

مجلة جامعة البعث

سلسلة العلوم الطبية والصحية



مجلة علمية محكمة دورية

المجلد 45 . العدد 7

1444 هـ - 2023 م

الأستاذ الدكتور عبد الباسط الخطيب

رئيس جامعة البعث

المدير المسؤول عن المجلة

رئيس هيئة التحرير	أ. د. محمود حديد
رئيس التحرير	أ. د. درغام سلوم

مديرة مكتب مجلة جامعة البعث

بشرى مصطفى

عضو هيئة التحرير	د. محمد هلال
عضو هيئة التحرير	د. فهد شريباتي
عضو هيئة التحرير	د. معن سلامة
عضو هيئة التحرير	د. جمال العلي
عضو هيئة التحرير	د. عباد كاسوحة
عضو هيئة التحرير	د. محمود عامر
عضو هيئة التحرير	د. أحمد الحسن
عضو هيئة التحرير	د. سونيا عطية
عضو هيئة التحرير	د. ريم ديب
عضو هيئة التحرير	د. حسن مشرقي
عضو هيئة التحرير	د. هيثم حسن
عضو هيئة التحرير	د. نزار عبشي

تهدف المجلة إلى نشر البحوث العلمية الأصيلة، ويمكن للراغبين في طلبها

الاتصال بالعنوان التالي:

رئيس تحرير مجلة جامعة البعث

سورية . حمص . جامعة البعث . الإدارة المركزية . ص . ب (77)

. هاتف / فاكس : ++ 963 31 2138071

. موقع الإنترنت : www.albaath-univ.edu.sy

. البريد الإلكتروني : [magazine@ albaath-univ.edu.sy](mailto:magazine@albaath-univ.edu.sy)

ISSN: 1022-467X

شروط النشر في مجلة جامعة البعث

الأوراق المطلوبة:

- 2 نسخة ورقية من البحث بدون اسم الباحث / الكلية / الجامعة) + CD / word من البحث منسق حسب شروط المجلة.
 - طابع بحث علمي + طابع نقابة معلمين.
 - إذا كان الباحث طالب دراسات عليا:
يجب إرفاق قرار تسجيل الدكتوراه / ماجستير + كتاب من الدكتور المشرف بموافقة على النشر في المجلة.
 - إذا كان الباحث عضو هيئة تدريسية:
يجب إرفاق قرار المجلس المختص بإنجاز البحث أو قرار قسم بالموافقة على اعتماده حسب الحال.
 - إذا كان الباحث عضو هيئة تدريسية من خارج جامعة البعث :
يجب إحضار كتاب من عمادة كليته تثبت أنه عضو بالهيئة التدريسية و على رأس عمله حتى تاريخه.
 - إذا كان الباحث عضواً في الهيئة الفنية :
يجب إرفاق كتاب يحدد فيه مكان و زمان إجراء البحث ، وما يثبت صفته وأنه على رأس عمله.
 - يتم ترتيب البحث على النحو الآتي بالنسبة لكليات (العلوم الطبية والهندسية والأساسية والتطبيقية):
عنوان البحث .. ملخص عربي و إنكليزي (كلمات مفتاحية في نهاية الملخصين).
- 1- مقدمة
 - 2- هدف البحث
 - 3- مواد وطرق البحث
 - 4- النتائج ومناقشتها .
 - 5- الاستنتاجات والتوصيات .
 - 6- المراجع.

- يتم ترتيب البحث على النحو الآتي بالنسبة لكليات (الآداب - الاقتصاد - التربية - الحقوق - السياحة - التربية الموسيقية وجميع العلوم الإنسانية):
- عنوان البحث .. ملخص عربي و إنكليزي (كلمات مفتاحية في نهاية الملخصين).
- 1. مقدمة.
- 2. مشكلة البحث وأهميته والجديد فيه.
- 3. أهداف البحث و أسئلته.
- 4. فرضيات البحث و حدوده.
- 5. مصطلحات البحث و تعريفاته الإجرائية.
- 6. الإطار النظري و الدراسات السابقة.
- 7. منهج البحث و إجراءاته.
- 8. عرض البحث و المناقشة والتحليل
- 9. نتائج البحث.
- 10. مقترحات البحث إن وجدت.
- 11. قائمة المصادر والمراجع.
- 7- يجب اعتماد الإعدادات الآتية أثناء طباعة البحث على الكمبيوتر:
 - أ- قياس الورق 25×17.5 B5.
 - ب- هوامش الصفحة: أعلى 2.54- أسفل 2.54 - يمين 2.5- يسار 2.5 سم
 - ت- رأس الصفحة 1.6 / تذييل الصفحة 1.8
 - ث- نوع الخط وقياسه: العنوان . Monotype Koufi قياس 20
- . كتابة النص Simplified Arabic قياس 13 عادي . العناوين الفرعية Simplified Arabic قياس 13 عريض.
- ج . يجب مراعاة أن يكون قياس الصور والجداول المدرجة في البحث لا يتعدى 12سم.
- 8- في حال عدم إجراء البحث وفقاً لما ورد أعلاه من إشارات فإن البحث سيهمل ولا يرد البحث إلى صاحبه.
- 9- تقديم أي بحث للنشر في المجلة يدل ضمناً على عدم نشره في أي مكان آخر، وفي حال قبول البحث للنشر في مجلة جامعة البعث يجب عدم نشره في أي مجلة أخرى.
- 10- الناشر غير مسؤول عن محتوى ما ينشر من مادة الموضوعات التي تنشر في المجلة

11- تكتب المراجع ضمن النص على الشكل التالي: [1] ثم رقم الصفحة ويفضل استخدام التهميش الإلكتروني المعمول به في نظام وورد WORD حيث يشير الرقم إلى رقم المرجع الوارد في قائمة المراجع.

تكتب جميع المراجع باللغة الانكليزية (الأحرف الرومانية) وفق التالي:

آ . إذا كان المرجع أجنبياً:

الكنية بالأحرف الكبيرة . الحرف الأول من الاسم تتبعه فاصلة . سنة النشر . وتتبعها معترضة (-) عنوان الكتاب ويوضع تحته خط وتتبعه نقطة . دار النشر وتتبعها فاصلة . الطبعة (ثانية . ثالثة) . بلد النشر وتتبعها فاصلة . عدد صفحات الكتاب وتتبعها نقطة . وفيما يلي مثال على ذلك:

-MAVRODEANUS, R1986- Flame Spectroscopy. Willy, New York, 373p.

ب . إذا كان المرجع بحثاً منشوراً في مجلة باللغة الأجنبية:

. بعد الكنية والاسم وسنة النشر يضاف عنوان البحث وتتبعه فاصلة، اسم المجلد ويوضع تحته خط وتتبعه فاصلة . المجلد والعدد (كتابة مختزلة) وبعدها فاصلة . أرقام الصفحات الخاصة بالبحث ضمن المجلة . مثال على ذلك:

BUSSE,E 1980 Organic Brain Diseases Clinical Psychiatry News , Vol. 4. 20 – 60

ج . إذا كان المرجع أو البحث منشوراً باللغة العربية فيجب تحويله إلى اللغة الإنكليزية و التقيد

بالبنود (أ و ب) ويكتب في نهاية المراجع العربية: (المراجع In Arabic)

رسوم النشر في مجلة جامعة البعث

- 1- دفع رسم نشر (40000) ل.س أربعون ألف ليرة سورية عن كل بحث لكل باحث يريد نشره في مجلة جامعة البعث.
- 2- دفع رسم نشر (100000) ل.س مئة الف ليرة سورية عن كل بحث للباحثين من الجامعة الخاصة والافتراضية .
- 3- دفع رسم نشر (200) مئتا دولار أمريكي فقط للباحثين من خارج القطر العربي السوري .
- 4- دفع مبلغ (6000) ل.س ستة آلاف ليرة سورية رسم موافقة على النشر من كافة الباحثين.

المحتوى

الصفحة	اسم الباحث	اسم البحث
38-11	د. جهاد حربالي د. فاتن سليمان قمر عيسى	اصطناع مشتق بوريني كمثبط مقترح لبروتين كيناز المعتمد على السيكلين-2 وتحري الشوانب المرافقة
60- 39	هيا معروف د. وليد خدام	دراسة الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد الزنك النانوية على سلالتين من جراثيم الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية
90-61	د. أمل ديوب د. فراس حسين رقية وسوف	الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية Blastocystis hominis عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية
112-91	نور ابراهيم د. نبيه رسلان	مقارنة بين نظام الإلصاق تخريش- غسل وبين نظام الإلصاق ذاتي التخريش في تدبير الأرحاء المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي
144-113	د. ماهر سيفو د. سلاف الوسوف لبانه الخضر	دور تعداد الصفيحات واللمفاويات كمشعرات تنبؤية للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقلي

اصطناع مشتق بوريني كمثبط مقترح لبروتين كيناز المعتمد على السيكلين-2 وتحري الشوائب المرافقة

قمر عيسى⁽¹⁾ ، د. جهاد حربالي⁽¹⁾ د. فاتن سليمان⁽²⁾

⁽¹⁾ قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق.

⁽²⁾ قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية، كلية الصيدلة، جامعة طرطوس.

ملخص

استحوذت مشتقات الأدينين المتبادلة على الموقع N_6 اهتماماً كبيراً في الآونة الأخيرة كمثبطات ومعدلات للعديد من الأهداف الحيوية وخاصة بروتينات السيكلين المعتمدة على الكيناز CDK. وعلى الرغم من ذلك، تعاني نواة الأدينين من نقص الانتقائية في مواقعها مما يجعل الاصطناع العضوي الانتقائي لمشتقاتها أمراً صعباً.

لهذا السبب، يهدف هذا البحث إلى اصطناع مركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide والذي أظهرت دراسات الإرساء قدرته على تشكيل تأثيرات هامة مع ثملات الأحماض الأمينية المفتاحية الرابطة في بروتين CDK_2 ; أحد الأهداف الدوائية الهامة في المعالجات السرطانية. كما يهدف إلى استخدام الطرق الطيفية المختلفة كمطيافية الكتلة الترادفية المرتبطة بالاستشراب السائل عالي الأداء ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي البروتوني لتحري وجود أي شوائب متعلقة بعملية الاصطناع ناتجة عن نقص الانتقائية في نواة الأدينين.

تم الاصطناع وفقاً لمرحلتين، تم في المرحلة الأولى أسيلة الأنيلين باستخدام 2-كلورو أسيتيل كلورايد للحصول على مشتق ن- أست أميد أنيلين، الذي يقوم في مرحلة أخرى بالأكلية نواة الأدينين ضمن محل دي ميتيل فورأميد للحصول على المركب المنشود. وعند توصيف المركبات باستخدام الطرق الطيفية تبين أن الناتج هو مزيج مركبين مماكبي موضع (Regioisomer) حدثت الأكلية في أحدهما على الموقع N_6 في حين حدثت الأكلية في الآخر على الموقع N_9 مع عدم تمكن الطرق الكروماتوغرافية المطبقة من فصلهما بشكل كامل.

الكلمات المفتاحية: بروتينات السيكلين المعتمدة على الكيناز، الاصطناع العضوي، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي، مطيافية الكتلة الترادفية المتصلة بالاستشراب السائل، مماكبات موضع.

Synthesis of a Purinic derivative as a Suggested Cyclin-dependent kinase 2 Inhibitor and Detection of its Accompanying Impurities.

Amar Issa^{1*}, Jehad Harbali¹, Faten Sliman²

¹Department of Pharmaceutical Chemistry and Quality Control, Faculty of Pharmacy, University of Damascus, Damascus, Syria

²Department of Pharmaceutical Chemistry and Quality Control, Faculty of Pharmacy, University of Tartous, Tartous, Syria

Abstract

N⁶-substituted adenines have received an increasing attention as inhibitors and modulators of many key biological targets, such as Cyclin Dependent Kinase. In fact, adenine derivatives suffer from a lack of regioselectivity which makes their regioselective synthesis a difficult mission.

Hence, this paper aims to synthesis the compound N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide. However, molecular docking studies demonstrated that this compound showed good interaction model with CDK2; one of the important biological targets for anticancer drugs. In addition, it aims to exploit different spectrometry methods, such as liquid chromatography

with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and Nuclear Magnetic Resonance in order to detect any synthesis related impurities.

The synthesis depends on the acylation of aniline with 2- chloro acetyl chloride, the resulted compound was then interacted with adenine in Di- methyl formamide in order to synthesis the intended compound.

Different purification and separation methods were applied. Nevertheless, the comprehensive interpretation of recorded spectra showed that the product is a mixture of two compounds, the alkylation in the first compound happened on N6, whereas it happened on N9 in the second one.

Keywords: Cyclin Dependent Kinase, organic synthesis, Lc/ Ms-MS, NMR, Ragioselective compounds.

1. مقدمة:

تعد نواة البورين من أنظمة الحلقات غير المتجانسة ذات الأهمية الكبيرة بسبب تواجدها الطبيعي في العديد من الجزيئات المنظمة لمجال واسع من العمليات الفيزيولوجية [1]. كما أن الطبيعة الكيميائية لنواة البورين المكونة من 5 ذرات كربون و 4 ذرات آزوت موزعة ضمن نظام ثنائي الحلقة تجعل منها حجر أساس في البحث عن العوامل العلاجية والدوائية [2].

إنَّ الأدينين واحداً من المشتقات البورينية التي تدخل كـمكون أساسي في الأحماض النووية، وهذا يجعله موضع اهتمام الكثير من الأبحاث المعنية بالأمينوبورينات ودراسات تصميم الأدوية وتحديداً تصميم مثبطات لبروتينات الكيناز المعتمدة على السيكلين Cyclin-dependent Kinase (CDK) التي تعتبر من الاستراتيجيات الفعالة في المعالجات السرطانية [3]. فعلى سبيل المثال، يُعد Roscovitine (R)- المثبط لـ CDK مُستقاً لـ 2،6-ثنائي أمينو بورين [4]، [5]، [6].

وعلى الرغم من أهمية نواة الأدينين كجوهر للعديد من المركبات المثبطة لـ CDK₂، فهي تُعاني من ضعف الانتقائية ما بين مواقعها [7]، [8]. ممّا يجعل من الاصطناع العضوي لمشتقاتها أمراً يحتاج للمراقبة الدقيقة لتحري تشكل نواتج ثانوية مرافقة (Side Products). هذا ويعتبر التنبؤ بالشوائب المتشكلة خلال الاصطناع الكيميائي أمراً أساسياً في رحلة تطوير الدواء [9]، [10]، [11].

إضافةً لما سبق، يعتبر طيف الكتلة Mass Spectroscopy (MS) تقنية مفاتيحية في تحديد بنية المركبات مجهولة الهوية [12]، [13]، كما أنّ تكامل المعلومات المفسرة من طيف الكتلة المتصل بتقنيات تحليلية أخرى مثل الكروماتوغرافيا السائلة ومصادر معلومات أخرى كزمن الاحتباس وشروط التفاعل، إضافةً لتحليل إشارات طيف الرنين النووي

المغناطيسي (NMR) Nuclear Magnet Resonance ذو فائدة كبيرة في توصيف المركبات المجهولة [14]، [15].

2. هدف البحث:

يهدف هذا البحث إلى اصطناع مركب **N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide** والذي أبدت دراسات النمذجة الحاسوبية أهمية تأثيراته مع ثملات الأحماض الأمينية المفتاحية في CDK_2 ، تمت بدايةً أسيلة المجموعة الأمينية في الأنيلين ليتفاعل الناتج في المرحلة الثانية مع الأدينين، كما يهدف هذا البحث إلى الاستفادة من التفسير المتكامل لأطياف LC-MS/MS المطبقة بطريقتي SIM و Scan مع طيف 1H NMR لتوصيف الناتج إضافةً للنتائج بتشكيل أي نواتج ثانوية له [16].

3. المواد والطرق:

1.3. المواد:

- أدينين Adenine مخصص للاصطناع العضوي إنتاج شركة Roth بنقاوة $\leq 98\%$.
- أنيلين Aniline إنتاج شركة FLuka, UK.
- خلات الإيتيل 99% من شركة Surechem.
- حلقي الهكسان Cyclohexane من شركة BDH بنقاوة 99.8%.
- كلوروفورم عالي النقاوة Chloroform extra pure إنتاج شركة Merck.
- 2- كلورو أستيل كلورايد وثلاثي إيتيل أمين وميثانول وأطباق TLC مفلورة F_{254} من شركة Merck.
- ثنائي ميثيل فورمأميد (DMF) Dimethyl formamide وبيكرونات الصوديوم من شركة Sigma.

- حمض النمل من شركة Chemlab.
- هلامة السيليكا المفلورة المخصصة للاستشراب العمودي Silica Gel for Chromatography 60 Mesh/F254 Column إنتاج شركة Merck.
- أسيتونتريل (HPLC purity) Acetonitril إنتاج شركة BDH.
- ماء مقطر.

2.3. الأجهزة:

- سخان كهربائي Labinco ، Netherland.
- جهاز إظهار صفائح الاستشراب على الطبقة الرقيقة TLC visualizer مزود بمصباح الأشعة فوق البنفسجية ذات الموجة القصيرة.
- أدوات زجاجية مختلفة Vissal Borosilical glass.
- مبخر دوار Rotary Evaporator إنتاج شركة Buchi.
- ميزان حساس Analytical Balance.
- جهاز الاستشراب السائل عالي الأداء High Performance Liquid Chromatography preparative- Jasco.
- جهاز مطيافية الرنين النووي المغناطيسي - Nuclear Magnetic Resonance Bruker Biospin 500, Karlsruhe, Baden Wurttemberg Germany. [500 MHz (1H), $\delta = 0$ (TMS)]. تم التعبير عن الانزياحات الكيميائية بجزء من المليون PPM نسبةً إلى TMS كعيار داخلي. تعطي قيم J بالهرتز Hz.
- جهاز مطيافية الكتلة ثنائية البعد المرتبطة مع الاستشراب السائل عالي الأداء LC/Ms-Ms : نوع عمود الاستشراب Eclipse XDB C18, 4.6 mm * 150mm, 3.5 من شركة Agilent.

3.3. الطرق:

1.3.3. إرساء المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide على

CDK₂.

تم إجراء عملية الإرساء للمركب المصطنع على الموقع الفعال المحضر مسبقاً لبنية بروتين CDK₂ ذو الرمز (2C6O) [17] باستخدام بروتوكول CDOCKER المطبق في برنامج Biovia Discovery Studio 2016.

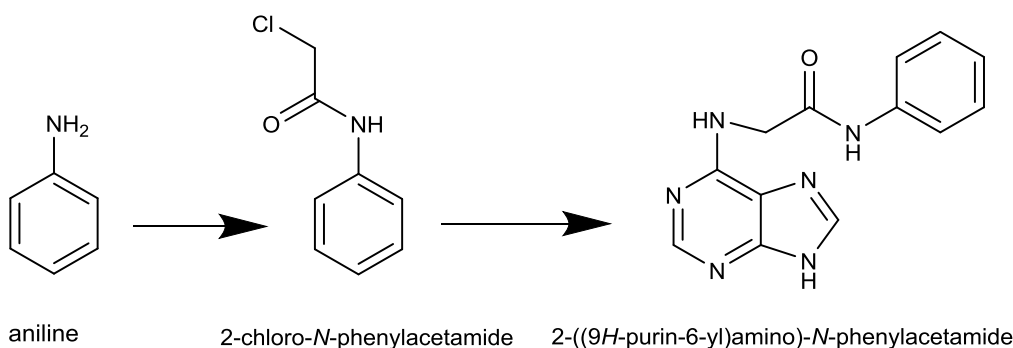
- حُضِرَ الشكل البلوري للبروتين باستخدام بروتوكول General Purpose Protocol في برنامج (Discovery Studio Biovia, 2016) من خلال نزع جزيئات الماء، وإضافة ذرات الهيدروجين وتصحيح رتب الروابط والشحنات باستخدام عدة حقول قوى أهمها CHARMM
- وأخيراً استُخدمت خوارزمية Adopted Basis Newton-Raphson (ADNR) لتقليل طاقة المركب وإجراء استرخاء لبنية الشكل البلوري Minimization للتخلص من الإعاقة الفراغية التي سببتها إضافة ذرات الهيدروجين إلى البنية.
- قبل البدء بدراسة الإرساء، تمّ التحقق من مصدوقية طريقة إرساء مثبطات CDK₂ قبل أن يتم تنفيذها من خلال تطبيق عمليات الإرساء للجين Triazolopyrimidine المتبلور مع المعقد على البروتين ذو الرمز 2C6O وذلك باستخدام Protocol: CDocker وبتطبيق حقل القوة CHARMM وقياس الانحرافات المعيارية RMSD بين توضعات اللجين في المعقد البلوري والتوضعات التي تم الوصول لها من دراسة الإرساء المنجزة حيث يجب ألا يزيد الانحراف المعياري RMSD عن 2^أ[18].
- لتقييم نتائج دراسات الإرساء وبهدف الوصول لمركبات رأس السلسلة، تمّ الاعتماد على قيم طاقة ارتباط CDocker interaction energy - والتي تُعبّر عن طاقات ارتباط

البروتين مع المركب المدروس [19]. كما تمت دراسة التأثيرات بين ثملات الأحماض
الأمينية في الجيب الفعال تحديداً المفتاحية منها, Leu^{134} , Lys^{33} , Leu^{83} , Glu^{81} ,
 Asp^{145} , Val^{18} , Ala^{131} , وبين المركب المدروس اعتماداً على الروابط الهيدروجينية
والروابط الكهربائية الساكنة والروابط الكارهة للماء.

2.3.3. الاصطناع العضوي

تم اصطناع المركب وفقاً لمخطط الاصطناع المبين بالمعادلة 1 والمكون من مرحلتين:

- اصطناع المركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide
- اصطناع المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide



المعادلة 1 : مخطط اصطناع المركب (N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide

2.3.3. اصطناع المركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide

حُلَّ (2.45 مل، 22.68 ميلي مول) من الأنيلين (المركب 1) في مزيج ثنائي الطور
من خلات الإيثيل (50 مل) ومحلول بيكرونات الصوديوم المائي (IM, 25 ml).
أضيفَ 2- كلوروأستيل كلورايد (2مل، 25 ميلي مول) قطرة قطرة إلى المزيج ثنائي

الطور وحرك المزيح لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة. روقب التفاعل بال TLC باستخدام طور متحرك حلقي الهكسان: خلات الإيتيل (3:7). فصلت الطبقتين واستخلصت الطبقة المائية بـ (3*25 مل) من خلات الإيتيل. تم جمع الطبقات العضوية وتجفيفها بوجود كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتبخيرها لنصف حجم خلات الإيتيل ومن ثم تركها لتبرد [20].

22.3.3. اصطناع المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide

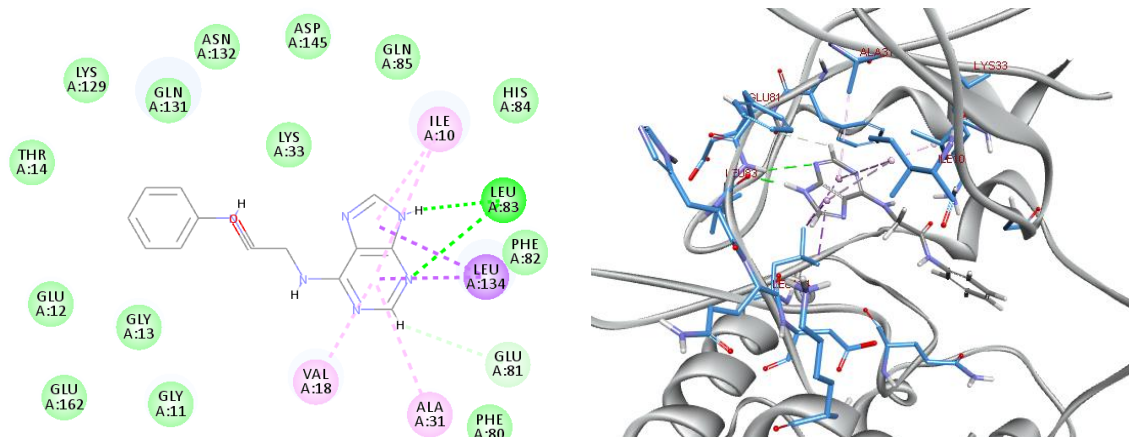
حل (2 ميلي مول، 270 مغ) من الأدينين في الـ DMF وأضيف (2 ميلي مول، 338 مغ) من المركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide بوجود ثلاثي إيتيل أمين، ترك التفاعل لمدة ساعتين بوجود مكثف عكوس.

- غسّل الناتج بالهكسان وخلات الإيتيل للتخلص من بقايا المركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide باستخدام عمود الاستشراب مع طور متحرك (كلوروفورم/ميتانول، 2:8) ومن ثم بالـ HPLC-preparative.

4. النتائج والمناقشة:

1.4. نتائج إرساء المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide.

بينت دراسات الإرساء للمركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide أنه يشكل تأثيرات هامة مع الأحماض الأمينية في الجيب الفعال لبروتين CDK₂ حيث تتشكل رابطتين هيدروجينيتين مع Leu83 ورابطة هيدروجينية مع Glu81، إضافة لشبكة من الروابط الكارهة للماء مع كل من leu¹³⁴ و Val¹⁸ و Ala³¹ و Ile¹⁰. كما كانت قيمة طاقة الارتباط -CDocker energy=39.33 Kcal/mol، الشكل (1).

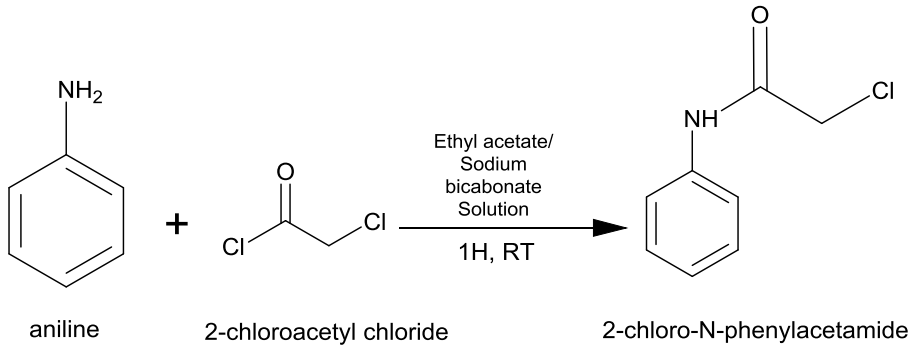


الشكل (1) المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide وتأثيراته مع الـ CDK_2 .

2.4. نتائج الاصطناع العضوي

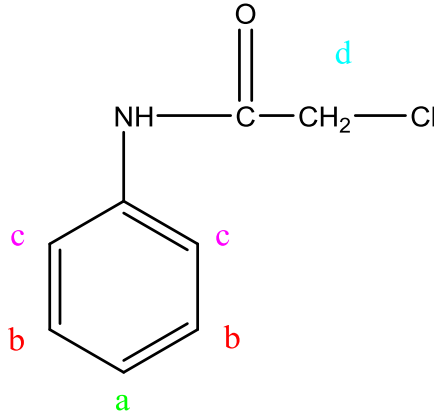
12.4. نتائج اصطناع المركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide

تمت أسيلة الأنيلين باستخدام كلوروأسيثيل كلورايد في مزيج ثنائي الطور (خلات الإيثيل، محلول بيكربونات الصوديوم) مع التحريك لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة. المعادلة 2 روقبَ التفاعل بالـ TLC باستخدام طور متحرك من حلقي الهكسان: خلالات الإيثيل (3:7) وبعد الاستخلاص وإعادة البلورة بخلالات الإيثيل تشكلت بلورات بلون أبيض مُصفر ذات درجة انصهار $135^{\circ}C$. كان مردود التفاعل 80%.



المعادلة 2 اصطناع المركب **2-Chloro-N-phenyl-acetamide**

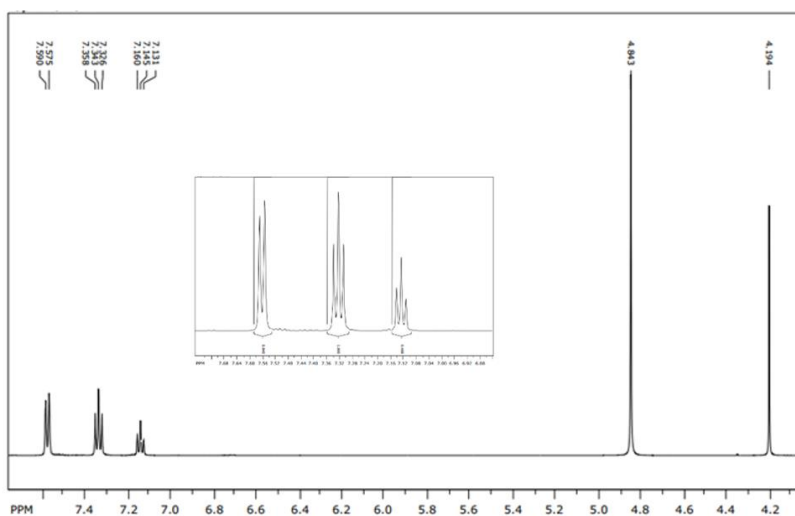
➤ سُجِّل طيفاً $^1\text{H-NMR}$ الشكل (2) و 13c APT :13 C Attached-Proton-Test حيث ظهرت الإشارات الخاصة بذرات الهيدروجين العطرية في المجال العطري 7.1 - 7.7 على الشكل التالي:



الشكل 2 المركب **2-Chloro-N-phenyl-acetamide**

- تظهر الإشارة a بشكل (Doublet to Doublet) : لاقتران الهيدروجين في الموقع باراً مع هيدروجينين في الموقعين ميتا بقيمة انزياح كيميائي 7.14 ppm.

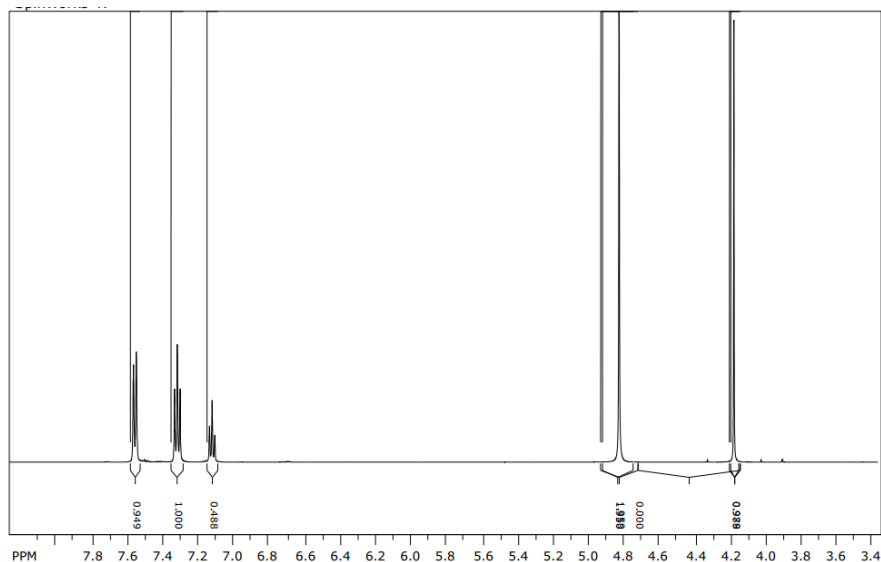
- تظهر إشارة هيدروجيني الموقع ميتا (الإشارة b) بشكل (Doublet to Doublet) : حيث يقترن كل منها مع هيدروجيني الموقعين أورثو و بارا بقيم انزياح كيميائي 7.34 ppm.
 - أما الإشارة c فنظهر بشكل Doublet لهيدروجيني الموقعين أورثو يقترن كل منهما مع هيدروجين واحد في الموقع ميتا بقيم انزياح كيميائي 7.58 ppm.
- وبذلك، تمثل الإشارات a، b، c هيدروجينات الحلقة العطرية بنسب تكامل 2،2،1 على التوالي. الشكل (3).



الشكل (3) طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide

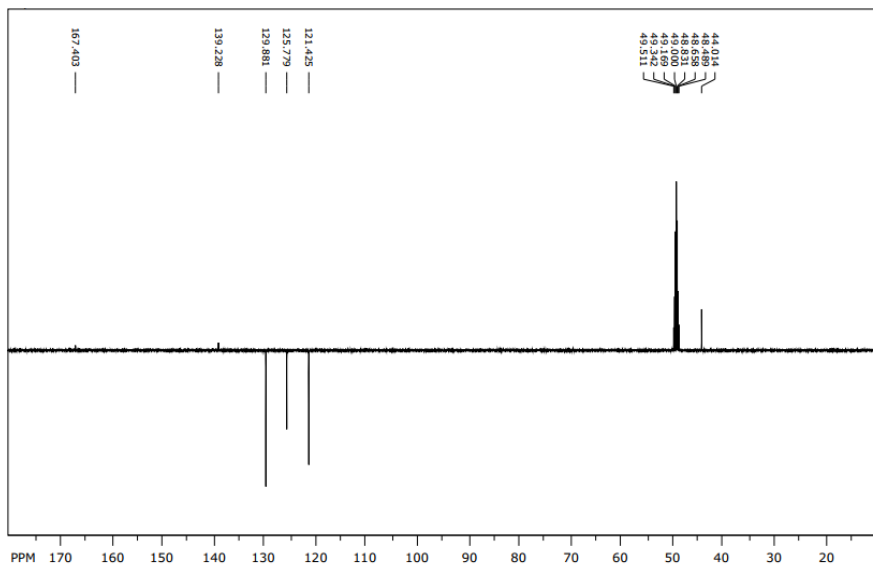
$^1\text{H-NMR}$. (Methanol- d_4 , 500MHz), δ 7.58 (d, 2H, $J=8$ Hz, H_c), 7.34 (dd, 2H, $J=8$ Hz, H_b), 7.14 (dd, 1H, $J=8$, H_a), 4.19 (s, 2H, CH_2 , H_d).

أما الإشارة التابعة لـ CH_2 الأليفاتي (الإشارة d) فنظهر بشكل Singlet بقيمة انزياح كيميائي 4.19 ppm بنسبة تكامل=2. الشكل 4.



الشكل (4) حساب تكامل إشارات طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب 2-Chloro-N-phenylacetamide

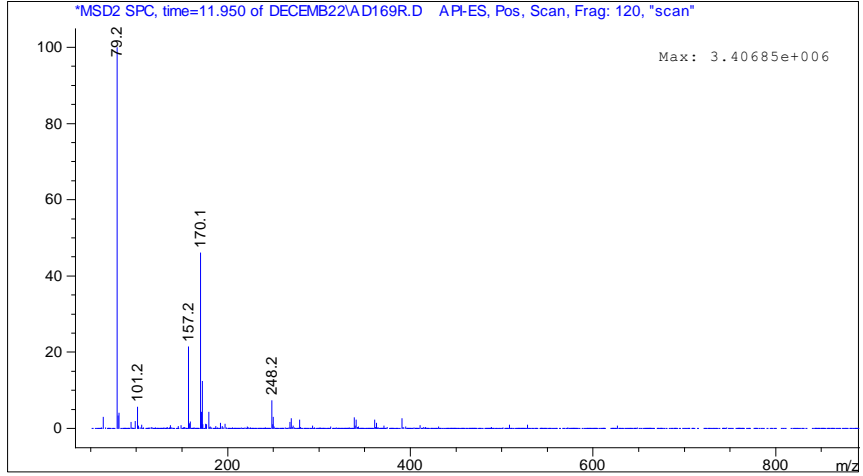
➤ عند دراسة الطيف الكربوني APT 13c للمركب الناتج، الشكل (5) ظهرت إشارات الكربونات في الحلقة العطرية عند قيم انزياحات كيميائية 121.42، 125.77، 129.88 ppm. كما ظهرت إشارة الكربون الأليفاتي عند قيمة انزياح كيميائي حوالي 42 ppm.



الشكل (5) طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide

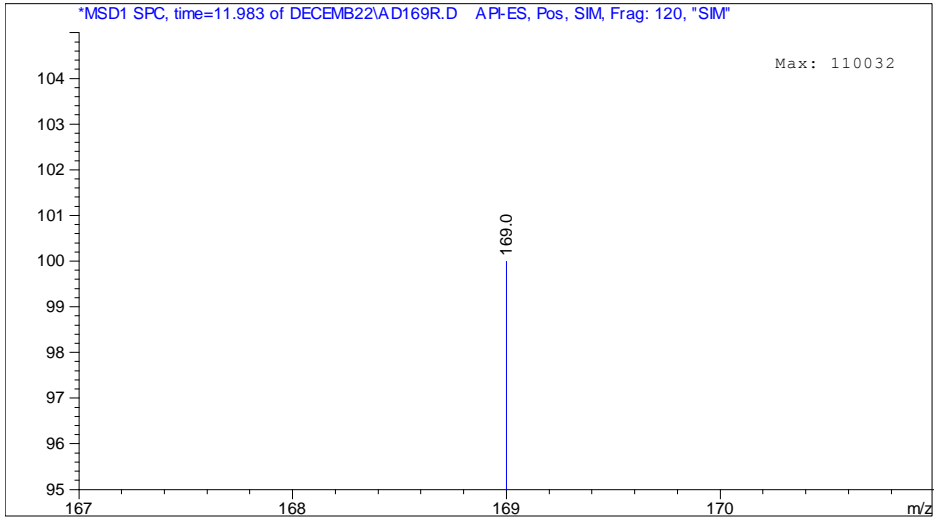
$^{13}\text{C-NMR}$. (Methanol- d_4 , 500MHz), δ 167.40 (1C_q, C=O), 139.23(1C_q), 129.88 (2CH), 125.78 (1CH),121.42 (2CH), 44.01 (1CH₂).

➤ من خلال مسح طيف LC-MS/MS للمركب الناتج، عُرِّقَت الخصائص الأيونية للقطعة الظاهرة عند زمن احتباس 11.9 دقيقة، الشكل (6) حيث أظهرت أنها ممثلة للمركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide ذو الكتلة m/z 169 حيث أنَّ الإشارة توافق [M+1] 170.1 وفُسِّرَت الشدفة الناتجة عند القيمة 79.2 بأنها تعود لشظية حلقة البنزن.



الشكل (6) مسح LC-MS-MS للمركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide يظهر الخصائص الأيونية للقمّة بزمن احتباس 11.9 دقيقة.

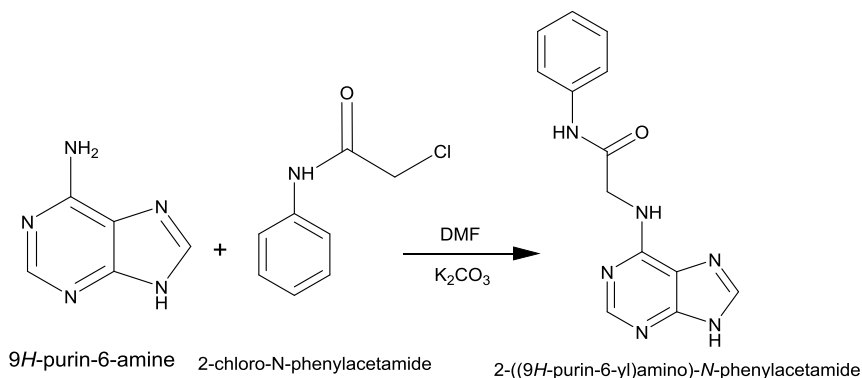
➤ أكدت نتائج الحقن بطريقة SIM عند قيمة محددة لنسبة الكتلة/ الشحنة 169 (m/z) الموافقة لكتلة المركب المنشود 2-Chloro-N-phenyl-acetamide أن العينة عائدة له. الشكل (7).



الشكل (7) حقن SIM للعينة عند قيمة m/z 169.0 الموافق للمركب 2-Chloro-N-phenyl-.acetamide

22.4. نتائج اصطناع المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide.

استُخدمَ المركب **2-Chloro-N-phenyl-acetamide** كعامل مؤلِّك للأدنين في مُجَلِّ الـ DMF بوجود قلوي ثلاثي إيثيل أمين، المعادلة 3 مع شرط مكثَّف عكوس لمدَّة ساعتين حيث تغيَّر بعدها لون مزيج التفاعل إلى اللون الأحمر القرمزي وتبيَّن من خلال مراقبته بالـ TLC باستخدام حلقي الهكسان وخلات الإيثيل (3:7) كطور متحرك تشكَّل عدَّة نواتج، (الشكل 8a).



المعادلة 3 مخطط اصطناع المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide

➤ لذا تمَّت محاولة فصل النواتج باستخدام عمود الاستشراب مع طور متحرِّك (كلوروفورم/ ميثانول، 2:8) حيث روقبت القطفات المأخوذة بالـ TLC، وقد بينت أنّ القطفات بقِيَت مشوبة نوعاً ما. الشكل (8b)



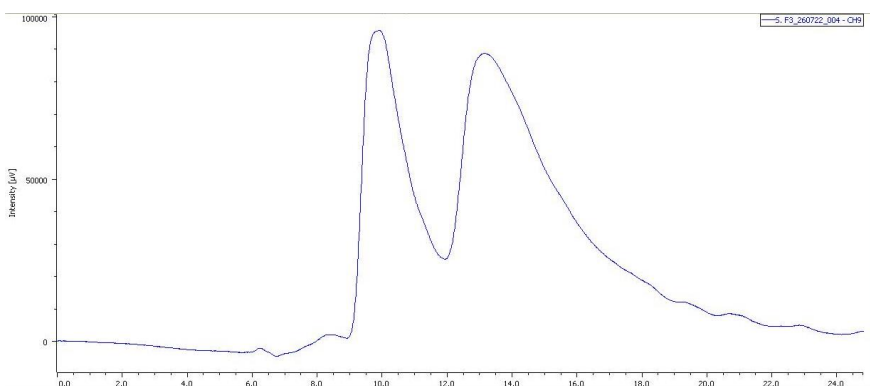
الشكل 8: (a) ناتج التفاعل بعد حله في الميثانول، (البقعة 1: الأدينين، البقعة 2: كلوروأستيل أنيلين، البقعة 3: الناتج)، (b) TLC للعينات المقطوفة من عمود الكروماتوغرافيا للناتج **N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide**.

نتيجةً لما سبق، تمّ اللجوء إلى إجراء تنقية إضافية للعينات المقطوفة من عمود الاستشراب باستخدام HPLC Preparative حيث جُمعت الأنايبب التابعة لنفس القطفة من عمود الاستشراب وحُقِن كل جزء في HPLC Preparative وذلك بعد حقن عياري الأدينين وحقن محلول المركب 2-Chloro-N-phenyl-acetamide بتطبيق الشروط الواردة في الجدول 1

الجدول (1) الشروط المستخدمة في HPLC preparative لفصل نواتج تفاعل اصطناع المركب **N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide**

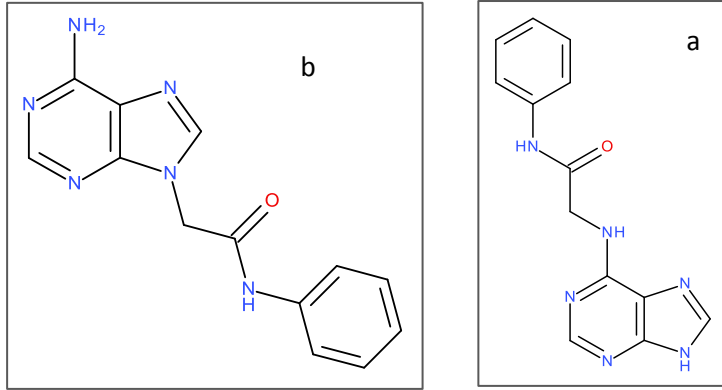
نوع المضخة	LPG1
نوع العمود	TRACER EXTRASIL ODS1 5µm 25*1
معدل التدفق	1.500 ml/min
الضغط الأعظمي	24MPa
الطور المتحرك	أسيتونتريل+ ماء محمض بمحض النمل (25:75)

عند الفصل على HPLC Preparative ، ظهرت قمة المنتج على شكل قمتين متراكبتين لم تتمكن من فصلهما بالإمكانات المتاحة الشكل (9). ويمكن أن يشير ذلك إلى أن المنتج قد يكون مشوب بنتائج آخر للتفاعل يحمل نفس الصفات الفيزيوكيميائية من حيث القطبية والانحلالية والوزن الجزيئي. لهذا السبب، تم قطف المنتج وإجراء تحليل LC/MS/MS وتحليل NMR بهدف توصيفه.



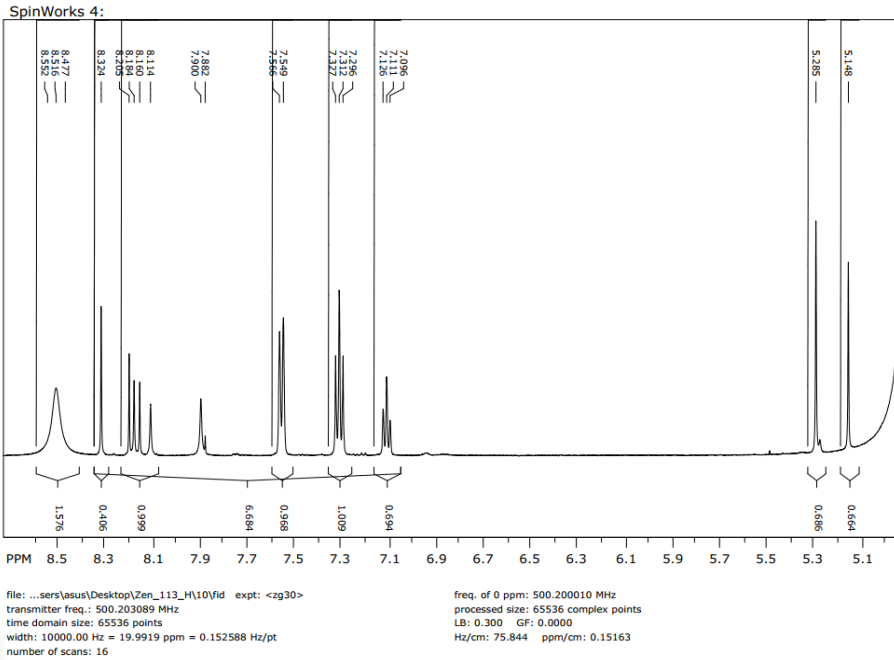
الشكل(9) الكروماتوغرام الناتج عن HPLC المركب 11 يظهر على شكل قمتين متراكبتين متتاليتين

➤ عند تسجيل طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino) acetamide تبين وجود بعض الإشارات التي قد تعود إلى مركب ثانٍ. وعند تفسير هذه الإشارات تم اقتراح وجود مركبين في العينة تم توصيفهما بأنهما:
المركب a: N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide ، في الشكل (10-a).
المركب b: 2-(6-aminopurin-9-yl)-N-phenyl-acetamide ، في الشكل (10-b)



الشكل (10) : a المركب a ، b المركب b

حيث فسّر طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide والمبين بالشكل (11) كما يلي:



الشكل (11) طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide

$^1\text{H-NMR}$. (Methanol- d_4 , 500.20MHz), δ 8.516 (s, HN), 8.324 (s,1H), , 8.20 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.9 (s, 1H), 7.558 (dd, 4H, J=8Hz), 7.31 (dd, 4H, J=8Hz), 7.11 (dd, 2H, J=8Hz), 5.28 (s, 2H), 5.15 (s, 2H).

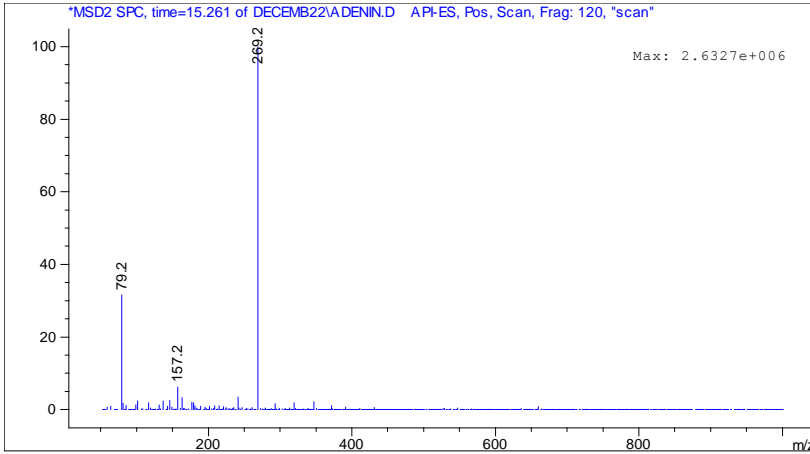
تظهر إشارات المجال العطري عند حوالي 7.1، 7.31، 7.54 والتي تعود إلى حلقة الأنيلين. إلا أنه عند حساب التكامل لهذه الإشارات تبين أنها بنسبة (2:4:4) مما يشير إلى وجود نوأتي أنيلين وليس نواة واحدة فقط. عند البحث عن إشارة بروتونات الإيثيل الأليفاتي العائد لجذر الأسيل، تبين وجود إشارتين: إحداهما عند 5.14 ppm بتكامل 2، والثانية عند 5.28ppm بتكامل 2 أيضاً مع ملاحظة انزياح قليل بينهما.

تتوزع إشارات بروتون الأمين سواء أكان ضمن حلقة الأدينين ($\text{HN}_{\text{adenine}}$) أو المتصلة بها ضمن مجموعتي الأميد (HN_{co}) في المنطقة العطرية بجوار إشارات بروتونات (CH) مما يصعب تمييزها عن بعضها. نظراً لمطيفية NMR سيكون من المتوقع إما حدوث ألكلة ثنائية على نواة الأدينين أو وجود مزيج من مركبين ضمن العينة حيث حدث ألكلة أحدهما في الموقع N_9 المركب (a) والثاني في الموقع N_6 ، المركب (b).

➤ للتأكد من صحة توصيف المركبات الناتجة عن التفاعل وللإجابة عن التساؤل الذي راودنا عند تفسير طيف $^1\text{H-NMR}$ عن احتمالية أن يكون الطيف عائد لمركب واحد جرت فيه الألكلة على الموقعين N_9 و N_6 بأن واحد، تم تسجيل طيف LC/MS/MS بطريقتي المسح Scan و SIM عند الكتلة الجزيئية التابعة للمركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide (من الجدير بالذكر أن المركبين a و b لهما نفس الكتلة الجزيئية 268.1) إضافةً لحقنة SIM عند الكتلة 401.16 العائدة للمركب الذي من المحتمل أن يكون قد تشكل نتيجةً لحدوث الألكلة في كل من الموقعين N_9 و N_6 .

➤ تبين من النتائج عدم ظهور قمة واضحة عند 401.16 m/z سواء بطريقة Scan أو Sim. مما أدى إلى استبعاد احتمال وجود مركب ثنائي الألكيل.

➤ في حين أنه عند المسح الطيفي للعينة، بينت الخصائص الأيونية للقيمة الظاهرة عند زمن احتباس 15.2 دقيقة، الشكل (12)، تسجيل إشارة عند قيمة 269.2 m/z الموافقة لـ (M+H) لكتلة المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide مع إشارة عند قيمة 79.2 m/z الممثلة للبنزن.

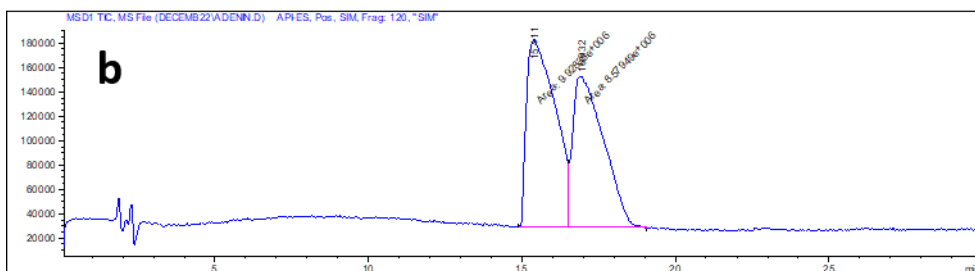
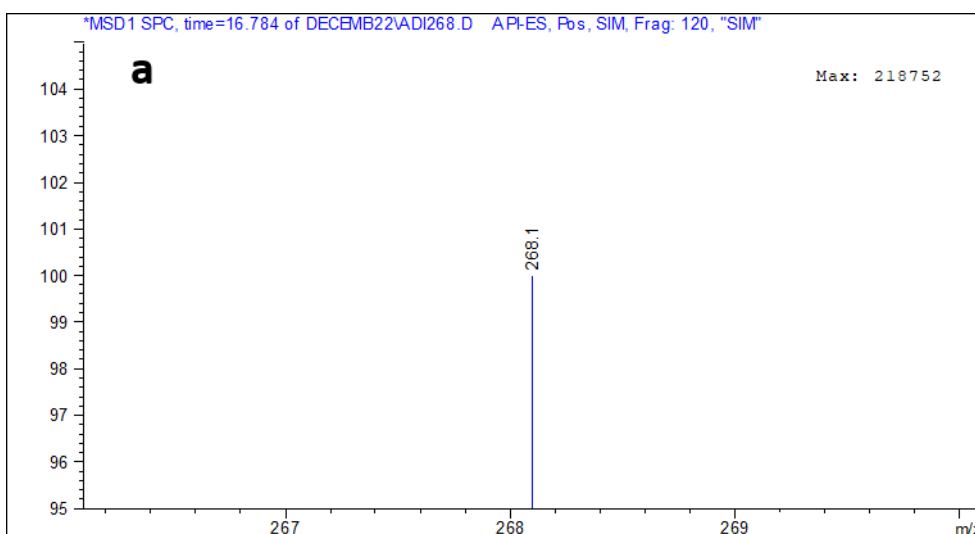


الشكل (12) الخصائص الأيونية للقيمة بزمن احتباس 15.2 د الظاهرة بالمسح الطيفي LC-MS لعينة المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide

➤ إلا أن ارتباط مطيافية الكتلة مع الاستشراب السائل عالي الأداء أدى إلى التمكن من تحري مركبين لهما نفس الكتلة إذ لا يمكن لمطيافية الكتلة لوحدها من كشفهما. حيث بين الكروماتوغرام الناتج عن HPLC وجود قمتين عند زمني احتباس متقاربين جداً لم نتمكن من فصلهما (يظهران في الشكل كقمتين متاليتين متراكبتين). وهذا يتوافق مع النتائج التي حصلنا عليها في طيف NMR بأن ناتج الألكلة الرئيسيين الذين تمت تنقيتهما وفصلهما بشكل متعاقب من عمود الاستشراب السائل وحتى الاستشراب السائل عالي الأداء التحضيري HPLC preparative وكانا قد ظهرا كبقعة واحدة على الـ TLC بقيا مزيجاً

صعب الفصل بسبب امتلاكها لنفس الخواص من ناحية الكتلة وزمن الاحتباس
والقطبية وغيرها.

➤ ولتأكيد ذلك تمت إعادة حقن العينة بطريقة SIM عند قيمة كتلة المركب
وظهرت كذلك كقمتين متراكبتين متتاليتين. الشكل (13). مما يؤكد وجود
مركبين وهما المركب a والمركب b أحدهما بنسبة 53.64% عند زمن احتباس
15.14 دقيقة والآخر بنسبة 46.35% عند زمن احتباس 16.93 دقيقة.



الشكل 13: (a) مسح الكروماتوغرامي الكامل للمركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide عند القيمة m/z 268.1 الموافقة لكتلة المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide. (b) حقن SIM للعينة عند قيمة m/z 268.1 الموافقة

5. الاستنتاجات والتوصيات:

تم في هذا البحث اصطناع المركب N-phenyl-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide كمثبط لبروتين CDK₂ وفقاً لدراسات النمذجة الحاسوبية التي أثبتت أنه يشكل تآثر هام مع ثمالات الأحماض الأمينية الرابطة المفتاحية في الجيب الفعال للبروتين. كما جرى التحري عن وجود أي شوائب متعلقة بعملية الاصطناع باستخدام الطرق الطيفية LC/MS/MS وNMR.

بين التفسير المتكامل للأطياف التي تم تسجيلها لنواتج الاصطناع الذي تم بألكلة الأدينين مع أست أميد الأنيلين ضمن محل DMF بوجود ثلاثي إيثيل أمين لمدة ساعتين مع مبرد عكوس نواتج ألكلة متعددة على نواة الأدينين يمكن فصلها بطريقة عمود الاستشراب وطريقة HPLC preparative باستثناء الناتج الأساسي والذي يمثل مزيجاً من المركب المنشود ومماكب موضع له في الموقع 9 لا يمكن فصلهما عن بعض بالطرق الكروماتوغرافية المستخدمة. أي أنه مزيج مركبين أحدهما عائد للمركب N-phenyl-a-2-(9H-purin-6-ylamino)acetamide والآخر عائد للمركب N-(6-aminopurin-9-yl)-phenyl-acetamide. وبناء عليه يمكن اقتراح اختبار مخططات اصطناع مختلفة عن المخطط المدروس في هذا البحث ومراقبة التفاعلات لدراسة النواتج والشوائب المحتملة. كمحاولة اصطناع المركب المدروس اعتباراً من نواة 6-كلورو بورين عوضاً عن نواة الأدينين وذلك من خلال تفاعلات استبدال نكليوفيلي مع الأمينات الأولية على نواة 6-كلورو بورين.

المراجع: References

- [1] Schmidt A.P, Lara D.R, Souza D.O (2007) Pharmacology & Therapeutics **j.pharmthera**, 116: 401–416.
- [2] Gasque C.E (1982) **Phytochemistry** 21:1501–1507.
- [3] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011, March). Hallmarks of Cancer: An Organizing Principle for Cancer Medicine, **Cell**, 144 (5): 646-74, Switzerland, Elsevier.
- [4] Meijer, L., Nelson, D. J., Riazanski, V., Gabdoulkhakova, A. G., Hery-Arnaud, G., Le Berre, R., Loaëc, N., Oumata, N., Galons, H., Nowak, E., Guegantou, L., Dorothée, G., Prochazkova, M., Hall, B., Kulkarni, A. B., Gray, R. D., Rossi, A. G., Witko-Sarsat, V., Norez, C., Becq, F., Ravel, D., Mottier, D. Rault, G. (2016), Modulating Innate and Adaptive Immunity by (R)-Roscovitine: Potential Therapeutic Opportunity in Cystic Fibrosis, **Journal of Innate Immunity**, 8 (4), 330–349..
- [5] Welsch M.E, Snyder S.A, Stockwell B.R (2010) **Current Opinion in Chemical Biology** 14: 347–361.
- [6] De Azevedo Jr., & Kim, S.H. (1997, January) Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues: Crystal Structure of Human CDK2 Complexed with Roscovitine. **European Journal of**

Biochemistry, 526, 518-526, Berkeley, USA, Wiley.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.0518a>.

[7] Coxon C.R, Anscombe E, Harnor S.J, Martin M.P, Carbain B, Golding B.T, Hardcastle I.R, Harlow L.K, Korolchuk S, Matheson C.J, Newell D.R, Noble M.E, Sivaprakasam M, Tudhope S.J, Turner D.M, Wang L.Z, Wedge S.R, Wong C, Griffin R.J, Endicott J.A, Cano C (2017) **Journal of Medicinal Chemistry** 60 1746–1767.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01254>.

[8] Décout J.-L (2022) Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV 419–499. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2>.

[9] W. Watson (2012) *Org. Process Res. Dev.*, 16, 12, 1877.

[10] Charde, M. S., Kumar,J, Welankiwar, A. S. & Chakole ,R. D. (2013), Recent Approaches for Impurity Profiling of Pharmaceuticals, **International Journal Of Advances In Pharmaceutics**, 2 (3).p.25-33.

[11] Venkatesan, P. & Valliappan, K. (2014). Impurity Profiling: Theory and Practice. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research** 6 (7): 254–59.

[12] Böcker S, Rasche F (2008) *Bioinformatics* 24 : 49–55.

[13] Johnstone ,R.A. W. & Rose,M,E, (2012, june), **Mass spectrometry for chemists and biochemists.**

[14] Scheubert, K., Hufsky, F., & Böcker, S. (2013, March). Computational mass spectrometry for small molecules. **Journal of Cheminformatics**, 5(1).

[15] Field, L.D.,Sternhell, S. & Kalman, J.R. (2007), **Organic structures from spectra**, 4th Edition.

[16] Biswas, S., (2021, July), (n.d.). **Nuclear Magnetic Resonance (NMR)**, India.

[17] Richardson, C.M., Williamson, D.S.&Parratt, M.J.(2006, March) Triazolo[1,5-a]pyrimidines as Novel CDK2 Inhibitors: Protein Structure-Guided Design and SAR. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 16 (5), 1353-1357.

[18] Kaserer, T., Beck, K.R., Akram, M., Odermatt, A. & Schuster, D. (2015, December) Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases. **Molecules**, 20 (12), 22799-22832.

[19] Singh, A.K., Raj, V. and Saha, S. (2017, August) Indole-Fused Azepines and Analogues as Anticancer Lead Molecules: Privileged Findings and Future Directions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 142, 244-265.

[20] Qandil A.M, Fakhouri L.I (2012) Pharmaceuticals 5 :591–612.

دراسة الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد

الزنك النانوية على سلالتين من جراثيم

الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية

الطالبة: هيا معروف كلية الصيدلة – جامعة البعث

إشراف الدكتور وليد خدام

المُلخَص:

مقدمة: حازت تقانة النانو على اهتمام الباحثين في مختلف المجالات نظراً للتطبيقات اللامحدودة التي يمكن أن توفرها جزاء تعديل المواد على المستوى الذري. يتركز الاهتمام حالياً حول أكسيد الزنك النانوي من بين أكاسيد المعادن النانوية، بسبب خصائصه الفيزيائية والكيميائية المميزة وتنوع طرائق اصطناعه بالإضافة لاستخداماته الطبية المعروفة.

الطرائق: في هذه الدراسة، تم اصطناع جسيمات أكسيد الزنك النانوية كيميائياً بطريقة سول-جل. تم توصيف الجسيمات النانوية المحضرة بمطيافية الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية وتقانة تبعثر الضوء الديناميكي. تمت دراسة الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد الزنك النانوية على سلالتين جرثوميتين سليبتين غرام هما الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية بطريقة الانتشار بالحفر. تمت أيضاً دراسة تأثير المشاركة بين الجسيمات النانوية وبعض الصادات في الفعالية المضادة للجراثيم لكل منهما.

النتائج: نتج عن التوصيف بمطيافية الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية قمة عند طول موجة 310 نانومتر. أظهر التوصيف بتقانة تبعثر الضوء الديناميكي أن أبعاد جسيمات أكسيد الزنك المحضرة حوالي 82.2 نانومتر. أبدى أكسيد الزنك النانوي فعالية

دراسة الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد الزنك النانوية على سلالتين من جراثيم الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية

مضادة للجراثيم تجاه السلالتين المدروستين وكانت فعاليته تجاه *P. aeruginosa* أكبر مقارنة مع فعاليته المضادة للجراثيم تجاه *E. coli*. أظهرت المشاركة بين مُعلّق أكسيد الزنك النانوي بتركيز 100 ملغ/مل مع كلاريثرومايسين (بِقَطْر هالة تثبيط 25 مم) فعالية أكبر من تلك الناتجة عن كلّ من 100 ملغ/مل من أكسيد الزنك (16 مم) وكلاريثرومايسين (19 مم) على حدة. أمّا بالنسبة للمشاركة بين 100 ملغ/مل من معلّق أكسيد الزنك النانوي وسيفاليكسين تجاه *E. coli* فكانت الفعالية المضادة للجراثيم (12 مم) مقارنة مع أكسيد الزنك النانوي لوحده (10 مم) وسيفاليكسين الذي أبدت *E. coli* مقاومةً تجاهه.

الاستنتاجات: يملك أكسيد الزنك النانوي (ذو الأبعاد 82.2 نانومتر) فعالية مضادة للجراثيم تجاه كلّ من *E. coli* و *P. aeruginosa* ويُظهر تأثيراً تآزرياً بالفعالية مع كلّ من كلاريثرومايسين وسيفاليكسين. يمكن أن يُستخدم أكسيد الزنك النانوي كمركّب مضادّ للجراثيم كما يمكن أن يُستخدم للتغلّب على المقاومة الجرثومية للمضادات.

الكلمات المفتاحية: تقانة النانو، أكسيد الزنك النانوي، الاصطناع الكيميائي، طريقة سول-جلّ، مُضادّ جرثوميّ، تأثير تآزريّ.

A Study of The Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles on two strains of *E. coli* and *P. aeruginosa*

Abstract:

Background: Nanotechnology has grasped the interest of researchers in most fields due the unlimited applications it could provide by altering materials on the atomic level. The focus is currently pointed towards zinc oxide nanoparicles (ZnO NPs) among metal oxides NPs for their special physical and chemical properties and the variety of synthesis methods as well as their well-known medical applications.

Methods: In this study, ZnO NPs were synthesized using chemical synthesis via sol-gel method. ZnO NPs were characterized using UV-Vis spectroscopy and Dynamic light scattering (DLS). ZnO NPs were studied for their antibacterial activity against two Gram-negative strains, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using well diffusion method. The effect of combining ZnO NPs with antibiotics on the antibacterial activity of both of them was also studied.

Results: Characterization with UV-Vis spectroscopy resulted in a peak at 310 nm. DLS results showed that particle size was 82.2 nm. ZnO NPs showed antibacterial activity against both strains with antibacterial activity against *p. aeruginosa* higher than *E. coli*.

Combining 100 mg/ml of ZnO NPs with Clarithromycin showed greater antibacterial activity on *p. aeruginosa* (inhibition zone 25mm) compared to the antibacterial activity of each 100 mg/ml ZnO NPs (16 mm) and Clarithromycin (19 mm) alone. for *E. coli*, when 100 mg/ml of ZnO NPs were combined with Cephalexin, antibacterial activity (12 mm) was higher than ZnO alone (10 mm) and Cephalexin which *E. coli* was resistant to.

Conclusion: Zinc oxide nanoparticles (82.2 nm) have antibacterial activity on both *E. coli* and *P. aeruginosa*, and exhibit synergistic effects with Clarithromycin and Cephalexin. ZnO NPs could be used as antibacterial agent and further applied in combating bacterial resistance to conventional antibiotics.

Key Words: Nanotechnology, Zinc Oxide nanoparticles, Sol–Gel method, antibacterial activity, antibacterial activity, synergistic effect.

1. المقدمة Introduction:

تفاقت مشكلة مقاومة المضادات الحيوية مؤخراً بشكلٍ لا يمكن تجاهله، ووفقاً لمنظمة الصحة العالمية، فإننا نقتررب بسرعة من عصر "ما بعد المضادات الحيوية" والذي ستعدو فيه هذه الأدوية عديمة الفائدة تقريباً، الأمر الذي استدعى الاستنفار الكامل للباحثين لإيجاد البدائل المناسبة قبل فوات الأوان [1]. برزت في السنوات الأخيرة تقانة النانو Nanotechnology بتطبيقاتها الواعدة في المجالات الطبية العلاجية كأحد الحلول المقترحة لمشكلة مقاومة المضادات الحيوية [2]، وحازت على اهتمام المختصين في مختلف المجالات نظراً لاكتساب المواد خواصاً مُحسّنة أو جديدة كلياً عند تحويلها من جزيئات ذات حجم كبير Bulk material لجسيماتٍ بأبعاد ضمن المجال النانوي [3]. تُعرّف المادة النانوية بأنها المادة التي يكون واحد على الأقل من أبعاد جسيماتها ضمن المجال النانوي 1 - 100 نانومتر [4]، وتُصنّف حسب تركيبها الكيميائي إلى مواد نانوية عضوية، غير عضوية و كربونية لكل منها تطبيقاتها وخصائصها المختلفة [5]. تمتلك مركبات كأكاسيد بعض المعادن كالزنك والحديد والتيتانيوم وأملاح الفضة والزنك فعالية مضادة للجراثيم والفتور استغلها الإنسان منذ القدم واعتمد عليها حتى قبل اكتشاف المضادات الحيوية في القرن الماضي [6]. من بين أكاسيد المعادن النانوية المدروسة، يُعد أكسيد الزنك النانوي من أقوى المواد المرشحة لتصدُر المواجهة مع الجراثيم والفتور وخاصة المقاومة منها في السنوات القادمة، نظراً لاستخدامات أكسيد الزنك الطبية المعروفة منذ القدم ضمن المستحضرات الجلدية [7] كمُقَبِّضٍ ومُطَهِّرٍ آمنٍ ومضادٍّ للحكّة والاحمرار، بالإضافة إلى أنّه مكونٌ أساسيٌّ في الواقيات الشمسية [8]، كما يعدّ الزنك من أهمّ المعادن الزهيدة التي يحتاجها الجسم بشكل يوميّ لسيّر معظم التفاعلات الحيوية على المستوى الخلويّ والعمليات البيولوجية كالتنمؤ والاستقلاب والوظيفة المناعية والتكاثر وترميم الجروح وغيرها الكثير [9][10]. يملك

أكسيد الزنك النانوي خصائص فيزيائية وكيميائية فريدة باعتباره من أنصاف النواقل حيث يملك فجوة طاقة كبيرة قدرها 3.37 إلكترون فولت وطاقة ارتباط عالية 60 ميلي فولت [11] [7] كما يُبدي ثباتاً واضحاً تحت مختلف شروط الضَّغط والحرارة، ويتمتع بفعالية كيميائية كبيرة على الرغم من ثباته الكيميائي [12]. يتميز بتتوُّع طرائق تحضيره سواءً على المستوى الصناعي أو البحثي وتتوُّع الجسيمات النانوية والأشكال البلورية التي يمكن الحصول عليها بتغيير شروط التَّحضير [13]، وبالتالي يوفر طيفاً واسعاً من التَّطبيقات الخاصة بكلِّ شكلٍ ناتجٍ من تلك الجسيمات سواءً في المجالات الطبيَّة أو التَّجميلية أو حتَّى التَّطبيقات في المجالات الصَّناعية كصناعات المطاط والسيراميك والصناعات الإلكترونية [12]. تُعدّ طريقة sol - gel من أكثر طرائق الاصطناع الكيميائي المعتمدة لاصطناع أكاسيد المعادن النانوية وخاصةً أكسيد الزنك النانوي [14]، نظراً لسهولة تطبيق هذه الطَّريقة دون الحاجة لتجهيزات معقَّدة وبشروط اصطناع بسيطة مقارنةً بالاصطناع بالطرائق الفيزيائية [15] إضافةً للتَّحكُّم بصفات أكسيد المعدن النانوي الناتج بسهولة بضبط ظروف التَّحضير [14].

2. هدف البحث Aim of research:

- تحضير جسيمات أكسيد الزنك النانوية بطريقة sol - gel الكيميائية.
- دراسة فعالية أكسيد الزنك النانوي تجاه جراثيم الإشريكية القولونية *Escherichia coli* والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*.
- مقارنة فعالية أكسيد الزنك النانوي مع سيفاليكسين وكلاريثرومايسين كلَّ على حدة وتحري تأثير المشاركة بين تلك الصادات وأكسيد الزنك النانوي على الفعالية المضادة للجراثيم لكلِّ منهما.

3. المواد والأجهزة المستخدمة **Materials and devices**:

1.3. المواد المستخدمة:

خلّات الزنك ثنائية الماء %99.9 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ماء ثنائي التقطير
 Double distilled water (DDW)، هيدروكسيد الصوديوم 90% NaOH، كحول
 مُطلق 95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ، سلالات مُنمّطة من جراثيم الإيشريكية القولونية *E. coli*
 (ATCC 8739) و الزانفة الزنجارية *P. aeruginosa* (ATCC 9026)، آغار مُغذّ
 Nutrient agar (NA)، آغار موللر هنتون (MHA) Mueller Hinton agar، ماء
 عقيم Sterile water، أقراص صادات $30\ \mu\text{g}$ Cephalexin و Clarithromycin
 $15\ \mu\text{g}$.

2.3. الأجهزة المستخدمة:

تم إدراج الأجهزة التي استُخدمت في اصطناع ZnO NPs، تحضير أوساط الزرع
 الجرثوميّ وتحضير المعلّقات النانوية والجرثوميّة ضمن الجدول 1.

الجدول 1. الأجهزة المستخدمة في الدراسة والشركات المصنّعة لها

بلد المنشأ والشركة المصنّعة	الجهاز
Australia (Velpscientifica)	جهاز تحريك مغناطيسيّ مع التسخين Magnetic stirrer
Germany (Hwashin Technology)	حوض الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic bath
Germany (DI 18 basic)	جهاز خلط بسرعات عالية High-speed mixer
UK (Malvern Instruments)	جهاز تحديد أبعاد الجسيمات Zeta nano sizer
Japan (Shimadzu)	جهاز قياس الطيف الضوئيّ Spectrophotometer

4. طرائق العمل Methods:

1.4. تحضير جسيمات أكسيد الزنك النانوية Preparation of ZnO NPs:

تمّ اصطناع جسيمات أكسيد الزنك النانوية بطريقة كيميائية (sol – gel) ضمن حرارة الغرفة. تمّ وزن 2 غ من ملح خلات الزنك ثنائية الماء وحلّها ضمن 15 مل من الماء ثنائي التقطير، كما تمّ وزن 8 غ من هيدروكسيد الصوديوم وحلّها ضمن 8 مل من الماء ثنائي التقطير. تمّ تحريك كلّ من المحلولين على حدة لمدة 5 دقائق حتّى تمام الانحلال، ثمّ أُضيف كامل محلول هيدروكسيد الصوديوم بالتدريج إلى محلول خلات الزنك ثنائية الماء مع استمرار التحريك. وأخيراً، تمّت معايرة المزيج السابق باستخدام 100 مل من الكحول حتّى تشكّل العكر في المحلول، تلاها تحريك المزيج النهائي لمدة ساعة كاملة وتُرك بعدها ليُجفّ بحرارة 60 C لمدة 24 ساعة تمّ بعدها جمع الراسب المتشكّل بعد التجفيف وحفظه في عبوات زجاجية عاتمة بدرجة حرارة الغرفة.

2.4. توصيف جسيمات أكسيد الزنك النانوية Characterization of ZnO NPs:

1.2.4 مطيافية الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية UV-Vis

:Spectroscopy

تُظهر الخصائص الضوئية المميزة للجسيمات النانوية عندما يحدث انتقال للإلكترونات بين نطاق التكافؤ ونطاق التوصيل، أي حركة الإلكترونات من المدار الجزيئي الأعلى المشغول إلى المدار الجزيئي الأدنى غير المشغول وذلك بسبب الأبعاد المنخفضة للهيكل الإلكتروني للجسيمات النانوية والتي تؤثر في طاقة الإثارة اللازمة لهذا

الانتقال. [16]

بناء على ما سبق، استُخدم جهاز التحليل الطيفي UV-Vis Spectrophotometer لتسجيل الأطياف المرئية للأشعة فوق البنفسجية لمسحوق ZnO NPs، حيث تم تحضير العينة بتمديدتها بالماء المقطر بنسبة 1:1 ونقلها لخلية كوارتز، ثم أُجري المسح الطيفي بين طولي الموجة 500-200 نانومتر بمعدل قياس 1 نانومتر .

2.2.4. تشتت الضوء الديناميكي (DLS) Dynamic Light Scattering:

تُعرف أيضاً بمطابقة الارتباط بالفوتون، وهي أكثر الطرائق استخداماً لتحليل الجسيمات النانوية. وتستخدم هذه التقنية من أجل تحديد نمط توزع حجم الجسيمات Particle size distribution profile في المعلق أو البوليميرات في المحلول من خلال قياس التغيرات العشوائية في كثافة الضوء المنتشرة من المعلق أو المحلول. ويعتمد مبدأ عمل هذه التقنية على سقوط شعاع ضوئي وحيد اللون على المحلول الحاوي على جسيمات صغيرة معلقة خاضعة لحركة عشوائية حرارية تُعرف بالحركة البراونية Brownian motion، وتعتمد سرعة هذه الجسيمات على حجمها فتكون الجسيمات الكبيرة بطيئة الحركة أما الجسيمات الصغيرة فتكون أسرع حركةً، و عندما يصطدم الضوء بالجسيمات يحصل تأثير دوبلر Doppler effect بسبب التغيرات في الطول الموجي للضوء، ويكون حجم الجسيمات في عينة المحلول مرتبطاً مع تغير طول الموجة [17]. يُحدّد حجم الجسيمات من معامل الانتشار من خلال معادلة ستوكس-أينشتاين [18] وتقاس العينات بعد تعليقها أو حلّها بالمحلات المناسبة وتُنقل للخلية المُخصّصة للقياس.

3.4. دراسة الفعالية المضادة للجراثيم Antibacterial activity

1.3.4. تحضير المعلق الجرثومي:

استُخدمت سلالات منمطة من جراثيم الإشريكية القولونية *E. coli* (ATCC8739)، والزوائف الزنجارية (*P. aeruginosa* (ATCC9026)، وتم زرع كل منها على وسط الآغار المغذي (NA) Nutrient Agar ثم حُضِنَت في الحاضنة بدرجة $35 \pm 2^\circ\text{C}$ مدة 24 ساعة. تم تحضير معلق جرثومي من مستعمرات من كل سلالة مدروسة بعد نموها على وسط NA حيث أُخِذَ ملء عروة الزرع loop من كل مستعمرة ونُقِلَ كل منها إلى أنبوب يحوي 10 مل من الماء العقيم مع التأكد من الاستحلاب والمزج الجيد لمحتوى العروة ضمن الماء العقيم لضمان تشكّل معلق متجانس. قيست الامتصاصيات لكل معلق جرثومي بجهاز spectrophotometer عند طول موجة 625 نانومتر مع تعديل تركيز المعلق الجرثومي حتى الوصول لقيم امتصاصية لكل معلق ضمن 0.08 – 0.1، أي ما يعادل عكارة نصف ماكفرلاند 0.5 McFarland.

2.3.4. تحضير المعلق النانوي:

تم تحضير المعلقات النانوية بحلّ أوزان مختلفة من ZnO NPs في DMSO الممدّد بالماء، واختلفت التراكيز المعتمدة باختلاف الجراثيم المدروسة كما هو موضّح في الجدول 2.

3.3.4. دراسة الفعالية المضادة للجراثيم بطريقة الانتشار بالحفر Well diffusion

:method

تم تحريّ الفعالية المضادة للجراثيم لأكسيد الزنك النانوي وتحريّ تأثير مشاركته مع بعض الصادات، و أجري الاختبار على وسط MHA محضّر مسبقاً. تم نقل 10ميكروليتر من كل معلق جرثومي لكل جرثومة مدروسة بواسطة مِمَصّ صغير micropipette وأفرغت على نقاط متفرقة على سطح الوسط الزرعّي ثم نُشِرَت

بشكل طبقة موحدة السماكة باستخدام الناشر الزجاجي المعقم مسبقاً، وتُركت الأطباق لمدة خمس دقائق ضمن غرفة العزل. تمَّ إحداث خمس حفر (كلُّ منها بقطر 9 ملم) ضمن كلِّ وسط زرعِي باستخدام ثاقب فيليني عقيم، تلاها تعبئة الحفر في كلِّ وسط بمعلقات ZnO NPs وأقراص الصادات المختارة لاختبار التحسس على الصادات وفق الجدول 2. حُضنت الأطباق ضمن الحاضنة بدرجة حرارة $2 \pm 35^\circ \text{C}$ لمدة 24 ساعة. أخيراً، تمَّ قياس أقطار هالات التثبيط Inhibition zones بواسطة مسطرة مدرجة وسُجّلت القياسات المأخوذة.

الجدول 2. توزيع كلِّ من معلقات ZnO NPs وأقراص الصادات على الأوساط الزرعية للجراثيم المدروسة

Bacterium	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5
<i>E. coli</i>	Cephalexin 30 µg	100 mg/mL ZnO NPs	200 mg/mL ZnO NPs	100 mg/mL ZnO NPs + Cephalexin 30 µg	Blank
<i>P. aeruginosa</i>	Clarithromyc in 15 µg	50 mg/mL ZnO NPs	100 mg/mL ZnO NPs	100 mg/mL ZnO NPs + Clarithromyc in 15 µg	Blank

5. النتائج والمناقشة Results and discussion:

1.5. الاصطناع الكيميائي لأكسيد الزنك النانوي بطريقة سول-جل Chemical

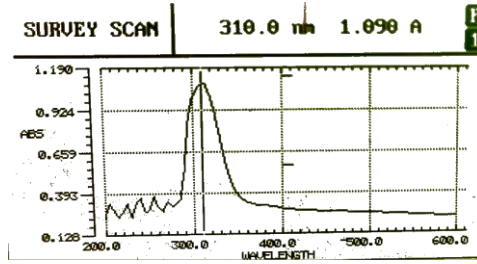
:Synthesis of ZnO NPs via sol-gel method

تم التفاعل بدرجة حرارة الغرفة وبالتحريك المستمر أثناء كل مراحل التحضير. تم بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم (كمصدر لمجموعات الهيدروكسيل OH^-) إلى محلول المادة الأولية (خلات الزنك ثنائية الماء) ضمان حلمة كامل خلات الزنك في الماء وتشكيل جزيئات هيدروكسيد الزنك $\text{Zn}(\text{OH})_2$ المعلقة Suspended غير المنحلة في الوسط. تُعدّ جزيئات هيدروكسيد الزنك نوى تنمو وتتشكل منها جسيمات أكسيد الزنك ZnO خلال المراحل اللاحقة من الاصطناع. ساعدت إضافة الكحول المطلق بعد إضافة هيدروكسيد الصوديوم على ثبات مُعلّق هيدروكسيد الزنك لأنّ زيادة تركيز مجموعات الهيدروكسيل سالبة الشحنة (من محلول NaOH و من الكحول المطلق) في الوسط تضمن تغليف نوى هيدروكسيد الزنك بإحكام بطبقة من مجموعات الهيدروكسيل OH^- نتيجة الروابط الهيدروجينية المتشكلة، مما يُعيق تجمع جزيئات $\text{Zn}(\text{OH})_2$ في المزيج النهائي وبالتالي يضمن قدر الإمكان تقليل حجم جسيمات أكسيد الزنك المتشكلة أثناء التجفيف. تم بالتجفيف بدرجة حرارة 60°C لمدة 24 ساعة التخلص من كل من المُجلّ (الماء) والكحول المطلق وتفكك Decomposition جزيئات $\text{Zn}(\text{OH})_2$ لأكسيد الزنك ZnO ذي اللون الأبيض. بالرغم من اعتماد الاصطناع على سلسلة من التفاعلات الكيميائية، لا يعبر حساب المردود المئوي للتفاعل عن نسبة الجسيمات النانوية الناتجة بل عن كمية أكسيد الزنك الناتج بأبعاده الميكروية والنانوية معاً.

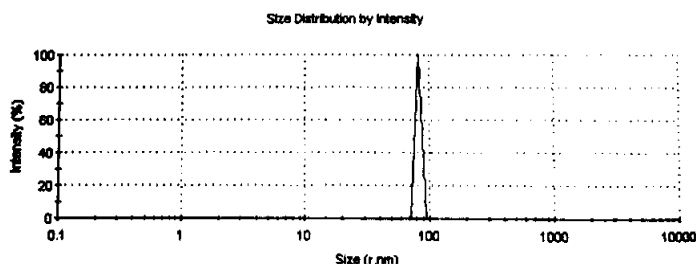
2.5. توصيف جسيمات أكسيد الزنك النانوي ZnO NPs Characterization

يوضح الشكل 1 المنحني الناتج عن المسح الطيفي لعينة من أكسيد الزنك المُصنَّع بطريقة سول-جل عند تحليلها بمطيافية الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية، تظهر فيه قمة امتصاصية واضحة عند 310 نانومتر وهي قيمة تقع في مجال امتصاص أكسيد الزنك النانوي مما يؤكد هوية أكسيد الزنك المتشكل وتُوافق فجوة طاقة قدرها 3.9 eV [19] حيث تزداد فجوة الطاقة بتناقص حجم الجسيمات المدروسة.

يوضح الشكل 2 توزع أبعاد الجسيمات size distribution الناتج عن تشتت الضوء الديناميكي DLS وتظهر فيه قمة وحيدة عند 82.2 نانومتر تؤكد أن أبعاد الجسيمات المُحضرة تقع ضمن المجال النانوي (1- 100 نانومتر) وهي نتيجة تتوافق مع دراسة أجراها J.N. Hasnidawani et al [20]



الشكل 1. الطيف الناتج عن المسح الطيفي لعينة من أكسيد الزنك النانوي بجهاز spectrophotometer



الشكل 2. توزع أبعاد الجسيمات لعينة أكسيد الزنك النانوي بعد تحليلها بتقانة (DLS)

3.5. تأثير أكسيد الزنك النانوي على الجراثيم المدروسة

أظهرت معقدات أكسيد الزنك النانوي المطبقة فعالية مضادة للجراثيم Antibacterial activity على كل من *E. coli* و *P. aeruginosa* ، وكانت قياسات أقطار هالات عدم النمو متناسبة طردياً مع تركيز أكسيد الزنك النانوي المستخدم كما هو موضح في الشكل 3، ويعود ذلك لتأثير أكسيد الزنك النانوي بشكل مباشر على الجدار الخلوي للجراثيم نتيجة التجاذب بين الجسيمات النانوية موجبة الشحنة الكأية والمحفظة المكوّنة من عديدات السكاريد السالبة الشحنة ممّا يسبب تغليف الخلية بتراكيز عالية من ZnO NPs [21] التي بدورها تولّد جذور الأوكسيجين المتفاعلة Reactive oxygen species (ROS) وخاصة جذور الهيدروكسيل ضمن الوسط المائي المحيط بها، تسبب هذه الجذور شديدة التفاعلية مع كافة المركبات والبنى الخلوية تآكل الجدار الخلوي وسهولة نفاذ الجسيمات النانوية بتراكيز كبيرة لداخل الخلية [22] حيث تبدأ شوارد الزنك Zn^{+2} بالتحرّر بشكل أكبر بتأثير الوسط الحمضي [12] للجسيمات الحالة ضمن

الخلية [23][24]. تسبب هذه التراكيز العالية سمية خلوية نتيجة تثبيط أنزيمات السلسلة التنفسية وبالتالي تحريض الموت الخلوي المبرمج [25].

أبدى معلق أكسيد الزنك النانوي بتركيز 100 ملغ/مل تأثيراً مضاداً تجاه *P. aeruginosa* بشكل أكبر من *E. coli*، وقد يرجع ذلك إلى أن ثخانة محفظة عديدات السكاريد المخاطية المحيطة بالإشريكية القولونية تعادل ضعف ثخانة المحفظة المحيطة بجراثيم الزوائف الزنجارية [26].

أبدت *E. coli* مقاومة تجاه قرص الصاد سيفاليكسين ولم تظهر حالة تثبيط خاصة بقرص الصاد، أما *P. aeruginosa* فأبدت حساسية تجاه قرص الصاد كلاريثرومايسين وكان قطر حالة التثبيط 19 مم ويعود تثبيط النمو الجرثومي لتثبيط الصاد لاصطناع البروتينات الجرثومية. تم تحديد الحساسية بمقارنة أقطار هالات التثبيط مع جداول مرجعية.

كان التأزر بالفعالية المضادة للجراثيم واضحاً عند مشاركة معلق ZnO NPs بتركيز 100 mg/mL مع أقراص الصادات المختارة، حيث تم التغلب على مقاومة *E. coli* لسيفاليكسين عند مشاركته مع ZnO Nps وكان قطر حالة التثبيط الناتجة عن تلك المشاركة (12 مم) أكبر مقارنة مع قياس قطر حالة التثبيط لمعلق المادة النانوية لوحده (10 مم)، ويمكن القول أن آلية التأثير بالفعالية بين أكسيد الزنك وسيفاليكسين تتخلص باستهداف سلامة جدار الخلية الجرثومية بالآليات المذكورة سابقاً وخاصة أكسدة مكونات الجدار الخلوي بالجذور الحرة الناتجة عن ZnO NPs والتي أدت لهذا التأزر في الفعالية المضادة للجراثيم على *E. coli*.

كان قطر حالة التثبيط الناتجة عن المشاركة بين الكلاريثرومايسين و ZnO NPs (25 مم) وهو أكبر بكثير من القياسات الخاصة بهالات التثبيط الناتجة عن تطبيق كل من

دراسة الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد الزنك النانوية على سلالتين من جراثيم الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية

100ملغ/مل أكسيد الزنك (16 مم) والصّادّ (19 مم) على حدة، مما يشير لوجود تآزر بالفعالية المضادة للجراثيم بين أكسيد الزنك النانوي وكلاريثرومايسين ويمكن تفسير هذه النتيجة بتسهيل الجسيمات النانوية دخول الصّادّ عبر الجدار المتهدك للخلية الجرثومية وبالتالي زيادة نجاعة الصّادّ بالمقارنة مع تطبيقه وحده.



a.

b.

الشكل 3. دراسة فعالية جسيمات أكسيد الزنك النانوية على *E. coli* (a) و *P. aeruginosa* (b) بطريقة الانتشار بالحفر حيث تُعبّر الحفر المسماة Anti+100 mg nano عن المشاركة بين 100 ملغ/مل من أكسيد الزنك مع قرص الصّاد في نفس الحفرة.

6. الاستنتاجات Conclusions:

تقدّم تقانة النانو حلاً واعدة لمشكلة مقاومة الصّادّات من أبرزها استخدام أكاسيد المعادن النانويّة كمركّبات مضادّة للجراثيم. يجتذب أكسيد الزّنك النّانويّ بشكل خاصّ أنظار الباحثين نظراً لخصائصه الفيزيائيّة والكيميائيّة المميّزة وإمكانية اصطناعه بسهولة بطرائق مختلفة وصفات محدّدة بدقّة بالإضافة لاستخداماته العديدة وخاصّة الدوائيّة منها.

تمّ اصطناع أكسيد الزّنك النّانويّ بطريقة sol – gel الكيميائيّة بجسيمات أبعادها 82.2 نانومتر. أبدت ZnO NPs فعاليّة مضادّة للجراثيم تجاه الإشريكية القولونيّة و الزائفة الزنجارية، وكانت التأثير المضادّ للجراثيم لها تجاه *p. aeruginosa* أكبر من التأثير تجاه *E. coli*، كما أبدت تلك الجسيمات النّانويّة تازراً بالتأثير المضادّ للجراثيم عند مشاركتها مع مركبيّ كلاريثرومايسين وسيفاليكسين تجاه *p. aeruginosa* و *E. coli* على التّوالي، كما تمّ التّغلب على مقاومة *E. coli* لمركّب سيفاليكسين عند مشاركته مع ZnO NPs بتركيز 100 ملغ/مل.

7. التّوصيات Recommendations:

- دراسة الفعاليّة المضادّة للجراثيم لأكسيد الزّنك النّانويّ على أنواع جرثوميّة أخرى.
- تحزّي آليّات التأثير المضادّ للجراثيم لأكسيد الزّنك النّانويّ وتحديدها بدقّة.
- تحديد آليّات التّأزر بالفعاليّة المضادّة للجراثيم بين ZnO NPs والصّادّات من مُختلّف الرّمز.

8. المراجع References:

1. Hasan CM, Dutta D, Nguyen ANT. Revisiting Antibiotic Resistance: Mechanistic Foundations to Evolutionary Outlook. *Antibiotics* 2021;**11**:40.
2. Gao W, Zhang L. Nanomaterials arising amid antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2021;**19**:5–6.
3. Kolahalam LA, Kasi Viswanath IV, Diwakar BS *et al.* Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Materials Today: Proceedings* 2019;**18**:2182–90.
4. Anu Mary Ealia S, Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2017;**263**:032019.
5. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnol* 2022;**20**:262.
6. Ye Q, Chen W, Huang H *et al.* Iron and zinc ions, potent weapons against multidrug-resistant bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2020;**104**:5213–27.

7. Borysiewicz MA. ZnO as a Functional Material, a Review. *Crystals* 2019;**9**:505.
8. Koł odziejczak–Radzimska A, Jesionowski T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials* 2014;**7**:2833–81.
9. Chasapis CT, Ntoupa P–SA, Spiliopoulou CA *et al.* Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Arch Toxicol* 2020;**94**:1443–60.
10. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA *et al.* Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* 2012;**86**:521–34.
11. AL–Asady ZM, AL–Hamdani AH, Hussein MA. Study the optical and morphology properties of zinc oxide nanoparticles. Baghdad, Iraq, 2020, 020061.
12. Raha S, Ahmaruzzaman Md. ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives. *Nanoscale Adv* 2022;**4**:1868–925.
13. Mandal AK, Katuwal S, Tettey F *et al.* Current Research on Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications. *Nanomaterials* 2022;**12**:3066.

14. Parashar M, Shukla VK, Singh R. Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *J Mater Sci: Mater Electron* 2020;**31**:3729–49.
15. Bokov D, Turki Jalil A, Chupradit S *et al.* Nanomaterial by Sol–Gel Method: Synthesis and Application. Wang Z (ed.). *Advances in Materials Science and Engineering* 2021;**2021**:1–21.
16. Mohan S, Oluwafemi SO, Kalarikkal N *et al.* Synthesis of Inorganic Nanomaterials. :314.
17. Nasrollahzadeh M, Atarod M, Sajjadi M *et al.* Plant–Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. *Interface Science and Technology*. Vol 28. Elsevier, 2019, 199–322.
18. Modena MM, Rühle B, Burg TP *et al.* Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Adv Mater* 2019:1901556.
19. Navale GR, Shinde SS. Antimicrobial Activity of Zno Nanoparticles against Pathogenic Bacteria and Fungi. 2015:9.

20. Hasnidawani JN, Azlina HN, Norita H *et al.* Synthesis of ZnO Nanostructures Using Sol–Gel Method. *Procedia Chemistry* 2016;**19**:211–6.
21. Mendes CR, Dilarri G, Forsan CF *et al.* Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Sci Rep* 2022;**12**:2658.
22. Lallo da Silva B, Abuçafy MP, Berbel Manaia E *et al.* Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview. *IJN* 2019;**Volume 14**:9395–410.
23. Siddiqi KS, ur Rahman A, Tajuddin *et al.* Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale Research Letters* 2018;**13**, DOI: 10.1186/s11671–018–2532–3.
24. Jiang Y, Zhang L, Wen D *et al.* Role of physical and chemical interactions in the antibacterial behavior of ZnO nanoparticles against E. coli. *Materials Science and Engineering: C* 2016;**69**:1361–6.

25. Mishra PK, Mishra H, Ekielski A *et al.* Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discovery Today* 2017;**22**:1825–34.
26. Yao X, Jericho M, Pink D *et al.* Thickness and Elasticity of Gram–Negative Murein Sacculi Measured by Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 1999;**181**:6865–75.

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند

مرضى سرطان القولون والمستقيم

في مشفى تشرين الجامعي – اللاذقية – سورية

طالب الدراسات العليا: رقية وسوف

المعهد العالي لبحوث البيئة – جامعة: تشرين

الدكتورة المشرفة: أمل ديوب + د. فراس حسين

الملخص:

مقدمة:

يعد سرطان القولون والمستقيم من أخطر أنواع السرطانات ويحقق نسبة وفيات كبيرة حول العالم سنوياً، ونظراً لانتشاره الكبير في سورية وارتباطه الوثيق بالعوامل المعدية وخاصة طفيلي المتبرعمة الكيسية *Blastocystis hominis* فقد أجريت الدراسة الحالية بهدف الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم مقارنة مع عينات شاهد (مرضى الهضمية) في مشفى تشرين الجامعي واللاذقية، ودوره في الآلية الإمبراضية لسرطان القولون والمستقيم.

طرائق الدراسة:

جمعت عينات البراز لمرضى سرطان القولون ومرضى الشاهد من قسم الهضمية في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، خلال الفترة الممتدة من شهر تموز حتى تشرين الأول لعام 2022 بلغ عدد العينات الكلية المدروسة 100 عينة (50 مريض بسرطان القولون و50 عينة لمرضى الشاهد)، فُحصت عينات البراز بطريقة الفحص المباشر باستخدام المحلول الفيزيولوجي واليود اليودي، وأكّدت الإصابة بالطفيلي وتحديد هوية الطفيلي بطريقة الزرع المخبري باستخدام وسط جونز المعدل.

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

النتائج:

بينت نتائج الفحص المجهرى المباشر من دون تلوين، ومع التلوين باستخدام المحلول اليودي (اللوغول) لعينات البراز لمرضى سرطان القولون ومرضى الشاهد، انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند مرضى السرطان والشاهد معاً، بمعدل إصابة عام 70% و 42% على التوالي بفرق ذات دلالة احصائية بين النسبتين ($p\text{-value}=0.004$). كما أظهرت نتائج الدراسة أن سرطان القولون والمستقيم وكان أكثر شيوعاً عند الرجال منه عند النساء، وعند الفئة العمرية بين 50-60 سنة، وكان ذلك مترافقاً مع انتشار كبير لطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم أكثر من مرضى الهضمية (الشاهد) و الرجال أكثر من النساء. وكان الانتشار الكبير لطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم بالفئات العمرية من 40-50، بينما عند مرضى الشاهد بالفئات العمرية من 51-60، كما بينت الدراسة أن الانتشار الكبير لطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى السرطان والشاهد كان عند المرضى القاطنين في الريف أكثر من المدينة، أي الأشخاص الذين يقومون بالأعمال الزراعية وتربية الحيوانات أكثر من غيرهم، و كانت أكثر أشكال الطفيلي تكراراً و التي ظهرت في عينات البراز لمرضى سرطان القولون والمستقيم ومرضى الشاهد هي الأشكال الفجوية الصغيرة والمتوسطة ومتعدد الفجوات والشكل الحبيبي بينما كان الشكل الأميبي أقل ظهوراً ولم تشاهد أية أشكال كيسية. إن تأكيد انتشار طفيلي المتبرعمة البشرية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم يسجل لأول مرة في سورية في هذه الدراسة

الخلاصة:

انتشار كبير لطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم مقارنة مع الشاهد وتحديداً عند الرجال من سكان الريف الأمر الذي يرجح أن يكون للمتبرعمة الكيسية دور في نشوء سرطان القولون والمستقيم، وكذلك من المحتمل أن يوفر هذا المرض بيئة مناسبة لانتشار الطفيلي واستمراره في الأمعاء.

كلمات مفتاحية: مرضى سرطان القولون والمستقيم، طفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية، مشفى تشرين الجامعي.

Detection of the prevalence of Blastocystis hominis infection among patients with colorectal cancer at Tishreen University Hospital in Lattakia, Syria

Abstract:

Introduction:

Colorectal cancer (CRC) is one of the most dangerous types of cancer, which causes annually a large mortality rate around the world. Given its great prevalence in Syria, and its close link with infectious agents, especially the *Blastocystis hominis*, we conducted the current study to reveal the extent of infections with this parasite among CRC patients at Tishreen University Hospital (TUH), and determine its role in the pathogenesis of CRC.

Methods:

A total number of one hundred fecal specimens were collected and studied from two groups of patients: colorectal cancer patients and control patients (In the Digestive Department) of TUH, during July - October 2022. Fifty samples from each group.

Results:
Results of direct microscopic examination with and without staining, using iodine solution (Lugol) of fecal samples of colorectal cancer and control patients, showed the prevalence of infection with *B. hominis* in both groups, with a general infection rate of 70% and 42%, respectively, and the difference between the two percentages is statistically significant (p -value = 0.004). Results of the study also showed that CRC is more common in men than women, and in the age group of 50–60 years old. It was associated with a large prevalence of *B. hominis* in CRC more than

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي – اللاذقية- سورية

in control patients and men more than women. The study also showed that the high prevalence of *B. hominis* among colorectal cancer and control patients was among the rural population more than the urban, that mean people who do agricultural work and animal husbandry more than others. The most frequent of parasitic forms in the feces specimens of colorectal cancer and control patients were the small and medium vacuole forms, multi-vacuoles, and granular form, while the amoebic form was less visible, and we could not distinguish any cystic forms. Results of the lab culture of *B. hominis* showed better growth in the Jones medium by adding yeast more than Jones medium modified by adding starch. Confirmation of the prevalence of *B. hominis* in patients with CRC is detected for the first time in Syria in this study.

Conclusions:

There is a significant prevalence of *B. hominis* among patients with CRC compared to the control patients, specifically among men from rural populations, Which is likely to have a role for Blastocystis in the emergence of colorectal cancer, as well as the possibility that this disease provides a suitable environment for the spread of the parasite and its persistence in the intestine

Keywords:

CRC patients. *B. hominis*. Tishreen University Hospital, Lattakia City, Syria.

المقدمة:

تعود أغلب أسباب الوفيات على مستوى العالم إلى الأمراض غير المعدية حيث يكون السرطان مسؤولاً عن 20% من إجمالي الوفيات [1]. في تقرير صادر عن منظمة الأمم المتحدة في 21 ديسمبر عام 2021 بلغ عدد الوفيات من مرضى السرطان عام 2020 حوالي 10 مليون حالة وفاة وكانت الحالات الأكثر شيوعاً مرض سرطان الثدي 2,26 مليون حالة، يليه سرطان الرئة 2,21 مليون حالة، ثم سرطان القولون والمستقيم 1,93 مليون حالة [2].

يعد سرطان القولون والمستقيم (Colorectal Cancer (CRC أحد الأمراض الفتاكة عالمياً، ومع ذلك غالباً لا يدرك المرضى الإصابة به لعدم وجود أعراض واضحة في المرحلة المبكرة للإصابة [3].

إن سرطان القولون هو نوع من السرطانات التي تصيب الأمعاء الغليظة أو الجزء الأخير من الجهاز الهضمي للإنسان [4]، وقد بينت العديد من الدراسات أن مسببات الأمراض المعوية مثل الجراثيم والطفيليات تلعب دوراً هاماً في المساهمة بزيادة سرطان القولون والمستقيم، يعد طفيلي المتبرعمة الكيسية (*Blastocystis hominis*) من أكثر الطفيليات المعوية شيوعاً في الجهاز الهضمي للإنسان حيث تم اقتراح اسم المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* على النوع الذي يصيب البشر، و هي من أهم المسببات المرضية الطفيلية المعوية المرتبطة بسرطان القولون [5,6]، تم ملاحظة ارتفاع معدل الإصابة بطفيلي المتبرعمة البشرية بشكل ملحوظ عند المرضى الذين يعانون من سرطان القولون والمستقيم مع توقع تأثيرها المسرطن المحتمل على الكولون و المستقيم حيث اثر على الخلايا المعوية عند الفئران في المختبر والتي تم إعدادها صناعياً

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

بالمترعمة البشرية حيث عمل الطفيلي على تحفيز تشكيل الخلايا السرطانية عند الفئران المختبرة [7]

تنتمي المتبرعمة الكيسية تصنيفياً إلى مملكة الـ Protista شعبة الـ Stramenopiles التي تضم تجمع تطوري متباين ومعقد من الأنواع غيرية التغذية وذاتيتها حيث تصنف المتبرعمة الكيسية البشرية ضمن صف (Bastocystea) ، [8] ورتبة (Blastocystales) ، [8] وفصيلة (Blastocystaceae) ، [8] وجنس (*Blastocystis*)، [9] والنوع *B. hominis* : [10] Specie ، يوصف هذا النوع على أنه طفيلي معوي وحيد خلية من الأولي الحيواناتية (لاهوائي إجباري obligate anaerobic) يهاجم بشكل كبير البشر، والحيوانات مثل الثدييات، والزواحف والطيور والبرمائيات والحشرات [11,12,13]

أعلى نسبة انتشار للمترعمة الكيسية البشرية في البلدان النامية مقارنة بالدول المتقدمة وهذا يعود لسوء النظافة والاحتكاك الوثيق بالحيوانات [14] . تحدث العدوى بالمترعمة الكيسية عن طريق تناول مياه الشرب أو الخضار النيئة أو الفواكه والأيدي غير النظيفة الملوثة بأكياس الطفيلي [15,16] للطفيلي عدة أشكال مورفولوجية في الأمعاء، لكن ثلاثة أشكال منها تعد الرئيسية و الأكثر شيوعاً في الأمعاء وهي: الشكل الفجوي والحبيبي والأميبي (Vacuolar, Granular, Ameboid) [17,18,19] بالإضافة إلى أشكال أخرى يمكن رؤيتها أيضاً وهي الشكل متعدد الفجوات Multivacuolar ، والشكل عديم الفجوات Avacuolar، والشكل الكيسي cyst [19,20]، يتميز الشكل الفجوي بوجود فجوة كبيرة تشغل كل مساحة الخلية كما بينت الدراسات المرجعية أن ما يسمى بالفجوات هي في الواقع أجسام مرتبطة بالغشاء تحتوي على مواد حبيبية متداخلة أو حبيبات دقيقة موزعة بشكل غير منتظم تتكون من الكربوهيدرات والشحوم. حيث يحتمل

أن يعمل الجسم المركزي كعضو تخزين. بالإضافة إلى وظيفة التخزين، فقد حددت الدراسات أن الجسم المركزي يؤدي دوراً أساسياً في استماتة خلايا الكائن الحي [21,22]، أما الشكل الحبيبي الحبيبي Granular فهو يشبه بنويماً الشكل الفجوي باستثناء وجود الحبيبات في الجسم المركزي والهيولى وقد حددت الدراسات المجهرية الإلكترونية ثلاثة أنواع من الحبيبات وهي الحبيبات الأيضية والتكاثرية والشحمية. توجد الحبيبات الأيضية حصرياً في السيتوبلازم وتشارك في تنفيذ عمليات التمثيل الغذائي المختلفة للكائن الحي. بينما تُرى الحبيبات التكاثرية داخل الجسم المركزي فقط [23].

تظهر الأشكال الأميبية بشكل أقل تكراراً من الأشكال الفجوية والحبيبية، وتتميز بأنها غير منتظمة مجهزة بأرجل كاذبة، لكن على الرغم من أن امتلاك هذا الشكل لوحدة أو اثنين من الأرجل الكاذبة وهي سمة مميزة، إلا أن الدراسات السابقة قد أشارت إلى أن الأشكال الأميبية غير متحركة، وقد تحتوي الهيولى إما على فجوة واحدة كبيرة مثل تلك الموجودة في شكل الجسم المركزي أو فجوات متعددة أصغر [24] وقد افترض أن الجسم المركزي يكتسب شكلاً أميبياً وسيطاً قبل التحول إلى أكياس.

الشكل الكيسي (Cyst) هو أصغر أشكال الطفيلي يظهر بشكل كروي إلى بيضاوي، والسمة المميزة للأكياس هي وجود الغلاف السميك متعدد الطبقات. بالإضافة إلى جدار الكيس المميز، وقد أشار العديد من الباحثين أن الأكياس المتشكلة حديثاً تكون محاطة بدورها بطبقة سطحية من الشكل الفراغي الذي تطورت منه أو قد تفقد الغلاف السطحي وتظهر ككيسات عارية [25, 26]، تكون الهيولى كثيفة وتحتوي على أعداد متفاوتة من المتقدرات وفجوات صغيرة غنية بالشحوم أو الغليكوجين. عادة ما تكون الأكياس المعزولة من البشر ثنائية النواة. ومع ذلك، يمكن أن يختلف عدد النوى من واحدة إلى أربعة. يمنح الشكل الكيسي المقاومة للطفيلي من الظروف غير المناسبة وتبين أنه يبقى قابلاً للحياة لمدة تصل إلى شهر واحد عند درجة حرارة 25 درجة مئوية حتى عند التعرض للهواء،

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

وقد أكدت الدراسات المرجعية أن الأكياس هي الأشكال المعدية القابلة للانتقال وإحداث العدوى، والتي عند دخولها إلى مضيف مناسب تتطور إلى الشكل الفجوي [16,27].

يقدر معدل الإصابة بهذا الطفيلي حوالي مليار شخص حول العالم، ومن أهم الأعراض **السريرية** للإصابة بالمتبرعمة الكيسية هي الإسهال، الألم البطني، غثيان، فقدان شهية، انتفاخ البطن [28]

قدمت العديد من الدراسات العالمية والإقليمية **تقريباً** حول انتشار هذا الطفيلي عند المرضى عموماً ومرضى سرطان القولون والمستقيم خصوصاً وقد بينت الانتشار الكبير للطفيلي عند مرضى **سرطان** القولون والمستقيم مقارنةً مع المرضى غير المصابين بالسرطان عموماً أو المرضى المصابين بسرطانات أخرى، كذلك بينت دراسات أخرى انتشار الطفيلي عند مرضى سرطان القولون أثناء العلاج الكيميائي [29,30,31,32,33]

أما محلياً فقد تركزت الدراسات على دراسة واحدة في جامعة حلب [34] بعنوان: دراسة انتشار وغازرة المتكيسية الأريمية *Blastocystis hominis* وتحديد أنماطه الشكلية ومقارنة طرائق تشخيصه مختلفة في حلب -سورية.

أهداف البحث: هدفت الدراسة الحالية إلى:

1-دراسة انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم مقارنةً مع مرضى من قسم الهضمية (عينة شاهد) في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية.

2- تأثير بعض العوامل الحيوية (العمر -الجنس-طبيعة العمل.) على الإصابة بسرطان القولون وطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند المرضى.

3- دراسة تأثير الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية على الاستجابة للعلاج الكيميائي لمرضى سرطان القولون والمستقيم.

أهمية البحث:

للبحث أهمية بيئية ، و اقتصادية، و علمية حيث أن الكشف عن انتشار المتبرعمة الكيسية البشرية عند الإنسان يقدم مؤشراً حيوياً هاماً لمدى انتشاره في البيئة والذي يقتضي بالضرورة تطبيق الإجراءات اللازمة للسيطرة والوقاية منه، كما أن الكشف الدوري عن انتشار هذا الطفيلي عند مرضى سرطان القولون وتعزيزه للإصابة بسرطان القولون يعني تخفيض لعدد الجرعات وبالتالي كلفة المعالجة، بالإضافة لتخفيض كلفة المعالجة بالنسبة لمسبب مرضي اخر غير السرطان ، كما تأتي الأهمية العلمية للبحث من أنه يعد الدراسة الأولى محلياً حول إيجاد العلاقة بين الإصابة بسرطان القولون والمستقيم وانتشار طفيلي المتبرعمة الكيسية، وتأثير ذلك على الخطة العلاجية و رفد قاعدة البيانات العلمية والطبية.

مواد وطرائق البحث:

جمع العينات:

تم جمع عينات البراز لمرضى سرطان القولون والمستقيم من المرضى المراجعين لمركز المعالجة الكيميائية وعينات الشاهد من مرضى **الشعبة** الهضمية في مشفى تشرين الجامعي (اللاذقية)، وذلك خلال الفترة الممتدة من شهر تموز حتى تشرين الأول لعام

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

2022 بلغ عدد العينات الكلية المدروسة 100 عينة (50 مريض بسرطان القولون و 50 عينة لمرضى الشاهد)، نقلت العينات مباشرة إلى المخبر المركزي (مخبر الجراثيم) في مشفى تشرين الجامعي من أجل الفحص المخبري والكشف عن طفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية. *Blastocystis hominis* حيث يعد التشخيص المجهرى باستخدام المجهر الضوئي من أكثر طرائق الفحص استخداماً، أما الفحص المجهرى الإلكتروني فهو غير مطلوب لكنه مفيد لتأكيد الأشكال المورفولوجية غير النوعية للطفيليات [17]

الفحص المجهرى للكشف عن طفيلي المتبرعمة الكيسية :

أجري الفحص المجهرى بشكل مباشر دون تلوين، ومع التلوين باستخدام المحلول اليودي (اللوغول). حيث ووضِع على شريحة زجاجية في أحد طرفيها قطرة من المصل الفيزيولوجي وعلى الطرف الآخر قطرة من المحلول اليودي (يسمح بتلوين الطفيلي و إظهار البنى الداخلية)، ثم أُخذت كمية قليلة من البراز بواسطة عود خشبي، ثم مزجت جيداً بشكل متجانس في المصل الفيزيولوجي ومحلول اللوغول، وغطيت بساترة زجاجية الشكل (B،A،1) وفحصت تحت المجهر على التكبيرات $10 \times$ ، $40 \times$. (كُررت العملية عدة مرات لنفس عينة البراز الواحدة).



الشكل 1 : الفحص المباشر للبراز بطريقة المسحة الرطبة باستخدام المصل الفيزيولوجي ومحلول اللوغول
(A،B).

لتأكيد النوع لطيفلي المتبرعمة الكيسية البشرية بشكل أدق مخبرياً فقد اتبعت طريقة الزرع المخبري، حيث تعد طرائق الاستزراع أكثر حساسية من الفحص المباشر، حيث أظهرت أوساط الزرع مثل ووسط (MEM) ووسط جونز المعدل الانتقائي +10% مصل الحصان نجاحاً في زرع الكائنات الحية الدقيقة ومنها (المتبرعمة الكيسية البشرية) [35] الشكل(2).



الشكل 2 : الزرع في وسط جونز المعدل

النتائج والمناقشة:

بينت نتائج الفحص المجهرى لعينات البراز لمرضى سرطان القولون ومرضى الشاهد والبالغ عددهم 50/ 50 مريض، انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند مرضى السرطان والشاهد معاً، حيث كان عدد المصابين 35 مصاب من مرضى السرطان و 21 مصاب من مرضى الشاهد بمعدل إصابة عام 70% و 42% على التوالي بفروق ذات دلالة احصائية بين النسبتين ($p\text{-value}=0.004$)، حيث يظهر واضحاً الانتشار الكبير لهذا الطفيلي عند مرضى سرطان القولون والمستقيم منه عند مرضى الشاهد، وقد توافقت ذلك مع العديد من الدراسات العالمية السابقة التي أكدت على الانتشار الكبير لهذا الطفيلي عند مرضى السرطان وخاصةً سرطان القولون والمستقيم [29,30,31,32,33] و عزي السبب بذلك أولاً إلى لضعف المناعة عند مرضى السرطان والتي تؤدي لتفاقم الإصابات الثانوية الأخرى ومنها الطفيليات، والسبب الثاني يعود للقدرة الإمراضية العالية للطفيلي حيث أكدت بعض الدراسات أن طفيلي المتبرعمة

الكيسية البشرية ربما يلعب دوراً محرضاً لفرط التنسج و **رفع الشدة التأكسدية** لتكوين الأكسجين التفاعلي مما يتسبب في زيادة سمية الخلايا والإصابة بالسرطان بطريقة أسهل وبالتالي ظهور الإجهاد التأكسدي وهو ظاهرة طبيعية في الجسم إلا **أن الشدة التأكسدية التي** تستمر لفترة طويلة من الزمن يمكن **أن تؤدي إلى** العديد من الحالات المرضية بما في ذلك السرطان [36] أظهرت الدراسات أن **الشدة التأكسدية** ترتفع عند البشر المصابين بالطفيليات المعوية مثل المتبرعمة الكيسية عند مرضى السرطان [37]

أيضاً بيّنت الدراسات أيضاً أن طفيلي المتبرعمة يحرض على إنتاج السيتوكينات الالتهابية التي تلعب دوراً في التهاب المفاصل الروماتويدي، كما تفرز إنزيم البروتياز الذي يؤدي في النهاية إلى التدمير الذاتي لخلايا الأمعاء مما يتسبب في موت الخلايا المبرمج المعزز لذلك يمكن أن تتكاثر خلايا القولون والمستقيم البشرية بطريقة غير طبيعية

[38,39,40,6]

ومن عوامل الأمراض الأخرى لطفيلي المتبرعمة الكيسية **هي قدرته** على تعديل الاستجابة المناعية للمضيف ضده وهذا يساعد الطفيلي على الهروب المناعي، وهنا يحفز الجسم على إفراز السيتوكينات الالتهابية IL-6, IL-8, IL-1BETA للتخلص من الجسم الغريب [41]

أما بالنسبة لتأثير العوامل الحيوية (الجنس والعمر للمريض) الجداول (1،2،3،4) على انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند مرضى سرطان القولون والشاهد فهي كالآتي:

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

جدول (1): معدل انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم حسب الجنس.

معدل الانتشار		عدد مرضى السرطان المصابين بطفيلي المتبرعمة الكيسية		عدد مرضى سرطان القولون والمستقيم		
p-value	إناث	ذكور	إناث	ذكور	إناث	الذكور
0.47	%76	%67	13	22	17	33

جدول (2): معدل انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى الشاهد حسب الجنس.

معدل الانتشار %		عدد مرضى الشاهد المصابين بطفيلي المتبرعمة البشرية		عدد مرضى الشاهد		
p-value	إناث	ذكور	إناث	ذكور	إناث	ذكور
0.91	%42	%41	9	12	21	29

نجد من الجدولين (1،2) أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من 0.05 وبالتالي لا يوجد فروق ذات دلالة إحصائية بين نسبة انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند المرضى الذكور والإناث المصابين بسرطان القولون والمستقيم ومرضى الشاهد.

أما بالنسبة لاختلاف نسبة انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم والشاهد حسب العمر فهو كآلاتي في الجدولين (3،4).

جدول (3): معدل انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم حسب العمر

معدل الانتشار %			عدد المرضى المصابين بالطفيلي			عدد مرضى سرطان القولون والمستقيم حسب الفئة العمرية /سنة		
60<	60-51	50-40	60<	60-51	50-40	60<	60-51	50-40
%58	%60	%89	7	12	16	12	20	18

بلغت قيمة مستوى الدلالة الإحصائية بين النسبتين (89% و 60%) ($p = 0.043$) و بين النسبتين (89% و 58%) ($p\text{-value} = 0.049$) والقيمتين أقل من 0.05 وبالتالي يوجد فرق ذو دلالة إحصائية بين النسبتين.

أما بالنسبة لمستوى الدلالة الإحصائية بين النسبتين (60% و 58%) قد بلغت قيمة الـ ($p\text{-value} = 0.926$) وهي أكبر من 0.05 وبالتالي لا يوجد فرق ذو دلالة إحصائية بين النسبتين.

يبين الجدول (4) نسب اختلاف الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى قسم الهضمية (عينة الشاهد) غير المصابين بسرطان القولون والمستقيم حسب العمر الجدول (4).

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

جدول (4): معدل انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى الشاهد حسب العمر

معدل الانتشار%			عدد مرضى الشاهد المصابين بطفيلي المتبرعمة البشرية حسب الفئة العمرية			عدد مرضى الشاهد حسب الفئة العمرية /سنة		
60<	60-51	50-40	60<	60-51	50-40	60<	60-51	50-40
%36	%82	%28	5	9	7	14	11	25

بلغت قيمة مستوى الدلالة الإحصائية بين النسبتين (28% و 82%) ($p = 0.002$) وهي أقل من 0.05 وبالتالي يوجد فرق دال احصائياً بين النسبتين، أيضاً تبين وجود فرق ذو دلالة إحصائية بين النسبتين (82% و 36%) حيث بلغت قيمة ($p\text{-value} = 0.021$) وهي أصغر من 0.05 وبالتالي يوجد فرق ذو دلالة إحصائية بين النسبتين.

بينما لا يوجد فرق ذو دلالة إحصائية بين النسبتين (28% و 36%) حيث بلغت قيمة ($p\text{-value} = 0.617$) وهي أكبر من 0.05.

بالمقارنة بين الجدولين (3،4) نلاحظ أن أعلى انتشار لطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في الفئة العمرية 40-50 سنة، بينما كان أكثر انتشاراً عند مرضى الأمراض الهضمية الأخرى في الفئة العمرية بين 51-60 سنة، على الرغم من أن العدد الأكبر للمصابين بسرطان القولون والمستقيم هم في الفئة العمرية من 51-60 سنة، وبالتالي يمكن أن يعود الانتشار الكبير لطفيلي المتبرعمة الكيسية

عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في الفئة العمرية بين 40-50 إلى أسباب أخرى قد تكون طبيعة الحياة و نوعية العمل.

عموماً نلاحظ من النتائج السابقة أن سرطان القولون والمستقيم في هذه الدراسة قد أصاب الرجال أكثر من النساء، و أكثر انتشار له كان في الفئة العمرية (50-60) بنسبة 40%، بينما بلغت نسبة انتشاره عند المرضى 36% من الفئة العمرية 40-50، على عكس الدراسات السابقة التي بينت أن سرطان القولون والمستقيم قد سجل معدلات إصابة مرتفعة في الفئة العمرية من 40-50 [3] أما بالنسبة لانتشار طفيلي المتبرعمة البشرية و علاقته بمرض سرطان القولون والمستقيم فعند مقارنة انتشار هذا الطفيلي عند مرضى سرطان القولون ومرضى الشاهد وعلاقة ذلك بالجنس والعمر للمريض، فيلاحظ من الجداول (1،2،3،4) أن طفيلي المتبرعمة البشرية قد أصاب الرجال أكثر من النساء ومرضى السرطان أكثر من مرضى الشاهد وبالتالي نلاحظ العلاقة الإيجابية العالية بين انتشار الإصابة بسرطان القولون والمستقيم و الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية، إلا ان انتشار الطفيلي حسب الفئة العمرية فقد لوحظ أن الطفيلي كان أكثر انتشاراً عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في الفئة العمرية بين 40-50، أما انتشاره عند مرضى الشاهد فقد سجل أعلى انتشار في الفئة العمرية 50-60 سنة.

أما بالنسبة لتأثير طبيعة العمل ومكان الإقامة لمرضى السرطان والشاهد ومدى انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة البشرية فقد لاحظنا عموماً انتشاره الكبير عند الأشخاص الذين يسكنون الريف بنسبة انتشار 60% مقارنة مع المرضى المفحوصين من المدينة بنسبة انتشار 50%، أي الأشخاص الذين يقومون بالأعمال الزراعية وتربية الحيوانات أكثر من غيرهم. إن دراسة طبيعة العمل وعلاقتها بانتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة البشرية هام جداً لأنه يمكن أن يعطي مؤشر لآلية انتقال العدوى.

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

فيما يتعلق بالأشكال التطورية الأكثر تكراراً للطفيلي في الفحص المجهرى لعينات البراز عند مرضى سرطان القولون والشاهد، فقد أظهرت الدراسة الحالية تبايناً واضحاً بتعدد أشكال الطفيلي حسب شدة المرض ومراحل العلاج الكيميائي عند مرضى سرطان القولون حيث لوحظ في بداية تشخيص الإصابة بسرطان القولون والمستقيم وقبل البدء بالعلاج الكيميائي ظهور الأشكال الفجوية صغيرة الحجم ومتوسطة الحجم لطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية، أما بالنسبة لمرضى السرطان الذين يخضعون للعلاج الكيميائي فقد لوحظت ظهور الأشكال الفجوية الكبيرة والمتوسطة و الشكل متعدد الفجوات عند المرضى في بداية العلاج الكيميائي أما عند المرضى في منتصف مرحلة العلاج الكيميائي فقد ظهرت عندهم الأشكال الفجوية الكبيرة ومتعدد الفجوات والأشكال الحبيبية ولوحظ غزارة واضحة بالطفيلي أما في نهاية العلاج الكيميائي فقد لوحظ ظهور واضح وغزير تقريباً لكل الأشكال التطورية لطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية حيث ظهرت الأشكال الأميبية بالإضافة للأشكال الفجوية كبيرة الحجم والحبيبية ومتعدد الفجوات كما لوحظ ظهور واضح لخلايا ظهارية متوسفة من بطانة الأمعاء ناتجة عن تهتك الكولون نتيجة الإصابة الكثيفة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية حيث لوحظ ظهور الخلايا الظهارية المتوسفة بنهاية مرحلة العلاج الكيميائي الذي ترافق مع انتشار وتطور مرحلي كبير للطفيلي (بيئة مناسبة) وبالتالي يمكن أن يؤثر الطفيلي في امتصاص الأدوية من قبل الخلايا المعوية وبالتالي فشل في المعالجة.

أما عند مرضى الشاهد غير المصابين بسرطان الكولون فقد سجل انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية بأشكال فجوية صغيرة فقط عند الأشخاص الاصحاء الذين لا تظهر لديهم أعراض هضمية، أما الأشخاص الذين كانوا يعانون من شكايات هضمية من دون اسهال فقد ظهرت عندهم الأشكال الفجوية المتوسطة ومتعدد الفجوات، والأشخاص الذين لديهم سوابق هضمية من الإسهال المزمن والآلام البطنية والغازات،

فقد ظهرت عندهم الاشكال الفجوية الكبيرة والحبيبية وتراقت في بعض الحالات مع انتشار إصابة واضحة بأنواع المتحولات كالمتحول القولوني والزحاري والمتحولة المتغايرة. حيث لم يتمكن من تحديد الهوية بشكل حاسم بالطرق الشكلية.

أكدت الدراسات المرجعية أن ظهور الشكل الفجوي الصغير يعني أن العدوى الطفيلي حديثة فعند تناول أكياس الطفيلي تتطور في الأمعاء الغليظة للشكل الفجوي الصغير الذي يتطور فيما بعد إلى المراحل الإعاشية الأخرى (الشكل الفجوي الكبير ومتعدد الفجوات والشكل الحبيبي والأميبي ثم الأكياس) في الظروف المناسبة. تم التعرف على الأشكال والمراحل التطورية الطفيلي التي ظهرت بعينات البراز من خلال الخصائص الشكلية والبنوية بالإضافة للقياسات الميكرو مترية ومقارنتها مع الأشكال النموذجية للطفيلي الواردة في الأبحاث العلمية المتخصصة المحكمة والمنشورة في مجلات عالمية معتمدة بالإضافة للمفاتيح التصنيفية العالمية [42,43,20]

أمكن تمييز الشكل الفجوي Vacuolar من احتوائه على فجوة مركزية كبيرة شغلت معظم مساحة الخلية، تدفع الهيولى والمكونات الأخرى للخلية إلى الحافة المحيطية الرفيعة الشكل (A,3). تراوح قطر الشكل الفجوي بين 6 - 80 ميكرون. وقد توافق ذلك مع القياسات المذكورة من قبل [44,45] بين (2 - 200) ميكرون الذين سجلوا وجوده عند أشخاص غير عرضيين للإصابة بالطفيلي.

أبدى الشكل الحبيبي Granular بنويماً تشابهاً كبيراً مع الشكل الفجوي باستثناء وجود الحبيبات في الجسم المركزي والهيولى، الشكل (B,3). تراوح متوسط قطر الأشكال الحبيبية من 15 ميكرومتر إلى 25 ميكرومتر وقد توافق ذلك مع القياسات المذكورة في دراسات مرجعية أخرى حيث تراوح قطرها بين 3-80 ميكرومتر، يلاحظ وجود هذا

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

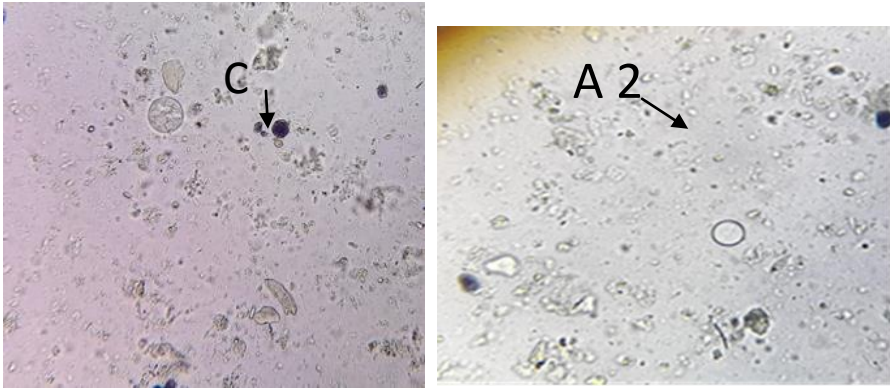
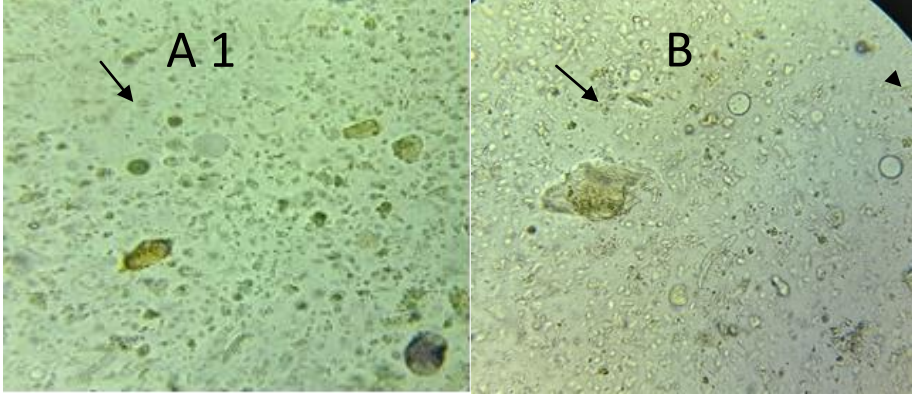
الشكل عند موت الطفيلي في مرحلة الانحدار أي عند استخدام أدوية مضادة للطفيلي [46].

أما الشكل الأميبي (Amoeboid) فقد لوحظ ظهوره نسبياً بشكل أقل تكراراً من الأشكال الفجوية والحبيبية وهذا ما أكد عليه فعلياً الباحثون [47] حيث بدت الأشكال الأميبية غير منتظمة مجهزة بأرجل كاذبة الشكل (C,3)، بلغ متوسط حجمها حوالي 6 ميكرومتر، و نظراً إلى أنه يتم التعرف على هذه الأشكال بشكل كبير عند المرضى الذين يعانون من أعراض الإسهال، فقد أشارت التقارير الحديثة إلى احتمال أن تكون الأشكال الأميبية مسببة للأعراض المرضية [48,49,50].

لم نتمكن من تمييز الشكل الكيسي (Cyst) الذي يعد أصغر أشكال الطفيلي قطراً في عينات البراز المدروسة، لأن الشكل الكيسي لا يظهر إلا عندما تكون الظروف المحيطة غير مناسبة مثل درجة الحرارة أو تناول الأدوية العلاجية النوعية للطفيلي، كما أن الإصابة بسرطان القولون والمستقيم بحد ذاتها تخلق بيئة مناسبة لنمو الأشكال الإعاشية فقط للطفيلي. إن ظهور الأشكال الكيسية مهم لتبقى أطول فترة ممكنة على قيد الحياة وبالتالي استمرار البقاء وانتشار العدوى، تُعزل الأكياس بالدرجة الأكبر عند الحيوانات المضيفة [50,51].

كما توجد الأشكال عديمة الفجوات (Avacuolar) ومتعددة الفجوات (Multi-vacuolar) وهي ذات أهمية في الدراسة الحالية، حيث أمكن ملاحظة انتشار الأشكال (متعددة الفجوات) بكثرة والتي احتوت على فجوات صغيرة متعددة بأحجام مختلفة مترابطة مع بعضها البعض أو منفصلة في الهيولى الشكل (A2, 3). تشير الملاحظات الحديثة إلى أن الأشكال Avacuolar و Multi-vacuolar هي الأشكال السائدة في الجسم الحي وغالباً ما يتم تقويتها أثناء الفحص المجهرى بسبب نقص الخبرة [16,20]

أظهرت الدراسات أن كل شكل من أشكال طفيلي المتبرعمة الكيسية يمكن أن يتحول بشكل طبيعي وبعملية عشوائية في الجسم الحي إلى أشكال أخرى ونتيجة هذا التحول يمكن إيجاد العديد من الأشكال الوسيطة المتحولة التي تهمل في الكشف المجهرى [26]



الشكل 3: الأشكال التطورية لطفيلي *Blastocystis hominis*. التي ظهرت في

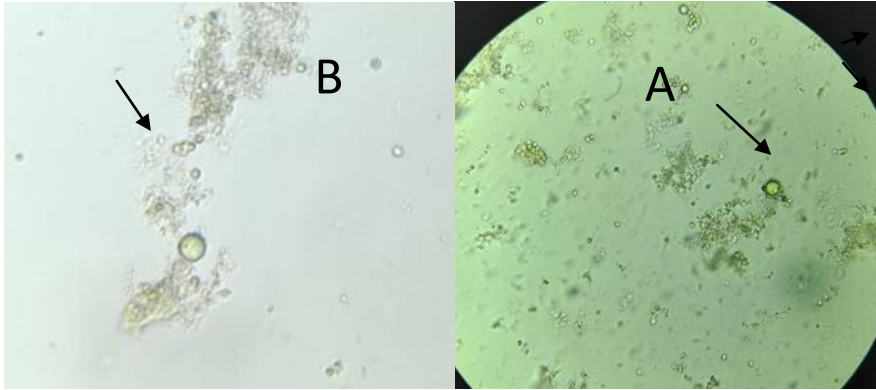
عينات البراز على التكبير x40

A1: الشكل الفجوي، B. الشكل الحبيبي A2: الشكل متعدد الفجوات ، C. الشكل

الأميبي.

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية- سورية

أما بالنسبة لنتائج الاستزراع المخبري كطريقة مخبرية أكثر دقة لتأكيد النوع لطفيلي المتبرعمة البشرية *Blastocystis hominis*، فقد بينت نتائج الفحص المجهرى لتنمية الطفيلي على وسط جونز المضاف له الخميرة ووسط جونز المعدل بإضافة النشاء بدل الخميرة أنه بعد 48 ساعة من الحضانة قد لوحظ نمو إيجابي في الوسط الزرعى المضاف له الخميرة، حيث ظهرت بشكل واضح تحت المجهر أشكال فجوية صغيرة الحجم، أما في الوسط المضاف له النشاء فلم يلاحظ أي نمو أو تكاثر للطفيلي، و بعد مرور 72 ساعة لوحظت الأشكال الفجوية كبيرة الحجم أكبر من 6 ميكرومتر الشكل A) ، 4 (وأشكال تطويرية متقدمة حبيبي وزيادة في أعداد الشكل الأميبي الشكل (4,B).



الشكل 4 : الأشكال التطورية لطفيلي *Blastocystis hominis* التي

ظهرت في عينات الزرع في وسط جونز المعدل

A : الشكل الفجوي ، B : الشكل الأميبي x40

الاستنتاجات و التوصيات:

- تأكيد انتشار طفيلي المتبرعمة البشرية عند مرضى سرطان القولون والمستقيم لأول مرة في سورية مقارنة مع الشاهد من غير المصابين بسرطان القولون وظهر كثافة بأعداد الطفيلي وأشكاله خلال فترات المعالجة المختلفة، وبالتالي سوء الحالة الصحية لمرضى السرطان بشكل أكبر.
- بينت الدراسة أن طفيلي المتبرعمة الكيسية كان أكثر انتشاراً عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في الفئة العمرية بين 40-50، أما انتشاره عند مجموعة الشاهد فقد سجل أعلى انتشار في الفئة العمرية 50-60 سنة.
- الانتشار الكبير لطفيلي المتبرعمة الكيسية عند مرضى السرطان والشاهد كان عند الأشخاص الذين يقطنون الريف أكثر من المدينة، أي الأشخاص الذين يقومون بالأعمال الزراعية وتربية الحيوانات أكثر من غيرهم.
- أكثر أشكال طفيلي المتبرعمة الكيسية تكراراً و التي ظهرت في عينات البراز لمرضى سرطان القولون والمستقيم ومرضى الشاهد كانت الأشكال الفجوية/الصغيرة والمتوسطة ومتعدد الفجوات/والحبيبية والشكل الأميبي بشكل أقل.
- يصيب سرطان القولون والمستقيم الرجال أكثر من النساء عموماً، وكان أكثر انتشاراً عند الفئة العمرية 50-60 سنة..

نوصي من خلال الدراسة:

- إجراء فحص طفيلي دوري لمرضى سرطان القولون والمستقيم للكشف عن المتبرعمة الكيسية البشرية حيث يمكن أن يكون للمتبرعمة الكيسية دور في نشوء سرطان القولون والمستقيم، وكذلك من المحتمل أن يوفر وجود هذا السرطان بيئة مواتية لانتشار هذا الطفيلي وتكاثره في الأمعاء وبالتالي تأثير إمراضي أكبر.
- اتباع الإجراءات الوقائية الصحية العامة عند السكان لعدم العدوى بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية من خلال غسل الخضراوات والفواكه جيداً و عدم التلامس المباشر مع الحيوانات، وغسل الأيدي جيداً عند الخروج من المراض، وشرب المياه النظيفة.
- عدم طرح مياه الصرف الصحي والزراعي بشكل مباشر إلى المسطحات المائية دون معالجة مسبقة
- إجراء دراسة وبائية مستقبلية متعدد المراكز لتحديد دور المتبرعمة الكيسية البشرية في نشوء وتطور سرطان القولون و المستقيم
- استكمال الدراسة بإجراء دراسة جزيئية / تحليل تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) / لعينات طفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية عند مرضى السرطان لأهمية معرفة الأنماط الفرعية للطفيلي التي يكثر الإصابة بها عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في سبيل اتخاذ الإجراءات المناسبة للوقاية منها ومنع وصولها لمرضى سرطان القولون والمستقيم .

REFERENCES:

- 1- WHO:**Guide to cancer early diagnosis** .2017 -
https://www.who.int/cancer/publications/cancer_early_diagnosis/en
(2017).
- 2-WHO: **Guide to cancer early diagnosis**. 2021-
https://www.who.int/cancer/publications/cancer_early_diagnosis/en
2021.
- 3-**American Society of Colon and Rectal Surgeons. Colon Cancer**.- [Internet]. [accessed on 2019]. Available at
<https://www.fascrs.org/patients/disease-condition/colon-cancer>.
- 4-Mayo Clinic. **Colon Cancer**. [Internet]. [accessed on 2019].
Available at <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc203536>.
- 5-Steer H.2007- **Blastocystis hominis and colorectal cancer**
Annals of The Royal College of Surgeons of England, 89: 539.
- 6-Amr M.M., Mona A.H., Dina A.Z. (2017- **Predominance and association risk of Blastocystis hominis subtype1 in colorectal cancer: a case-control study**. **Infectious Agents and Cancer**,12 (21): <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0131-z>.
- 7-Chandramathi S, Suresh K, Kuppusamy UR. (2010) -
Solubilized antigen of Blastocystis hominis facilitates the growth of human colorectal cancer cells HCT116, *Parasitol Res* 106(4):941–945.
- 8-Cavalier-Smith T. A1998- **revised six-kingdom system of life**, *Biol Rev Camb Philos Soc.*;73:203–66. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
- 9-Alexeieff A. (1911- "**Sur la nature des formations dites "kystes de Trichomonas intestinalis"**". *CR Soc Biol.* 71: 296–298.

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي – اللاذقية- سورية

- 10-Levine ND.; Croliss JO.; Cox FEG.; Deroux G.; Grain J.; Honigberg BM.; Leedale GF.; Loeblich AR.; Lom J.; Lynn D.; Merinfeld EG.; Page FC.; Poljansky G.; Sprague V.; vavra J.; Wallace FG. 1980 - **A Newly Revised Classification of the Protozoa.** J. Protozool, 27-37:58.
- 11-J.D. Silberman, M.L. Sogin, D.D. Leipe, C.G. Clark .1996 - **Human parasite finds taxonomic home***Nature*, 380 (6573) 398, <https://doi.org/10.1038/380398a0>. PMID: 8602239.
- 12-P. Poirier, I. Wawrzyniak, C. P Vivar`es, F. Delbac, El H. Alaoui.2012- **New insights into Blastocystis spp a potential link with irritable bowel syndrome,** PLoS Pathog. 8 (3), e1002545, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>.
- 13-J.I. Zapata Valencia, C. Rojas-Cruz.2012- **Una actualizaci´on sobre Blastocystis sp,** RevistaGastrohnutp ,A˜no 14 (3) 94–100.
- 14-Windsor J. D. Fragilis.2007- **B. hominis: neglected human -10 protozoa. Biomedical Scientist,** 51(7), 524.
- 15- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al .1997- **Experimental Blastocystis hominis infection in laboratory mice,** Parasitol Res.83:319–25.
- 16-Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al.1999- **Development of Blastocystis hominis cysts into vacuolar forms in vitro.***Parasitol Res.* 85:103–8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
- 17- Zierdt CH. 1991- **Blastocystis hominis: Past and future** .Clin Microbiol Rev;4:61–79.
- 18-Boreham P.F.L. and Stenzel D.J. 1993- **The current status of Blastocystis hominis.** Parasitol. Today. 9:251. (Letter.).
- 19-S. K. Agrawal. 2017- **" Blastocystis Hominis Infection Pathogenic or Commensal: Short Review "**, International Journal

of Research studies in Microbiology and Biotechnology , vol. 3, no. 3, p. 5. <http://dx.doi.org/10.20431/2454-9428.0303001>.

20-Stenzel DJ, Boreham PF, McDougall R.1991- **Ultrastructure of Blastocystis hominis in human stool samples.** *Int J Parasitol.* 21:807–12. [PubMed] [Google Scholar].

21-Dunn LA, Boreham PF, Stenzel DJ .1989- **Ultrastructural variation of Blastocystis hominis stocks in culture.** *Int J Parasitol* 19:43–56. [PubMed] [Google Scholar].

22-Yoshikawa H, Satoh J, Enose Y .1995- **Light and electron microscopic localization of lipids in Blastocystis hominis.** *J Electron Microsc (Tokyo)* 44:100–3. [PubMed] [Google Scholar].

23-Suresh K, Howe J, Ng GC, Ho LC, Ramachandran NP, Loh AK, et al.1994- **A multiple fission-like mode of asexual reproduction in Blastocystis hominis.** *Parasitol Res* 80:523–7. [PubMed] [Google Scholar].

24-Tan TC, Suresh KG.2006 -**Predominance of amoeboid forms of Blastocystis hominis in isolates from symptomatic patients.** *Parasitol, Res.* 98:189–93. [PubMed] [Google Scholar]

25-Zaman V, Howe J, Ng M.1998- **Scanning electron microscopy of Blastocystis. hominis cysts.** *Parasitol, Res.* 84:476–7. [PubMed] [Google Scholar].

26-Zhang X, Qiao JY, Dong XH, Li YQ, Li XQ, Li C.2003- **Study on morphology of Blastocystis hominis in culture and from diarrhea patients.** *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2003;21:116–8. [PubMed] [Google Scholar].

27-Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I.2004- **Fecal-oral transmission of the cyst form of Blastocystis hominis in rats.** *Parasitol, Res.*94:391–6. [PubMed] [Google Scholar].

28-Tan KS.2008- **New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp.** *Clin Microbiol Rev* 21(4), 639–665. doi: 10.1128/CMR.00022-08. pmid:18854485.

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي – اللاذقية- سورية

- 29-Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR. (2012)- **Infections of Blastocystis hominis and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic.** Trans R Soc Trop Med Hyg 106(4):267–269.
- 30-Kumarasamy, V., Roslani, A. C., Rani, K. U., & Govind, S. K. (2014)-**Advantage of using colonic washouts for Blastocystis detection in colorectal cancer patients.** *Parasites & vectors*, 7(1), 1-5.
- 31- Al-Dabbagh, L.K., & Al-Mukhtar, A.M. (2017)- **Infections with Blastocystis hominis in patients with colorectal cancer in Mosul city, Iraq.**
- 32-Esteghamati, A., Khanaliha, K., Bokharaei-Salim, F., Sayyahfar, S., & Ghaderipour, M. (2019)- **Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran.** Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 20(2), 495.
- 33- Ali, S. H., Ismail, M. A. M., El-Badry, A. A., Abu-Sarea, E. Y., Dewidar, A. M., & Hamdy, D. A. (2022)- **An Association Between Blastocystis Subtypes and Colorectal Cancer Patients: A Significant Different Profile from Non-cancer Individuals.** *Acta parasitologica*, 67(2), 752–763.
<https://doi.org/10.1007/s11686-021-00508-y>.
- 34-Al-Khalaf Iyad, Al-Abd Al-Rahman Ghassan, Asani Yahya.2020 - **Studying the prevalence, and frequency of infections with B.hominis, determining its morphological forms and comparing the different methods of its diagnosis in Aleppo – Syria.** Master's thesis, Aleppo University, Syria.
- 35- Ricci, N., Toma, P., Furlani, M., Caselli, M., & Gullini, S. 1984- **Blastocystis hominis: a neglected cause of diarrhoea?.** *Lancet (London, England)*, 1(8383), 966.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)92427-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)92427-9).

- 36-Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB .2010- **Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?** Free Radic Biol Med 49(11):1603–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.freer adbiomed.2010.09.006>.
- 37-Chan KH, Chandramathi S, Suresh K, Chua KH, Kuppusamy UR.2012- **Effects of symptomatic and asymptomatic isolates of Blastocystis hominis on colorectal cancer cell line, HCT116.** Parasitol Res 110:2475–2480. doi: 10.1007/s00436-011-2788-3. pmid:22278727.
- 38-Koltas S., Ozcan K., Tannverdi S., Paydas S., Baslamish F. 1999- **The prevalence of Blastocystis hominis in immunosuppressed patients.** Annals of the National Academy of Medical Sciences, 8: 117-119.
- 39-Long H.Y., Handschack A., Koing W., Ambrosch A. 2001- **Blastocystis hominis modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells.** Parasitology Research, 87 (12): 1029-1030.
- 40-Puthia M.K., Sio S.W., Lu J., Tan K.S. 2006 -**Blastocystis ratti induces Trichomonas vaginalis by McManus periodic acid-schiff stain.** American Journal of Clinical Pathology, 59: 741-746.
- 41-MacGillivray, D.M., & Kollmann, T.R. 2014- **The role of environmental factors in modulating immune responses in early life.** Frontiers in immunology, 5, 434.
- 42-Zierdt CH, Rude WS, Bull BS.1967- **Protozoan characteristics of Blastocystis hominis.** Am J Clin Pathol 48:495–501.
- 43-Stenzel DJ, Boreham PF.1996- **Blastocystis hominis revisited.** Clin Microbiol Rev 9:563–84. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- 44-Yoshikawa H, Koyama Y, Tsuchiya E, Takami K. 2016- **Blastocystis phylogeny among various isolates from humans to**

الكشف عن انتشار الإصابة بطفيلي المتبرعمة الكيسية البشرية *Blastocystis hominis* عند مرضى سرطان القولون والمستقيم في مشفى تشرين الجامعي – اللاذقية- سورية

insects. Parasitol Int [Internet]. Elsevier B.V;65(6):750–9.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.04.004>.

45-Zierdt CH .1973- **Studies of Blastocystis hominis**. J Protozool. 20:114–21. [PubMed] [Google Scholar].

46. -Stensvold CR, Clark CG.2016- **Current status of Blastocystis: A personal view**. Parasitol Int [Internet]. Elsevier Ireland Ltd.; 2016;65(6):763–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>.

47-Tan HK, Zierdt CH.1973- **Ultrastructure of Blastocystis hominis**, Z Parasitenkd. 42:315–24. [PubMed] [Google Scholar].

48-Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, et al. 2012- **Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of Blastocystis hominis**. Parasitol Res 110:1165–72. [PubMed] [Google Scholar].

49- Parija SC, Jeremiah SS.2013- **Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence**. Tropical parasitology.3(1):17.

50- Stenzel DJ, Boreham PF, McDougall R.1991- **Ultrastructure of Blastocystis hominis in human stool samples**, Int J Parasitol. 21:807–12. [PubMed] [Google Scholar].

51-Zaman, V., J. Howe, and M. Ng. 1995- **Ultrastructure of Blastocystis hominis cysts**, Parasitol. Res 81:465–469.

مقارنة بين نظام الإلصاق تخريش - غسل وبين نظام الإلصاق ذاتي التخريش في تدبير الأرحاء المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي (دراسة سريرية)

طالبة الماجستير: نور جبرا ابراهيم كلية: طب الأسنان - جامعة تشرين
اشراف الدكتور: نبيه رسلان

الملخص

المقدمة: يشكل ترميم الأرحاء المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي (MIH) تحدياً كبيراً في الممارسة السريرية.

هدف البحث: مقارنة نجاح ترميمات الكومبوزيت باستخدام نظامي إلصاق Etch-grinse

Self etching في سياق تدبير الأرحاء الأولى الدائمة المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي.

المواد والطرائق: تألفت عينة الدراسة من 32 رضى أولى دائمة مصابة ب MIH بازغة بشكل كامل وغير مرممة سابقا، عند أطفال من مراجعي قسم طب اسنان الأطفال في جامعة تشرين، الدراسة دراسة سريرية مقارنة، تم توزيع الأرحاء عشوائياً إلى مجموعتين الأولى مجموعة نظام الإلصاق ذاتي التخريش، والثانية مجموعة نظام الإلصاق تخريش - غسل. تم التقييم السريري باستخدام مشعر USPHS (United States Public Health Service). أجريت المتابعات السريرية بفواصل ثلاثة أشهر ولمدة 12 شهرا. استخدم تحليل (Kaplan-Meier) survival rate و Log Rank لمقارنة ديمومة الحشوات. اعتبرت الفروق مهمة إحصائياً عندما تكون $P \text{ value} < 0.05$.

مقارنة بين نظام الإلصاق تخريش- غسل وبين نظام الإلصاق ذاتي التخريش في تدبير الأرحاء
المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي

النتائج: كان متوسط ديمومة الترميم 11.58 شهراً في مجموعة Etch- rinse و 11.82 شهراً في مجموعة Self etching. دون وجود فرق مهم إحصائياً ($p>0.05$) بين مجموعتي الدراسة.

رغم أن معدل النجاح بعد سنة في مجموعة Etch-rinse كان أعلى (86.6%) من معدل النجاح في مجموعة Self Etching (64.7%)، إلا أن الفرق لم يكن مهماً إحصائياً أيضاً.

الاستنتاج: يمكن استخدام كل من تقنيتي الإلصاق Etch-rinse , Self etching في ترميم الأرحاء المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي.

الكلمات المفتاحية: نقص التمعدن الرحوي القاطعي، نظام الإلصاق تخريش -غسل، نظام الإلصاق ذاتي التخريش.

Comparison Of Etch-rinse adhesive system And self etching adhesive system for the management of molars with molar incisor hypomineralization(Clinical study)

Abstract

Introduction: The restorative management of molars with molar incisor hypomineralization (MIH) represents a challenge in the clinical practice.

Aim of study: The aim of this study was to compare the success of resin composite restorations using two adhesive systems: Etch-rinse, Self etching, in the context of management molars with MIH.

Materials and Methods: The study sample consisted of 32 full erupted, not previously restored molars with MIH. All Procedures were conducted at the Department of pediatric dentistry at Tishreen University. This study is comparative clinical study, the teeth were randomly allocated into two group: group A treated with Etch-rinse adhesive system, group B treated with, Self etching adhesive system. Clinical follow-ups were conducted at three-month intervals for a period of 12 months. Using USPHS (United States Public Health Service) creteria. Use survival rate (Kaplan-Meier) and Log Rank analysis to compare the survival of restorations. Differences were considered statistically significant when the P value < 0.05.

Results: The average of restoration duration was 11.58 months in the Etch-rinse group and 11.82 months in the self-etching group. Without a statistically significant difference ($p>0.05$) between the two study groups. Although the success rate after one year in the Etch-rinse group (86.6%) was higher than the success rate in the Self Etching group (64.7%), the difference was not statistically significant either.

Conclusion: Both Etch-rinse and Self-etching techniques can be used to restore molars affected by molar incisor hypomineralization.

Key Words: molar incisor hypomineralization, Etch-rinse adhesive system, Self-etching adhesive system.

المقدمة Introduction:

تم تعريف نقص التمعدن الرحوي القاطعي لأول مرة في 2001 من قبل Weerheijm et al بأنه عيب تطوري نوعي من أصل جهازي، يصيب 1-4 من الأرحاء الأولى الدائمة، ويترافق بشكل متكرر مع إصابة القواطع الدائمة. [1].
تمت الموافقة على استخدام مصطلح MIH في 2003 في المؤتمر السنوي للأكاديمية الأوروبية لطب أسنان الاطفال في أتيينا. [2].
تراوحت نسب انتشار MIH من 3-40% عالميا [3] ، وبلغت النسبة في سوريا حوالي 11% . [4] [5]

يعبر MIH عن نفسه بصورة سريرية واسعة تختلف باختلاف شدة الإصابة. [6] ترتبط الحالات الخفيفة تكون بوجود كموديات بيضاء كريمة أو صفراء بنية منفصلة عن بعضها في المناطق غير المعرضة للضغط في الأرحاء الأولى الدائمة مع عدم وجود خسارة بالبنية. [6] [7] أما الحالات المتوسطة و الشديدة فقد ارتبطت بوجود ترميمات لانموجية في الثلث الطاحن أو القاطعي نتيجة التهدم المينائي التالي للبروغ بسبب مسامية الميناء و هشاشته .بالإضافة لارتباط النخر بشكل كبير مع الميناء المصاب . [8]. [9]

على الرغم من محاولات الباحثين للوصول لقرار بخصوص أفضلية نظام إلصاق ترميمات الكومبوزيت لاستخدامه في حالات نقص التمعدن الرحوي القاطعي إلا أن الدراسات السريرية تعتبر قليلة، ولم تتوصل إلى نتيجة حاسمة بعد، لهذا كان لا بد من إجراء هذا البحث السريري لمقارنة نظامي الإلصاق تخريش-غسل وذاتي التخريش في ترميم الأرحاء المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي MIH.

المواد والطرائق **Materials and methods**:

1- تصميم الدراسة **Study Design**:

هي تجربة سريرية عشوائية RCT Randomized Clinical Trail هي تجربة سريرية عشوائية RCT، تم فيها إجراء المتابعات السريرية بفواصل ثلاثة أشهر ولمدة 12 شهرا من المعالجة .

2- العينة ومعايير الانضمام للدراسة **Sample And Inclusion Criteria**:

تألفت العينة من 32 رحي أولى دائمة (First Permenant Molar) مصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي (Molar incisor hypoineralizaion) عند أطفال بأعمار

6-12 سنة من مراجعي قسم طب أسنان الأطفال في جامعة تشرين. تم إجراء الفحص الفموي للطفل للتأكد من وجود MIH. وبعد شرح أهداف الدراسة وخيارات المعالجة وجميع الخطوات المراد تطبيقها للأهل، تم الحصول على الموافقة الخطية المستتيرة للمشاركة بالدراسة.

1-معايير الإدخال **Inclusion criteria**:

- 1-أرحاء أولى دائمة مصابة ب MIH وغير مرممة سابقا.
- 2-تكون الأرحاء مصابة بتهدم مينائي تالي للبزوغ أو بحاجة لترميم لا نموذجي.
- 3- تكون الرحي قابلة للترميم بحيث يوجد سطحين على الأقل سليمين من السطوح الخمسة.
- 4-تكون هذه الأرحاء بازغة بشكل كامل.
- 5-عدم وجود أعراض و/أو علامات التهاب لب غير ردود.

2- معايير الاستبعاد Exclusion Criteria:

1. الأرحاء ذات التيجان المتهدمة بشكل واسع وغير قابلة للترميم.
2. وجود أعراض أو علامات تدل على الإصابة اللبية.
3. المرضى الذين يضعون أجهزة التقويم الثابت.

3-إجراء الدراسة:

تمت جميع المعالجات من قبل طبيب أسنان واحد (الباحثة)، قسمت الأسنان إلى مجموعتين:

الأولى مجموعة Etch-rinse (n=17).

الثانية مجموعة Self Etching (n=15).

بعد التخدير وتطبيق الحاجز المطاطي وأخذ الصور الضوئية باستخدام الكاميرا داخل الفموية للتوثيق. الشكل (رقم 4)

يتم تجريف كامل الميناء المصابة التي يسهل اختراقها بالمسبر مع تجريف النخر أيضاً ويستمر التجريف حتى الوصول لميناء سليم (مقاوم للسنبلة ومقاوم للاختراق بالمسبر). تم التجريف بالتوربين باستخدام سنبله كروية الشكل مع التبريد بتيار ماء غزير، وفي المناطق العميقة قام الباحث بالتجريف باستخدام مجارف عاج يدوية. تم الشطب باستخدام سنبله لهب شمعة. تم إجراء تصوير السن بالكاميرا داخل الفموية بعد انتهاء التحضير.

الشكل رقم 4

تم التبطين في الترميمات العميقة باستخدام ماءات الكالسيوم وبهذا يتبع أحد التقنيتين:

• بروتوكول Etch-rinse:

يطبق حمض الفوسفور % 37 على الميناء لمدة 15 ثانية ثم يطبق 15 ثانية إضافية على الميناء والعاج معاً. ثم غسل بتيار مائي لمدة 10 ثوانٍ وبعدها تم التجفيف بشكل جيد للحصول على المظهر الطبشوري على الميناء مع تجنب التجفيف الزائد للعاج.

تطبيق المادة الرابطة Adper Single Bond 2 Adhesive, 3M ESPE, USA .
الشكل (رقم 1) لمدة 10 ثوان ثم فرش بتيار هواء بسيط ويتم التصليب لمدة 10 ثوان
وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة.

تمت إعادة تطبيق المادة الرابطة والتصليب 10 ثوان أخرى ثم تم تطبيق الكومبوزيت
Filtek Z250 3M ESPE USA . الشكل (رقم 3) على دفعات لا تتجاوز سماكتها
2مم وصلبت لمدة 20 ثانية وذلك حتى اكتمال الترميم وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة.
بالنهاية تم الإنهاء والتلميع باستخدام سنابل مطاطية لشركة (Rogen) وفحص الإطباق
باستخدام ورق العض.

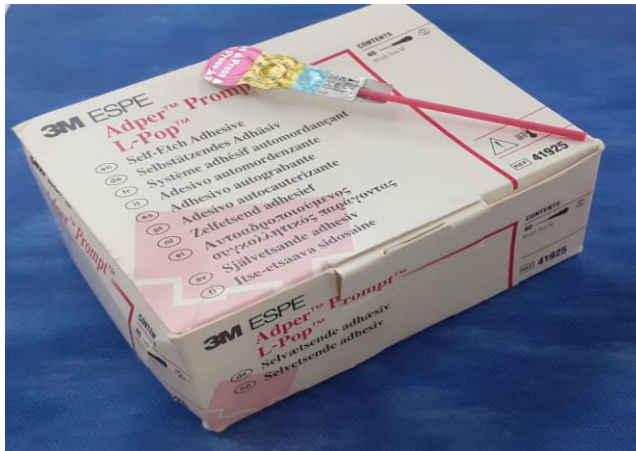
• بروتوكول Self etching:

تجفف منطقة التحضير بشكل جيد ثم تطبيق المادة الرابطة Adper™ Prompt L
Pop, 3M™ ESPE™ USA, الشكل (رقم 2) بواسطة الفرشاة المزودة بها بضغط
إصبعي متوسط الشدة لمدة 15 ثانية ثم تفرش بتيار هواء لطيف وتم التصليب لمدة 10
ثوان وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. تم تكرار العملية مرة ثانية وبعدها طبق الكومبوزيت
Filtek Z250 3M ESPE ,USA على دفعات لا تتجاوز سماكتها 2مم وصلبت لمدة
20 ثانية وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة.

بالنهاية تم الإنهاء والتلميع باستخدام سنابل مطاطية لشركة (Rogen) وفحص
الإطباق باستخدام ورق العض.



الشكل رقم 1 3M ESPE Adper Single Bond 2 Adhesive USA



الشكل رقم 2 Adper™ Prompt L Pop, 3M™ ESPE™ USA

مقارنة بين نظام الإلصاق تخريش- غسل وبين نظام الإلصاق ذاتي التخريش في تدبير الأرحاء
المصابة بنقص التمعدن الرحوي القاطعي



الشكل رقم 3 Filtek Z250 3M ESPE, USA



الشكل رقم 4 الكاميرا داخل الفم المستخدمة بالدراسة واستخدامها



الشكل رقم (5) الحالة من مجموعة (Etch-rinse) السن رقم (16)

A: يلاحظ التهدم التالي للبروغ مع نخر عاجي عميق، B: التحضير لاحظ امتداد التحضير إلى كامل الميناء المصاب وإزالة المناطق الكامدة مع تجريف العاج النخر، C: السن بعد الترميم مباشرة، D: الترميم بعد المتابعة النهائية (24 شهراً)



الشكل رقم (6) الحالة من مجموعة (Self etching) السن رقم (26)

A: يلاحظ التهدم التالي للبروغ مع نخر عاجي عميق، B: التحضير لاحظ امتداد
التحضير إلى كامل الميناء المصاب وإزالة المناطق الكادمة مع تجريف العاج النخر،
C: السن بعد الترميم مباشرة، D: الترميم بعد المتابعة النهائية (12 شهراً)

4- المتابعات:

أجريت المتابعات السريرية بعد 3-6-9-12 شهرا. من ترميم الأسنان. استخدم في التقييم مشعر خدمة الصحة العامة الأمريكية المعدل (USPHS) (Modified United States Public Health Service)

5- مشعر التقييم السريري:

مشعر (USPHS) (Modified United States Public Health Service) للتقييم السريري المباشر للترميمات، يقيم المشعر الترميمات من حيث :

1. الشكل التشريحي (anatomical form): يتم الفحص بالنظر مع وجود إضاءة جيدة وكذلك باستخدام المسبر السني ويأخذ القيم التالية:

• Alpha: الترميم استمرار للشكل التشريحي الموجود أو مسطح قليلا، وعندما يوضع طرف المسبر بشكل عرضي لا يلمس الزوايا الخطية المتقابلة لسطح الترميم بنفس الوقت.

• Bravo: موجود تقعر واضح، وعندما يوضع طرف المسبر بشكل عرضي لا يلمس الزوايا الخطية المتقابلة لسطح الترميم بنفس الوقت ولا يوجد انكشاف بالعاج أو المادة القاعدية.

• Charlei: فقد في مادة الترميم والتقعر واضح في السطح، مع انكشاف العاج أو المادة القاعدية.

2. انطباق الحواف (marginal adaption): يتم الفحص بالنظر مع وجود إضاءة جيدة وكذلك باستخدام المسبر السني ويأخذ القيم التالية:

• Alpha: انطباق تام على كامل محيط التاج، لا يوجد فجوات مرئية يعلق بها المسبر.

• Bravo: فجوات مرئية على الحواف يعلق بها المسبر ولكن لا تصل للملتقى المينائي العاجي ولا يوجد حركة في الترميم.

• Charlei: يخترق المسبر السني منطقة الفجوة ويصل للملتقى المينائي العاجي.

3. تلون الحواف (marginal discoloration): يتم الفحص بالنظر مع إضاءة جيدة

• Alpha: لا يوجد دليل مرئي على تلون الحواف مختلف عن لون مادة الترميم وعن لون السن المرممة.

• Bravo: يوجد دليل مرئي على تلون الحواف في منطقة اتصال الترميم مع السن ولن هذا اللون لا يخترق الترميم بالاتجاه اللبي.

• Charlei: يوجد دليل مرئي على تلون الحواف في منطقة اتصال الترميم مع السن وقد اخترق الترميم بالاتجاه اللبي.

4. الثبات (retention): يتم الفحص بالنظر مع وجود إضاءة جيدة وكذلك المسبر السني ويأخذ القيم التالية:

• Alpha: الترميمات سليمة وثابتة بشكل كلي.

• Bravo: الترميمات موجودة بشكل جزئي مع سلامة بعض أجزائها.

• Charlie: فقدان كلي للترميمات.

مع ملاحظة أنه في حال جود أكثر من ترميم على السن نفسه تم اعتبار سقوط أي واحد من هذه الترميمات أو جميعها يأخذ القيمة Charlie.

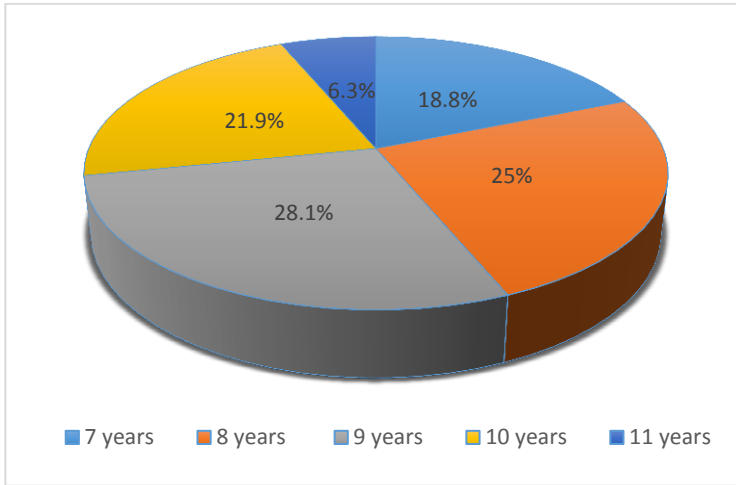
5. نكس النخر (secondary carious lesion): يتم الفحص سريريا بالنظر مع وجود إضاءة جيدة:

• Alpha: الترميم امتداد للشكل التشريحي للسن.

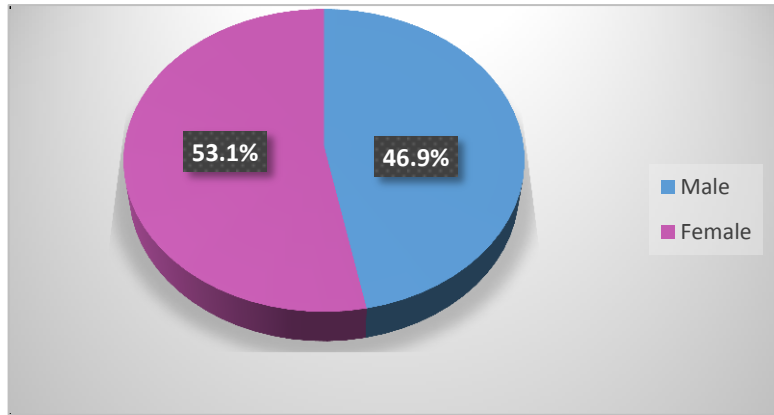
- Bravo: يوجد دليل مرئي لتلون داكن ملاصق للترميم لكنه غير مرتبط مباشرة مع حواف سطوح الترميمات.

النتائج Results:

تراوحت أعمار الأطفال بين 7-11 سنة (المتوسط الحسابي 8.7 سنة، الانحراف المعياري 1.2 سنة) الشكل 7، وبلغ عدد الذكور (8) وعدد الإناث (5) ويبين الشكل 8 توزيع عينة الدراسة حسب الجنس.



الشكل (7) توزيع عينة الدراسة حسب العمر



الشكل (8) توزيع عينة الدراسة حسب الجنس

مقارنة بين نظام الإلصاق تخريش- غسل وبين نظام الإلصاق ذاتي التخريش في تدبير الأرحاء
المصابة بنقص التمدن الرحوي القاطعي

يبين الجدول التالي نتائج المتابعات السريرية لكل من المجموعتين المدروستين:

جدول (1) التوزع التكراري لتقييم ديمومة الترميمات خلال فترات المتابعة

USPHS

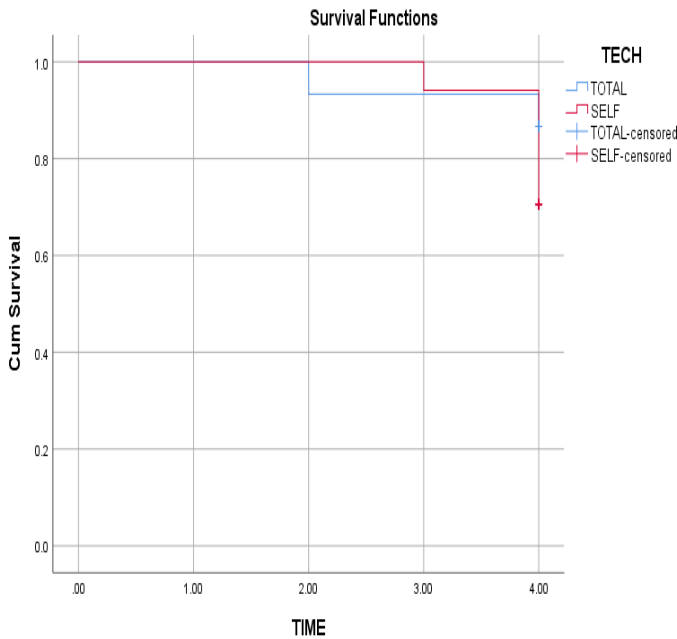
12 months		9 months		6 months		3 months		base			
Self etch	Total etch	Self etch	Total etch	Self etch	Total etch	Self etch	Total etch	Self etch	Total etch		
82.4%	100%	88.2%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	Alpha	المحيط التشريحي
17.6%	-	11.8%	-	-	-	-	-	-	-	Bravo	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Charlie	
76.5%	93.3%	88.2%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	Alpha	سلامة الحواف
23.5%	6.7%	11.8%	-	-	-	-	-	-	-	Bravo	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Charlie	
88.2%	93.3%	94.1%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	Alpha	تلون الحواف
11.8%	6.7%	5.9%	-	-	-	-	-	-	-	Bravo	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Charlie	
88.2%	86.7%	94.1%	93.3%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	Alpha	نكس نخر
11.8%	13.3%	5.9%	6.7%	-	-	-	-	-	-	Bravo	
82.4%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	Alpha	الثبات
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bravo	
17.6%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Charlie	

يلاحظ من الجدول (1) حصول المجموعة Etch-rinse على قيم

أعلى من مجموعة Self etching ما عدا في مشعر النخر.

بلغ معدل النجاح في متابعة ال 12 شهراً (86.6%) في مجموعة Etch-rinse و (64.7%) في مجموعة Self Etching. دون وجود فرق مهم إحصائياً $p=(0.287)>0.05$ بين مجموعتي الدراسة.

عند إجراء تحليل Kaplan-Meier لقياس معدلات البقاء (survival rates) كان متوسط ديمومة الترميم 11.58 شهراً في مجموعة total etch و 11.82 شهراً في مجموعة selfetch. دون وجود فرق مهم إحصائياً ($p>0.05$) بين مجموعتي الدراسة حسب تحليل log-rank.



الشكل (9) تحليل Kaplan-Meier لقياس معدلات البقاء (survival rates)

المناقشة Discussion:

تعد هذه الدراسة من الدراسات القليلة التي قيمت ديمومة ترميمات الكومبوزيت للأرحاء المصابة بنقص التمعن الرحوي القاطعي MIH باستخدام نظامي ربط مختلفين. تعد حالات فشل الربط البيني شائعة وتؤدي لكسور على مستوى حواف الترميم مما يؤثر على سلامتها ويتطلب إصلاح بشكل كبير ومتكرر [10] ، [11] لوحظ في الدراسة الحالية أداءً جيداً لكلا نظامي الربط على المستوى السريري خلال فترة المتابعة التي امتدت إلى 12 شهراً. إلا أن نظام الربط self etching يبين معدل نجاح أقل في الترميمات على مستوى سلامة الحواف وتلون الحواف وهذا يتفق مع دراسة Souza et al عام 2017 عند فترة المتابعة 12 شهراً ويفسر ذلك بقوة الارتباط الضعيفة التي تنتج عندما يعتمد على التخريش الذاتي حيث تكون $pH > 2$ بالمقارنة مع نمط التخريش الناتج عن حمض الفوسفور $pH < 0.5$. [12].

درس Gatón- Hernández et al عام 2019 فالعلاقة بين ترميمات الكومبوزيت ومدى تطور الجذر في الأرحاء الدائمة الفتية المصابة لمدة 24 شهراً مستخدماً النهج المحافظ بالتحضير ونظام الربط تخريش - غسل . بلغت نسبة الفشل 3.2 % مع شمول الحذبة بالترميم ل 278 رحي من 326 ونسب جميع حالات الفشل لتكسر الميناء في حواف الترميمات مما أدى إلى ظهور أعراض لبية وعدم اكتمال تشكل الجذر خلال السنة الأولى من المتابعة دون أي ازدياد بحالات الفشل خلال السنة الثانية . وتفسر نسب النجاح العالية في نظام الربط استخدام الباحثين لترميمات مرحلية (Interim restoration) من الزجاج الشاردي لمدة 6 أشهر مع تطبيق الفلورايد والسيطرة على اللويحة لتحسين الصحة الفموية وتحسين التمعن وتقليل معدل الخطورة النخرية. [13].

تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج lygidakis et al 2003 إذ استخدموا في دراستهم نظام الإلصاق تخريش- غسل فقط وبلغ معدل نجاح الترميمات 100% بعد 4 سنوات من المراقبة أما في الدراسة الحالية فقد بلغت نسبة النجاح في مجموعة 86.6 Etch-rinse % ويمكن أن تعود نسبة النجاح الكبيرة لتطبيق الباحثين في تلك الدراسة مادة سادة بعد الانتهاء من الترميم بهدف تحسين الانطباق الحفافي.

مع الأخذ بعين الاعتبار اتفاق دراستهم مع الدراسة الحالية من حيث نسبة نجاح الترميمات التي عدد سطوحها أكبر من 2 في مجموعة Etch-rinse وكانت شاملة للحدبات 100% كما في دراسة lygidakis et al [14].

استخدم Ozsoy et al 2022 نظام إلصاق self etching لترميم الأرحاء المصابة بنقص التمعدين دون إزالة النسيج المصاب في حال عدم اتصاله بحدود الترميم وبلغت نسب النجاح نكس النخر، تلون الحواف وانطباق الحواف (100%, 95.3%, 90.7%) على الترتيب من اليمين بقيم أكبر من معدلات الدراسة الحالية (88.2%, 76.5% 88.2%) ويمكن تفسير ذلك لقصر فترة المراقبة في دراستهم 9 أشهر. [15]

في دراسة rolim et al 2021 كانت نسبة نجاح الترميمات 62.3%-80.8% لنظامي ذاتي التخريش و تخريش- غسل على الترتيب متقاربة جدا من نتائج الدراسة الحالية

وكذلك الأمر تقاربت النتائج من حيث سلامة الحواف والثبات ونكس النخر وتلون الحواف حيث اختار rolim et al 2021 إزالة جميع الميناء المعيب وتطبيق الفلورايد في كل متابعة إلا أنه استخدم بوند universal بتقنيتي الربط تخريش -غسل وذاتي التخريش. [16]

من ناحية أخرى linner et al 2020 في دراسة تراجمية لمدة 36 شهرا اختبر الفرق بين نظامي ربط self etching -total etch على الآفات غير متعددة السطوح

وكان معدل الديمومة التراكمي 29.9% فقط في ترميمات الكومبوزيت دون أي إزالة للأففة وارتفعت النسبة لـ 76.2% في ترميمات الكومبوزيت مع تجريف الميناء المعيب ويعتبر المعدل أقل من الدراسة الحالية نتيجة الفرق بفترة المراقبة 36-12 شهرا. [17]

الاستنتاج conclusion :

ضمن شروط الدراسة الحالية يمكن استنتاج أن:

كل من تقنيتي الإلصاق Etch-rinse , Self etch يمكن استخدامها في ترميم الأرحاء المصابة بنقص التمعدين الرحوي القاطعي. مع أفضلية صغيرة لنظام الإلصاق Etch-rinse

التوصيات Recommendations:

استخدام نظامي الإلصاق Etch-rinse , Self etch في ترميم الأرحاء المصابة بنقص التمعدين الرحوي القاطعي.

المقترحات Suggestions:

إجراء المزيد من الدراسات السريرية على أنظمة الإلصاق الأخرى ومقارنتها مع النظامين المستخدمين في الدراسة الحالية للتوصل لأفضل نظام إصاق لتدبير أرحاء MIH.

المراجع:References

- [1] K. L. Weerheijm, B. Jälevik, and S. Alaluusua, "Molar-Incisor Hypomineralisation".
- [2] K. L. Weerheijm *et al.*, "Judgement criteria for Molar Incisor Hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003," *EUROPEAN JOURNAL OF PAEDIATRIC DENTISTRY*.
- [3] "Silva et al. - 2016 - Etiology of molar incisor hypomineralization - A s.pdf."
- [4] Fehmieh Nawaya, "Prevalence of molar incisor hypomineralisation and its relationship with caries among the 8-10 year old children of Damascus City," *Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (37) No. (2) 2015*, 2015.
- [5] Afrah sabeh Abdul Wahab Nourallah Nabieh reslan, "A study of Clinical Presentation of Molar Incisor Hypomineralisation in a Group of Lattakia City," *Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (33) No. (4) 2002*, 2013.
- [6] C. M. Bullio Fragelli, F. Jeremias, J. Feltrin de Souza, M. A. Paschoal, R. de Cássia Loiola Cordeiro, and L. Santos-Pinto, "Longitudinal Evaluation of the Structural Integrity of Teeth Affected by Molar Incisor Hypomineralisation," *Caries Res*, vol. 49, no. 4, pp. 378–383, 2015, doi: 10.1159/000380858.
- [7] C. M. B. Fragelli, J. F. de Souza, F. Jeremias, R. de C. L. Cordeiro, and L. Santos-Pinto, "Molar incisor hypomineralization (MIH): conservative treatment management to restore affected teeth," *Braz. oral res.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–7, Jun. 2015, doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0076.
- [8] F. Jeremias, J. F. de Souza, C. M. da Costa Silva, R. de C. L. Cordeiro, Â. C. C. Zuanon, and L. Santos-Pinto, "Dental caries experience and Molar-Incisor Hypomineralization," *Acta Odontologica Scandinavica*, vol. 71, no. 3–4, pp. 870–876, Jan. 2013, doi: 10.3109/00016357.2012.734412.
- [9] "Lygidakis - 2010 - Treatment modalities in children with teeth affect.pdf."

- [10] V. William, L. B. Messer, and M. F. Burrow, “Molar Incisor Hypomineralization: Review and Recommendations for Clinical Management,” *Pediatric Dentistry*, 2006.
- [11] “Krämer et al. - 2018 - Bonding strategies for MIH-affected enamel and den.pdf.”
- [12] A. D. Loguercio, M. A. Muñoz, I. Luque-Martinez, V. Hass, A. Reis, and J. Perdigão, “Does active application of universal adhesives to enamel in self-etch mode improve their performance?,” *Journal of Dentistry*, vol. 43, no. 9, pp. 1060–1070, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.jdent.2015.04.005.
- [13] P. Gatón-Hernández *et al.*, “Minimally interventive restorative care of teeth with molar incisor hypomineralization and open apex—A 24-month longitudinal study,” *Int J Paediatr Dent*, vol. 30, no. 1, pp. 4–10, Jan. 2020, doi: 10.1111/ipd.12581.
- [14] “Lygidakis et al. - Evaluation of composite restorations in hypominera.pdf.”
- [15] M. Özsoy and Ö. E. Güngör, “Management of severity lesions of hypomineralized molars (MIH) with different treatment alternatives: 9-months results of a clinical trial.” In Review, preprint, Oct. 2022. doi: 10.21203/rs.3.rs-2064601/v1.
- [16] “Rolim et al. - 2021 - Adhesive restoration of molars affected by molar i.pdf.”
- [17] “Linner et al. - 2020 - Comparison of four different treatment strategies .pdf.”

دور تعداد الصّفيحات واللمفاويات كمشعرات تنبؤيّة للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي

لبنانه الخضر¹، ماهر سيفو²، سلاف الوسوف¹

¹ قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة البعث، حمص، سوريا

² قسم الأورام، كلية الطب البشري، جامعة دمشق، دمشق، سوريا

المخلص:

المقدمة: تترافق التغيرات في الآليات المناعية والتخثرية بتشكّل النقاثل الورمية، إذ أنها تساهم بالعديد من آليات تكوّن الورم والغزو والتّوعية، ونظراً للتكلفة العالية وصعوبة إجراء التحاليل الجينية والواسمات الورمية النوعية لسرطان الثدي النقيلي كان لا بدّ من البحث عن مشعرات روتينية وبسيطة لمراقبة الاستجابة للعلاج لدى المريضات.

الهدف: تهدف الدّراسة لتقصّي دور تعداد الصّفيحات واللمفاويات كمشعرات للتنبؤ بالاستجابة على العلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي وتقييمها كعوامل إنذارية لتشكّل النقاثل الورمية.

طريقة العمل:

أجريت الدّراسة في مشفى البيروني الجامعي في دمشق خلال الفترة الممتدة بين شهر أيلول من عام 2021 وأيار عام 2022 حيث شملت مجموعتين من المريضات، 76 مريضة تم تشخيصهن بسرطان ثدي نقيلي قبل خضعوهن للمعالجة الكيميائية التلطيفية كخط علاجي أول و 25 مريضة مشخصة بسرطان ثدي بدئي كعينة ضابطة. حيث تم قياس تعداد اللمفاويات والصفيحات قبل إبتاء أول جرعة من العلاج الكيميائي.

دور تعداد الصّفيحات والمفاويات كمشعرات تنبؤيّة للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي

تم تحليل مستويات تعداد اللمفاويات والصّفيحات البدنيّة باستخدام منحني ROC لتحديد القيم الحديّة الأفضل لكل منهما، وذلك لتقييم قدرتها على التنبؤ بالاستجابة على العلاج الكيميائي لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي وذلك بعد أربع دورات علاجية من بدء التشخيص.

النتائج:

أظهرت هذه الدراسة أن تعداد اللمفاويات البدني أقل وبفرق معنوي ($P=0.003$) لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي ($1658.43 \times 10^6/L$) مقارنة بمريضات سرطان الثدي البدني ($2130.40 \times 10^6/L$)، وبالمقابل كان متوسط تعداد الصّفيحات البدني لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي ($249.96 \times 10^9/L$) أكبر وبفرق معنوي ($P=0.001$) من مثيله لدى عينة المجموعة الضابطة ($228.4 \times 10^9/L$)

عند التقييم الأول للاستجابة، أظهر تحليل منحنيات ROC أن تعداد اللمفاويات والصفيحات البدني قادرة على تنبؤ الاستجابة للعلاج الكيميائي، حيث يرتبط معدّل تقدّم الورم مع المستويات المرتفعة من الصّفيحات والمستويات المنخفضة من اللمفاويات ($P=0.000$, $>222 \times 10^9/L$)، ($P=0.000$, $\leq 1505 \times 10^6/L$) على التوالي.

الخلاصة: يمكن اعتبار تعداد اللمفاويات والصّفيحات مشعرات تنبؤيّة وإنذارية هامة للاستجابة على العلاج الكيميائي لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي.

الكلمات المفتاحية: تعداد اللمفاويات، تعداد الصفيحات، سرطان الثدي النقيلي، العلاج الكيميائي، مشعرات تنبؤيّة.

Platelets and Lymphocytes Count as a Predictive Biomarker of Response to Chemotherapy in female Patients with Metastatic Breast Cancer

Abstract:

Introduction: Changes in the immunological and coagulation mechanisms are associated with the formation of tumor metastases, as they contribute to many mechanisms of tumor formation, invasion, and vascularization. Given the high cost and difficulty of conducting genetic analyses and specific tumor markers for metastatic breast cancer, it was necessary to looking for simple and routine indicators to monitor the response to treatment.

Aim: This study aims to investigate whether pretreatment lymphocytes and platelets count can be a predictive and prognostic indicator of chemotherapy response in metastatic breast cancer (MBC) patients.

Methods: This study included two groups of female patients, 76 of whom diagnosed with metastatic breast carcinoma and 25 with primary breast carcinoma. Lymphocytes and platelets count was measured before chemotherapy initiation in MBC patients.

The count of lymphocyte ($lymph_0$) and platelet (plt_0) before chemotherapy was measured using receiver operating characteristic (ROC) curves to determine the optimal cutoff baseline values of $lymp_0$ and plt_0 , and to evaluate their discriminatory abilities in predicting response to chemotherapy after four cycles of treatment.

Results: the mean level of Lymphocytes count was found to be significantly lower ($P=0.003$) in MBC patients than in primary breast cancer, with average of $(1658.43 \times 10^9/L)$. the mean level of

platelets count was higher ($P=0.001$) in MBC patients than in the control group with average of (249.96).

In the preliminary response evaluation, Analysis of ROC curves showed that Lymphocytes and platelets count at $lymp_0$ and plt_0 could discriminate the response to chemotherapy, whereas the progressive disease rate correlated with higher levels of platelets count and lower levels of lymphocytes count, ($>222 \times 10^9/L$, $P=0.000$), ($<1505 \times 10^6/L$, $P=0.000$).

Conclusion: pretreatment lymphocytes and platelets count are useful predictive and prognosis markers of response to chemotherapy in metastatic breast cancer.

Keywords: lymphocyte count, platelet count, metastatic breast cancer, chemotherapy, Predictive Biomarker.

المقدمة:

يعد سرطان الثدي خباثة معقدة متعددة المراحل تنتج عن خلل في تنظيم التمايز الخلوي والاستماتة. [1] ينتج عن حدوث طفرات في الجينات المسؤولة عن تنظيم نمو الخلايا. [2] تبين إحصائيات الوكالة الدولية لأبحاث السرطان المنشورة ضمن مشروع GLOBOCAN لعام 2020 أن معدل الإصابة بسرطان الثدي في سورية قد بلغ 37.5% من حالات السرطان المشخصة حديثاً للعام ذاته بينما بلغ معدل الوفاة 29.6% من جميع وفيات السرطان. [3]

يعرف سرطان الثدي النقيلي أيضاً بسرطان الثدي المتقدم ويصنف على أنه المرحلة الرابعة (VI) من سرطان الثدي. حيث تشكل النقائل الورمية النواتج النهائية لآليات بيولوجية خلوية متعددة المراحل تسمى شلال الغزو والنقائل، والذي يتضمن انفصال الخلايا الورمية وهجرتها لأعضاء بعيدة تشريحياً وتكيفها اللاحق مع بيئة الأنسجة الغريبة. [6] تعد العقد اللمفاوية غير الناحية (أي العقد اللمفية باستثناء العقد الإبطية وعقد الثدي الباطن والعقد تحت وفوق الترقوة المتوضعة في جهة الثدي المصاب)، والرئة والكبد والعظام والدماغ المقرات الأكثر شيوعاً لنقائل سرطان الثدي. [7]

تعاني 5-10% من المريضات من سرطان الثدي النقيلي عند التشخيص الأولي وبنسبة 20-30% ينطور لديهن من سرطان موضعي إلى نقائلي. [4] بالإضافة لذلك فإن معدل البقاء على قيد الحياة لمدة 5 سنوات للنساء المصابات بسرطان الثدي النقيلي هو 29%. ومتوسط مدة البقاء لا يزال 18-24 شهراً فقط. [5]

يعد سرطان الثدي النقيلي مرض غير قابل للشفاء، ويكون الهدف الأساسي من المعالجة تلطيفياً بغية الحفاظ على جودة الحياة وتحسين البقاء. يُستطب العلاج الكيميائي في سرطان الثدي النقيلي كخط أول في حالات معينة حسب المؤتمر السنوي للجمعية

الأورويّة لطب الأورام (ESMO) European Society for Medical Oncology بهدف الحصول على استجابة هامة وسريعة. [1] وعلى الرغم من وجود العديد من العوامل والمشعرات التي تلعب دوراً في الإنذار والتنبؤ بالاستجابة للعلاج والنتائج السريرية لدى المريضات وخاصة الاختبارات الجينية المتعلقة بسرطان الثدي التي لا تستخدم بشكل روتيني نظراً لصعوبة إجرائها وكلفتها العالية، لذا كان من الضروري البحث عن مشعرات جهازية جديدة تتنبأ بالاستجابة على العلاج الكيميائي والاندازية بسهولة وبأقل التكاليف. [8]

تعتبر الحالة المناعية عامل أساسي في تكوّن الورم وتطوره، [9] حيث تعتمد الاستجابة المناعية المضادة للسرطان على الآليات المثبطة للورم المُحَفَّزة بواسطة المناعة الخلوية وقدرة الخلايا الورمية على تجنب الضبط المناعي. [10] تعدّ المفاويات مكوناً أساسياً في المناعة المضادة للأورام. حيث تقوم بإحاطة الخلايا الورمية وتفعيل الاستجابة المناعية من خلال تحفيز الموت الخلوي المبرمج وإنتاج سيتوكينات [11] تثبّط تكاثر وهجرة الخلايا الورمية. [9] فقد وجدت العديد من الدراسات أنّ تعداد المفاويات قبل العلاج يعدّ مشعراً يعبر عن مستوى التنشيط المناعي لدى المريضات ويتعلق بالإنذارية في العديد من الأورام [12].

تظهر بعض الدراسات دور العلاج الكيميائي المثبط للمناعة من خلال التأثير على الدورة الخلوية للخلية الورمية بشكل نوعي أو غير نوعي، في حين أظهرت دراسات أخرى دوره المشابه للعلاج المناعي وفق الآليات التالية: يحفز الموت الخلوي المبرمج الخلايا الورمية على تحرير مستضدات ورمية تتم معالجتها من قبل الخلايا المقدمة للمستضدات وبالتالي تحفّز الخلايا التائية السامة النوعية للورم مما يعني تحفيز استجابة الجهاز المناعي وبذلك يمكن أن تتنبأ الحالة المناعية قبل العلاج بقدرة العلاج الكيميائي على إزالة الخلايا السرطانية. [13]

أشارت بعض الدراسات إلى ارتباط انخفاض تعداد اللمفاويات بالاستجابة الضعيفة للعلاج الكيميائي في بعض الأورام [12] في حين لا توجد أبحاث حول مريضات سرطان الثدي النقيلي اللواتي يتلقين المعالجة الكيميائية.

أصبح الارتباط الوثيق بين الالتهاب والتخثر وتقدم الورم محط اهتمام الأبحاث العلمية. [14] حيث وجد أن للصفائح دور أساسي في انتشار النقائل [15] من خلال حمايتها للخلايا الورمية الموجودة في الدم من تأثير الخلايا القاتلة، ومساعدتها على الانسلاخ كما تقوم الصفائح بتعزيز تراجع الخلايا البطانية وتحفيز نمو وتشكل أوعية جديدة من خلال تفعيل العديد من عوامل النمو. [16]

بالإضافة لذلك بينت العديد من الدراسات أن تعداد الصفائح لدى مرضى السرطان الذين يتلقون علاج كيميائي يمكن أن تؤثر على فعالية العلاج في العديد من أنواع السرطانات. إذ تتوسط الصفائح مقاومة الاستجابة للمعالجة الكيميائية من خلال العديد من الآليات [17]. وبالتالي وجد أن تعداد الصفائح يعتبر مشعر للإنذار السيئة للعلاج الكيميائي في العديد من الأورام مثل سرطان الأمعاء والرئة والمثانة والمبيض.

هدف البحث:

يهدف البحث لدراسة دور تعداد الصفائح واللمفاويات كمشعرات للتنبؤ بالاستجابة على العلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي وتقييم دورها كمشعرات لحدوث النقائل الورمية بالمقارنة مع مريضات سرطان الثدي البدئي (بدون نقائل) وذلك من أجل إيجاد مشعرات قليلة الكلفة، متوفرة وأقل ضرراً من التعرض المتكرر للأشعة لمراقبة الاستجابة العلاجية للمريضات.

المواد وطرائق العمل:

العينات المدروسة:

جمعت العينات الخاصة بهذه الدراسة من المريضات المراجعات لمشفى البيروني الجامعي في دمشق خلال الفترة الممتدة بين شهر أيلول 2021 وحتى نهاية شهر أيار 2022، بينما أنجز القسم العملي من البحث في مخبر الدمويات ومخبر الهرمونات والواسمات السرطانية في مشفى البيروني. حيث شملت الدراسة على:

مجموعة مريضات سرطان الثدي النقيلي: تضمنت 76 عينة دم لمريضات (أ) مشخصات بسرطان ثدي نقيلي (المرحلة IV حسب معايير اللجنة المشتركة الأمريكية للسرطان AJCC) متمثلاً بنقائل عظمية و/أو حشوية و/أو دماغية متزامنة مع التشخيص الأولي للورم و(ب) مشخصات بسرطان ثدي نقيلي تالي زمنياً للتشخيص الأولي للورم وذلك قبل خضعوهن للمعالجة الكيميائية التلطيفية كخط علاجي أول، وقد تراوحت أعمارهن بين (30-82) سنة وبمتوسط (53 ± 11.9) سنة.

اعتمد على التصوير المقطعي المحوسب Computerized Tomography Scan (CT Scan)، مرنان الدماغ (MRI) Magnetic Resonance Imaging، وومضان العظام Bone scan والمعايرة المخبرية للواسمات الورمية 15-3 Cancer Antigen (CA15-3) و (CEA) Carcinoembryonic Antigen لتقييم استجابة المريضات على المعالجة بعد أربع دورات علاجية. وقيمت استجابة المريضات اعتماداً على معايير تقييم الاستجابة للأورام الصلبة Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST 1.1) كما يلي: استجابة تامّة (CR) Complete Response، والتي عرفت باختفاء كامل للأدلة السريرية للمرض لمدة لا تقل عن 8 أسابيع؛ واستجابة جزئية (PR) Partial Response، والمعرفة بانخفاض عبء الورم بنسبة قدرها 30%

أو أكثر؛ واستقرار المرض (SD) Stable Disease، وذلك عند انخفاض عبء الورم بنسبة أقل من 30% أو زيادته بنسبة لا تتجاوز 20%؛ وتطور المرض Progression (PD) Disease، والذي يشمل ازدياداً في عبء الورم بنسبة 20% أو أكثر. [18]

المجموعة الضابطة: شملت 25 عينة دم لمريضات سرطان الثدي في مراحل مبكرة وذلك قبل خضوعهن للعلاج الكيميائي، تراوحت أعمارهم بين (27-70) سنة وبمتوسط (12.5±49.3) سنة، بغرض إجراء المقارنة مع مجموعة مريضات سرطان الثدي النقيلي.

معايير الاستبعاد:

يستثنى من الدراسة الحالات التالية:

- مريضات الاضطرابات التخثرية مثل: VTE، التخثر المنتشر داخل الأوعية.
- المريضات اللواتي يتناولن أدوية مميعة للدم (وارفارين أو أسبرين أو هيبارين).
- مريضات سرطان الثدي الالتهابي.
- وجود أمراض حادة (انتانات- التهابات- ذات رئة...)
- وجود أمراض مزمنة مثل: الذئبة الحمامية الجهازية، التليف الكبد، الفشل الكلوي....
- الحوامل

طريقة العمل:

جُمعت عينات الدم من مجموعتي الدراسة قبل البدء بالعلاج الكيميائي المتبع وبعد تعبئة الاستمارة والتأكد من عدم وجود أحد معايير الاستبعاد، حيث تم سحب 3 مل من الدم بوضعية الجلوس من الوريد المرفقي، وجمع (2.5 ml) من الدم في أنابيب تحوي مانع

دور تعداد الصّفِيحات والمفاويات كمشعرات تنبؤيّة للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي

تختر EDTA لإجراء تعداد الدّم الكامل CBC باستخدام جهاز الدّمويات الآلي Mindry
C-6200 Auto-Hematology Analyzer والذي يعتمد في عدّ الخلايا على مبدأ
التبعثر الضوئي Light Scattering (طريقة بصرية)

التحليل الإحصائي:

تمّ إجراء التحليل الإحصائي بمساعدة البرنامج الإحصائي Statistical Package for
Social Sciences (SPSS 24)، باستخدام الاختبارات الإحصائية الموضحة في
الجدول 1:

الجدول 1: الاختبارات الإحصائية المستخدمة

اسم الاختبار	وصف	الاستخدام
Independent Samples Test	T لعينتين مستقلتين	مقارنة بين متوسطي عينتين مستقلتين
Chi-Square Tests	كاي مربع	تحديد العلاقة بين متغيرات اسمية أو رتبية
Spearman test	الارتباط بواسطة سبيرمان	تحديد قيمة ومعنوية الارتباط بين متغيرات اسمية أو رتبية
Simple Scatter	الانحدار الخطي البسيط	ايجاد نموذج تنبؤي للعلاقة بين متغير مستقل ومتغير تابع
ROC Curve	منحني روك	حساب قيمة cut-off

حيث تم اعتبار الفروق عند عتبة الدلالة ($P\text{-value} < 0.05$) مهمة إحصائياً.

النتائج:

• **توصيف عينة الدراسة:**

يوضح الجدول 2 جميع البيانات الوصفية والسريية الورمية لمريضات سرطان الثدي النقيلي:
النقيلي:

الجدول 2: توصيف المتغيرات الورمية لمجموعة مريضات سرطان الثدي النقيلي

النسبة المئوية	التكرار	تصنيف المتغير	المتغير	
%52.6	40	53 >	العمر	
%47.4	36	53 ≤		
%28.9	22	قبل سن الإياس	الحالة الطمئية	
%71.1	54	بعد سن الإياس		
%76.3	58	إيجابية	مستقبلات الإستروجين ER	تنميط الورم
%23.7	18	سلبية		
%57.9	44	إيجابية	مستقبلات البروجسترون PR	
%42.1	32	سلبية		
%31.6	24	إيجابية	مستقبلات HER-2	
%68.4	52	سلبية		
%59.2	45	موقع واحد	عدد مواقع النقائل	
%28.9	22	موقعان		
%11.8	9	3 مواقع		
%10.5	8	عظمي	موقع النقائل	
%48.7	37	حشوي		
%5.3	4	دماغي		
%28.9	22	عظمي وحشوية		
%1.3	1	دماغي وحشوي		
%5.3	4	عظمي ودماغي		

دور تعداد الصّفِيحات والمفاويات كمشعرات تنبؤيّة للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي

5.3%	4	1	درجة الورم	
51.3%	39	2		
43.4%	33	3		
34.2%	26	مريضات مشخصات بنقائل متواقنة	تشخيص المرض	
65.8%	50	مريضات مشخصات بنقائل لاحقة		
81.6%	62	قنبوي	نسجياً	
6.6%	5	نببي		
11.8%	9	قنبوي+نببي		
%43.3	33	علاج وحيد single agent	نمط العلاج	
%27.6	21	Vinorelbine		
%7.9	6	Taxanes		
%7.9	6	Capecitabine		
%56.5	43	توليفة combination		
%18.4	14	Carboplatin +Vinorelbine		
%14.5	11	+Doxorubicin Cyclophosphamide		
%7.9	6	Capecitabin +Vinorelbine		
%5.3	4	Taxans +Carboplatin		
%2.6	2	Doxorubicin +Vinorelbine		
%2.6	2	Gemcitabine +Carboplatin		
%2.6	2	Taxans +Doxorubicin		
%2.6	2	+Cyclophosphamide Methotrexate+5- (CMF) Flourouracil		
%51.3	39	تقدم الورم PD		نمط الاستجابة للعلاج
%26.3	20	ثبات الورم SD		
%21.1	16	استجابة جزئية PR		
%1.3	1	استجابة كاملة CR		

17.1%	13	< 23 U/ml	قيم الواسم CA15-3
82.9%	63	≥ 23 U/ml	
30.3%	23	< 5.8 ng/ml	قيم الواسم CEA
69.7%	53	≥ 5.8 ng/ml	

• فروق المتوسطات للمعالم المدروسة:

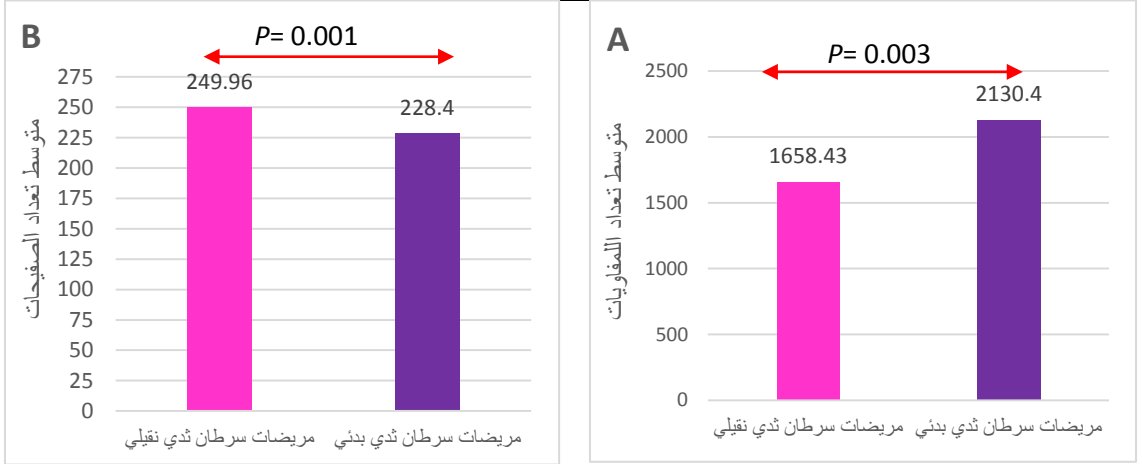
بيّن الجدول 3 انخفاض متوسط قيم تعداد اللمفاويات لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي ($1658.43 \times 10^6/L$) وبفارق معنوي ($P=0.003$) مقارنة بمريضات سرطان الثدي في مراحل مبكرة ($2130.40 \times 10^6/L$).

بينما يُلاحظ أن متوسط قيم تعداد الصفيحات لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي ($249.96 \times 10^9/L$) أعلى بفارق معنوي ($P=0.001$) عن قيمها عند المجموعة الضابطة ($228.40 \times 10^9/L$).

الجدول 3: فروق متوسطات المعالم المخبرية المدروسة عند كل من مجموعتي الدراسة:

المتغيرات	النوع	العدد	أدنى قيمة	أعلى قيمة	المتوسط ± الانحراف المعياري	P-value
تعداد اللمفاويات البدئي ($\times 10^6/L$)	سرطان ثدي بدئي	25	1230	3390	647.33 ± 2130.40	0.003
	سرطان ثدي نقيلي	76	832	4068	678.23 ± 1658.43	
تعداد الصفيحات البدئي ($\times 10^9/L$)	سرطان ثدي بدئي	25	100	314	50.32 ± 228.40	0.001
	سرطان ثدي نقيلي	76	116	440	84.60 ± 249.96	

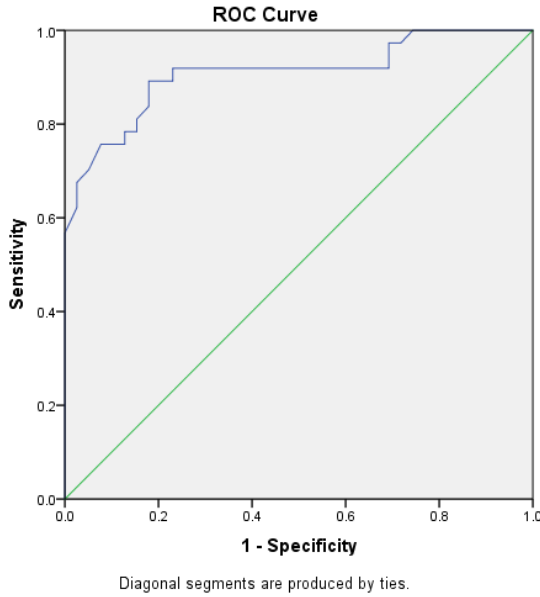
دور تعداد الصفائح واللمفاويات كمشعرات تنبؤية للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي



الشكل 1: A متوسط تعداد اللمفاويات لمريضات سرطان الثدي النقيلي ومريضات سرطان الثدي البدئي
B متوسط تعداد الصفائح لمريضات سرطان الثدي النقيلي ومريضات سرطان الثدي البدئي

• دراسة تقييم الاستجابة للعلاج الكيميائي حسب القيمة التنبؤية لتعداد اللمفاويات البدئي:

تمت دراسة قدرة مستويات تعداد اللمفاويات البدئي للتنبؤ بالاستجابة على العلاج الكيميائي لدى مريضات سرطان الثدي النقيلي باستخدام منحنى ROC. حيث وجد (الشكل 2) أنه عند قيمة تعداد اللمفاويات المساوية لـ $1505 \times 10^6/L$ (cut-off) تحققت أعلى قيم للحساسية والنوعية معاً (الحساسية 89.2% والنوعية 82.1%) وذلك لتقييم مستوى الاستجابة للعلاج الكيميائي. وكانت المساحة تحت المنحنى $AUC = 0.908$.



الشكل 2: حساسية ونوعية قيم تعداد اللمفاويات البدئية في تفريق الاستجابة للعلاج الكيميائي

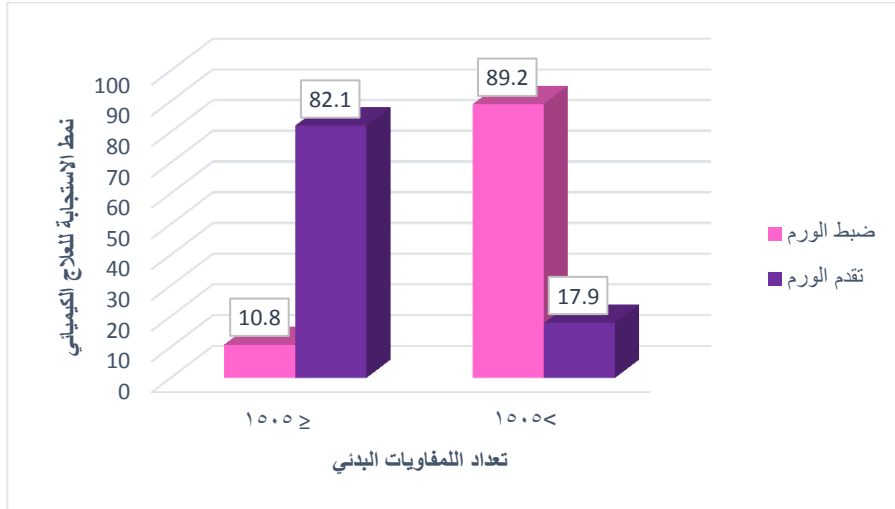
اعتماداً على القيمة الحدية تم تصنيف المريضات وفقاً لأنماط الاستجابة للعلاج الكيميائي (الجدول 4) ووجد أن نسبة المريضات اللواتي حققن ضبط الورم DC ولديهن تعداد لمفاويات أكبر من 1505 كانت أعلى مقارنة بالمريضات اللواتي لديهن تعداد اللمفاويات ≥ 1505 وذلك بفرق هام إحصائياً (89.2 vs 10.8%؛ $P=0.000$).

بالمقابل، وجد أن نسبة المريضات اللواتي تقدم لديهن المرض ويتعداد اللمفاويات أكبر من 1505 كانت أقل منها عند المريضات اللواتي لديهن تعداد اللمفاويات ≥ 1505 وبفرق هام إحصائياً (17.9 vs 82.1%؛ $p=0.000$).

جدول رقم (4): العلاقة بين قيم تعداد اللمفاويات وفق قيمة cut-off ونمط الاستجابة

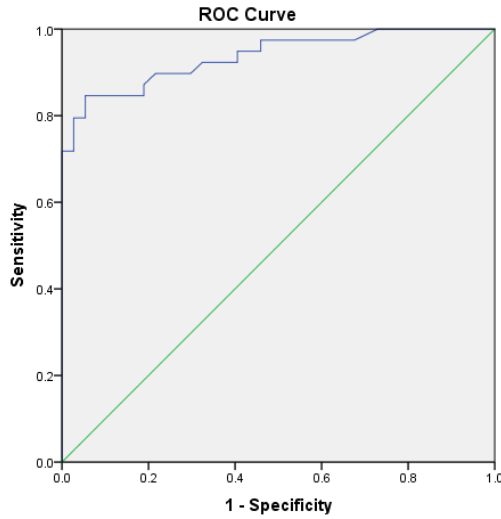
P- value	التشخيص		تعداد اللمفاويات
	تقدم الورم (39 مريض)	ضبط الورم (37 مريض)	
0.000	32 (82.1%)	4 (10.8%)	≥ 1505
	7 (17.9%)	33 (89.2%)	< 1505

دور تعداد الصفائح والمفاويات كمشعرات تنبؤية للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقلي



الشكل 3: العلاقة بين قيم تعداد المفاويات وفق قيمة cut-off ونمط الاستجابة

دراسة تقييم الاستجابة للعلاج الكيميائي حسب القيمة التنبؤية لتعداد الصفائح البدني تمت دراسة قدرة مستويات تعداد الصفائح البدني للتنبؤ بالاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقلي باستخدام منحنى ROC. وجد من (الشكل 4) عند قيمة تعداد صفائح مساوية لـ $222 \times 10^9/L$ (cut-off) تحققت أعلى حساسية ونوعية معاً (الحساسية 81.1% والنوعية 87.2%) وذلك لتقييم مستوى الاستجابة للعلاج الكيميائي. وكانت المساحة تحت المنحنى $AUC = 0.937$.



Diagonal segments are produced by ties.

الشكل 4: حساسية ونوعية قيم تعداد الصفحات البدئية في تفريق الاستجابة للعلاج الكيميائي

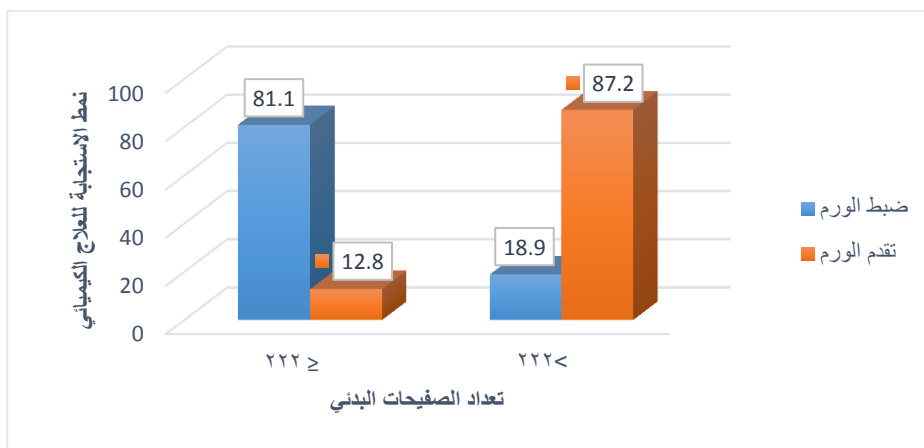
اعتماداً على القيمة الحدية تم تصنيف المريضات وفقاً لأنماط الاستجابة للعلاج الكيميائي (الجدول 5) ووجد أن نسبة المريضات اللواتي حققن ضبط الورم DC ولديهن تعداد الصفحات أقل من 222 كانت أعلى منها لدى المريضات اللواتي لديهن تعداد الصفحات < 222 وذلك بفرق هام ($P=0.000$ ؛ %18.9 vs %81.1)

بالمقابل، وجد أن نسبة المريضات اللواتي تقدم لديهن المرض وكان لديهن تعداد الصفحات أكبر من 222 كانت أكبر منها عند المريضات اللواتي لديهن تعداد الصفحات ≥ 222 ويفرق هام إحصائياً ($P=0.000$ ؛ %12.8 vs 87.2).

جدول (5): العلاقة بين قيم تعداد الصفحات البدئي وفق قيمة cut-off ونمط الاستجابة

التشخيص			تعداد الصفحات
P- value	تقدم الورم (39 مريض)	ضبط الورم (37 مريض)	
0.000	5 (12.8%)	30 (81.1%)	≥ 222
	34 (87.2%)	7 (18.9%)	< 222

دور تعداد الصفائح واللمفاويات كمشعرات تنبؤية للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي



الشكل 5: العلاقة بين قيم تعداد الصفائح البديني وفق قيمة cut-off و نمط الاستجابة

• دراسة العلاقة بين تعداد اللمفاويات وتعداد الصفائح والواسمات الورمية عند مريضات سرطان الثدي النقيلي:

تم إجراء اختبار الارتباط باستخدام بيرسون لتقييم العلاقة بين تعداد اللمفاويات وتعداد الصفائح قبل العلاج الكيميائي وكذلك العلاقة مع الواسمات الورمية النوعية لسرطان الثدي (CA15-3 و CEA) ضمن مجموعة مريضات سرطان الثدي النقيلي، ويوضح الجدول 6 نتائج هذا الاختبار

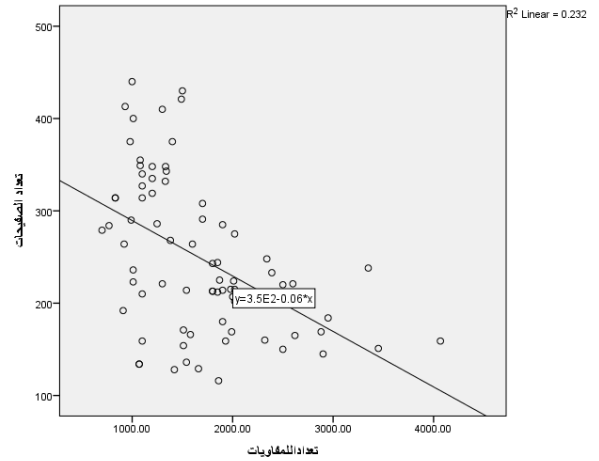
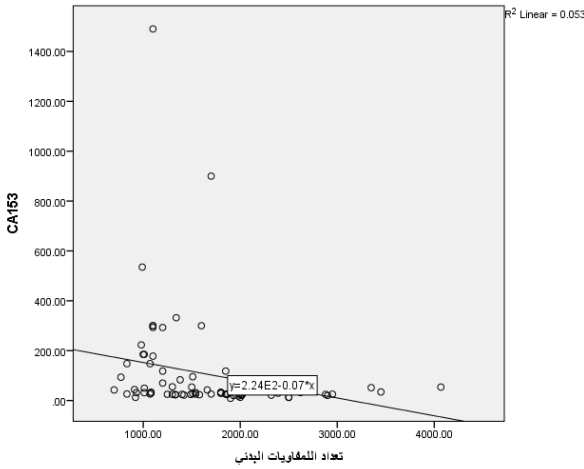
الجدول 6: نتائج ارتباط بيرسون بين تعداد اللمفاويات ومتغيرات الدراسة:

الارتباط	P-value	معامل ارتباط بيرسون	العدد	المريضات المتغيرات
سلبى معنوي	0.000	-0.482**	76	تعداد الصفائح
سلبى معنوي	0.046	-0.229*	76	CA15-3
غير معنوي	0.184	-0.154	76	CEA

$P\text{-value} < 0.01^{**}$

$P\text{-value} < 0.05^*$

حيث كانت العلاقة سلبية ذات دلالة إحصائية بين قيم تعداد الصّفحات وقيم تعداد اللمفاويات البدئية ($P\text{-value}= 0.000$) كما يوضح الشكل 6، أي أنه كلما انخفضت قيم تعداد اللمفاويات ازدادت قيم تعداد الصّفحات عند مريضات سرطان الثدي النقيلي. كما أوضحت العلاقة وجود ارتباط سلبي معنوي بين قيم تعداد اللمفاويات وقيم الواسم الورمي CA15-3 ($P\text{-value}= 0.046$) كما في الشكل 7، أي أنه كلما انخفضت قيم تعداد اللمفاويات ازدادت قيم CA15-3 عند مريضات سرطان الثدي النقيلي.



الشكل 7: العلاقة بين تعداد اللمفاويات وقيم CA15-3 لدى مجموعة المريضات

الشكل 6: العلاقة بين تعداد اللمفاويات وتعداد الصّفحات البدئية لدى مجموعة المريضات

• العلاقة بين المتغيرات الورمية ومشعرات الدراسة:

عند دراسة علاقة المتغيرات الورمية الموجودة في الجدول 2 مع قيم تعداد اللمفاويات الموزعة حسب القيمة الحدية ($1505 \times 10^6/L$) إلى مجموعتين حسب الجدول 7 وجد علاقة ذات دلالة إحصائية $P=0.045$ بين تواضع النقيلة وتعداد اللمفاويات البدئية فمعظم المريضات اللواتي كان تواضع النقيلة لديهم حشوي لديهم تعداد لمفاويات بدئي (> 1505).

دور تعداد الصّفِيحات والمفاويات كمشعرات تنبؤيّة للاستجابة للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقيلي

الجدول رقم (7) العلاقة بين تعداد المفاويات البدئي ومكان النقيلة:

P-value	تعداد المفاويات البدئي					
	> 1505		≤ 1505			
	N%	N	N%	N		
0.045	62.5%	25	33.3%	12	حشوي	مكان النقيلة
	7.5%	3	13.9%	5	عظمي	
	2.5%	1	8.3%	3	دماغي	
	27.5%	11	30.6%	11	حشوي+عظمي	
	0.0%	0	2.8%	1	حشوي+دماغي	
	0.0%	0	11.1%	4	دماغي+عظمي	

أما بالنسبة لقيم تعداد الصّفِيحات البدئي مع المتغيرات الورمية الموجودة في الجدول 2 وجدت علاقة ذات دلالة إحصائية $P= 0.05$ بين حالة الإيأس وتعداد الصّفِيحات، فقبل سن الإيأس كان لدى معظم المريضات تعداد صّفِيحات بدئي (≤ 222)، في حين أنه بعد سن الإيأس كان لدى معظم المريضات تعداد صّفِيحات بدئي (> 222) كما في الجدول 8.

الجدول رقم (8) العلاقة بين تعداد الصّفِيحات البدئي وحالة الإيأس

P-value	تعداد الصّفِيحات البدئي					
	> 222		≤ 222			
	N%	N	N%	N		
0.05	19.5%	8	40.0%	14	قبل سن الإيأس	حالة الإيأس
	80.5%	33	60.0%	21	بعد سن الإيأس	

• المناقشة:

أظهرت العديد من الدراسات دور الخلايا المناعية في الأورام الصلبة في تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية مساهمةً بذلك بضبط الورم.

وبناءً على مفهوم التعديل المناعي، تختلف البيئة المناعية وفقاً لمراحل السرطان. حيث لوحظ في هذه الدراسة انخفاض تعداد اللمفاويات لدى مريضات سرطان الثدي النقلي مقارنةً بمريضات سرطان الثدي في مراحله المبكرة، ويعود ذلك لدور التهرب المناعي في تقدّم الورم. وهذا ما يتوافق مع دراسات سابقة حيث بيّن Rin Ogiya وآخرون [19] أن الأورام في النكس النقلي الأول في سرطان الثدي ثلاثي السلبية وإيجابي Her-2 لديها نسبة أقل من الخلايا اللمفاوية المرتشحة للورم (Tumor Infiltrating Lymphocyte) والخلايا التائية CD8 و CD4 مقارنة بالسرطانات البدئية. وأكد Rin Ogiya وآخرون [20] في دراسة أخرى انخفاض مستويات TIL لدى مريضات سرطان الثدي ذو النقال الدماغية مقارنة بسرطان الثدي البدئي. بينما لاحظ Aqing Liu وآخرون [21] وجود ارتباط سلبي بين مستويات CD4 و CD8 مع المراحل السريرية وينخفض مع تقدّم الورم.

تُعزى أسباب نقص اللمفاويات لدى مريضات السرطان النقلي لعدة آليات مثل تدمير اللمفاويات المحفّز بالخلايا الورمية [22] من خلال التعبير عن رباط طليعة الموت الخلوي المبرمج FasL أو عامل التثخّر الورمي (TNF)، [23] وانخفاض قدرة اللمفاويات للاستجابة لتحفيز مستقبل الخلايا التائية (T-Cell Receptor TCR) نتيجة للتعبير المتغيّر لسلسلة ζ الموجودة في TCR، بالإضافة لزيادة نسبة الخلايا التائية المنظمة المعبرة عن CTLA-4 والتي تدعم الكبح المناعي. كما يعود سبب انخفاض تعداد

اللمفاويات التائية CD4 نتيجة لانخفاض بوظيفة الغدة التوتية، والخلل في إنتاج السيتوكينات (IL-7, IL-15, IL-2) أو مستقبلاتها (IL-7R α). [22]

كما تترافق التبدلات الجينية للخلايا المناعية في البيئة النكالية مع انخفاض مستويات الخلايا التائية المفعلة والمساعدة والمنظمة والسامة والتغصنية مقارنةً ببيئة السرطان في مراحل مبكرة. ويلاحظ النقص المتوافق مع أزواج المستقبلات الرابطة والتي تتواسط هجرة الخلايا التغصنية والبائية والتائية والوحيدات في الأنسجة المحيطة. كما يظهر في النكائل انخفاض بالتعبير عن CD27 وربطتها CD70 بالإضافة CD29 و CD40L الضرورية لتحفيز الخلايا التائية. وينخفض التعبير عن عوامل نسخ الخلايا التائية الفعالة -NFAT 1,2 والگرانزيمات وgranulysin، IFNc والجينات المنظمة للانترفيرون

(STAT1, IRF-1, -4, -7, IFI-27, -35, MX1) بشكل متوافق مع الحالة الغير فعالة للمفاويات التائية في النكائل. وكذلك فإن التعبير عن MHC class I (HLA-A, -B, -C) and class II (HLA-DRB3, -DOB, CD74) ومكونات البروتيازيم المناعية TAP1/TAPBP و PSMB-8, -9, -10 تكون أقل عند النكائل متنبئة بالاعتلال في القدرة على تقديم المستضدات. [24]

أفادت بعض الدراسات بوجود علاقة ارتباط بين نمط الاستجابة للعلاج الكيميائي ومستويات تعداد اللمفاويات، سواء الموجودة في الدم المحيطي أو المرتشحة للأورام، والتي تساهم في الاستجابة المناعية في الجسم. حيث وُجد أن نقص اللمفاويات البدئي مشعر إنذاري وتنبؤي بفعالية العلاج الكيميائي في أنماط مختلفة من السرطانات. فقد لاحظ George Emile وآخرون [25] ارتباط تقدم الورم عند التقييم الأول للاستجابة لدى المريضات ذو تعداد اللمفاويات المنخفض وذلك بفارق معنوي $P=0.016$. كما أظهرت دراسة Lissoni وآخرون [26] فكرة أن نقص اللمفاويات قبل العلاج الكيميائي يرتبط

بالفعالية المنخفضة للعلاج بشكل متوافق مع معدل تقدّم الورم عند مريضات الأورام الصلبة النفاثلية. وأن نجاعة العلاج الكيميائي تعتمد على التداخل مع المناعة المضادة للأورام. وبنتيجة مشابهة في هذه الدراسة، تم تحديد قيمة 1505 كقيمة حدية لتعداد اللمفاويات للتنبؤ بمستوى الاستجابة على العلاج الكيميائي لدى مريضات سرطان الثدي النقلي وذلك عند أعلى قيم للحساسية والنوعية كما لوحظ ارتباط القيم المنخفضة من تعداد اللمفاويات مع تقدّم الورم وذلك بفرق معتد به إحصائياً حيث أن 88.9% من مريضات سرطان الثدي النقلي اللواتي لديهن تعداد اللمفاويات أقل من 1505 تقدّم لديهن الورم مقارنةً بـ 17.5% من المريضات اللواتي لديهن تعداد اللمفاويات أكبر من 1505.

ولتفسير ذلك يوجد عدّة آليات للعلاج الكيميائي يستطيع من خلالها أن يعدّل التفاعلات بين الخلايا الورمية والجهاز المناعي. حيث يستطيع العلاج الكيميائي تحفيز موت الخلايا الورمية والذي بدوره يعزز التعبير عن المستضدات الورمية ويزيد قدرتها للهجوم المناعي. [27] وبالتالي التّفعيل المباشر لـ CD4 و CD8 مؤدّية لإنتاج كيموكينات وسيتوكينات، وكذلك تثبيط أو استنزاف الخلايا المثبّطة للمناعة المشتقّة من نقي العظم (Myeloid-Deriver Suppressor Cells (MDSCs)، وزيادة التّعبير عن MHC class 1 في الخلايا السرطانية. [20] أي تلعب اللمفاويات دوراً في تحفيز التأثير المضاد الورمي للعلاج الكيميائي من خلال زيادة حساسية الخلايا الورمية للموت الخلوي المبرمج المتواسط بـ perforin/granzyme وبتواسط ربيطة Fas. [28]

أي يمكن أن تتنبأ الحالة المناعية قبل العلاج بقدرة العلاج الكيميائي على إزالة الخلايا السرطانية حيث أنّ نقص اللمفاويات يعكس حالة انخفاض المناعة، والتي تنقص بدورها تأثير الهجوم المناعي مسببة تأثير أقل نجاعة للعلاج المضاد الورمي.

بالإضافة لذلك توجّهت الأبحاث لدراسة دور الصّفِيحات في النقائل الورميّة ووجدوا أن زيادة تعداد الصّفِيحات عند مريضات السرطان يعتبر عاملاً إنذارياً لتشكّل النقائل. [29] حيث بيّنت نتائج دراستنا ترافق ارتفاع تعداد الصّفِيحات مع تقدّم الورم وتشكّل النقائل مقارنةً بمريضات سرطان الثدي في مراحل مبكرة ويفرق معنّده إحصائياً ($P=0.001$). وقد جاءت هذه النتيجة متوافقة مع نتائج دراسات سابقة حيث وجد Emmanuel Asuquo Etim وآخرون [30] أن تعداد الصّفِيحات أعلى عند مريضات سرطان الثدي ذو المراحل الورمية 3 و4 مقارنة بمريضات المراحل 0 و1 ويعود ذلك لقدرة الخلايا السرطانية على تحفيز نمو وتكاثر الصّفِيحات. كما وجد Stravodimou و Voutsadakis [31] ارتفاع تعداد الصّفِيحات عند نسبة أعلى من مريضات سرطان الثدي المشخصّات بنقائل ورميّة منذ البداية مقارنةً بنسبة المريضات اللواتي لديهن تعداد الصّفِيحات طبيعي.

يمكن وصف العلاقة بين الصّفِيحات والخلايا الورمية بأنها علاقة ثنائية الاتجاه، حيث يحفّز نمو وتكاثر الخلايا الورمية ازدياد إنتاج الصّفِيحات الدموية في نقي العظم بتواسط IL-1 β و IL-6 وترومبوبويتين (المنظم الأساسي لتمييز سلائف النواء)، كما تعمل الخلايا الورمية على فرط تفعيل الصّفِيحات بتأثير العديد من الوسائط المتحررة منها وبالمقابل تؤثر الصّفِيحات المفعّلة في العديد من الآليات حيث تحيط الصّفِيحات بالخلايا الورمية وتشكّل غطاء حولها تحميها من قوى التدفق الدموي والمراقبة المناعية، كما تسهّل الصّفِيحات التصاق الخلايا السرطانية بخلايا البطانة الوعائية، والتي تؤدي للانسلال الخارج وعائي في السدى وتشكيل أورام ثانويّة. [33] وتحسّن قدرة الخلايا الورميّة لمقاومة anoikis والاستماتة، [32] وما يؤكد دور الصّفِيحات أيضاً تواسطها في التحول الظاهري للخلايا الورميّة Epithelial-to- Mesenchymal Transition EMT بتأثير العديد من وسائط النمو المشتقّة من الصّفِيحات والسيتوكينات المتعلّقة بـ EMT مثل TGF-B

و VEGF-A و PAI-1 [33]. كما تحقّر الصّفيحات نمو الورم والتّوعية من خلال تزويد الخلايا السرطانية بعوامل نمو مختلفة مثل مصدر VEGF من حبيبات α الموجودة في الصّفيحات. [34]

بالإضافة لذلك وُجد للصّفيحات تأثير مهم في تحضير البيئة طليعة النقائلية. حيث تطرح الصّفيحات CXCL5 و CXCL7 عند ارتباطها بالخلايا الورميّة لجذب الخلايا المحبّبة لتشكل البيئة النقائلية الجديدة. [35] يتم تنظيم كل خطوة بشلال النقائل بواسطة المستقبلات المتعلّقة بالصّفيحات والجزيئات الفعالة حيويّاً المشتقّة من الصّفيحات مثل عوامل النمو والسيتوكينات والكيموكينات و miRNA. [36]

على الرغم من الدور الإنذاري لتعداد الصّفيحات لدى مريضات سرطان الثدي النقلي إلا أن هناك بعض الدراسات التي تشير لارتباطه بفعالية العلاج الكيماي في العديد من أنواع السرطانات. حيث وجد Yu-Jie Lu وآخرون [37] أن مستويات تعداد الصّفيحات البدئي المنخفض يتعلّق باستجابة أفضل للعلاج الكيماي لدى مريضات سرطان الثدي. كما لاحظ Kalim Khan وآخرون [38] أن كثرة الصّفيحات قبل العلاج الكيماي عند مرضى سرطان الرئة غير صغير الخلايا يعتبر عامل تنبؤي سلبى للاستجابة على العلاج الكيماي لديهم. بينما عزّزت الدّراسات التجريبية في الزجاج هذا الدور، حيث وُجد في نماذج الفئران في سرطان الثدي والبروستات، أن انخفاض تعداد الصّفيحات يمكن أن يزيد حساسيّة الدوكسوروبيسين وباكليتاكسيل. [36] جاءت هذه النتائج متماشية مع نتائج دراستنا حيث لوحظ ارتباط القيم المرتفعة من تعداد الصّفيحات مع تقدّم الورم بفرق معنوي ملحوظ حيث أن 88.2% من مريضات سرطان الثدي النقلي اللواتي لديهن تعداد الصّفيحات أكبر من $222 \times 10^9/L$ تقدّم لديهن الورم مقارنةً ب 14.3% من المريضات اللواتي لديهن تعداد الصّفيحات أقل من 222.

ويعزى ذلك للعديد من الآليات الأساسيّة التي تتفعل بواسطة الصّفيحات وتتواسط مقاومة العلاج الكيميائي كتحفيز إشارات MAPK التي تعمل على زيادة تكاثر الخلايا السرطانية، [17] أو التثبيط المناعي المتواسط بانخفاض التّعبير عن NKG2-D [33]. كما تعاكس عوامل النّمو والسيتوكينات المتحررة من الصّفيحات المفعلة التأثير المضاد للنمو للعلاج الكيميائي من خلال تغيير التّوازن بين الجينات المضادة والجينات طليعة الموت الخلوي المبرمج. بالإضافة إلى ذلك تحسّن الصّفيحات دور منظّمات نمو الخلايا مما يؤدي لمنع توقف دورة حياة الخلية التي تسببها العوامل المضادة للسرطان. كما تبين أنّ للصفائح دوراً بتحسين فسفرة بروتينات إصلاح الـ DNA (CHK 1 ، BRCA1 و Mre11) بالتالي تسهّل عملية إصلاح الـ DNA والتّعبير عن P38 و JNK-P54 MAPK والتي تتواسط النّمو والتّمايز والبقيا والهجرة للخلايا السرطانية. وكذلك تؤثر الصّفيحات في التحوّل الظاهري للخلايا السرطانية EMT من خلال تحرير TGF-1 والذي يلعب دوراً هاماً في مقاومة العلاج. [36] ومن الآليات المقاومة أيضاً ازدياد عدد مضخات التّدفق الموجودة على غشاء الخلية. حيث أن الصّفيحات تعبّر عن كمّيّات مرتفعة من (multidrug resistance-associated protein 4 MRP4). إذ يغيّر MRP4 مقاومة الأدوية السامة للخلايا المعتمدة على النكليوزيد، و زيادة MRP4 يدعم دور التّوعية للصفائح. [39]

الاستنتاجات والتوصيات:

- أظهرت الدراسة الحالية، أنّ ارتفاع تعداد اللمفاويات وانخفاض تعداد الصّفيحات قبل الخضوع للعلاج الكيميائي يرتبط بشكل معنوي مع النجاعة الأفضل للعلاج الكيميائي عند مريضات سرطان الثدي النقلي. وبالتالي يمكن اعتبارهما مشعرات تنبؤيّة هامة للاستجابة على العلاج الكيميائي والتّوجيه لاختيار العلاج الأمثل. كما أكّدت الدراسة على دور تعداد اللمفاويات والصّفيحات البدنيّة في التنبؤ بتشكّل النفاثل الورميّة عند مريضات سرطان الثدي. لذلك نوصي بإجراء دراسات مستقبلية لتوثيق هذه النتائج ودراسة تأثير مشاركة أدوية مضادة للتخثر ورافعة للمناعة مع العلاج الكيميائي بهدف تحسين المعالجة.

المراجع:

- [1] Kotta-Loizou. I et al, 2012, "The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-in Breast Cancer," **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**.
- [2] "Breast Cancer Facts & Statistics 2023." <https://www.breastcancer.org/facts-statistics> (accessed Mar. 22, 2023).
- [3] "GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC." <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> (accessed Mar. 20, 2023).
- [4] Wang. R et al, 2019, "The Clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer," **BMC Cancer**, vol. 19, no. 1.
- [5] "Breast Cancer - Metastatic: Statistics | Cancer.Net." <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer-metastatic/statistics> (accessed Mar. 22, 2023).
- [6] Valastyan. S et al, 2011, "Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms," **Cell**, vol. 147, no. 2, p. 275.
- [7] Feng. Y *et al.*, 2018 "Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis," **Genes and Diseases**, vol. 5, no. 2. pp. 77–106.
- [8] Qian. Y *et al.*, 2018, "Peripheral inflammation/immune indicators of chemosensitivity and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy," **Onco Targets Ther**, vol. 11, pp. 1423–1432.
- [9] Zhao. J *et al.*, 2020, "Prognostic role of pretreatment blood lymphocyte count in patients with solid tumors: A systematic

- review and meta-analysis," ***Cancer Cell International***, vol. 20, no. 1.
- [10] Araki. K *et al.*, 2018, "Predictive impact of absolute lymphocyte counts for progression-free survival in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer treated with pertuzumab and trastuzumab plus eribulin or nab-paclitaxel 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis," ***BMC Cancer***, vol. 18, no. 1.
- [11] Ding. N *et al*, 2020, "Roles of neutrophil/lymphocyte ratio in prognosis and in differentiation of potential beneficiaries in HER2-positive breast cancer with trastuzumab therapy," ***BMC Cancer***, vol. 20, no. 1.
- [12] Liang. L *et al.*, "Predictive value of pretreatment lymphocyte count in stage II colorectal cancer and in high-risk patients treated with adjuvant chemotherapy." ***Oncotarget***,
- [13] Wang. K *et al*, 2016 , "Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis," ***Oncotarget***,
- [14] Seretis. C *et al*, 2012, "Enhancing the accuracy of platelet to lymphocyte ratio after adjustment for large platelet count: A pilot study in breast cancer patients," ***Int J Surg Oncol***, vol. 2012.
- [15] Schlesinger. M, 2018, "Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology," ***Journal of Hematology and Oncology***, vol. 11, no. 1.

- [16] Sylman. J et al, 2017, "Platelet count as a predictor of metastasis and venous thromboembolism in patients with cancer," ***Converg Sci Phys Oncol***, vol. 3, no. 2, p. 023001.
- [17] Elaskalani. O et al. P, 2017, "Targeting platelets for the treatment of cancer," ***Cancers***, vol. 9, no. 7.
- [18] Eisenhauer. E. A *et al.*, 2009, "New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)," ***Eur J Cancer***, vol. 45, no. 2, pp. 228–247.
- [19] Ogiya. R *et al.*, 2016, "Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients," ***Cancer Sci***, vol. 107, no. 12, pp. 1730–1735.
- [20] Ogiya. R *et al.*, 2017, "Comparison of immune microenvironments between primary tumors and brain metastases in patients with breast cancer," ***Oncotarget***,
- [21] Liu. A *et al.*, 2022, "The Predictive Value of Changes in the Absolute Counts of Peripheral Lymphocyte Subsets for Progression and Prognosis in Breast Cancer Patients," ***Contrast Media Mol Imaging***, vol. 2022.
- [22] Ménétrier-Caux. C et al, 2019, "Lymphopenia in Cancer Patients and its Effects on Response to Immunotherapy: An opportunity for combination with Cytokines?," ***Journal for ImmunoTherapy of Cancer***, vol. 7, no. 1.
- [23] Ray-Coquard. I *et al.*, 2009, "Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas," ***Cancer Res***, vol. 69, no. 13, pp. 5383–5391.

- [24] Szekely. B *et al.*, 2018, "Immunological differences between primary and metastatic breast cancer," ***Annals of Oncology***, vol. 29, no. 11, pp. 2232–2239.
- [25] Emile. G *et al.*, 2022, "Baseline lymphopenia as prognostic factor in patients with metastatic breast cancer treated with palbociclib," ***Oncol Lett***, vol. 23, no. 1.
- [26] Lissoni. P *et al.*, 2004, "Efficacy of Cancer Chemotherapy in Relation to the Pretreatment Number of Lymphocytes in Patients with Metastatic Solid Tumors," ***The International Journal of Biological Markers***, Vol. 19 no. 2, pp. 135-140.
- [27] Kou. F *et al.*, 2016, "Pretreatment lymphopenia is an easily detectable predictive and prognostic marker in patients with metastatic esophagus squamous cell carcinoma receiving first-line chemotherapy," ***Cancer Med***, vol. 5, no. 5, pp. 778–786.
- [28] Qian. Y *et al.*, 2018, "Peripheral inflammation/immune indicators of chemosensitivity and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy," ***Onco Targets Ther***, vol. 11, p. 1423.
- [29] Li. Z, Riesenberget al. X, 2019, "The role of platelets in tumor growth, metastasis, and immune evasion," ***in Platelets, Elsevier***, pp. 547–561.
- [30] Asuquo Etim. E, 2018, "Association of Platelet Count and Platelet Indices with Stages of Women Breast Cancer in Yola, Nigeria," ***Hematology & Transfusion International Journal***, vol. 6, no. 1.
- [31] Stravodimou. A *et al.*, 2013, "Pretreatment thrombocytosis as a prognostic factor in metastatic breast cancer," ***Int J Breast Cancer***, vol, pp. 1–6.

- [32] Bian. X *et al.*, 2022, "Roles of platelets in tumor invasion and metastasis: A review," ***Heliyon***, vol. 8, no. 12.
- [33] Ishikawa. S *et al.*, 2016, "Platelets surrounding primary tumor cells are related to chemoresistance," ***Oncol Rep***, vol. 36, no. 2, pp. 787–794.
- [34] Sylman. J. L *et al.*, 2017, "Platelet count as a predictor of metastasis and venous thromboembolism in patients with cancer," ***Converg Sci Phys Oncol***, vol. 3, no. 2, p. 023001.
- [35] Palacios-Acedo. A. L, Mège. D, Crescence. L, Dignat-George. F, Dubois. C, and Panicot-Dubois. L, 2019, "Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy," ***Frontiers in immunology***, vol. 10. NLM (Medline), p. 1805.
- [36] Braun. A, Anders. H. J *et al.*, 2021, "Platelet-Cancer Interplay: Molecular Mechanisms and New Therapeutic Avenues," ***Frontiers in Oncology***, vol. 11.
- [37] Lu. Y. J. *et al.*, 2019, "Prognostic values of platelet-associated indicators in advanced breast cancer," ***Transl Cancer Res***, vol. 8, no. 4, pp. 1326–1335.
- [38] Khan. K *et al.*, 2020, "Prognostic role of pre-chemotherapy platelet counts in patients with non-small cell lung cancer treated with first-line chemotherapy at IRD SMS medical college Jaipur," ***Advances in Human Biology***, vol. 10, no. 3, p. 115.
- [39] Huong. P. T *et al.*, 2019, "The role of platelets in the tumor-microenvironment and the drug resistance of cancer cells," ***Cancers***, vol. 11, no. 2.