

STUDY OF PROTEIN ELECTROPHORETIC PATTERN FOR SOME BREAST CARCINOMA CASES IN LIBYA

Al-Saadi, A. H.

Department of Biology, Faculty of Science University of Omar AL-Mukhtar, Libya

دراسة نمط الترحيل الكهربائي البروتيني لبعض حالات سرطان الثدي في ليبيا
علي حمود السعدي
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة عمر المختار

الملخص

يهدف هذا البحث الى دراسة التغيرات البروتينية في النساء المصابات بسرطان الثدي الخبيث بأجراء الترحيل الكهربائي للبروتين الكلي من أنسجة الثدي الورمية . ويمكن تلخيص النتائج المتحصل عليها فيما يلي :

- غياب إحدى الحزم البروتينية (بوزن جزيئي يقارب 13,5 KDa) في أنسجة ثدي المصابات بورم خبيث ، في حين تتوارد هذه الحزمة في أنسجة الثدي للنساء المصابات بورم حميد .
- زيادة كثافة الحزم البروتينية في عينات الأورام الحميدة وخصوصا تلك التي يقع الوزن الجزيئي لها بين ٢٠ - ٣٠ KDa .

وعلى الرغم من أن هذه الدراسة قد أنجزت باستخدام طرق تقليدية إلا أنها تمثل تطعماً مشرقاً نحو فهم طبيعة التغيرات الوراثية في التعبير الجيني للبروتينيات في خلايا سرطان الثدي .

INTRODUCTION المقدمة

بعد سرطان الثدي الخبيث (Breast carcinoma) في مقدمة الأمراض التي تصيب النساء في العالم حيث تشكل نسبة ١/١٠ ويموت أكثر من نصفهن ، كما ويصل عدد الوفيات إلى ٢٥٠٠٠ إمرأة لكل سنة في المملكة المتحدة و ربما يصنف من ضمن الأمراض الوراثية الأكثر تكرارا ، إذ يصل تكراره في الولايات السنوية ٣٠٠ / ١ حسب الإحصائيات الإنجليزية (Brown, ١٩٩٥) . وقد قدر معدل الوفيات في الولايات المتحدة ب ٢٣ حالة لكل ١٠٠٠٠ إمرأة سنويا (Gambrell, ١٩٨٠) . كما لوحظ ازدياد معنوي في نسبة الإصابة بهذا المرض في استراليا وأوروبا الغربية أيضا (Madivitt, ١٩٩٥) . وبالنسبة للعراق فقد أشارت إحصائيات مجلس السرطان إلى أن سرطان الثدي يعد من أكثر الأنواع شيوعاً وانتشاراً إذ يحتل المرتبة الأولى مقارنة بباقي أنواع السرطانات في النساء المصابات (Ministry of Health, ١٩٩٨) .

يمكن أن يورث هذا المرض بهيئه صفة جسمية سائدة كما أن النساء الحاملات للجين المعطوب يكونن أكثر عرضة لتطور المرض خلال حياتهن باحتمالية تصل إلى ٩٠ % (Brown, ١٩٩٥) . ومن الممكن أن تزداد نسبة الإصابة تحت تأثير العوامل الهرمونية و نوعية الغذاء و التعرض للأشعة الأيونية فضلاً عن عوامل أخرى كالجنس والعرق (MacMahon, 1994; Shepherd and Mutom, 1998) .

يتولد سرطان الثدي نتيجة لحدوث خلل في الهيئة الوراثية للخلايا الجسمية الثدي (Carins, 1981) والتي قد تكون ناتجة عن تغيرات كرومومosome عدديّة أو تركيبية أو كلاهما (Atkin, 1974; Steinardottir et al., 1995 ; Jafar et al., 2001) . هذا فضلاً عن بعض الحالات الناتجة عن عدم الاستقرار الوراثي والتي يمكن أن تنتج بفعل عامل الاستعداد الوراثي للإصابة (German, 1974) Predisposing factor .

لقد تم تحديد الجين المسئب لظهور هذا المرض والمسمى BRCA1 من خلال الاعتماد على تقنيات الهندسة الوراثية وخصوصا تقنية التباين في أطوال قطع التقى Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) حيث تبين أنه يقع على النزاع الطويل للكروموسوم رقم 17 وهو المسؤول عن الاستعداد الوراثي للإصابة بسرطان الثدي والمتباين عند النساء (Black and Solomon, 1993 ، Solomon, 1994) فضلاً عن وجود جين آخر مسبيب أطلق عليه BRCA2 يقع على النزاع الطويل للكروموسوم رقم 13 وهو المسؤول عن الاستعداد الوراثي للإصابة بسرطان الثدي في النساء والرجال (Nowak, 1994). لقد أشار تقرير منظمة التطور الصناعي للأمم المتحدة (UNIDO) الصادر في سنة ١٩٩٦ إلى أن حدوث الطفرات الوراثية في هذا الجين يمكن أن تزيد من احتمالية تشوّه سرطان الثدي في الرجال فضلاً عن إمكانية وجود جين ثالث أو أكثر . حيث أن حدوث أي اختلال كروموزومي يشتمل على مقاطع DNA الحاوية على هذه الجينات يؤدي إلى خلل في التعبير الجيني لها وبالتالي تكون حالة السرطان (Lynch, 1998 ; Orsetti et al., 2004) .

ونظراً لأهمية هذا المرض كونه يشكل مشكلة ذات أهمية خصوصية أصبحت شائعة في المجتمعات البشرية فقد هدف هذا البحث إلى إجراء دراسة لنمط الترحيل الكهربائي البروتيني لخلايا نسيج الثدي المصاب بالسرطان لتحديد بعض التغيرات التي يمكن أن تحدث على مستوى التغيير الجيني للبروتينات والتي قد تشكّل أحد المصادر المهمة في فهم آلية وتشخيص هذا المرض .

MATERIALS AND METHODS المواد وطرق العمل

- ١- الأفراد :

اشتملت الدراسة على عينة مولفة من ١٤ امرأة يرقن في مستشفى ٧ أكتوبر - مدينة بنغازي - ليبيا وتقرّب إجراء عملية جراحية لهن. ٧ منهن مصابات بسرطان الثدي الخبيث من النوع المنتشر داخل القناة I.D (Infiltrative ductal carcinoma) أو النوع الصلب S.C كما هو مبين في جدول ١- . ٧ آخريات مصابات بسرطان الثدي الحميد (Sirrhouus carcinoma) من النوع الغدي الليفي Fibroadenoma (مثلّ عينة قياسية للمقارنة) . واستثنى من الدراسة النساء المدخنات والمعاطيات للعقاقير لفترات طويلة .

جدول ١ . صفات مريضات سرطان الثدي الخبيث اللاتي تم دراسة نمط الترحيل الكهربائي البروتيني لهن

رمز المريضة	العمر	جهة الورم	نوع العملية الجراحية	المصابات من الأقارب	حجم الورم سم	نوع الورم	مرحلة الإصابة
BC 1	٥٠	اليسرى	استئصال كلي	IDC	٤	SC	نعم
BC 2	٤٢	اليسرى	استئصال الورم	SC	٣,٥	SC	كلا
BC 3	٤٩	كلا الجانبين	استئصال كلي	SC	٧,٥	الخالة	نعم
BC 4	٣٥	اليمني	استئصال الورم	SC	٥	SC	كلا
BC 5	٥٤	كلا الجانبين	استئصال كلي	IDC	٤	SC	نعم
BC 6	٣٥	اليسرى	استئصال الورم الأم ، الأخ	SC	٣	SC	كلا
BC 7	٣٦	اليسرى	استئصال الورم	-	٢	SC	كلا

SC : سرطان الصلب . IDC : المنتشر داخل القناة .

- ٢- تحضير مستخلص البروتين :

بعد إزالة الأنسجة الدهنية والمتخرّبة والدم من النسيج الورمي للثدي تم غسله بواسطة محلول منظم الفوسفات (PBS) المعقم ، وأُنجزت عملية تحضير مستخلص البروتين الكلي حسب طريقة Atkinson (١٩٨٥) بعد إجراء بعض التحويرات البسيطة ، فقد تم سحق ٥،٠ جم من النسيج جيداً بوجود ٣ أضعاف من الأسيتون (٣ جم : ١ وزن) المبرد في هاون خزفي مبرد داخل حمام ثلجي ، ثم نقل العالق إلى قمع بخثر وترك الراسب ليجف تحت التفريغ لمدة ٣٠ دقيقة . نقل الراسب إلى هاون خزفي مبرد وتم الاستخلاص بواسطة PBS بنسبة ١٥:١ وأجريت عملية الطرد المركزي المبرد (10000 دوره لمرة ١٥ دقيقة) . جمعت الطبقة العلوية الرائقة وكررت عملية الطرد المركزي بعد تتبّيعها بكبريتات الأمونيوم بنسبة ٩٠% بهدف ترسيب البروتين .

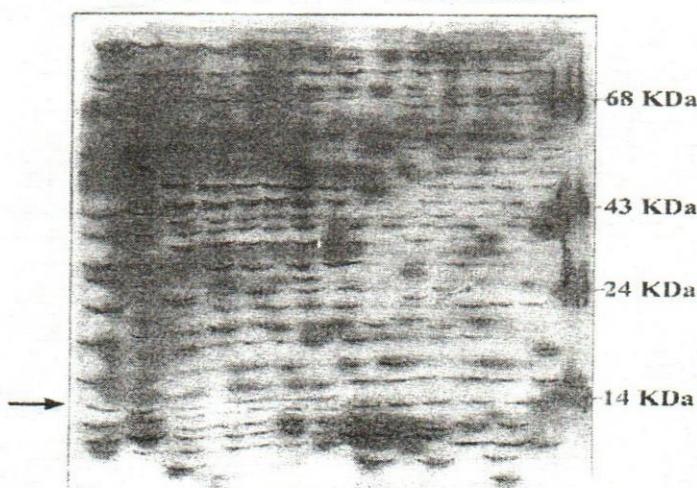
-٣ الترхيل الكهربائي :

أجريت عملية الترخيل الكهربائي على هلام الأكريل أميد (PAGE) المحضر بسمك ١,٥ ملم وبوجود الـ SDS حسب طريقة Laemmli (١٩٧٠) والمكون من ٣٠ مل pH 6.8 , 3% Acrylamide (Stacking gel) لهام الرص (pH 8.8 , 12.5% Acrylamide) (Separating gel) pH 8.3 , 192 mM Glycin , 25 mM Tris . و ١٢٠ مل المنظم (pH 8.3 , 192 mM Glycin , 25 mM Tris) . و تم تحويل ١/١٠ من كمية كل مستخلص بروتيني للعينات بعد المزج مع ٥٠ ميكروليتر من محلول التكسير { 10% glycerin , 1% 2-mercaptoethanol , 1% SDS , (pH 6.8) 60 mM Tris-HCl } آلة 0.01% bromophenol blue { والتسخين في حمام مائي مغلق لمدة ٥-٣ دقائق ثم ربط التيار الكهربائي (Constant current) عند درجة حرارة ٤ م° تقريبا . قدر الوزن الجزيئي لكل حزمة بروتينية بالمقارنة مع بروتينيات قياسية (Sigma شركة) تضمنت البروتينات مصل البقر BSA (٦٨ KDa) و البروبيون البيض Ovalbumin (٤٣ KDa) و إنزيم الـ Trypsin (٤٣ KDa) و Coomassie اإنزيم الـ Lysozyme (١٤ KDa) . صبغ الهلام باستخدام صبغة كوماسي الزرقاء Merril blue R 250 (brilliant blue R 250) حسب طريقة (١٩٨١) آخر .

RESULTS AND DISCUSSION النتائج و المناقشة

لقد أوضحت نتائج نمط الترخيل الكهربائي للبروتينات الكلية المستخلص من الأنسجة السرطانية (جدول ٢ - ٨) بأن العدد الكلي للحزم البروتينية يتراوح بين ٣٢ - ٣٧ لمجموعة عينات الأورام الخبيثة (المجالات ٨ - ١٤) وبين ٣٤ - ٣٨ لمجموعة عينات الأورام الحميدة (المجالات ١ - ٧) بحيث تراوحت الأوزان الجزيئية لجميع العينات بين ٨٩,٥ KDa إلى أقل من ٤,٥ KDa . وعلى الرغم من التطابق الكبير في تواجد أغلب الحزم البروتينية لكلا المجموعتين إلا أن ما تجدر الإشارة إليه هو تفرد عينات الأورام الحميدة بالحزمة البروتينية ١٣,٥ KDa (الشكل ١-١) التي ربما تمثل إحدى المواد البروتينية المهمة التي تلعب دوراً وقائياً ضد استئثار الورم والتي يكون إنتاجها تحت سيطرة أحد الجينات الكابحة .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



شكل ١ . فصل مستخلص البروتينات الكلية لأورام الثدي باستخدام تقنية الترخيل الكهربائي على هلام الأكريل أميد بوجود الـ SDS .

المجالات ١ - ٧ عينات سرطان الثدي الحميد من النوع الغدي الليفي (يشير السهم إلى موقع الحزمة 13.5KDa) .

المجالات ٨ - ١٤ عينات سرطان الثدي الخبيث BC1 - BC7 على التوالي . المجال ١٥ بروتينات قياسية .

و عند تفحص شدة الحزم البروتينية يلاحظ أنها أكثر كثافة في عينات أورام الثدي الحميدة مقارنة بعينات أورام الثدي الخبيثة وخصوصاً عند الأوزان الجزيئية التي تتراوح بين ما يقارب ٢٠ KDa - ٧٠ KDa الأمر الذي يمكن تفسيره في ضوء النقصان الكمي للـ mRNA والتعديل الجيني لبعض الأنزيمات المهمة والذي يمكن أن يحدث في عدد من الأورام السرطانية . (Avila et al. 2004)

اما بخصوص تباين وجود بعض الحزم البروتينية في بعض الحالات كالحزمة ٨٠ أو KDa ٧٨,٥ فإنه قد يعود الى التباين الفسيولوجي او الوراثي بين افراد النوع الواحد . إن النتائج المتحصل عليها تدعم الاعتماد على تقنية الترحيل الكهربائي وتساعد في تفسير آلية التعديل الجيني للجينات الكابحة المسؤولة عن هذه البروتينيات خصوصاً وأنها قد استخدمت في التحري عن التغيرات الوراثية للحيوانات (Wilcox, 1972) وفي دراسة التعديل الجيني في خلايا وأنسجة الإنسان (Cancela and Price, 1992) هذا فضلاً عن استخدامها في الدراسات المقارنة لأنسجة الجنينية وبالغة المتعلقة بتطور الحيوانات الفقارية . (Cancela et al. 2001)

REFERENCES المراجع

- Atkin, N. B.(1974).Chromosome human malignant tumors. In chromosome and cancer . John Wiley. NY.
- Atkinson, T.(1985).Human growth hormone: Microbial expression and purification . Biotech. 1:1-7.
- Avila, M.A., C. Berasain and L. Torres (2004). Reduce mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human live cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. 33(6) : 907-914.
- Black, D.M. and E. Solomon (1993).The search for the familial breast/ovarian cancer gene. Trend in Genetics, 9: 22-26.
- Brown, T.A. (1995).Gene cloning , an introduction .3rd ed. Chapman and Hall, London, UK.
- Cancela, M.L. and P.A. Price (1992). Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cell. Endocrinology, 130 :102-108.
- Cancela, M.L., C.M. Ohresser, J.P. Reia, C.S. Viegas, M.K. Williamson and P.A. Price (2001). Matrix Gla protein in *Xenopus laevis* : molecular cloning, tissue distribution and evolutionary consideration. Journal of Bone and Mineral Res., 16(9) : 1611-1621.
- Cairns, J.(1981). The origin of human cancer. Nature, 289: 353.
- Gambrell, R.(1980). In the menopause and post- menopause (Pasetto, N., R. Paolelli and J.C. Ambrus eds.), p289. Lancaster MTP press.
- German, J.(1974). Bloom syndrome II. The prototype of human genetic disorders predisposing to chromosomal instability and cancer. In: Chromosomes and Cancer (J. German ed.), Wiley NY. PP. 601-617.
- Jafar, S.G., N.Y.Yassen and R.M. Ijam (2001). Cytogenetic study of breast cancer in Iraq. Journal of Biotechnology Res., 3(1): 40-50.
- Laemmli, U. K.(1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of a bacteriophage T4. Nature, 227:680
- Lynch, H.T.(1998). Prognosis of BRCA1 . Hereditary breast cancer. Lancet,135-304.
- MacMahon, B. (1994). A biology frame work for the risk factors for breast cancer. Advance in oncology, 10.3-10.9

- Medivitt, R.W. (1995). Breast. In : Anderson of pathology. 9th ed. John, M.K. The C.V. Mosby Company, USA.PP.1726-1750.
- Merril, C.R., D. Goldman, Sedman and M.N. Ebert (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211:1437.
- Ministry of health (1998). Results of Iraqi. Cancer registry,1995-1997.In press. (Cited by Jafer et al., 2001).
- Nowak, R.(1994). Breast cancer gene offers surprises. *Science*, 265 :1976-1799.
- Orsetti, B., M. Nugoli, N. Cervera, L. Lasora and P. Chuchana (2004). Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alteration and novel candida genes. *Cancer Res.* 64(18) :6453-6460.
- Shepherd, J. and M.G. Mutom (1998). Testing for genetic susceptibility to ovarian and breast cancer in contemporary. OIG group. UK. PP. 88-114.
- Steinardottir, M., I. Petursdottir, S. Snorradttir, E.J. Eypgord and H.M Ogmundsdottir (1995). Cytogenetic studies of breast Qrcinoma (Different Karyotypic profiles detected by direct harvesting and short term culture). *Genes Chromosome Cancer*, 13: 239-248.
- UNIDO (1996). Genetic engineering and biotechnology. Vienna, 3:42.
- Wilcox, F.H.(1972).Genetic variation of a major liver protein in the mouse. *Journal of Heredity*, 63(1): 60-62.

STUDY OF PROTEIN ELECTROPHORETIC PATTERN FOR SOME BREAST CARCINOMA CASES IN LIBYA

Al-Saadi, A. H.

Department of Biology , Faculty of Science University of Omar AL-Mukhtar, Libya

ABSTRACT

Protein electrophoretic pattern analysis was made to study of protein variation in women patients with breast carcinoma .The obtained results summarized as following :

1. Absence of specific protein (13.5 KDa) in the tissues of women patients with breast carcinoma, which was found only in the tissues of breast benign tumors.
2. Increase of protein bands density in the being tumor samples , especially that situated between 30 KDa - 70 KDa .

Although this study was performed using conventional procedure , it is highly promising for understanding of the nature of protein gene expression in breast cancer cells .

Keywords : Breast carcinoma , Protein electrophoretic pattern