.C.; Dan, Y.Y.; Swisshelm, K.; Lehman, S.; Wright, J.H.; Haque, J.; Gu, Y. and Fausto, N.(2008) Defective DNA strand break repair causes chromosomal instability and accelerates liver carcinogenesis in mice. *Hepatol.* 47(6):2078–2088.

- **Thapa**, B.R. and **Walia**, A. (2007). Liver Function Tests and their Interpretation. *Indian J. Pediatr.* 74 (7): 663-671.
- **Thomas**, P.; **Toth**, C.A.; **Saini**, K.S.; **Jessup**, J.M. and **Steele**, G. (1990). The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1032:177–89.
- **Thuy**, L.; **Morita**, T.; **Yoshida**, K.; **Wakasa**, K.; **Iizuka**, M.; **Ogawa**, T.; **Mori**, M.; **Sekiya**, Y.; **Momen**, S.; **Motoyama**, H.; **Ikeda**, K.; **Yoshizato**, K. and **Kawada**, N. (2011). Promotion of Liver and Lung Tumorigenesis in DEN-Treated Cytoglobin-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* 179(2): 1050–1060.
- **Tian**, J.; **Tang**, Z.Y.; **Ye**, S.L.; **Liu**, Y.K.; **Lin**, Z.Y.; **Chen**, J. and **Xue**, Q. (1999). New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis. *Br. J. Cancer.* 81(5):814–821.

V

- **Van Hemelrijck**, M.; **Jassem**, W.; **Walldius**, G.; **Fentiman**, I.S.; **Hammar**, N.; **Lambe**, M.; **Garmo**, H.; **Jungner**, I. and **Holmberg**, L. (2011). Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545,460 persons - the Swedish AMORIS study. *Eur. J. Cancer.* 47(13):2033-41.
- **Venook**, A.P.; **Papandreou**, C. and **Furuse**, J. (2010). The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: A global and regional perspective. *The Oncologist*, 4:5-13.

W

- **Walker**, H.K. ; **Hall**, W.D. and **Hurst**, J.W. (1990). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd ed. Wolf, D.C. Chapter 94: Evaluation of the Size, Shape, and Consistency of the Liver.
- **Walther**, Z. and **Jain**, D. (2011). Molecular pathology of hepatic neoplasms: classification and clinical significance. *Pathol. Res. Int.*

- **Wei, J.;** Rau, M. and Geier, A. (2014). Non-alcoholic Fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 111(26):447-452.
- **Welzel, T.M.;** Graubard, B.I. and Zeuzem S. (2011). Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology.*54:463-71.
- **William, S.;** Michael, R. and charlotte, A. (2007). Essential of genetic. Chap. 16: 358-374.
- **Wilt, F.H.** (2011). Growth biology. The Editors of Encyclopaedia Britannica.
- **Wong, L.L.;** Kim, C.J.; Kwee, S.A. and Hernandez, B.Y. (2013). Alpha-fetoprotein testing for hepatocellular carcinoma may not be helpful in nonalcoholic steatohepatitis. *Open J. Gastroenterol.* 3:49-54.
- **World Cancer Report.** (2014). World Health Organization. Chap.1.1.
- **Wu, Y.;** Renard, C.A.; Apiou, F.; Huerre, M.; Tiollais, P.; Dutrillaux, B. and Buendia, A. (2002). Recurrent allelic deletions at mouse chromosome 4 and 14 in Myc-induced liver tumors. *Oncogene.* 21:1518–1526.
- **Wu, W.;** Doreswamy, V.; Sanchez, D.; Samet, J.M.; Kesic, M. and Dailey, L. (2011). GSTM1 modulation of IL-8 expression in human bronchial epithelial cells exposed to ozone. *Free Radical Biol. Med.* 51:522–9.
- **Wu, E.;** Zhou, S.; Bhat, K. and Ma, Q. (2013). CA 19-9 and Pancreatic Cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 11(1): 53–55.

Y

- **Yaseen, H.** (1990). Cytogenetic study of human colorectal cancer cell. Ph.D. Thesis. Univ. Sheffield.
- **Yu, S.J.** (2016). A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world: 2010-2016. *Clin. Mol. Hepatol.* 22:7-17.
- **Yuan, R.H.;** Jeng, Y. and Hu, R. (2011). “Role of p53 and β -catenin mutations in conjunction with CK19 expression on early tumor

recurrence and prognosis of hepatocellular carcinoma,” *J. Gastrointestinal Surg.* 15(2):321–329.

Z

- **Zaghloul**, R.A.; Al-Gayyar, M.M.H.; El-Shishtawy, M.M. and Ebrahim, M.A. (2013). Cytotoxic effects of antiglypican-3 against HepG2 cell line. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3(12): 031-035.
- **Zhang**, Y.J. (2010). Interactions of chemical carcinogens and genetic variation in hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* 27(2(3)):94-102.
- **Zhang**, Y.J.; Chen, Y.; Ahsan, H.; Lunn, R.M.; Chen, S.Y.; Lee, P.H.; Chen, C.J. and Santella, R.M. (2005). Silencing of glutathione S-transferase P1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 221(2):135-43.
- **Zhang**, F.; Yao, S.; Yuan, J.; Zhang, M.; He, Q.; Yang, G.; Gao, Z.; Liu, H.; Chen, X. and Zhou, B. (2011). Elevated IL-6 receptor expression on CD4+ T cells contributes to the increased Th17 responses in patients with chronic hepatitis B. *Virology J.* 8(1):270.
- **Zhao**, Y.J.; Ju, Q. and Li, G.C. (2013). Tumor markers for hepatocellular carcinoma (Review). *Mol. Clin. Oncol.* 1(4): 593-8.
- **Zhao**, J.; Yan, T.; Bi, X.; Zhao, H.; Huang, Z.; Zhou, J.; Li, C. and Cai, J. (2014). Correlation of carcinoembryonic antigen with prognosis of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 36(6):430-434.
- **Zhao**, W.; Zhang, L.; Xu, Y.; Zhang, Z.; Ren, G.; Tang, K.; Kuang, P.; Zhao, B.; Yin, Z. and Wang, X. (2014). Hepatic stellate cells promote tumor progression by enhancement of immunosuppressive cells in an orthotopic liver tumor mouse model. *Lab. Invest.* 94:182–191.
- **Zheng**, Z.; Zhou, L.; Gao, S.; Yang, Z.; yao, J. and Zheng, S. (2013). Prognostic Role of C Reactive Protein in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Med. Sci.* 10(6):653-664.

- **Zhou, L.;** Liu, J. and Luo, F. (2006). "Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma". *World J. Gastroenterol.* 12 (8): 1175–1181.
- **Zimonjic, D.;** Brooks, M.W.; Popescu, N.; Weinberg, R.A. and Hahn, W.C. (2001). Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. *In: Cancer Res.* 61(24):8838–8844.

Summary

A new liver cancer cell line Hepatic Cancer Ahmed Majeed (HCAM) has been characterized; it is considered as a useful tool in liver cancer research. The HCAM cell line was established from the primary tumor of a white swiss albino male mouse with spontaneous diffuse hepatocellular carcinoma. The current study in different experiments aimed to characterize our cancer cell line, which are:

A morphological study was carried out by staining the cells with hematoxylin and eosin dyes. They were polygonal epithelial like cells with central nucleus and multi-nuclei, further to the clear vacuoles in cytoplasm. In addition, Studying two growth curves for different cells numbers of HCAM cell line (10,000 cells/1ml and 100,000 cells/1ml), The lag phase was identical for the curves (24 hour), while log phase ranging from 24 hour to 144 hour and the decline phase was 240 hour. We also calculated the population doubling time that has been 54 hour for 10,000 cells/1ml and 47 hour for 100,000 cells/1ml.

The physiological study aimed to characterize HCAM tumor cells in eighth passage by studying the high activity of liver enzymes (Alanine transaminase, Aspartate aminotransferase, Gamma glutamyl transferase, Lactic dehydrogenase and C-reactive protein) U/L ($P \leq 0.05$) in tumor cell line comparing to normal liver cells from embryo and adult mice. High values of tumor marker proteins (Alpha-fetoprotein, Carcinoembryonic antigen and Carbohydrate antigen) U/L ($P \leq 0.05$) were also found in HCAM cell line compared with normal hepatocytes.

Immunohistochemistry examination was done for the tumor cells grown in tissue culture slides to detect the presence of some immune enzymes: Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1) gives negative result,

Summary

Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gives weak positive result and to test P53 protein that gives clear positive result.

The Cytogenetic study showed chromosomal aberrations with many numerical changes among the tumor cells and abnormal structures (Metacentric chromosomes, Breakpoints in the arms of chromosomes and abnormal chromosomal length) gives chromosomes with unknown origin called marker chromosome.

The Genetic study of HCAM cell line by using traditional polymerase chain reaction showed positive result for Mouse Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene and negative result for Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene. Conclusion: the hepatic cancer cell line showing high morphological, physiological, Immunohistochemical and genetically activities and this make it useful as liver cancer model.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Karbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology



**Study of histological and cellular
characteristics
For Hepatocellular Carcinoma cell line**

By

Huda Muayad Abd Al-Ridha Al-Musawi

Bachelor of Biology / College of Education for Pure Sciences

A Thesis submitted to the College of Education for Pure Sciences of Karbala
University as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Certificate of
Master in Biology - Zoology

Supervised By

Assist. Prof

Ahmed Majeed Alshammary

Assist. Prof

Sinaa Joubory Al-Bazii

1438 A.H.

2017 A.D.