العلاقة بين جين عامل تحول النمو بيتا1 TGFβ1 وسرطان القولون والمستقيم في المجتمع العراقي

اثير عبد القادر زين العابدين محمد و أنور عبد ناصر ضبعان
قسم علوم الحياة- كلية التربية- الجامعة العراقية

الخلاصة

شملت الدراسة على 75 عينة دم كان منها 50 عينة لأشخاص مصابين بسرطان القولون والمستقيم Colorectal Cancer (CRC) تراوح اعمارهم مابين 25-75 سنة وكان متوسط اعمارهم 48.4 سنة, و 25 عينة دم لاشخاص اصحاء (عينات سيطرة) وكانت اعمارهم تتراوح بين 18-60 سنة ومتوسط اعمارهم كان 20.6 سنة. درس التعدد الشكلي لجين TGFβ1-509C/T المتضخم باستعمال تقانة تفاعل البلمرة لنظام الممانعة للتضاعف الرباعي Tetra-Amplification refractory mutation system (TARMS-PCR). اظهرت النتائج وجود فروق معنوية مع نسبة عالية للأليل C في عينة المصابين بالمقارنة مع الأليل T, وظهر الأليل C كأليل مسبب مرتبط مع خطر الأصابة بسرطان القولون والمستقيم، بينما سجل الأليل T نسبة اعلى من الأليل C في العينة القياسية، وظهر الأليل T كأليل وقائي من المرض. اظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبط وبصورة معنوية مع الجزء المسبب للاصابة بسرطان القولون والمستقيم, بينما ظهر النمطين الوراثيين TT و TC كنمطين وراثيين مرتبطين مع الجانب الوقائي من خطر الاصابة بسرطان القولون والمستقيم. كما اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود علاقة معنوية مابين جين TGFβ1 وسرطان القولون والمستقيم, واظهرت هذه العلاقة ارتباط معنوي لبعض الانماط الوراثية لجين TGFβ1 في الموقع 509C/T مع تطور خطر الاصابة بسرطان القولون والمستقيم.

البحث مستل من رسالة الباحث الاول

الكلمات المفتاحية: جين عامل تحول النمو بيتا 1، سرطان القولون والمستقيم، التعدد الشكلي المظهري

Association between TGFβ1 and colorectal cancer in Iraqi population

Atheer abd al qadeer zain al abdeen mohammed and Anwar Abed Nasser Dhabaan

The Iraqi University / Collage of Education, Iraq

ABSTRACT

This study included 75 blood specimens. Fifty four samples collected from colorectal cancer (CRC) with age ranged between 25-75 years (mean age 48.4 years), and 25 blood specimens collected from healthy as a control sample with age ranged between 18-60 years (mean age 20.6 years). The polymorphism of TGFβ1-509 C/T gene, which amplified by using amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) was showed high percentage of C allele frequency in (CRC) patients sample in comparison with T allele frequency, and the C allele revealed as etiological fraction with risk by having (CRC) disease, whereas the T allele showed high frequency from the C allele frequency in control specimen, and the T allele revealed as preventive fraction from infection by this disease. The TT and TC genotypes revealed as preventive fraction with risk by having (CRC) disease, whereas the CC genotype revealed as etiological fraction with risk by having (CRC) disease. Our findings demonstrate that the TGFβ1-509 C/T gene polymorphism may represent a significant risk factor for (CRC) in Iraqi population and there is association between the TGFβ1-509 C/T polymorphism and (CRC) patients.

Keywords: : Transformed growth factor gene, Colorectal Cancer, Polymorphisms

المقدمة:

سرطان القولون والمستقيم Colorectal cancer هو المصطلح المستخدم لوصف السرطان الذي نشأ في البطانة الظهارية من الأمعاء الغليظة [1], ويعد سرطان القولون والمستقيم (CRC) المسبب الثالث للوفاة قياساً بانواع السرطانات الاخرى على مستوى العالم، وتتزايد معدلات حدوثه في البلدان النامية ويكون أقل في البلدان المتطورة، وعادةً ما يظهر سرطان القولون والمستقيم CRC في الخلايا الغدية الظهارية للأمعاء الغليظة، وينشأ السرطان عندما تكتسب هذه الخلايا السليمة سلسلة من الطفرات الجينية التي تمنحها سلسلة انقسامات غير طبيعية [2], ومع زيادة هذا الانقسام والنمو الغير طبيعي سوف تؤدي إلى ظهور ورم غدي، الذي قد يتطور إلى ورم خبيث يستطيع الإنتشار إلى مناطق اخرى بعيدة من جسم الإنسان [3]. الوظيفة الأساسية للقولون هي إعادة امتصاص المواد الغذائية من ماء ومعادن ومواد تغذوية مختلفة. تنتظيم الطبقة الظهارية في الجهاز الهضمي على شكل خبايا Crypts و زغابات Villi، كما تشمل الخلايا الظهارية خلايا بانيث Paneth cells والخلايا الكأسية Goblet cells وأيضاً تشمل خلايا الغدد الصماء المعوية [4], يصنف سرطان القولون والمستقيم في المرتبة الثانية من بين أكثر السرطان فتكاً وثالث أكثر الأورام الخبيثة انتشاراً في العالم، وتتسبب في اصابة 1.8 مليون حالة جديدة من سرطان القولون والمستقيم في عام 2018، مع تسجيل 881,000 حالة وفاة من العام نفسه، اي مايمثل 10% من حالات الوفيات بمرض السرطان في جميع انحاء العالم [5], وفي عام 2020 سيتم تسجيل 147,950 إصابة جديدة بهذا المرض الخطير وهو ما يمثل 8.2% من حالات الإصابة الجديدة بسرطان القولون والمستقيم، بينما عدد الوفيات سيكون 53,200 حالة وهو ما يمثل 8.8% من حالات الوفيات بالسرطان [6]، ويتوقع ارتفاع حالات الاصابة بسرطان القولون والمستقيم إلى مايقارب 2.5 مليون حالة بحلول عام 2035 [7], الكشف المبكر لسرطان القولون والمستقيم مهم في علاج المرض، وان خطورة المرض تعتمد على تاريخ حدوث الإصابة ودرجة إنتشاره وعادةً ما يكون العلاج الأمثل لسرطان القولون و المستقيم هو بتحقيق الإزالة الكاملة للورم والتي تتطلب تدخلاً جراحياً[8]. تلعب الحركيات الخلوية Cytokines دوراً بارزاً في نمو وتطور سرطان القولون والمستقيم [9], ويمكن تعريف الحركيات الخلوية Cytokines على انها وسائط حركية مناعية تكون على شكل بروتينات ذائبة ذات سلاسل ببتيدية منخفضة الوزن الجزيئي تتراوح بين 5 الى 25 كيلو دالتون, وتعتبر وسائط ذات أهمية بارزة لكونها تشترك في الأستجابات المناعية ضد الأمراض ومسبباتها [10] يتم انتاج الحركيات الخلوية Cytokines بواسطة عدد كبير من الخلايا المناعية, حيث تعمل على تنشيط المناعة الخلوية الموجهة ضد المسبب المرضي [11], تظم الحركيات الخلوية مجموعة واسعة من الوسائط المناعية من بينها (TGFβ1) [12], الـTGF-β1 هو عبارة عن بروتين يشارك في العديد من العمليات الحيوية بما في ذلك تكاثر الخلايا والتمايز والهجرة الخلوية والموت المبرمج ويعتبر من الحركيات الخلوية المهمة والموجة ضد الخلايا السرطانية ومن بينها سرطان القولون والمستقيم [13]. اظهرت الدراسات الوراثية حول الموضوع بان الجين الوراثي المسؤول عن تشفير TGF-β1 يقع على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 19 في الموقع 19q13.2 [14], اي تغير وراثي في التراكيب الجزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج هذا البروتين سوف يوثر على الفعاليات الحيوية لوظيفتها، وإن اي خلل وراثي في الموروثات المسؤولة عن هذه انتاج هذا الحركي الخلوي يمكن أن يقود بالنهاية إلى نمو وتطور خطر سرطان القولون والمستقيم [15]. الهدف من هذه الدراسة الكشف عن التعدد الشكلي المظهري لجين TGFβ1 باستعمال نظام الممانعة للتضاعف بتقانةARMS-PCR بعد عزل

الدنا DNA من العينات المدروسة لمعرفة مدى علاقة وارتباط الانماط الوراثية لجينTGFβ1 مع سرطان القولون والمستقيم.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات دم المرضى المصابين بسرطان القولون والمستقيم

شملت الدراسة 75 عينة دم، وكانت 50 عينة دم لاشخاص مصابين بسرطان القولون والمستقيم تراوحت اعمارهم بين سنة 25-75 و25 عينة من الأصحاء (المجموعة القياسية) تراوحت اعمارهم بين 18-60 سنة. جمعت عينات المرضى من مستشفى الأمل الوطني للأورام في بغداد- العراق للمدة من 1 أيلول من عام 2019 ولغاية 15 تشرين الأول من العام نفسه. جمع الدم في أنابيب خاصة بحجم 2.5 مليلتر حاوية على مادة الـ EDTA كمانع لتخثر الدم والتي أستعملت في استخلاص الدنا DNA، وشخصت العينات من قبل المختصين في وحدة السكري في مستشفى الأمل الوطني للأورام. نظمت أستمارة خاصة جمعت فيها معلومات المرضى والأصحاء.

عدة عزل واستخلاص الدنا (DNA) من عينة المرضى المصابين بسرطان القولون والمستقيم وعينة الاصحاء

استعملت عدة خاصة بعزل واستخلاص الدنا واستعملت بحسب النشرة المرفقة من قبل شركة Geneaid الأميركية المصنعة للعدة. عين تركيز ونقاوة الدنا باستعمال جهاز Nanodrop باستخراج نسبة A_{260}/A_{280} وأن الدنا النقي تكون قيمة نسبة الامتصاص له هي 1.8±0.1 [16]. حفظت العينات بعد ذلك تحت حرارة 20- °م لحين الاستعمال.

خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR mix

استعمل الخليط AccuPower® PCR PreMix في تجارب نظام الممانعة للتضاعف بتقانة ARMS-PCR، وحضرت بحسب النشرة المرفقة من قبل شركة Bioneer الأميركية. تسلسل البادئات لجين 509C/T-TGFβ1.

البادئات (Primers):

صنعت اربعة من البوادئ الخاصة في شركة Alpha DNA الكندية وبحسب الطلب, وكانت اثنان منها للكشف عن جين TGFβ1-509C/T جدول (1), وأثنان للكشف عن الأليل T و C جدول (2) وبحسب المصدر [17]. وحضرت بحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة.

واصم الوزن الجزيئي للدنا DNA molecular weight markers

استعمل الواصم الجزيئي Molecular marker المنتج من قبل الشركة Bioneer الأمريكية بحجم 2000 زوج قاعدة وبدرجة 100 زوج قاعدة.

الكشف عن جين TGFβ1-509C/T

استعملت طريقة تفاعل سلسلة البلمرة لنظام التظاعف ARMS-PCR في الكشف عن جين TGFβ1-509C/T, وحضر المزيج الأساسي PreMix للبوادئ الخاصة بالدراسة وبحسب طريقة شركة Bioneer) (الكورية مع بعض التغيرات. استعمل AccuPower® PCR PreMix المزود من شركة Bioneer الكورية وحسب النشرة المرفقة. أستعملت البوادئ للكشف عن الأليل C و T ثم وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري (Thermocycler) لغرض تضخيم الحامض النووي الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف مثالية للتفاعل. المرحلة الاولى هي مسخ القالب الأول Denature template وبدرجة حرارة 95 ºم وتستمر لمدة 5 دقائق والمسخ الأبتدائي الأول First initial denaturation ضبط بدرجة حرارة 95 ºم لمدة 30 ثانية والتحام البادئ الأول First annealing ضبط بدرجة حرارة 60 ºم ولفترة 30 ثانية والاستطالة الأولى First extension ضبط بدرجة حرارة 72 ºم ولفترة 30 ثانية والاستطالة النهائية Final extension ضبطت بدرجة حرارة 72 ºم لمدة 10 دقائق والمرحلة النهائية للحضن ضبطت بدرجة حرارة 4 ºم لمدة 5 دقائق ومراحل المسخ الأبتدائي وألتحام البادئ والأستطالة الأولى ضبطت بـ 35 دورة. والمسخ الأبتدائي الثاني Second initial denaturation ضبط بدرجة حرارة 95 ºم ولفترة 30 ثانية والتحام البادئ الثاني Second annealing ضبط بدرجة حرارة 60 ºم ولفترة 30 ثانية والأستطالة الثانية Second extension ضبط بدرجة حرارة 72 ºم ولفترة 30 ثانية والاستطالة النهائية الثانية Second final extension ضبطت بدرجة حرارة 72 ºم لمدة 10 دقائق والمرحلة النهائية الثانية للحضن ضبطت بدرجة حرارة 4 ºم لمدة 5 دقائق وكانت مراحل المسخ الأبتدائي وألتحام البادئ والأستطالة الثانية ضبطت بـ 35 دورة. حملت نواتج الـ TARMS-PCR للدنا المرضى المصابين بسرطان القولون والمستقيم وعينة الاصحاء في جهاز هلام الآكاروز بتركيز 2.5%. حمل الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 2000 زوج قاعدة. أستعملت صبغة Diamond^{TM} Nucleic Acid Dye والتي تم تصنيعها من قبل شركة Promega الأمريكية. حضر 10X من هذا دارئ (TBE) Tris-Borate-EDTA buffer لغرض أستعماله في الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis وذلك بإذابة 108 غرامات من مادة Trizma base و55 غراماً من حامض البوريك Boric acid و40 ملليتراً من مادة (EDTA) Ethelene Diamine Tetra Acetic Acid بتركيز 0.5 مولاري. أضيف الماء المقطر المعقم وصولاً إلى لتر واحد مع تعديل الأس الهايدروجيني pH إلى 8، كما استعمل الدارئ نفسه المعد من قبل شركة PIONEER الكورية. حضر هلام الآكاروز بتراكيز 2.5% في تجارب نظام الممانعة للتضاعف بتقانة Tetra-ARMS-PCR، إذ أذيب 2.5% غرام من الآكاروز وعلى التوالي في 50 ملليتراً من دارئ (TBE) Tris-borate buffer. سخن الخليط عند درجة حرارة 60 ºم بأستعمال الصفيحة الساخنة Hot plate وحتى ذوبان الخليط وصب في حوض الترحيل المخصص وحسب تعليمات شركة Biobasic الكندية. شوهدت باندات الانماط الوراثية وصورت قطع الدنا المتضخمة بوساطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا لهذا الغرض.

التحليلات الأحصائية

حللت بيانات ناتج تفاعل سلسلة البلمرة لنظام االمانعة للتظاعف باستعمال البرنامج الاحصائي Statistical Package for Social Sciences (SPSS)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار

فشر Fisher's test على مستوى أحتمالية P<0.05. وحللت تكرارات الاليلات والأنماط الوراثية والنسبة الحرجة Odds ratio (OR) وفسحة الثقة Confidence Intervals (CI) باستعمال برنامج Compare 2 Ver.3.04 والمصنع بواسطة J. H. Abramson عام 2003-2007 [18]. جرى تحليل للنتائج باستعمال قانون التوازن لهاردي-واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium وحسب الموقع الألكتروني . www.had2know.com/academics.html

النتائج والمناقشة

عينات المصابين بسرطان القولون والمستقيم والعينة القياسية

تضمنت الدراسة 75 عينة دم، وكان منها 50 لأشخاص مصابين بسرطان القولون والمستقيم تراوح أعمارهم ما بين 25-75 سنة ومتوسط اعمارهم 48.4 كان سنة, كما شملت الدراسة على 25 عينة دم لاشخاص اصحاء ظاهرياً التي عدت كعينات سيطرة وكانت اعمارهم تتراوح بين 18-60 سنة, وكان متوسط أعمارهم 20.6 سنة. أجريت دراسة وراثية على عينات الدم المأخوذة من الأشخاص المصابين بسرطان القولون والمستقيم والأصحاء (العينة القياسية).

التعدد الشكلي لجين TGFβ1-509C/T

درس تعدد الأشكال الوراثية Genetic polymorphism لجين TGFβ1 في المرضى المصابين بسرطان القولون والمستقيم باستعمال تقانة ARMS-PCR وتم مقارنتها مع العينات الأصحاء (العينات القياسية). أظهرت نتائج التحليل الوراثي لجين لجين TGFβ1-509C/T إلى وجود ثلاثة أنماط وراثية هي TT، TC و CC في عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم والعينة القياسية تم الحصول عليها من نتائج اليل T واليل C، فعند ظهور حزمة واحدة في المجال T وعدم وجودها في المجال C فيكون النمط الوراثي هو TT وفي حالة ظهور حزمة في المجال C وعدم ظهورها في المجال T فيكون النمط الوراثي CC وعند ظهور حزمتين في كلا المجالين T و C فيكون النمط الوراثي TC، وكما في الشكل (1 و2)، ولم نضع جميع الأشكال لكثرتها وتشابهها ونكتفي بوضع شكل واحد من عينات المصابين لغرض توضيح كيفية تعيين اللألليلات والأنماط الوراثية في العينات المدروسة. أظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين T و C لجين TGFβ1-509C/T وباستعمال البرنامج الاحصائي وجود نتائج متغايرة مابين عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم وعينة الاصحاء, إذ أظهر الأليل C فروق معنوي في عينة المصابين ونسبة شكلت 64% بالمقارنة مع الأليل T الذي سجل نسبة 36%، بينما سجل الأليل C في العينة القياسية نسبة 48% بالمقارنة مع الأليل T الذي سجل نسبة 52% شكل (3). كذلك يبين الجدول (3) أن التوزيع التكراري قد تباين معنوياً بين عينة المصابين وعينة الاصحاء, وتبين النتائج بأن الأليل C أظهر تكرار معنوي لدى عينة المصابين بنسبة أعلى من عينة الاصحاء, وكانت النسبة الحرجة Odds ratio (OR) هي 1.93 (عندما تكون النسبة الحرجة أكثر من واحد تكون مرتبط مع المرض) مع فسحة ثقة Confidence Intervals (CI) تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 0.97-3.81, وظهرت نسبته كأليل مسبب مع المرض Etiological fraction (EF) = 30.8%, بينما أظهر الأليل T تكراراً معنوياً في عينة الاصحاء, وكانت النسبة الحرجة Odds ratio هي 0.52 مع فترة ثقة Confidence Intervals تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 0.26-1.03 ، وكانت نسبته كأليل وقائي من المرض Preventive fraction (PF) بلغت 25%.

أظهرت نتائج التحليل الوراثي لتقانة TARMS-PCR للجين TGFβ1-509C/T, إلى وجود ثلاثة أنماط وراثية لدى عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم وعينة الاصحاء, وهي TT، TC و CC (شكل رقم 3). واظهرت النتائج كما مبينة في الجدول (4) وجود فروق معنوية في تكرار الأنماط الوراثية ما بين عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم وعينة الاصحاء, إذ أظهر النمط الوراثي CC فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ مع سرطان القولون والمستقيم وكانت نسبته أعلى بالمقارنة مع عينة الاصحاء وكانت النسب 54% و 24% وعلى التوالي شكل (4). اظهرت قيمة النسبة الحرجة 3.72 وفترة الثقة كانت قيمتها بين 1.30-10.67، كما ظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبط مع خطر الأصابة بسرطان القولون والمستقيم، إذ بلغت قيمته 39.5%, كما اظهر النمط الوراثي TC فروق معنوية بين المصابين والأصحاء, وسجلت النسب 20% و 48% وعلى التوالي شكل (4), وكانت قيمة النسبة الحرجة 0.27 وفترة الثقة كانت قيمتها بين 0.10-0.76، كما لوحظ TC كنمط وراثي مرتبط مع الجزء الوقائي، إذ بلغت قيمته 35%. أظهر النمط الوراثي TT كنمط مرتبط مع الجانب الوقائي من خطر الاصابة بسرطان القولون والمستقيم اذ اظهر ارتباطا معنويا مع عينة الاصحاء وبنسبة أعلى من عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم وكانت النسب 28% في عينة الاصحاء و 26% في عينة المرضى. كانت قيمة النسبة الحرجة 0.90 وفترة الثقة كانت قيمتها بين 0.31-2.61.

من خلال النتائج أعلاه يتبين أن الطرازيين الوراثيين متماثل الزيجة TT ومتباين الزيجة TC يرتبطان مع العامل الوقائي من الإصابة بالمرض, ولكن نسبة أرتباط الطراز الوراثي TC مع الجانب الوقائي من خطر الأصابة بسرطان القولون والمستقيم كانت عالية, لذا يتبين أن الطرازين الوراثيين متماثل الزيجة TT ومتباين الزيجة TC يمكن أن يعتمد عليهما كمؤشر وقائي من خطر الأصابة بالمرض, ويتبين من النتائج أيضاً أن النمط الوراثي CC المتماثل الزيجة Homozygote مرتبط مع خطورة الإصابة بالمرض.

اتفقت هذه النتائج مع دراسة [19] من حيث ظهور النمط الوراثي CC متماثل الزيجة Homozygous مرتبط مع الجزء المسبب لخطورة الإصابة بمرض سرطان القولون والمستقيم, والنمط الوراثي TC المتباين الزيجة Heterozygo مرتبط مع الجزء الوقائي بينما اختلفت دراستنا عنه من حيث ظهور النمط الوراثي TT متماثل الزيجة Homozygous مرتبط مع الجزء المسبب. كذلك اتفقت هذه الدراسة مع دراسة [20] من حيث ظهور النمط الوراثي TT متماثل الزيجة Homozygous مرتبط مع الجزء الوقائي لخطورة الإصابة بمرض سرطان القولون والمستقيم, والنمط الوراثي CC متماثل الزيجة Homozygous مرتبط مع الجزء المسبب لخطورة الإصابة بالمرض, بينما اختلفت عنه من حيث ظهور النمط الوراثي TC المتباين الزيجة Heterozygo مرتبط مع الجزء المسبب لخطورة الإصابة بالمرض. يلعب مسار إشارات عامل النمو المحول بيتا TGF-β11 أدوراً مهمة في التحكم بعملية نمو الأنسجة وتكاثرها وتمايزها وموت خلاياها المبرمج [21], وعلى هذا النحو يؤدي اضطراب مسار الإشارات هذا إلى العديد من الأمراض بما في ذلك السرطانات [22], حيث يؤدي تعطيل إشارات هذا الحركي الخلوي المناعية إلى تطور الورم الخبيث في الأنسجة الطبيعية [23].

من نتائج هذه الدراسة تبين وجود علاقة كبيرة ما بين جين TGFβ1-509C/T وسرطان القولون والمستقيم وهذه العلاقة تكون مرتبطة مع تكرار الانماط الوراثية ضمن جين TGFβ1 وخطر العامل المسبب Etiological fraction لسرطان القولون والمستقيم.

المصادر

[1] Humphries, A. & Wright, N.A., 2008. Colonic crypt organization and

tumorigenesis. Nature reviews. Cancer, 8(6), pp.415–24.

[2] Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. The molecular genetics of colorectal cancer. Frontline Gastroenterol (2014); 5: 26-30.

[3] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med (1988); 319: 525-32.

[4] Peifer M. Developmental biology: colon construction. Nature (2002) ; 420: 274-5.

[5] Bray, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin.

[6] Yin D, Morris CR, Bates JH, German RR. Effect of misclassified underlying cause of death on survival estimates of colon and rectal cancer. J Natl Cancer Inst. (2011); 103(14):1130-1133.

[7] Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. & Wallace, M. B. Colorectal cancer. Lancet 394, 1467–1480 (2019). Dinarello, C. A. (2007). Historical Review Cytokines. J. Immunol. 37 (suppl 1):PP. 34-45.

[8] Kuipers, E. J. et al. Colorectal cancer. Nat. Rev. Dis. Prim. 1, 15065 (2015).

[9] Becker C., M.C. Fantini, S. Wirtz, A. Nikolaev, H.A. Lehr, P.R. Galle, Rose John & M.F. Neurath (2005) IL-6 Signaling Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer, Cell Cycle, 4:2, 220-223, DOI: 10.4161/cc.4.2.1413.

[10] Dinarello, C. A. (2007). Historical Review Cytokines. J. Immunol. 37 (suppl 1):PP. 34-45. Doan, T., Melvold, R., Viselli, S. and Waltenbaugh,

[11] Wang J, Tang S, and Shen H. (2010). Association of genetic polymorphisms in the IL12-IFNG pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. (10):PP.1291-1295.

[12] Mager LF, Wasmer MH, Rau TT and Krebs P (2016) Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. Front. Oncol. 6:96.

[13] Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFβ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders.Cell (2000);103:295–309.

[14] Barton, D., Foellmer, B., Du, J., Tamm, J., Derynck, R. and Francke, U. (1988). Chromosomal mapping of genes for transforming growth factor beta2 and beta3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family. Oncogene Res. 3(4):323-331.

[15] Stanilova S, Stanilov N, Julianov A, Manolova I, Miteva L (2018) Transforming growth factor-β1 gene promoter -509C/T polymorphism in association with expression affects colorectal cancer development anddepends on gender.

[16] Clark, M. S. (1997). In: Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual, pp 305- 328, Springer-Verlog Berlin Heidelberg, New York.

[17] Ebrahim Eskandari D, Malihe Metanat B, Elham Pahlevani and Tooba Nakhzari-Khodakheir L. Association between TGFβ1 polymorphisms and chronic hepatitis B infection in an Iranian populationRev Soc Bras Med Trop 50(3):301-308, May-June, 2017.

[18] Dhabaan A. A.(2017). The Allelic and Polymorphism Association of Tumor Necrosis Factor-alpha Gene (-308 G/A Genotype) in Some Iraqi Rheumatoid Arthritis Patients. International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) .36(5): 302-309 .

[19] Sonja I.Berndt S, Wen-Yi Huang J, Nilanjan Chatterjee A, Meredith Yeager C, Robert WelchV, Stephen J.Chanock M, Joel L.Weissfeld E, Robert E, Schoen and Richard B, Hayes R. Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma pp.1965–1970, (2007).

[20] Mairi Macarthur S, Linda Sharp V, Georgina L. Hold, Julian Little, and Emad M. El-Omar JL. The Role of Cytokine Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer and Their Interaction with Aspirin Use in the Northeast of Scotland 2005;14(7);1613-8.

[21] Jung, B.; Staudacher, J.J.; Beauchamp, D. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. Gastroenterology (2017), 152, 36–52.

[22] Massague, J. TGFbeta signalling in context. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2012), 13, 616–630.

[23] Munoz, N.M.; Upton, M.; Rojas, A.; Washington, M.K.; Lin, L.; Chytil, A.; Sozmen, E.G.; Madison, B.B.; Pozzi, A.; Moon, R.T.; et al. Transforming Growth Factor β Receptor Type II Inactivation Induces the Malignant Transformation of Intestinal Neoplasms Initiated by Apc Mutation. Cancer Res. (2006), 66, 9837.

جدول (1) البوادئ المستعملة في الكشف عن جين TGFβ1 - 509C/T

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)	Size (bp)
1	Forward outer	AGTAAATGTATGGGGTCGCAGGGTGTTG	295
2	Reverse outer	AAAGAGGACCAGGCGGAGAAGGCTTAAT	

جدول (2) البوادئ المستعملة في الكشف عن الأليل T و C

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)	Size(bp)
1	Forward inner (T allele)	GGTGTCTGCCTCCTGACCCTTCCATACT	207
2	Reverse inner (C allele)	GAGGAGGGGGCAACAGGACACCTTAG	141

جدول (3): تكرارات الأليلين *t* و*c* للجين TGFβ -509 C/T في عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم والعينة القياسية

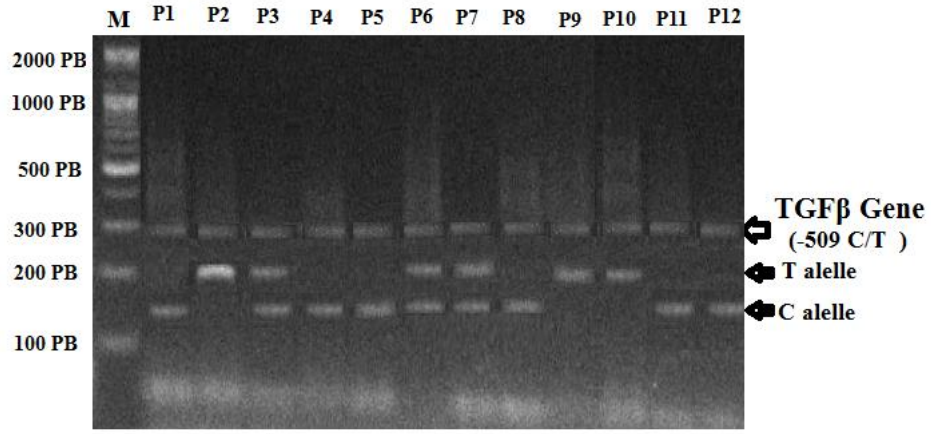
الجين	الأليل	عينة المصابين العدد100(%)	العينة القياسية العدد50(%)	(95%CI) OR	P value
TGFβ -509 C/T	T	(%36)36	(%52)26	(0.26-1.03)0.52	*0.045
	P.F	%25			
	C	(%64)64	(%48)24	(0.97-3.81)1.93	
	E.F	%30.8			

Odds ratio =OR (النسبة الحرجة)، Confidence Intervals =CI (مدة الثقة)، Preventive faction =P.F (نسبة الجزء الوقائي)، Etiological faction =E.F (نسبة الجزء المسبب).

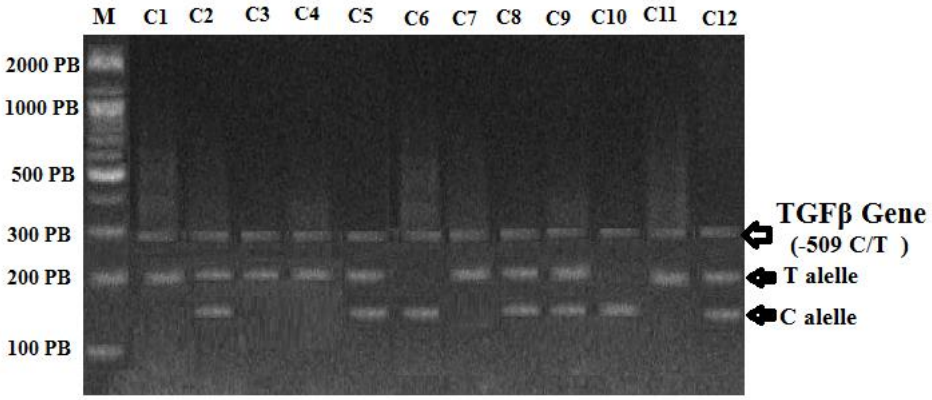
جدول (4): تكرار الأنماط الوراثية للجين TGFβ1 - 509C/T في عينات المصابين بسرطان القولون والمستقيم والعينة القياسية

الجين	النمط الوراثي	عينة المصابين العدد 50 (%)	العينة القياسية العدد 25 (%)	(95%CI) OR	P value
TGFβ -509 C/T	TT	(%26)13	(%28) 7	(0.31-2.61)0.90	0.531
	P.F		%2.7		
	TC	(%20)10	(%48)12	(0.10-0.76)0.27	*0.013
	P.F		%35		
	CC	(%54)27	(%24)6	(1.30-10.67) 3.72	*0.012
	E.F		%39.5		

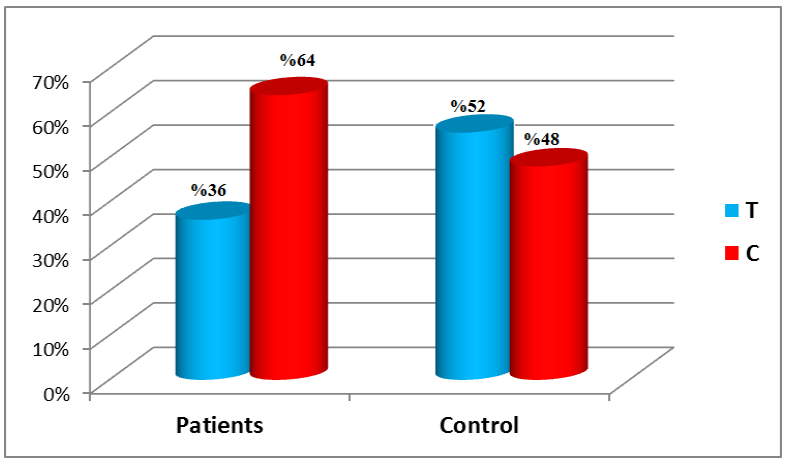
Odds ratio = OR (النسبة الحرجة)، Confidence Intervals =CI (مدة الثقة)، Preventive faction =P.F (نسبة الجزء الوقائي)، Etiological faction =E.F (نسبة الجزء المسبب)، *= اختلاف معنوي عند مستوى أحتمال P<0.05 وباستعمال اختبار فشر Fisher's test



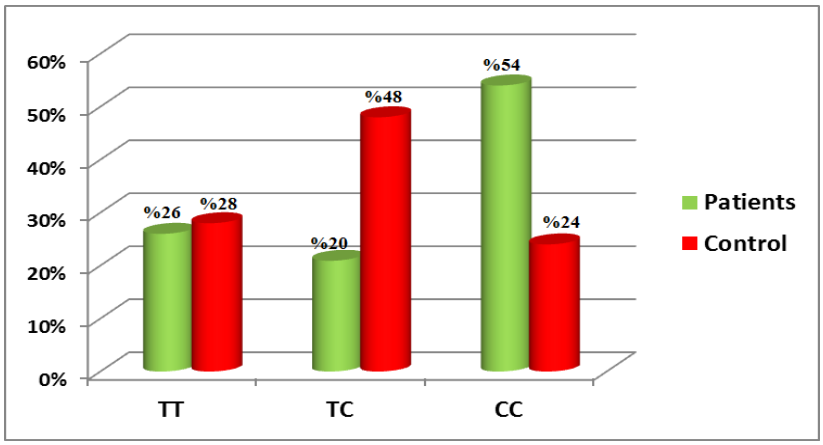
الشكل (1): يبين الترحيل الكهربائي لجين TGFβ1-509C/T مبيناً فيه الآليلين T و C في عينة المصابين بمرض سرطان القولون والمستقيم، وتم الترحيل الكهربائي بأستعمال هلام الآكاروز بتركيز 2.5% وتحت جهد فولتية 75V لمدة ساعة ونصف. يمثل الرقم P10,P9,P2 النمط الوراثي متماثل الزيجة TT، ويمثل الرقم P12,P11,P8,P5,P4,P1 النمط الوراثي متماثل الزيجة CC، بينما يمثل الرقم P6,P7,P3 النمط الوراثي متباين الزيجة TC.



شكل رقم (2) : يبين الترحيل الكهربائي لجين TGFβ1-509C/T مبيناً الآليلين T و C في العينة القياسية وتم الترحيل الكهربائي بأستعمال هلام الآكاروز بتركيز 2.5 % وتحت جهد فولتية 75V لمدة ساعة ونصف. يمثل الرقم 2 C,5 C,9 C,8 C12 النمط الوراثي متباين الزيجة TC، ويمثل الرقم C1,C11,C7,C4,C3 النمط الوراثي متماثل الزيجة TT، بينما يمثل الرقم P12,P8,P9.P5.P2 النمط الوراثي متباين الزيجة TC.



الشكل (3): تكرارات الأليلين T و C في عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم والعينة القياسية



الشكل (4): تكرارات الأنماط الوراثية للجين TGFβ1-509C/T في عينة المصابين بسرطان القولون والمستقيم والعينة القياسية