الجمهوريّة العربيّة السّوريّة
وزارة التّعليم العالي والبحث العلميّ
جامعة دمشق
كليّة الطّبّ البشريّ
قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة

تحرّي الطّفرات في الإكسون 2 من جين MED12 في الأورام العضليّة الملساء من عيّنات أرحام مستأصلة في مشافي جامعيّة

رسالة مقدّمة لنيل درجة الماجستير في اختصاص الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة

إعداد: د. لينا موفق البيطار

المشرف الرّئيس
د. محمّد إياد الشّطيّ
أستاذ في قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة
كليّة الطّبّ البشريّ– جامعة دمشق

المشرف المشارك
د. فريز أحمد
مدرّس في قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة
كليّة الطّبّ البشريّ– جامعة دمشق

1446 هـ/2024 م

قرار لجنة الحكم مع توقيع لجنة المناقشة Approval

نوقشت هذه الأطروحة الموسومة بعنوان (تحرّي الطّفرات في الإكسون 2 من جين MED12 في الأورام العضليّة الملساء من عيّنات أرحام مستأصلة في مشافي جامعيّة) في جلسة علنيّة بتاريخ 2025/1/22.

وبعد الاطّلاع على النّسخة المعدّلة المقدّمة من قبل طالبة الدّراسات العليا: لينا موفق البيطار تبيّن أنّه جرى التّقيّد بالملاحظات كلّها، وأُجريت كافّة التّصويبات المطلوبة، وأُجيزت من قِبل أعضاء لجنة التَّحكيم.

أ. د. محمّد إياد الشّطيّ	**أ. د. وليد الصّالح**	**م. د. أحلام حميد**
الأستاذ في قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية – كلية الطب البشري – جامعة دمشق	الأستاذ في قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية – كلية الطب البشري – جامعة دمشق	المدرس في قسم الطب المخبري – كلية الطب البشري – جامعة دمشق
(عضواً مشرفاً)	(عضواً)	(عضواً)

تصريح خطي

أنا الموقع أدناه أصرّح بعلمي الكامل وقبولي:

1. أنّ كلّ ما ينتج عن البحث والأطروحة هو ملكيّة فكريّة وماليّة بالتّشارك مع جامعة دمشق، وأنّني ألتزم بأخذ موافقة الجامعة في حال رغبتي بنشر البحث أو الأطروحة أو جزءٍ منها نصاً أو مضموناً خارج إطار الجامعة (من دور نشر أو مكتبات أو مواقع الكترونيّة وغيرها من وسائل النّشر).

2. أنّه لا يوجد أيّ جزء من هذه الأطروحة تمّ اقتباسه من عمل علميّ آخر أو أُنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أيّة جامعة أو معهد تعليميّ داخل أو خارج الجمهوريّة العربيّة السّوريّة.

الاسم والتّوقيع

لينا موفق البيطار

شكر

أسمى آيات الشّكر والتّقدير لكلّ شمعة أضاءت طريق العلم والمعرفة والإنجاز وذلّلتِ الصّعاب في وطني الحبيب سوريّة وأخصُّ بالشُّكرِ:

المعلّم القدير والأب الرّوحي لجميع طلاب الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة في سوريّة الأستاذ الدّكتور محمّد إياد الشّطّي على كلّ ما قدّمه لي من علم وإرشاد خلال سنوات الدّراسة ومن دعم لموضوع الرّسالة، ستبقى كلماته نبراساً لي كحال كلّ من نهل من علمه.

الأستاذ الدّكتور فريز أحمد لمشاركته في الإشراف على هذه الدّراسة وعلى تعاونه ودعمه الدّائميَن، والأستاذ الدّكتور يحيى الشّمالي على مساعدته القيّمة لإنجاز هذا البحث مع تقديري وامتناني.

الأستاذة الدّكتورة غالية أبو الشّامات والأستاذة الدّكتورة سمر النّحاس من قسم البيولوجيا –كليّة العلوم لمساعدتهما وتشجيعهما في إنجاز هذا البحث في مخبر البحوث–2. والآنسة سلمى وهبي الذّهبي لكلّ ما قدّمته من مساعدة بكرم ومحبّة.

الأستاذ الدّكتور رائد أبو عودة من كليّة العلوم الصّحيّة في الشّارقة للمساعدة بما يخص السّلسلة، والدّكتور طوني سيوفي من شركة الشّام للتّقنيات المتقدّمة للمساعدة بما يخصّ البادئات النّوعيّة.

زملائي في قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة الّذين شاركوني علمهم ومعرفتهم ومهّدوا طريق المعرفة، وأخصّ بالذّكر الدّكتور عبد الله محمد، والّذين ساعدوني أثناء جمعي للعيَنات وأخصّ بالذّكر الدّكتورة مريم حيدر، الدّكتورة صبا خدّاج، الدّكتورة رهام النونو، والدّكتور أيمن الأصفر.

الأساتذة الأخصّائيين الدّكتور صلاح شيخة والدّكتورة ديمة عدوان والدّكتورة عبير كنجاوي من مستشفى التّوليد الجامعيّ لتسهيل جمع العيّنات والسّيدة آلاء وهبة والدّكتورة نور العاني من المستشفى الوطني الجامعيّ للمساعدة القيّمة في تحضير العيّنات للدّراسة.

إهداء

إلى عائلتي، صخرتي في هذه الحياة

عرفاني وامتناني على تفهّمكم أنّ عشقيّ الأبديّ للاستزادة من المعرفة حالة لا شفاء منها

أشكركم من كلّ قلبي على دعمكم الدّائم لي ومحبّتكم اللّامتناهية

إليكم أهدي هذا العمل المتواضع ...

فهرس المحتويات

المحتوى	الصّفحة
فهرس الأشكال التّوضيحيّة والصّور	VIII
فهرس الجداول	IX
قائمة المصطلحات والاختصارات	X
الملخّص	XVII
1- المقدّمة والأهداف	1
الإطار العام للبحث	2
1-1- المقدّمة	2
1-2- مشكلة البحث	3
1-3- تساؤلات البحث	3
1-4- هدف البحث	4
1-5- أهمّيّة البحث	4
1-6- مسوّغات البحث	5
1-7- محدوديّات البحث	6
1-8- منهج البحث وإجراءاته	7
2- الدّراسة المرجعيّة	9
2-1- الرّحم	10
2-2- الورم العضليّ الأملس الرّحميّ	12
2-2-1- الشّكل العيانيّ والهيستولوجيّ	12
2-2-2- عوامل الخطورة	14
2-2-3- الانتشار	14
2-2-4- الأعراض والعلامات	15
2-2-5- الإمراضيّة	16
2-2-6- التّشخيص والتّدبير والوقاية	18
2-3- الوحدة الفرعيّة 12 للمعقّد الوسيط (MED12)	19
2-3-1- الجين والبروتين	19
2-3-2- الوظيفة والتّأثير والطّفرات	20
2-3-3- تواتر وطبيعة وآليّة تأثير طفرات MED12-exon 2 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة	22
2-4- الخلاصة والغاية من الدّراسة	26

3- المواد والطّرائق	27
3-1- عيّنة ومكان الدّراسة	28
3-2- طرائق العمل	29
3-2-1- حجم العيّنة	29
3-2-2- الاعتبارات الأخلاقيّة	29
3-2-3- مراحل الدّراسة	29
3-2-3-1- المرحلة الأولى: أمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء	30
أ- جمع العيّنات المحفوظة من الأرشيف	30
ب- جمع العيّنات الطّازجة وتثبيتها وتحضيرها	30
ج- استخلاص الدنا الجينوميّ	33
د- التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز	37
3-2-3-2- المرحلة الثّانية: التّقصّي عن الطّفرات	39
أ- جمع العيّنات الطّازجة	40
ب- تثبيت العيّنات الطّازجة وتحضيرها واستخلاص الدنا الجينوميّ وتضخيم exon 2-MED12	40
ج- إجراء تفاعلات سلسلة للشّدف المضخّمة بالاعتماد على طريقة سانجر	40
3-2-3-3- المرحلة الثّالثة: تحليل النّتائج	41
4- النّتائج	43
4-1- نتائج أمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء	44
4-2- نتائج التّقصّي عن الطّفرات	47
5- المناقشة	54
6- الاستنتاجات والتّوصيات	65
7- قائمة المراجع	68
8- ملاحق البحث	76
Abstract	79

فهرس الأشكال التّوضيحيّة والصّور

المحتوى	الصّفحة
الشّكل 1. مقطع إكليلي في الرّحم	11
الشّكل 2. أورام عضليّة ملساء متعدّدة العدد متنوعة التّوضّع في رحم مستأصل	13
الشّكل 3. ورم عضليّ أملس رحميّ معزول كما يبدو عيانياً للعين المجرّدة	13
الشّكل 4. ورم عضليّ أملس رحميّ كما يبدو هيستولوجيّاً تحت المجهر الضّوئي بتلوين إيوزين وهيماتوكسيلين	13
الشّكل 5. منظر عياني لـ 45 ورم عضليّ أملس تمّ استخراجها من رحم مستأصلة من امرأة في الهند	16
الشّكل 6. رسم توضيحيّ لعمليّة إصمام الشّريان الرّحميّ	19
الشّكل 7. جين MED12 على الصّبغي X	20
الشّكل 8. آليّة عمل منتج جين MED12	21
الشّكل 9. منظر عياني للسّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة	22
الشّكل 10. دورة حياة الخليّة المنقسمة	25
الشّكل 11. صورة لأنسجة محفوظة ومثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين	28
الشّكل 12. صورة مشراح	31
الشّكل 13. شكل توضيحيّ لسلايدات رُفعت عليها مقاطع نسيجيّة مثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين	31
الشّكل 14. شكل توضيحيّ لخطة العمل في تحضير العيّنات الطّازجة وأمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء	32
الشّكل 15. صورة للجهاز الآليّ المستخدم في تلوين الأنسجة	33
الشّكل 16. مخطّط ترسيميّ لعمليّة استخلاص الدنا من النّسيج الموضوع بالبرافين	34
الشّكل 17. صورة لجهاز Nanodrop	36
الشّكل 18. صورة للحجيرة الخاصّة بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز	38
الشّكل 19. صورة لجهاز المدوّر الحراريّ	38
الشّكل 20. صورة لجهاز الرّحلان الكهربائيّ	39
الشّكل 21. صورة لجهاز إضاءة بالأشعة فوق البنفسجيّة مع نظام توثيق الجل والكاميرا	39
الشّكل 22. صورة لهلامة آغاروز 3% تُظهر نتائج عمليّة الرّحلان الكهربائيّ للعيّنات المستخدمة في أمثلة شروط الدّراسة	45
الشّكل 23. صور مجهريّة توضح كثافة خلويّة مختلفة للأورام العضليّة الملساء في العيّنات المدروسة	47
الشّكل 24. صورة لهلامة آغاروز 3% تظهر نتائج عمليّة الرّحلان الكهربائيّ للعيّنات المستخدمة في التّقصّي عن الطّفرات	49
الشّكل 25. نتائج سلسلة exon 2–MED12 في عدد من عيّنات الدّراسة مقارنة بالجينوم المرجعي باستخدام أداة المعلوماتيّة الحيويّة Geneious 4.8.4	51

الشّكل 26. مقارنة تسلسلات exon 2–MED12 في النّمط السّويّ والعيّنة 14 من الدّراسة الّتي أظهرت الطّفرة المزدوجة	52

فهرس الجداول

المحتوى	الصّفحة
الجدول 1. معدل حدوث طّفرات exon 2–MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في بعض الدّراسات حول العالم	23
الجدول 2. جدول المعالم المختارة لأمثلة شروط انتقاء الأنسجة	44
الجدول 3. تقييم تسلسلات exon 2–MED12 الّتي تمّ تحديدها في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في مريضات الدّراسة	48

قائمة المصطلحات والاختصارات

Absorbance	تماصّ
Agarose	أغاروز
Alignment	محاذاة
Allele(s)	أليل (ألائل)
Altered	متبدل
Amplicon	أمبليكون / مُضَخَّم نوويّ
Amplification	تضخيم
Amplified	مضخّم
Annealing	إعادة التّشافع / التّلدين
Anonymous	معمّى
Areolar	خلالي (هاليّ)
Atypical	لانمطي
Autosomal Dominant	جسدي سائد
Band(s)	عصابة (عصائب)
Base(s)	قاعدة (قواعد)
Beads	خرزات
Biomarker	واسم بيولوجي
Blank	شاهد
Body Mass Index, BMI	مؤشّر كتلة الجسم
Buffer	دارئة
Buffered	مدروء
Cellular	مفرط الخلويّة
Cervix	عنق الرّحم
Characterization	توصيف
Chemotherapy	علاج كيماوي
Chronic myeloid leukaemia (CML)	لوكيميا الخلايا النّقويّة المزمنة
Chromosome	صبغي
Classifier	مُصَنِّف
Clonal	نسيلي
Coding	ترميز
Codon(s)	رامزة/ روامز

Collagenous	كولاجيني
Columnar	إسطوانيّة
Compartmentalization	تجزئة / تحاوز
Conformational	هيئي
Conserved	محافِظ
Contraceptives	مانعات الحمل
Cornu	قرن
Coronal	إكليلي
Cultured	مستزرعة/ مستنبتة
Deformation	تشوه
Degenerative hyaline fibrosis	تليف هيالييني (زجاجي/ شفاف) تنكسي
Deleterious	مؤذ
Deletion	حذف
Denaturation	فكّ التّشافع / تمسّخ
Deoxyribonucleic Acid, DNA	حمض نووي ريبوزي منزوع الأكسجين، دنا
Deterioration	تدهور
Developmental	نمائيّة
Deviation	شذوذ / اختلاف / انحراف
Diagnostics	تشخيصيّة
Disrupting	تعطيل
Driver	قائدة / مسواق
Electrophoresis	رحلان كهربائيّ
Elute	فصل / شطف
Elution buffer	دارئة الفصل / الشّطف
Embedding	إسجّاء
Embedded	مسجّى / مسجّاة
Embolization	إصمام
Embryonic	جنينيّ
Environment	بيئيّ
Enzyme	إنزيم
Eosin	أيوزين

Epidermal growth factor receptor, EGFR	مستقبل عامل النّموّ الأدميّ
Epigenetic change	تبدل بالتّخلق المتوالي
Epithelium	ظهارة
Epitheloid	ظهاريّ
Ethidium Bromide	ايتيديوم بروميد
Ethnicity	العرقيّة/ الإثنيّة
Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA	حمض إيثيلين دايأمينيت تترا أسيتيك
Exon	إكسون
Exome	إكسوم
Extension	إطالة السّلسلة / تمديد
External os	فوّهة ظاهرة
Extracellular matrix (ECM)	مطرق خارج الخلايا
Extraction Kit	عتيدة استخلاص
Fallopian	فالوب
Fertilized egg	بيضة مخصّبة
Fetal	جنينيّ
Fibroblast	أرومة ليفيّة
Fibrotic	تليفيّ
Flow–through	سائل متدفق
Formalin fixed and paraffin embedded, FFPE	مثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين
Forward primer	بادئة أماميّة / تقدّميّة
Fragmentation	تشدّف
Frameshift	انزياح الإطار
Frequency	تواتر
Fundus	قاع
Gel documentation system	نظام توثيق الجل
GenBank	البنك الجيني
Gene	جين
Genesis	تكوّن/تكوين
Genetic	جينيّة
Genomic Deoxyribonucleic Acid, gDNA	دنا جينوميّ
Genopathology	باثولوجيّة جينيّة

Hematoxylin	هيماتوكسيلين
Hemoperitoneum	تدمّي الصّفاق
Hetero	متغاير (الألائل)
High Power field (HPF)	ساحة تكبير عالي (رؤية بتكبير x400)
Histology	هيستولوجيّ
Hormonal	هرمونيّ
Human epidermal growth factor receptor 2, HER2	مستقبل عامل النّموّ الأدميّ البشريّ 2
Hypertension	فرط ضغط الدّم
Immunohistochemistry	كيمياء هيستولوجيّة مناعيّة
Immunotherapy	علاج مناعيّ
Implantation	انغراس
Incidence	الإصابة / الوقوع
Initiating	بادئ
Insertion	إدخال
In silico	حاسوبيّة
In situ	في المَوْضِع/ لابد
Instability	عدم استقرار
Insulin-like growth factor 2, IGF2	عامل النّمو الشّبيه بالإنسولين
Internal os	فوّهة غائرة
Invasive	غزويّ
Isthmus	برزخ
Laboratory	مختبر
Leiomyoma, LM	ورم عضليّ أملس
Leiomyosarcoma, LMS	ساركوما عضليّة ملساء
Lifestyle	نمط حياة
Loading Dye	صبغة تحميل
Local	موضعيّ
Magnetic Resonance Imaging, MRI	تصوير بالرّنين المغناطيسيّ
Mediator complex subunit 12, MED12	وحدة المعقّد الوسيط 12
Menopause	سنّ الإياس
Menstrual cycle	دورة الحيض
Mental retardation	تأخر عقلي

Mesothelium	طبقة متوسطة
Metastases	نقائل
Microdissection	تشريح مجهريّ
Micron / Micrometer, μm	ميكرون/ ميكرومتر
Microscope	مجهر
Microscopic	مجهريّ
Microtome	مشراح
Millimeter, mm	ميليمتر (مم)
Missense mutation	طفرة مغيّرة
Mitochondria	متقدّرة
Molecular	جزيئيّ
Mutated	طافر
Mutation	طفرة
Myometrial	عضليّة رحميّة
Myxoid	مخاطيّ
NCBI	قاعدة البيانات العالميّة
Nucleotide	نوكليوتيد
Ovulation	إباضة
Panel	مجموعة (رعيل)
Parallel	على التّوازي
Parameter(s)	معلم / معالم
Passenger	عابرة
Pathobiology / Pathology	باثولوجيا
Pathogenesis	إمراضيّة / باثولوجيا سببيّة
Pathogenic mutations	طفرات ممرِضة
Pathogenicity	القدرة الإمراضيّة
Pear	كمثرى
Pelvic	حوضيّ
Peritoneum	صفاق
Personalized Medicine	طبّ شخصيّ
Physiologic	فيزيولوجيّ
Pivotal	محوريّ/ بالغ الأهمّيّة

Placental	مشيميّ
Polymerase chain reaction, PCR	تفاعل سلسليّ للبوليميراز
Polymorphism	تَعَدُّد أشكال
PCR Chamber	حجيرة خاصّة بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز
Posterior pituitary	نخاميّة خلفيّة
Precision medicine	طبّ دقيق
Prevalence	انتشار
Preventive	وقائيّة
Primers	بادئات / مشرعات
Progesterone receptor, PR	مستقبل البروجسترون
Proliferation	تكاثر
Purity	نقاوة
Race	العرق
Reagent	كاشف
Receptor modulator	مؤثر في المستقبِل
Remodeling	إعادة قولبة
Repair	إصلاح
Repression	كظم
Reprogram	يعيد برمجة
Reverse primer	بادئة عكسيّة
RNA Polymerase II, RNA-Pol-II	إنزيم بوليميراز الرنا الثّاني
Section	مقطع
Selection	انتقاء
Sequence	تسلسل
Sequencing	سلسلة
Serosa	مصليّة
Sigmoid colon	قولون سينيّ
Signaling	إطلاق إشارات
Signaling pathway	مسار إطلاق الإشارات
Silencing	إسكات
Single	مفردة

Smooth muscle	عضلة ملساء
Software	برمجيّة
Somatic mutation	طفرة جسميّة
Stem	جذعيّة
Stock solution	محلول أمّ
Stratum basalis	طبقة قاعديّة
Stratum functionalis	طبقة وظيفيّة
Stroma	سدى
Structure	بنية
Substitution	استبدال
Subunit	وحدة
Targeted therapy	علاج مستهدف
Thermocycler	جهاز المدوّر الحراريّ
Transcriptional	انتساخ
Transforming growth factor, TGF	عامِل نُمُوّ مُحُوِّل
Translocation	إزفاء
Truncated	مبتور
Tumor Suppressor Genes	جينات كابحة للورم
Ultrasound	أمواج فوق الصّوتيّة
Upregulation	تحسين تنظيم
Uterine	رحميّ
Uterine leiomyoma, uLM	ورم عضليّ أملس رحميّ
Vagina	مهبل
Variant	متغيّر
Vascular endothelial	بطانة الأوعية الدّمويّة
Vortex	دوّارة / خلّاط / رجّاج
Waist	خصر
Wild Type, WT	نمط سويّ (البري)

الملخّص

ملخّص موجز للنّقاط الرّئيسيّة في البحث: يعدّ الورم العضليّ الأملس الرّحميّ أشيع ورم نسائيّ حميد في سنّ النّشاط التّناسليّ وسبب رئيسيّ للعقم واستئصال الرّحم، وتعدّ طفرات الإكسون 2 من جين وحدة المعقّد الوسيط 12 (exon 2–MED12) أهمّ المتطلبات القائدة لتشكّله ومسؤولة عن 31–88% من الحالات عالميّاً. هدف البحث إلى دراسة إمراضيّة الورم والآليّة الجزيئيّة لتشكّله من خلال التّقصّي عن وجود طفرات exon 2–MED12 في مريضات سوريّات. تمّ أولاً العمل على 12 عيّنة مؤرشفة ذات ظروف تثبيت بالفورمالين وإسجاء بالبرافين مجهولة، ثم أمثلة شروط التّثبيت والتّحضير على 5 أورام للوصول لاستخلاص دنا جينوميّ ناجح، وأخيراً تضخيم الدنا بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز وسلسلته من 16 ورم للتّقصّي عن الطّفرات. لم ينجح استخلاص الدنا وتضخيمه من الأنسجة المؤرشفة، ونجح من 5 أورام طّازجة تمّ تثبيتها وإسجّاؤها يدويّاً. أظهرت نتائجنا وجود طفرات جسميّة ومتغايرة الألائل شائعة في الكودون 44، لكن تواترها أقلّ من الدّراسات العالميّة، وطفرة إدخال (G) في الكودون 35 جديدة يتوقّع أن تسبّب انزياح إطار التّرجمة وبروتينياً متبدّلاً أو مبتوراً وتمّ تسجيلها في البنك الجينيّ برقم PP979487. تصنّف جميع الطّفرات المكتشفة في الدّراسة "مسبّبة للمرض". البحث أوّل دراسة باثولوجيّة جينيّة في سوريّة وثاني دراسة في الوطن العربيّ تتقصّى MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة. تدعو إيجابيّة النّتائج لإجراء المزيد من الدّراسات على عيّنة أكبر لتحرّي تواتر طفرات exon 2–MED12 والآليات الجزيئيّة المساهمة في تشكّل الورم في المجتمع السّوريّ. يُعدّ فهم الآليات الجزيئيّة لهذه الأورام مهمّاً جدّاً للوقوف على إمراضيّتها والسّعي لعلاج غير جراحيّ في المستقبل مستند إلى الطّبّ الشّخصيّ والدّقيق، يستهدِف الطّفرات ويحافظ على الرّحم في سنّ النّشاط التّناسليّ.

الكلمات الرّئيسيّة: ورم عضليّ أملس رحميّ، exon 2–MED12، كودون44، كودون35، طفرة جسميّة، نسيج مثبّت بالفورمالين ومسجّى بالبرافين، سوريّة.

الفصل الأوّل

المقدّمة والأهداف

الإطار العام للبحث

1-1- المقدّمة

ينشأ الورم العضليّ الأملس الرّحميّ (الورم اللّيفيّ، العضلوم الأملس leiomyoma) من الخلايا العضليّة الملساء في الرّحم، وهو أشيع ورم نسائيّ حميد في سنّ النّشاط التّناسليّ. يسبّب هذا الورم مشكلة صحيّة مهمّة للعديد من النّساء حول العالم وقد وصل معدل انتشاره (prevalence) إلى 40-80% في الدّراسات العالميّة [Mäkinen *et al.*, 2017; Heinonen *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018; Machado-Lopez *et al.*, 2021; Mousa *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2022; Stewart and Nowak, 2022].

قد يتطوّر الورم العضليّ الأملس الرّحميّ بشكل تحت سريري فيعطي كتلاً لا عرضيّة. أمّا في الحالات الّتي يترافق مع وجود أعراض فتشمل غزارة طمث شديدة، عُسرُ طمث، سلس بول، آلام مختلفة الشّدّة في منطقة الحوض أو البطن، إمساك، أو نزيف رحميّ شاذّ. كذلك قد يسبّب الورم العضليّ الأملس الرّحميّ حدوث العقم، الولادة المبكّرة، أو الإجهاض. وقد يحدث في حالات أكثر ندرة تمزّق الورم وتدمّي الصّفاق (hemoperitoneum)، أو التّحوّل إلى ورم خبيث [Ligon and Morton, 2001; Zhang *et al.*, 2014; Mäkinen *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018; McKendrick *et al.*, 2024].

على الرّغم من شيوعه ورغم الدّراسات العالميّة العديدة حوله، فإنّ الأسباب المؤدّية لتشكّل الورم العضليّ الأملس الرّحميّ ما زالت بمجملها مبهمة. وفي دراسات حديثة برز اسم جين وحدة المعقّد الوسيط 12 (mediator complex subunit 12, MED12) كأحد أهمّ الجينات الطّافرة (mutated) في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة والّذي قد يكون مسؤولاً بمفرده عن تشكّل الورم (عامل قائد / مسواق driver)، إذ أُكتشفت طفرات (mutations) في الإكسون 2 منه (exon 2-MED12) في 31-88% من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المدروسة وأُكتشفت طفرات

أخرى في الإكسون 1 والإنترون 1 بمعدلات أقلّ بكثير [Mäkinen *et al.*, 2011a; McGuire *et al.*, 2012; Heinonen *et al.*, 2014; Kämpjärvi *et al.*, 2014; Wang *et al.,* 2015 Sadeghi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018; Machado-Lopez *et al.*, 2021; Keneme *et al.*, 2023].

كما وجد بأنّ طفرات MED12 قد تساهم في نموّ سرطانات شديدة العدوانيّة كالسّاركوما العضليّة الملساء (leiomyosarcoma)، إذ تعدّ طفرات MED12 أحد أشيع التّغيّرات الّتي تحدث في السّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة [Mäkinen *et al.*, 2016]. لذا، فمن المهمّ سريرياً فهم الآليّات الجزيئيّة للأورام العضليّة الملساء الرّحميّة حيث قد يؤدّي ذلك في المستقبل إلى تطوير طرق تشخيص وعلاج مستندة إلى الطّبّ الشّخصيّ والدّقيق (precision and personalized medicine) ممّا قد يساهم في تحسين أسلوب المعالجة وتخفيف معاناة المصابات.

1-2- مشكلة البحث

قد تسبّب الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة مشاكل عديدة للمصابات أهمها العقم أو استئصال الرّحم في الشّابات العازبات أو المتزوّجات غير المنجبات، والإجهاض في النّساء الحوامل، بالإضافة لإمكانيّة تحوّلها إلى الخباثة. مع ذلك، لا توجد في سوريّة دراسات حول إمراضيّة (pathogenesis) الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة أو انتشارها أو الأسباب الجزيئيّة (molecular) الكامنة خلف تكوّنها (genesis) خاصّة الطّفرات الشّائعة في جين MED12 أحد أهمّ العوامل المسبّبة لتشكّل هذه الأورام حسب الدّراسات العالميّة.

1-3- تساؤلات البحث

هل تتواجد طفرات في exon 2-MED12 في الأورام العضليّة الملساء المستأصلة من أرحام مريضات سوريّات؟

1-4- هدف البحث

تعدّ دراسة الأمراض أوّل خطوة على طريق إيجاد علاج لها، ومن هذا المنطلق هدف هذا البحث إلى دراسة إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في سوريّة من خلال دراسة باثولوجيّة جينيّة (genopathology) تمّ من خلالها التّقصّي عن وجود طفرات في exon 2-MED12 في عيّنة عشوائيّة ومقارنة النّتائج بالدّراسات العالميّة المنشورة حول هذا الموضوع.

1-5- أهمّيّة البحث

يهتمّ هذا البحث بتحديد أحد مسبّبات تشكّل الورم العضليّ الأملس الرّحميّ عن طريق دراسة عامل الخطورة الأكثر تواتراً في الدّراسات العالميّة وهو طفرات exon 2-MED12.

تكمن أهمّيّة هذا البحث في أنّه أوّل دراسة من نوعها في سوريّة وثاني دراسة في الوطن العربيّ. فعلى الرّغم من أنّ الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة شائعة الانتشار عالميّاً ومحليّاً، وبالرّغم من أنّ أوّل تقرير عن دور exon 2-MED12 في تشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة يعود الى 2011 [Mäkinen *et al.*, 2011a]، إلّا أنّه لم تتمّ في سوريّة دراسة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة سواء من وجهة نظر وبائيّة لتحديد انتشارها أو من حيث الإمراضيّة والأسباب بما فيها exon 2-MED12. فتأتي هذه الدّراسة لتفتح آفاقاً للتّعرّف على الآليّات الجزيئيّة الّتي تشارك في مسبّبات الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في المريضات السّوريّات. كما تُخبر الدّراسة عن طفرة جديدة لم تُنشر من قبل وتساهم في مجموعة الأدلة العالميّة الّتي تثبت أنّ جين MED12 يلعب دوراً محوريّاً بالغ الأهمّيّة في إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة.

بالإضافة لذلك، تميّزت هذه الدّراسة في أنّها قد حدّدت بعضاً من أهمّ المعايير الحاسمة لنجاح عمليات استخلاص وتضخيم الدنا (Deoxyribonucleic Acid, DNA) من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المثبّتة

بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين مثل تركيز المثبّت، ومدّة التّثبيت، ومعايير انتقاء المقاطع. تُستخدم الأنسجة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين على نطاق واسع في التّشخيص والأبحاث الطّبيّة الحيويّة عالميّاً. لذا تعدّ هذه الدّراسة مهمّة ومجزيةً ومؤثّرةً، لأنّها تمهّد الطّريق أمام أبحاث مستقبليّة في مختبرنا أو مختبرات المشافي الجامعيّة وغيرها في سوريّة والّتي تعتمد على تفاعل سلسليّ للبوليميراز (polymerase chain reaction, PCR) ناجح للقيام باختبارات جزيئيّة وجينيّة مثمرة مثل سلسلة الدنا (sequencing) وغيرها.

1-6- مسوّغات البحث

ينتشر الورم العضليّ الأملس الرّحميّ في سوريّة بشكل شائع، ويشهد على ذلك عدد الأرحام المستأصلة يوميّاً في مستشفى التّوليد الجامعيّ وشهادة وخبرة أساتذة الباثولوجيا في القطر، لكنّه غير مدروس حتّى الآن من النّاحية الإمراضيّة أي من وجهة نظر علم الباثولوجيا الخلويّة والجزيئيّة خاصّة فيما يتعلّق بالطّفرات المتواجدة في هذه الأورام.

تعاني المريضات من أعراض مختلفة بعضها شديد يؤثّر على نوعيّة حياتهنّ وحياة أسرهنّ، وقد يمتد التّأثير السّلبي إلى المجتمع ويشكّل عبئاً على قطاع الرّعاية الصّحيّة. إذ تشكّل المعالجة في حدّ ذاتها تحدّياً، فهي بمعظمها جذريّة وباضعة ومحدودة باستئصال الرّحم في الأورام الكبيرة الّتي تحتلّ معظم الرّحم ممّا يسبّب حدوث العقم، أو قد تقتصر على استئصال الورم العضليّ وحده إذا كان ذلك قابلاً للتّطبيق. لكن، حتّى استئصال الورم قد يقود للعقم بسبب التّندّب بعد العمل الجراحيّ [Ligon and Morton, 2001; Stewart and Nowak, 2022].

لذا يبدو من المهمّ فهم الآليّات الجزيئيّة لهذه الأورام، من أجل تطوير طرق تّشخيص وعلاج مستندة إلى الطّبّ الشّخصيّ والدّقيق، وتحسين أسلوب المعالجة، وتخفيف معاناة المصابات سريريّاً في المستقبل. يعدّ الطّبّ الدّقيق عماد المعالجة الحديثة وأساس التّوجه المستقبليّ نحو علاجات أفضل، ويعتمد الطّبّ الدّقيق في معالجة الأورام على تحديد الطّفرات الّتي يمكن العمل عليها ومحاصرتها بجزئيات مستهدِفة (targeted). إذ يتمّ استخدام الشّذوذات (الاختلافات / الانحرافات deviations) والطّفرات الجينيّة (genetic) المتكرّرة للتّشخيص وكأهداف علاجيّة في أنماط مختلفة من

السّرطانات، كما في استخدام مستقبل عامل النّموّ الأدميّ (EGFR) في سرطانات الرّئة، وإزفاء (translocation) BCR/ABL1 في لوكيميا الخلايا النّقويّة المزمنة (chronic myeloid leukaemia)، ومستقبل عامل النّموّ الأدميّ البشريّ (HER2) في سرطانات الثّدي [Crintea *et al.*, 2023; Leak *et al.*, 2023; Swain *et al.*, 2023].

الورم العضليّ الأملس الرّحميّ هو ورم حميد ونادراً ما يؤدّي للموت لكنّه شائع وسبب رئيسيّ للعقم واستئصال الرّحم [Bulun, 2013]. ويشير التّواتر (frequency) المتكّرر لطفرات exon 2–MED12 إلى إمكانيّة استخدام الطّفرات في التّشخيص والعلاج غير الجراحيّ للورم العضليّ الأملس الرّحميّ مستقبلاً، خاصّة للحفاظ على الرّحم في سنّ النّشاط التّناسليّ. ورغم أنّه لم يتمّ استهداف طفرات MED12 في الأورام العضليّة الملساء حتّى تاريخ إعداد هذه الأطروحة، إلّا أنّه يبدو علاجاً محتملاً ومنطقيّاً في المستقبل القريب. ومن هنا تأتي أهمّيّة وتميّز هذا البحث وفائدته للمريضات السّوريّات المصابات بالأورام العضليّة الملساء والحاملات لطفرات exon 2–MED12، فقد يصبح بالإمكان اعتماد المعالجات الجزيئيّة المستهدفة لديهم حال توفرها. كما أنّ اكتشاف طفرات exon 2–MED12 في السّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة يجعل دراسة هذه الطّفرات مبرّرة جدّاً.

1-7- محدوديّات البحث

تركّز الدّراسة على exon 2–MED12 فقط، فقد لا تتواجد الطّفرات في exon 2 في العيّنة المدروسة، إنّما قد تتواجد الطّفرات في مناطق أخرى من الجين. مع أنها حالات نادرة لكن تمّ الكشف في دراسات سابقة عن طفرات في الإكسون 1 [Kämpjärvi *et al.*, 2014]، وفي الإنترون 1 [Wang *et al.*, 2015] من الجين MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة. كذلك، قد لا تكون طفرات جين MED12 هي المسؤولة عن تكوّن الأورام في المريضات السّوريّات إنّما طفرات جينات أخرى والّتي تم اكتشافها في أورام عضليّة ملساء رحميّة في دراسات سابقة [Mehine *et al.*, 2016 and 2022; Välimäki *et al.*, 2023].

بالإضافة إلى ذلك، فإنّ صغر حجم العيّنة الّتي تمّ استقصاء الطّفرات فيها يعدّ من محدوديّات الدّراسة. إنّ عدم إمكانيّة إجراء البحث على نطاق أوسع أو اختيار عيّنة أكبر من المريضات يعود للأسباب التّالية:

أوّلاً، عدم إمكانيّة الاستفادة من العيّنات المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين (Formalin fixed and paraffin embedded, FFPE) في أرشيف المشافي الجامعيّة للحصول على الدنا المناسب لعمليّات التّضخيم والسّلسلة على غرار الدّراسات العالميّة. ممّا حتمّ على الباحثة ضرورة القيام بعدّة خطوات إضافيّة تمّ فيها البحث عن سبب فشل استخدام العيّنات المؤرشفة، ثمّ جمع عيّنات طازجة وإجراء التّثبيت والإسجاء بشكل يدويّ، ثمّ أمثلة شروط العمل، قبل الوصول لعمليّة استخلاص دنا ناجح لإجراء التّفاعل السّلسليّ للبوليميراز والسّلسلة.

ثانياً، الكلفة الباهظة لعتيدة الاستخلاص (extraction Kit) والّتي تشمل عدد عيّنات محدّد مسبقاً (24، 50، 100 عيّنة) وكذلك للكواشف اللّازمة للقيام بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز، وقد تمّ استهلاك الكثير منها في عمليّة البحث عن السّبب الكامن وراء فشل تضخيم الدنا المستخلص من العيّنات المؤرشفة وفي أمثلة معايير التّثبيت والانتقاء.

ثالثاً، الكّلفة الباهظة جدّاً لسلسلة الدنا والّتي تمّت خارج القطر.

ورغم تحقيق هدف الدّراسة بنجاح إلّا أنّه وبسبب العدد المحدود للعيّنات الّتي شملتها مرحلة التّقصّي عن الطّفرات (16 ورم) فلا يمكن رؤية نتائجنا من منظور أوسع أو تعميمها، فهناك حاجة إلى دراسة أكثر شمولاً تستخدم عدداً أكبر من الأورام لتقدير مساهمة طفرات exon 2–MED12 في إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في المريضات السّوريّات.

1-8- منهج البحث وإجراءاته

البحث هو دراسة باثولوجيّة جينيّة مقطعيّة مستعرضة معمّاة على عيّنات مثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين (Formalin fixed and paraffin embedded, FFPE) من أورام عضليّة ملساء رحميّة.

في البداية، تمّ جمع 12 من عيّنات البحث من العيّنات النّسيجيّة الّتي تأتي لمختبرات الباثولوجيا (في مستشفيي التّوليد والبيروني الجامعيّين) للتّشخيص الرّوتيني، وخضعت بالتّالي لبروتوكول الباثولوجيا المطبّق في المشافي الجامعيّة بدمشق. تمّ اختيار الجمهرة بشكل عشوائيّ من الحالات الّتي تمّ تشخيصها على أنّها أورام عضليّة ملساء رحميّة وأخذ عيّنات مطابقة من كلّ ورم. وبعد إعادة التّأكّد من التّشخيص بالفحص الباثولوجيّ المجهريّ تمّت محاولة استخلاص الدنا الجينوميّ (genomic)، وهي المرحلة الّتي تسبق عمليّات تضخيم exon 2–MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز وسلسلة الدنا. إلّا أنّ النّتائج كانت مخيّبة للآمال، إذ فشلت جميع المحاولات لاستخلاص دنا جينومي ذي جودة وتركيز مقبولين. تمّت محاولة حلّ هذه المعضلة، ولكن بعد عدّة محاولات، تمّ الخلاص إلى نتيجة أنّ شروط الحفظ والتّثبيت لا تناسب العمليّات الجزيئيّة وأنّ جودة و/ أو تركيز الدنا المستخلص ستبقى منخفضة، ولا يمكن بالتّالي تضخيمه.

تمّ تالياً تحديد الشّروط المثلى لعمليّات التّثبيت والانتقاء والّتي تناسب العمليّات الجزيئيّة بالعمل على 5 عيّنات طازجة من أورام عضليّة ملساء رحميّة تمّ استئصالها من رحم مريضة واحدة، وتمّ تثبيتها وإسجاؤها بالبرافين يدويّاً، ثمّ تمّ استخلاص الدنا الجينوميّ وتضخيم exon 2–MED12 بمساعدة البادئات / المشرعات النّوعيّة (primers). حال التّأكّد من نجاح عمليّة التّضخيم، تمّ جمع 16 ورم من 9 مريضات وتثبيتها وإسجاؤها وانتقاء المقاطع مع التّقيد بالشّروط المثلى المحدّدة، ثمّ تمّ استخلاص الدنا الجينوميّ منها وتضخيم exon 2–MED12 وسلسلته للكشف عن الطّفرات، وتمّ تسجيل النّتائج ومقارنتها بالدّراسات العالميّة المنشورة.

الفصل الثّاني

الدّراسة المرجعيّة

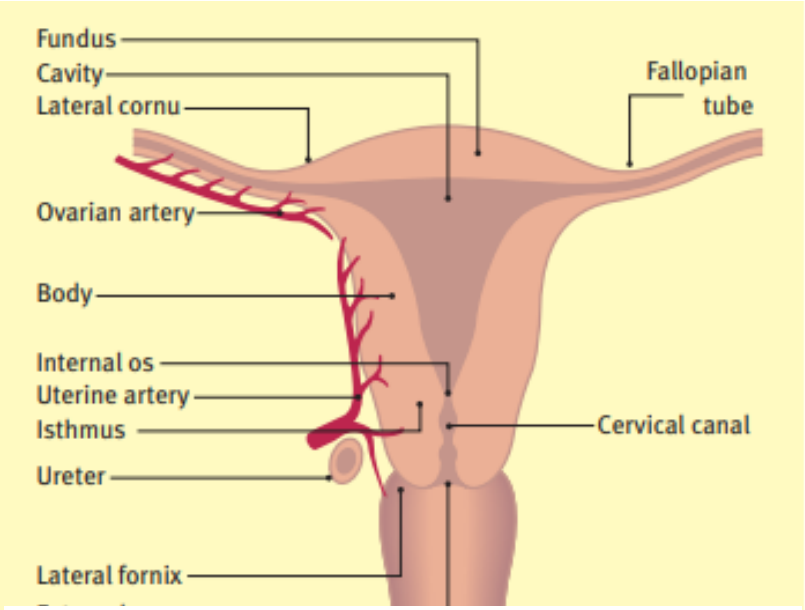
2-1- الرّحم

الرّحم عضو حوضيّ (pelvic) على شكل كمّثرى (pear)، يعمل كموضع فيزيولوجي (physiologic) لانغراس (implantation) البيضة المخصّبة (fertilized egg)، ويخضع لتغييرات لدعم الارتباط المشيميّ (placental) والتّطوّر الجنينيّ (embryonic/fetal) اللّاحق [Ellis, 2005; Kyle and Schwartz, 2024].

يتوضّع الرّحم خلف المثانة وأمام القولون السّينيّ (sigmoid colon)، بوزن وسطيّ 60 غ وطول 7.5 سم في الأنثى البالغة. يتكّون الرّحم من قاع (fundus) وجسم (body) وعنق (cervix). تدخل قناتي فالوب (fallopian) الرّحم في الزّاويا العلويّة الجانبيّة، وتدعى مواقع إدخال قناة فالوب في جسم الرّحم بالقرن (cornu)، ويقع فوقها قاع الرّحم. يضيق جسم الرّحم إلى خصر (waist) هو البرزخ (isthmus) والّذي يستمرّ كعنق الرّحم بينما يشبه مظهره الهيستولوجيّ (histology) بطانة (endometrial) جسم الرّحم. يبلغ طول البرزخ 1.5 مم، ويتميّز تقاطعه مع جسم الرّحم داخل تجويف الرّحم بالفوّهة الغائرة (internal os). تشكّل الفوّهة الغائرة صلة الوصل بين تجويف الرّحم وقناة عنق الرّحم وتفتح القناة في المهبل (vagina) عبر الفوّهة الظّاهرة (external os) (الشّكل 1) ، ويصبح البرزخ الجزء السّفليّ من الرّحم أثناء الحمل [Ellis, 2005; Kyle and Schwartz, 2024].

يتكّون الرّحم من النّاحية الهيستولوجيّة من ثلاث طبقات. الطّبقة الخارجيّة المصليّة (serosa/ الصّفاقperitoneum) وهي طبقة رقيقة تتكّون من نسيج ضامّ رخو وطبقة متوسطة (mesothelium). الطّبقة الوسطى وهي طبقة العضليّة الرّحميّة (myometrium)، وتشكّل الجدار البنيويّ للرّحم والمؤلّف بشكل أساسيّ من العضلات الملساء (smooth muscle). والطّبقة الدّاخليّة أو طبقة البطانة الرّحميّة (endometrium)، وهي الطّبقة المخاطيّة الّتي تبطّن تجويف الرّحم. تتكّون الطّبقة الدّاخليّة من الغدد البطانيّة (الّتي تفتح في تجويف الرّحم وتفرز المخاط)، ومن السّدى (stroma) المتخصّص (الّذي يضمّ الأوعية الدّمويّة واللّمفاويّة والأعصاب). تبطّن بطانة الرّحم ظهارة أسطوانيّة (columnar epithelium)، وتكون الظّهارة على طبقتين، الطّبقة القاعديّة (stratum basalis) العميقة وتستجيب

بشكل طفيف للهرمونات وتعمل على تجديد الطّبقة الوظيفيّة بعد الدّورة الحيضيّة (menstrual cycle)؛ والطّبقة الوظيفيّة (stratum functionalis) وهي الطّبقة السّطحيّة من بطانة الرّحم الّتي تستجيب للهرمونات وتخضع لتّغيّرات وظيفيّة ومورفولوجيّة طوال الدّورة الحيضيّة وتتساقط خلالها [Campbell, 2005; Kyle and Schwartz, 2024].



الشّكل 1. مقطع إكليلي (coronal) في الرّحم [Ellis, 2005].

يخضع نموّ الرّحم ونشاطه إلى حدّ كبير للسّيطرة الهرمونيّة، والّتي تمتدّ خلال الدّورة الحيضيّة والحمل والولادة. وعلى سبيل المثال أثناء الدّورة الحيضيّة يحفّز الإستروجين نشاط عضلة الرّحم ويجعلها أكثر حساسية للأوكسيتوسين (المنتج من الغدّة النّخاميّة الخلفيّة posterior pituitary)، وتكون مستويات الإستروجين أعلى ما يمكن قبل الإباضة (ovulation)، ممّا يزيد من حركة قناة فالوب وربّما يساعد في حدوث الحمل. بينما يمنع البروجسترون، الّذي يفرزه المبيض في النّصف الثّاني من الدّورة الحيضيّة نشاط عضلة الرّحم ويجعلها أقلّ حساسيّة للأوكسيتوسين، فيمنع تقلّص العضلات وبالتّالي يشجّع على الانغراس. كما يتمّ أثناء الدّورة الحيضيّة تحفيز انقباضات الرّحم بواسطة البروستاغلاندين [Campbell, 2005; Kyle and Schwartz, 2024].

2-2- الورم العضليّ الأملس الرّحميّ

2-2-1- الشّكل العيانيّ والهيستولوجيّ

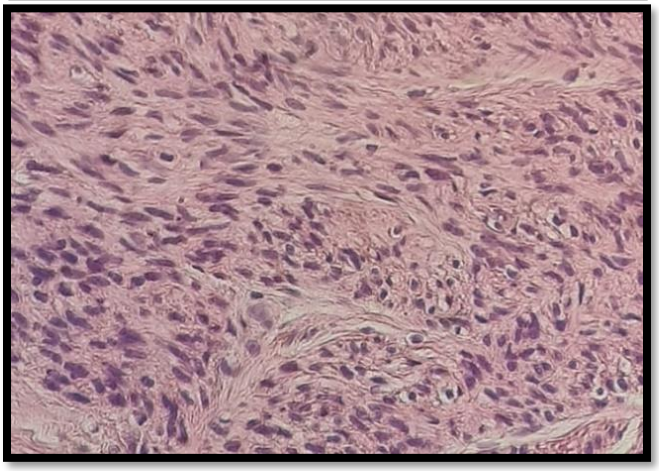
عيانيّاً، يكون الورم مستدير الشّكل، ومختلف الحجم، ومتباين العدد والتّوضع. إذ قد يكون حجم الورم مجهريّاً وقد يتجاوز حجمه الـ 10 سم، كما قد يكون مفرداً أو متعدّداً، وقد يتوضّع تحت البطانة أو ضمن العضلة الرّحميّة أو فوق الطّبقة المصليّة للرّحم (الشّكل 2). قد تبدو الأورام متماثلة الشّكل للعين المجرّدة فتتكّون من عقيدات حُزميّة بيضاء إلى رماديّة اللّون (الشّكل 3) وقد تحيط بها محفظة كاذبة من نسيج خلاليّ (هاليّ areolar) وألياف عضليّة متراصّة، إلّا أنّها غير متماثلة من النّاحية الهيستولوجيّة والإمراضيّة [Moore *et al.*, 2010; Koltsova *et al.*, 2023].

هيستولوجيّاً، تتكّون جميع الأورام بشكل أساسيّ من تكاثر (Proliferation) خلايا عضليّة ملساء وحيدة النّسيلة (clonal) غير طبيعيّة وذات مؤشّر انقسام منخفض (الشّكل 4)، لكنها تضمّ أيضاً أورمات ليفيّة (fibroblasts) وخلايا بطانة الأوعية الدّمويّة (vascular endothelial cells)، ومطرق خارج الخلايا (extracellular matrix, ECM) متنوع الكمّيّة والتّركيب كما تتباين البيئة المحيطة بالأورام [Matsubara *et al.*, 2013; Holdsworth-Carson *et al.*, 2016].

وبالمثل، فآليّات متنوّعة ومعقّدة تكمن وراء إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة وبداية ظهورها، والمتطلّبات الأساسيّة القائدة (driver) والعابرة (passenger) المرافقة لتكّونها. لذا، فإنّ التّمييز بين خصائص الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة وجميع العوامل المؤثّرة الّتي تساهم في ظهور الورم وإمراضيّته أمر مهمّ للغاية [Matsubara *et al.*, 2013; Holdsworth-Carson *et al.*, 2016; Mehine *et al.*, 2016; Mäkinen *et al.*, 2017; Machado-Lopez, 2021; Ishikawa *et al.*, 2023; Koltsova *et al.*, 2023].

الشّكل 2. أورام عضليّة ملساء متعدّدة العدد متنوّعة التّوضّع في رحم مستأصل [https://medicine.en-academic.com/135490/leiomyoma_uteri].

الشّكل 3. ورم عضليّ أملس رحميّ معزول كما يبدو عيانيّاً للعين المجرّدة.



الشّكل 4. ورم عضليّ أملس رحميّ كما يبدو هيستولوجيّاً تحت المجهر الضّوئيّ بتلوين أيوزين وهيماتوكسيلين (H&E).

2-2-2- عوامل الخطورة

تساهم عوامل عديدة في تشكّل الورم العضليّ الأملس الرّحميّ، ومن أهمّ عوامل الخطورة الّتي تمّ تحرّيها: العمر، العرق (race) (فالنّساء الأمريكيّات من أصل إفريقي هن أكثر إصابة من النّساء القوقازيات)، مؤشّر كتلة الجسم (BMI) المرتفع / البدانة، فرط ضغط الدّم (hypertension)، عدم التّوازن الهرموني (hormonal)، بدء الطّمث الباكر، استخدام مانعات الحمل (contraceptives) في عمر مبكّر (< 16 سنة)، التّعرض إلى المركّبات الكيميائيّة الّتي تعطلّ الجملة الصّماويّة (endocrine)، ونمط الحياة (كالغذاء، ومستوى التّوتر، ومستويات فيتامين د) (lifestyle). ذلك بالإضافة للدّور الّذي تلعبه الوراثة والعوامل الجينيّة والّذي ظهر تأثيرها من خلال وجود أنماط عائليّة من الورم ومن خلال الدّراسات على التّوائم [Stewart *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018]. كلّ هذه العوامل قد تعيد برمجة (reprogram) الخلايا العضليّة الرّحميّة الجذعيّة (myometrial-stem) ممّا يؤدّي إلى تشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة [Muawad *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022]. على العكس من ذلك، فإنّ استخدام مانعات الحمل البروجسترونيّة وتعدّد الولادات ينقص من خطر تشكّل هذه الأورام.

تزيد بعض عوامل الخطورة كعدم الإنجاب، وبدء الطّمث الباكر، وانقطاع الطّمث المتأخّر، والبدانة من حجم هذه الآفات أيضاً، بينما يتراجع حجم الورم العضليّ الأملس الرّحميّ بعد انقطاع الطّمث (كما في سنّ الإياس menopause)، ممّا يؤكّد دور هرموني الإستروجين والبروجسترون في تنظيم نموّ الورم [Ligon and Morton, 2001; Flake *et al.*, 2003].

2-2-3- الانتشار

تعدّ الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة الأورام الحميدة الأكثر انتشاراً في الجهاز التّناسليّ الأنثويّ [Baird, 2003]. لأهمّيتها، تمّ إجراء العديد من الدّراسات على هذه الأورام في مناطق مختلفة من العالم مثل الولايات المتّحدة الأمريكيّة، وفنلندا، والصّين، وكوريا، واليابان، وجنوب أفريقيا، والشّرق الأوسط، وغيرها. يتقلّب معدّل الإصابة بهذه الأورام بين

البلدان وحتّى بين الأعراق المختلفة داخل نفس البلد. يُقدّر معدّل الانتشار (prevalence) العالميّ بنحو 40–80% في حين يبلغ معدّل الإصابة / الوقوع (incidence) 20–77% في مختلف أنحاء العالم [Mäkinen *et al.*, 2011a and b; McGuire *et al.*, 2012; Je *et al.*, 2012; Matsubara *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017; Laughlin-Tommaso *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Mousa *et al.*, 2021; Cheng *et al.,* 2022; Stewart and Nowak, 2022].

2-2-4- الأعراض والعلامات

قد يتطوّر الورم العضليّ الأملس الرّحميّ بشكل تحت سريري فيعطي كتلاً لا عرضيّة. أمّا في الحالات الّتي يترافق فيها الورم مع وجود أعراض، فتتباين الأعراض في حدّتها وشدّتها تبعاً لحجم الكتل وعددها وتوضّعها في الرّحم، وقد تؤثّر بشكل كبير على نوعيّة حياة المريضة المصابة [Milewska *et al.*, 2024]. وقد تستحلّ الكتل الورميّة كامل الرّحم فتسبّب مشكلة مهمّة جدّاً للمريضة. ففي واحدة من الحالات المثيرة للاهتمام، تمّ استخراج 45 ورم عضليّ أملس بوزن كليّ 5 كغ وبحجم كليّ (22x19x13.5سم) من رحم امرأة في الهند خلال جائحة كوفيد- 19 (الشّكل 5). كانت المريضة بعمر 43 سنة ولديها ثلاث حالات ولادة وثلاثة أطفال [Katke *et al.*, 2021].

تغطّي الأعراض، إن وجدت، طيفاً واسعاً يشمل نزيفاً مهبليّاً شاذّاً شديداً قد يترافق مع فقر دم، غزارة طمث شديدة، عُسر طمث، إمساكاً، آلاماً مختلفة الشّدّة في منطقة الحوض أو البطن، وسلس بول. كذلك، قد يسبّب الورم العضليّ الأملس الرّحميّ حدوث العقم، الولادة المبكّرة، أو الإجهاض. وقد يحدث في حالات أكثر ندرة تمزّق الورم وتدمّي الصّفاق، أو تحوّل إلى خباثة (0.5% من الحالات) [Ligon and Morton, 2001; Zhang *et al.*, 2014; Mäkinen *et al.*, 2017; Al-Hendy *et al.*, 2017a; Lee *et al.*, 2018; Coutinho *et al.*, 2022; Stewart and Nowak, 2022; McKendrick *et al.*, 2024].

الشّكل 5. منظر عياني لـ 45 ورم عضليّ أملس تم استخراجها من رحم مستأصلة من امرأة في الهند [Katke *et al.*, 2021].

2-2-5- الإمراضيّة

على الرّغم من شيوعه ورغم الدّراسات العالميّة العديدة حوله، فإنّ الأسباب المؤدّية لتشكّل الورم العضليّ الأملس الرّحميّ ما زالت بمجملها مبهمة. تُسلّط نتائج الأبحاث العالميّة المتراكمة الضّوء على العوامل المعقّدة الّتي تساهم في تكوين الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة وهي العوامل الوراثيّة والجينيّة، بالإضافة للبيئة (environment)، ونمط الحياة [Amendola *et al.*, 2024; Vafaei *et al.*, 2024].

فقد بيّنت دراسات سابقة دوراً لبعض الشّذوذات الصّبغيّة (في الصّبغيات 6، و7، و12، و14) في تطوّر الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في 40- 50% من الحالات. كما تمّت دراسة الدّور الّذي تلعبه الطّفرات، وتغير التّعبير و/أو حالة المثيلة (إضافة الميثيل methylation) في جينات المستقبلات الهرمونيّة (hormone receptor)، وعوامل النّمو (growth factors)، وجينات إصلاح الدنا (repair)، وجينات المطرق خارج الخلايا (ECM)، وجينات

الكولاجين (collagen) والمتقدّرات (mitochondrial) في إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة [Ligon and Morton, 2001; Sandberg, 2005; Parker, 2007; Islam *et al.*, 2013; Montgomery *et al.*, 2014; Sant'anna *et al.*, 2017].

وفي دراسات أخرى برز اسم جين MED12 بقوّة كأحد أهمّ الجينات الطّافرة في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة وبتواتر مرتفع جدّاً يصل إلى 88% [Mäkinen *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2018]. وفي هذا الصّدد، أصبح يُعتقد أنّ الطّفرات الجسميّة (somatic) في MED12 هي السّبب الرّئيس لتشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة، مع اعتماد نموّها وتطوّرها على عوامل النّمو، والسّيتوكينات، والهرمونات السّتيروئيديّة المبيضيّة والّتي تحرّض تكاثر الخلايا العضليّة الملساء وتسبّب زيادة إنتاج المطرق خارج الخلايا [Islam *et al.*, 2018].

فعلى سبيل المثال فيما كان هرمون الإستروجين يُعتبر لفترة طويلة العامل البادئ (initiating) الأكثر أهمّيّة في نموّ وتطوّر الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة، بدأت الأبحاث الحديثة تشير إلى أنّ هرمون البروجسترون يلعب دوراً رئيسيّاً على أكثر من صعيد [Kim and Sefton, 2012; Milewska *et al.*, 2024]. ويبدو ذلك جليّاً بالنّظر إلى ازدياد التّعبير عن المستقبلات البروجسترونيّة النّوويّة في هذه الأورام [Patel *et al.*, 2015]. ومع أنّ الصّورة النّهائيّة لتوصيف دور المستقبلات البروجسترونيّة في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة لم تتضح بشكل كامل، يعتقد أنّ للبروجسترون دوراً مهمّاً في التّغيّرات المتعلّقة بالتّخلّق المتوالي (epigenetic) والّذي يؤدّي إلى حدوث طفرات في الخلايا العضليّة الرّحميّة الطّبيعيّة [Stewart and Nowak, 2022].

كذلك ينظّم عامل النّموّ المحوّل Transforming growth factor-β (TGF-β) التّعبير عن الجينات المشاركة في إعادة قولبة (remodeling) الأنسجة وتنظيم المطرق خارج الخلايا [Massague, 2012]، إذ يؤدّي تحسين تنظيم (upregulation) إطلاق إشارات TGF-β (signaling) في الخلايا العضليّة الملساء الرّحميّة إلى تطوّر النّمط الظّاهريّ التّليفيّ (fibrotic) فيها [Lewis *et al.*, 2019].

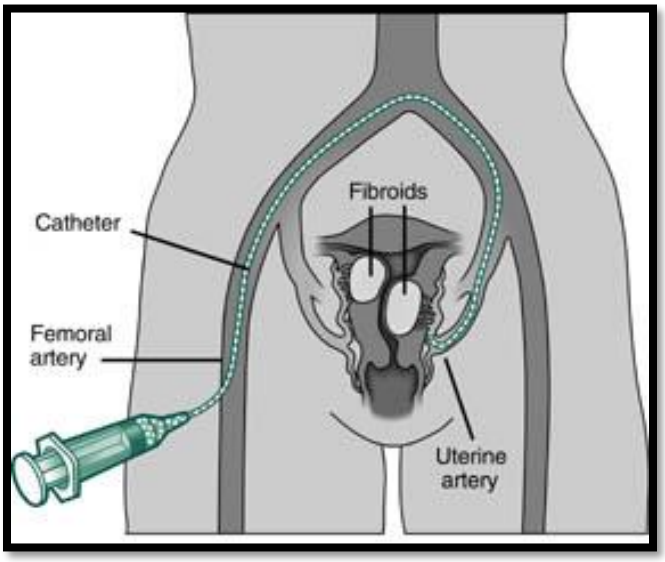
تبيّن دراسة سابقة أنّ البروجسترون يحسّن تنظيم التّعبير عن TGF-β في الخلايا العضليّة الملساء الرّحميّة [Arici and Sozen, 2000]. ممّا يعطي أهمّيّة خاصّة للأدوية الّتي تعمل كمؤثّرات في مستقبل البروجسترون (receptor modulator) والّتي ستناقش لاحقاً.

2-2-6- التّشخيص والتّدبير والوقاية

يتمّ تشخيص الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة بالقصّة المرضيّة، والفحص السّريري، والأمواج فوق الصّوتيّة في معظم الحالات، ويمكن اللّجوء للتّصوير بالرّنين المغناطيسيّ في الحالات الّتي تحتاج دراسة أكثر تفصيلاً.

تتمّ معالجة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة دوائيّاً بمسكّنات ألم، ومضادات التهاب غير ستيروئيديّة، وأدوية هرمونيّة للتّخفيف من الأعراض، إلّا أنّها معالجة مؤقّتة ومحدودة وداعمة فقط، ففي حال التّوقف عن استخدامها قد تعاود الأعراض هجماتها. يخفّض إصمام الشّريان الرّحميّ (الشّكل 6) من تدفّق الدّم إلى الأورام وقد يخفّف من حدّة الأعراض، لكن يبقى التّداخل الجراحيّ لاستئصال الورم وحده أو الرّحم كاملاً العلاج الأنجح لهذه الأورام.

يشكّل التّداخل الجراحيّ في حدّ ذاته تحدّياً، فهو معالجة جذريّة وباضعة تتمحور حول استئصال الرّحم في الأورام الكبيرة الّتي تحتلّ معظم الرّحم ممّا يسبّب حدوث العقم، أو استئصال الورم العضليّ إذا كان قابلاً للتّطبيق. وحتّى استئصال الورم فقط قد يقود للعقم بسبب التّندّب بعد العمل الجراحيّ. تبيّن الدّراسات العالميّة أنّ الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة هي المسؤول الأوّل عن حالات استئصال الرّحم. وعلى سبيل المثال، في الولايات المتّحدة الأمريكيّة تشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة لوحدها أكثر من ثلث حالات استئصال الرّحم سنوياً [Ligon and Morton, 2001; Stewart and Nowak, 2022].



الشّكل 6. رسم توضيحيّ لعمليّة إصمام الشّريان الرّحميّ [https://www.medicaltourismco.com].

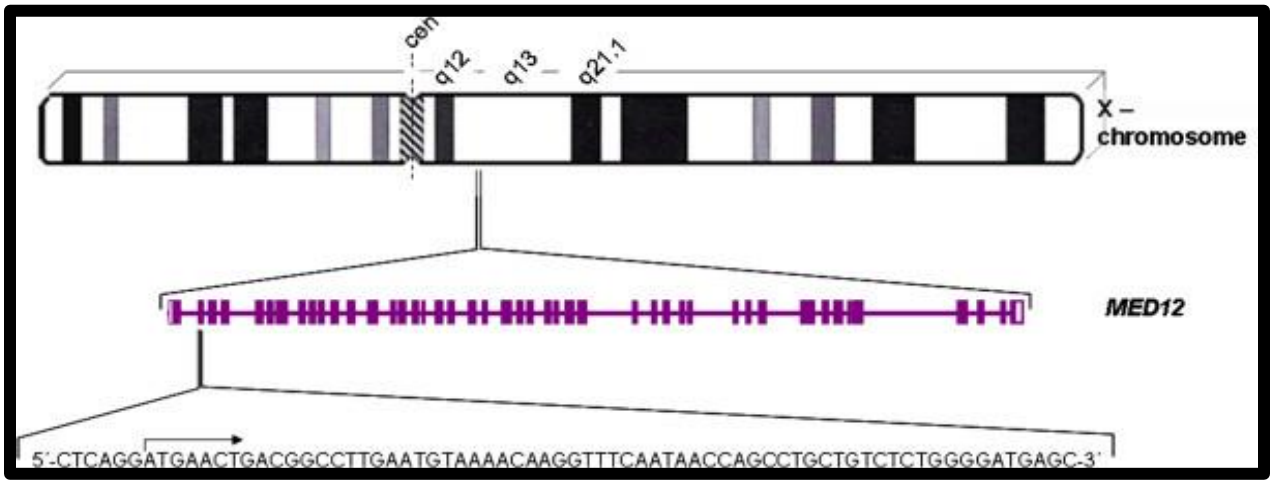
تسلّط بعض الأبحاث الحديثة الضّوء على إمكانيّة تعزيز الوقاية من حدوث الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة من خلال تعديلات في عوامل الخطورة الّتي يمكن التّحكّم فيها مثل نمط الحياة والغذاء والبيئة والّتي من شأنها تحسين جودة حياة المريضة [Stewart *et al.*, 2016; Vafaei *et al.*, 2024].

2-3- الوحدة الفرعيّة 12 للمعقّد الوسيط (MED12)

2-3-1- الجين والبروتين

يعدّ جين MED12 والّذي يقع على الذّراع الطّويل من الصّبغيّ X في الموقع (Xq13.1) أحد أهمّ الجينات القائدة في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة، والّتي تمّت دراستها بكثافة والتّحقيق فيها على نطاق واسع في مجموعات عرقيّة مختلفة حول العالم. يتألّف جين MED12 من 23899 قاعدة (base)، يتواجد 6531 قاعدة منها في 45 إكسون ترميز (coding) (الشّكل 7) [Mäkinen *et al.*, 2011a and b]، بينما يضمّ بروتين MED12 2177 حمضاً

أمينيّاً (243081 دالتون). يتألف موضوع الدّراسة (exon 2–MED12) من 105 قواعد تزّمز 35 حمضاً أمينيّاً [Lee *et al.*, 2018; Machado-Lopez *et al.*, 2021].



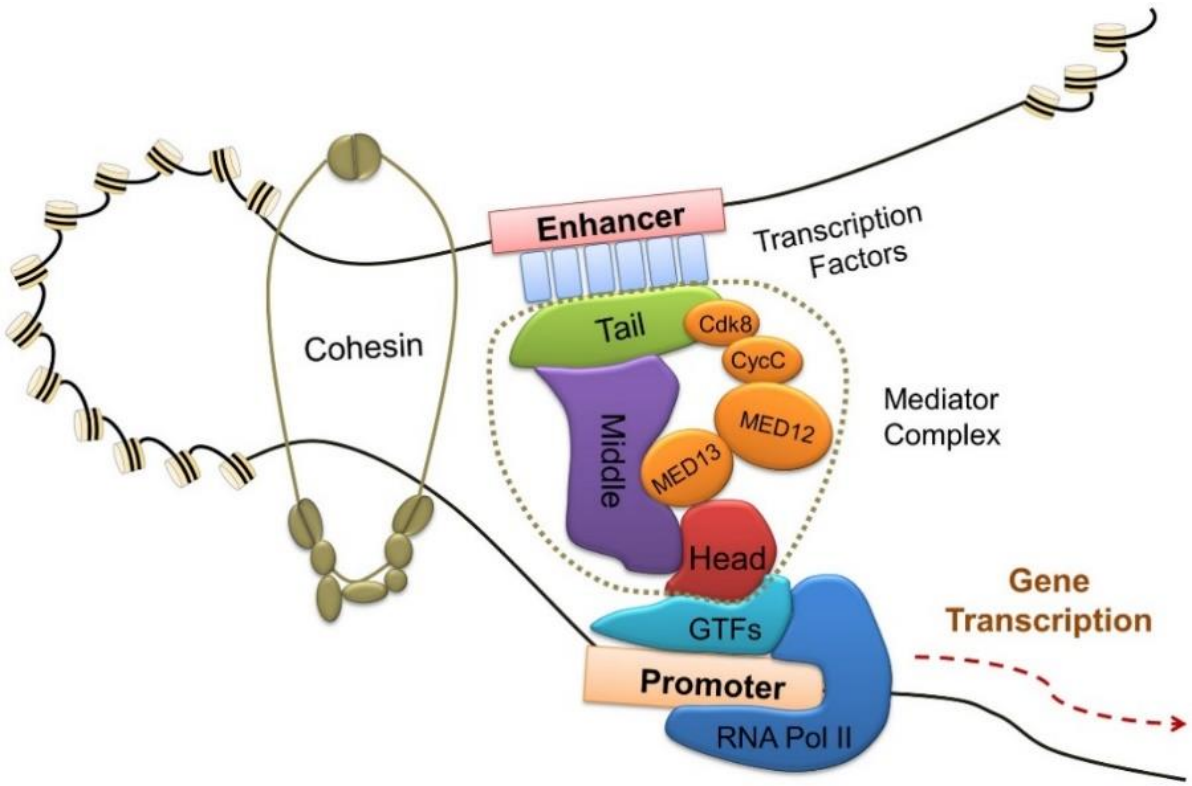
الشّكل 7. جين MED12 على الصّبغيّ X [Markowski *et al.*, 2013].

2-3-2- الوظيفة والتّأثير والطّفرات

يعمل بروتين MED12 كوحدة من وحدات المعقّد الوسيط والّتي يبلغ عددها 26 في البشر. يشارك المعقّد الوسيط في تنظيم نشاط إنزيم بوليميراز الرنا الثّاني RNA Polymerase II من خلال التّوسط بين الإنزيم وعوامل انتساخ مختلفة (الشّكل 8)، فيؤثّر على تنشيط وكظم عمليّة الانتساخ. كما يشارك البروتين في العديد من العمليّات النّمائيّة (developmental)، لذا قد ينجم عن طفرات وراثيّة في جين MED12 أو تبدّل في تعبيره الجينيّ اضطرابات سلوكيّة أو متلازمات مثل FG وLujan-Fryns والّتي تتميز بتأخر عقليّ (mental retardation) [Taatjes *et al.*, 2010; Mäkinen *et al.*, 2011a; Lee *et al.*, 2018; Richter *et al.*, 2022].

وغالباً ما يطفُر الجين في الأورام الحميدة والخبيثة على حدّ سواء. فبالإضافة للطّفرات المدروسة في الأورام العضليّة الملساء الحميدة تم الكشف عن طفرات في عدد من الإكسونات في جين MED12 أو تبدّل في تعبيره الجينيّ

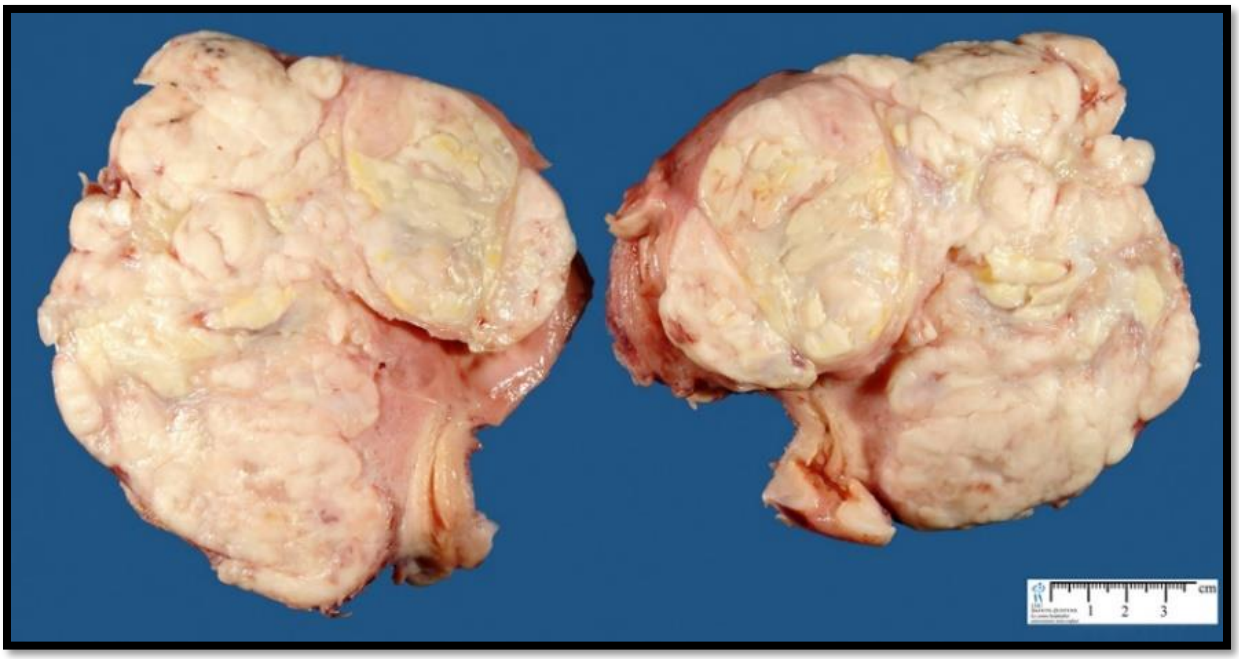
في سرطانات أعضاء مختلفة، كالثّدي، والبروستات، والكولون، والرّئة، والكظر، والمبيض [Mäkinen *et al.*, 2011a; Je *et al.*, 2012; Mäkinen *et al.*, 2016; Machado-Lopez *et al.*, 2021].



الشّكل 8. آليّة عمل منتج جين MED12. يعمل المنتج كوحدة في المعقّد الوسيط الّذي ينظّم (تنشيطاً أو كظماً) الانتساخ بإنزيم RNA polymerase II [Zhang *et al.*, 2020].

وتساعد طفرات في exon 2-MED12 على نموّ سرطانات شديدة العدوانيّة كالسّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة ذات معدّلات البقيا المنخفضة ومعدّلات النّكس المرتفعة (الشّكل 9). تحدث معظم حالات السّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة عند النّساء فوق سنّ الخمسين، وتتداخل أعراض هذا السّرطان بشكل كبير مع أعراض الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة الحميدة، ممّا يجعل التّشخيص المبكّر للسّاركوما المذكورة صعباً [Mäkinen *et al.*, 2017]. تعدّ

طفرات exon 2–MED12 أحد أشيع التّغيّرات الّتي تحدث في السّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة والّتي قد تصل لـ 30% من الحالات ممّا يؤكّد أهمّيّة دراسة exon 2–MED12 والتّحقيق فيه [Ravegnini *et al.*, 2013; Mäkinen *et al.*, 2016 and 2017; Park *et al.*, 2018].



الشّكل 9. منظر عياني للسّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة [https://www.humpath.com/spip.php?article2434**].**

2-3-3- تواتر وطبيعة وآليّة تأثير طفرات exon 2–MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة

تمّت دراسة exon 2–MED12 باستفاضة لما تبيّن لهذا الإكسون من دور أساسيّ في عمل البروتين، ولاحتوائه على معظم الطّفرات. إذ وجدت بعض الدّراسات أن معظم الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المدروسة (71–88%) تضمّ طفرات جسميّة في exon 2، خاصّة الأورام المتعدّدة والصّغيرة (<30 مم) [Mäkinen *et al.*, 2011a; Heinonen *et al.*, 2017; Ishikawa *et al.*, 2023; Keneme *et al.*, 2023]. لكن عندما تمّ استقصاء تواتر الطّفرات على نطاق أوسع اختلف معدّل تواترها بشكل كبير حيث بلغ 31–88% حول العالم. قد يعود هذا الاختلاف إلى طبيعة

الدّراسة ومنطقتها الجغرافيّة وبالتّالي تبعاً للمجموعات العرقيّة الّتي تمّت الدّراسة عليها، كذلك إلى اختلاف عدد المريضات المشاركات مما يعطي أهمّيّة مختلفة لكل دراسة (الجدول 1).

الجدول 1. معدل حدوث طفرات exon 2–MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في بعض الدّراسات حول العالم.

الدّراسة	بلد الدّراسة	عدد المريضات	عدد الأورام	معدل حدوث الطّفرات في الأورام
Keneme *et al.*, 2023	السّنغال	50	50	%88
Mäkinen *et al.*, 2011a	فنلندا	80	225	%71
Mäkinen *et al.*, 2011b	جنوب أفريقيا	18	28	%50
Markowski *et al.*, 2012	ألمانيا الاتحاديّة	50	80	%47
Ajabnoor *et al.*, 2018	المملكة العربيّة السّعوديّة	77	77	%44
Sadeghi *et al.*, 2016	جمهوريّة إيران الإسلاميّة	58	103	%31.1

أظهرت دراسات سابقة أنّ معظم الطّفرات الجسميّة في exon 2–MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة هي من نمط طفرات حذف (deletion) وطفرات إدخال (insertion) وطفرات مغيّرة (مغلوطة المعنى missense)، حيث وجد أنّ الكودون 44 يخضع لأعلى نسبة تطفير، والّتي قد تصل إلى 53.1–100% من الطّفرات [Mehine *et al.*, 2013; Heinonen *et al.*, 2014; Amendola *et al.*, 2024].

جدير بالذّكر أنّه في هذه الدّراسات وبإجراء السّلسلة على كامل الدنا المستخلص لم يتمّ الكشف عن أيّة طفرات في جينات أخرى في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المدروسة، ممّا يدلّ على أنّ طفرات جين MED12 قد تكون وحدها المسؤولة عن تكوّن الورم [Mäkinen *et al.*, 2011a and 2014; Heinonen *et al.*, 2017; Machado–Lopez, 2021]. وانطلاقاً من هذا السّبب تمّ تعيين دوراً وظيفيّاً رئيسيّاً وقائداً لجين MED12 في إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة [Zhang *et al.*, 2020].

كما دعمت أسباب أخرى فكرة الجين القائد لـMED12، إذ يؤدّي التّعبير عن متغيّر مغيّر في exon 2– MED12 (c.131G>A، الكودون 44) في رحم الفأر إلى تكوين أورام عضليّة ملساء في وقت أبكر ممّا يحدث في النّمط الطّبيعيّ [Mittal *et al.*, 2015]. كما أنّ إسكات (silencing) جين MED12 في خلايا الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المستنبتة (cultured) يقلّل من تكاثرها [Al-Hendy *et al.*, 2017b].

تمّت دراسة آليّة تأثير طفرات exon 2–MED12 الجسميّة على نموّ وتكاثر الخلايا العضليّة الملساء الرّحميّة وتبيّن أن لهذه الطّفرات التّأثيرات التّالية:

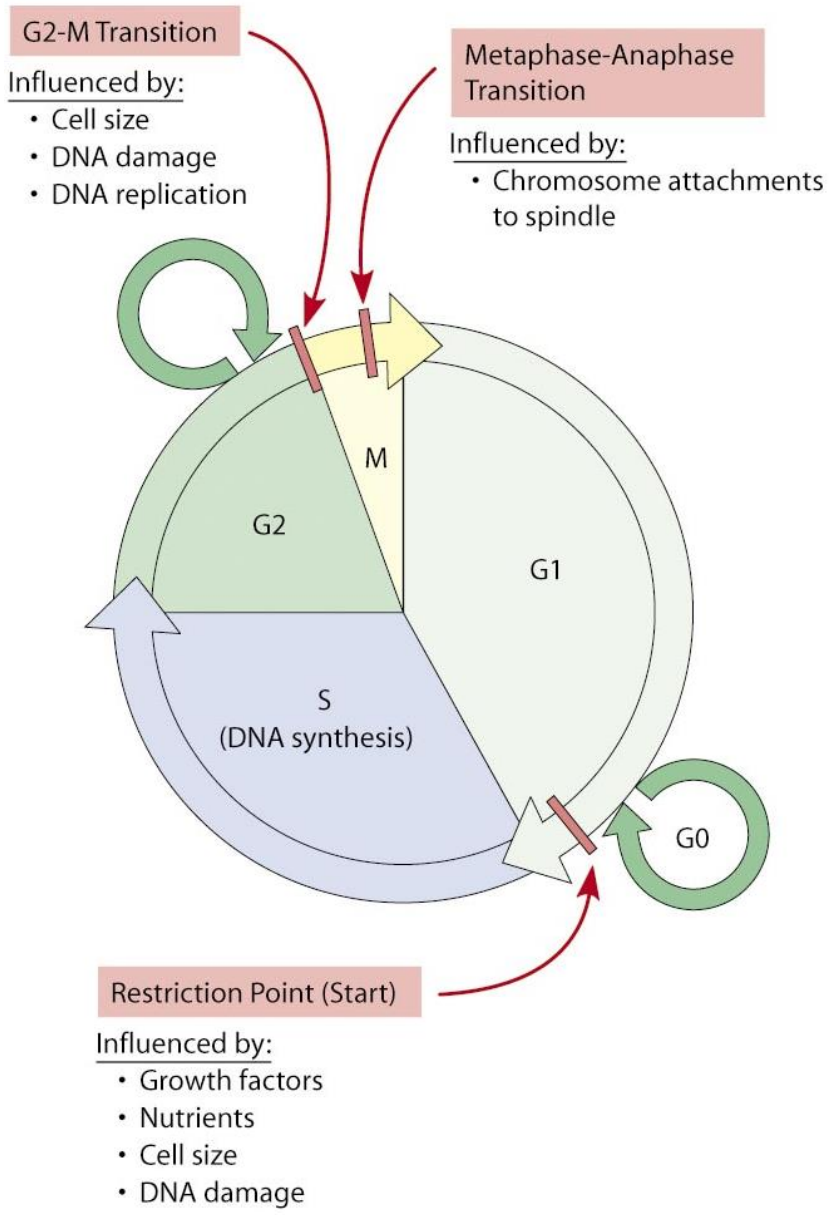
1) تغيير تجزئة (تحاوز compartmentalization) الجينوم ثلاثيّ الأبعاد [Buyukcelebi *et al.*, 2023].

2) تعزيز عدم الاستقرار (instability) الجينوميّ [Mittal *et al.*, 2015].

3) تعطيل (disrupting) فعاليّة cyclinC–CDK8/19 ممّا يقود إلى تحسين تنظيم (upregulation) التّعبير عن عامل النّموّ الثّاني الشّبيه بالإنسولين IGF–2 والّذي يملك دوراً رئيسيّاً في نمو الخلايا [Di Tommaso *et al.*, 2014; Turunen *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2018].

4) تفعيل مسار إطلاق إشارة (signaling pathway) AKT/mTOR، حيث يثبّط تنشيط AKT من تعبير GSK–3β. ينجم عن مستويات GSK–3β المنخفضة (المشاهدة في الخلايا الّتي تؤوي MED12 الطّافر) تراكم في β–catenin، والّذي يلعب دوراً محفّزاً لتكاثر الخلايا في العديد من الأورام [Al-Hendy *et al.*, 2017b; El-Andaloussi *et al.*, 2020].

5) تفعيل مسار إطلاق إشارة الـ Wnt4/β–catenin والّذي يحفّز تقدّم الخليّة المنقسمة عبر الطّور S وبالتّالي زيادة تكاثر الخلايا (الشّكل 10) [Al-Hendy *et al.*, 2017b; El-Andaloussi *et al.*, 2020].



الشّكل 10. دورة حياة الخليّة المنقسمة [https://satyajeetsrivastava.wordpress.com/cell-biology].

2-4- الخلاصة والغاية من الدّراسة

خلصت الدّراسات العالميّة إلى أنّ الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة هي المسؤول الأوّل عن حالات استئصال الرّحم. وتؤدّي الوراثة والاختلافات الجينيّة والشّذوذات الصّبغيّة دوراً في تشكّل هذه الأورام كما تزيد بعض عوامل الخطورة من حجمها. ويعدّ جين MED12 على الصّبغيّ X أحد أهمّ الجينات الطّافرة في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة، إذ أُكتشفت طفرات exon 2-MED12 فيها بمعدل تواتر يصل إلى 88%، وقد تكون وحدها المسؤولة عن تكوّن الورم. علاوةً على أنّ بعض هذه الطّفرات قد يدعم نموّ سرطانات شديدة العدوانيّة كالسّاركوما العضليّة الملساء الرّحميّة ذات معدّلات البقيا المنخفضة ومعدّلات النّكس المرتفعة.

يحمل الطّبّ الدّقيق إمكانيّات كبيرة لمعالجة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة. تمتلك العوامل الّتي تستهدف الجينات القائدة مثل MED12 أهمّيّة خاصّة فهي قد تفيد المريضات اللّواتي لديهنّ آليّات جزيئيّة مدروسة ومعروفة. إذ من المتوقّع أن تستهدف هذه العوامل الجينات القائدة في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة باستخدام أساليب أقلّ غزويّة (invasive) من المعالجات الباضعة الحاليّة. وسيكون هذا أفضل بمراحل إذا تمّ بناء التّشخيص أيضاً حول الجينات القائدة، بحيث يعتمد تشخيص ومعالجة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة على هذه الجينات على شكل طبّ شخصيّ. وهذا بالطّبع يتطلّب معرفة الآليّات الجزيئيّة لدى المريضات مسبقاً.

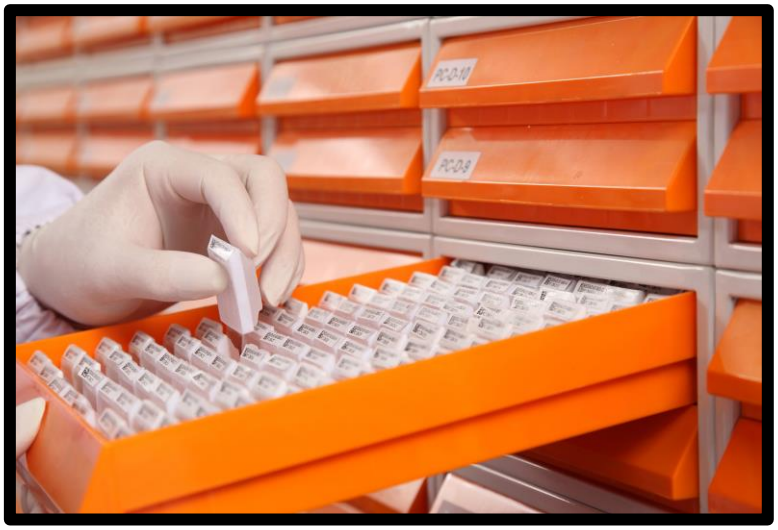
لذا يبدو الكشف عن الآليّات الجزيئيّة القائدة لتشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة لدى المريضات السّوريّات وخاصّة في الإكسون الطّافر exon 2-MED12 مفيداً، لأنّه قد يمكّن المريضات من الاستفادة من طرق التّشخيص والعلاجات المستهدِفة (targeted therapies) المستقبليّة. إلّا أنّه لم يتمّ سابقاً إجراء أيّ بحث على الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة لتحديد هذه الآليّات ومعدّل تواترها في المريضات السّوريّات. لذا أجرينا هذه الدّراسة الأولى في هذا السّياق بهدف التّحقيق في حالة exon 2-MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في المريضات السّوريّات، وعلى وجه التّحديد أردنا استقصاء وجود طفرات جسميّة في exon 2-MED12.

الفصل الثّالث

المواد والطّرائق

3-1- عيّنة ومكان الدّراسة

تمّت الدّراسة على أورام عضليّة ملساء رحميّة ثبتت بالفورمالين وحفظت بالبرافين تمّ جمعها من أرحام مريضات سوريّات، وتمّ استبعاد أيّ تشخيص باثولوجيّ مخالف للورم المدروس. بدايةً، تمّ جمع العيّنات من بين الأنسجة المحفوظة والمثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين (الشّكل 11) من أرشيف مختبرات الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة في مستشفيي التّوليد والبيروني الجامعيّين بدمشق، لكن تبيّن لاحقاً أنّ ظروف التّثبيت والحفظ المطبّقة قد لا تتناسب مع استخلاص الدنا وتضخيم exon 2–MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز. فقمنا بأمثلة شروط الجمع والتّثبيت والانتقاء على عيّنات جُمعت بشكل طازج من مستشفى التّوليد الجامعيّ. وبعد أمثلة الشّروط أصبح جمع العيّنات الطّازجة يتمّ مباشرة بعد عمليّات الاستئصال (للرّحم أو للأورام) من مستشفى التّوليد الجامعيّ. تمّت عمليّات التّثبيت والإسجاء بشكل يدويّ في مختبر الباثولوجيا والباثولوجيا الخلويّة في المستشفى الوطني الجامعيّ. وتمّت الدّراسة الجزيئيّة في مختبر البحوث–2، قسم البيولوجيا في كليّة العلوم، جامعة دمشق (استخلاص وتضخيم الدنا)، بينما تمّت عمليّة سلسلة الدنا في مختبرات شركة ماكروجن في كوريا (Macrogen, Seoul, Korea).



الشّكل 11. صورة لأنسجة محفوظة ومثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين

.[https://usbiolab.com/FFPE]

3-2- طرائق العمل

3-2-1- حجم العيّنة

شملت الدّراسة الأوّليّة 12 عيّنة محفوظة بالبرافين لأورام عضليّة ملساء رحميّة مستأصلة من 12 مريضة. حقّقت العيّنات معايير الاشتمال، لكنّها كانت ذات ظروف تثبيت وإسجاء غير معروفة وكان الدنا المستخلص منها سيّئ التّركيز و/ أو الجودة. فتمّ جمع 5 أورام طازجة من رحم مستأصل من مريضة واحدة وتثبيتها بالفورمالين وإسجاؤها بالبرافين بشكل يدويّ. هذه العيّنات هي الّتي تمّت أمثلة شروط التّثبيت والإسجاء عليها، وكذلك أمثلة عمليّة انتقاء المقاطع من عدد وسماكة. بعد أمثلة الشّروط، تمّ جمع 16 ورماً طازجاً من أرحام 9 مريضات وتمّت عليها عمليّات تثبيت وإسجاء وانتقاء مطابقة تماماً للشّروط المثلى، ومن ثمّ أُجريت عليها عمليّات استخلاص الدنا الجينوميّ وتضخيم exon 2-MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز وسلسلته.

3-2-2- الاعتبارات الأخلاقيّة

تمّ أخذ موافقة لجنة الدّراسات الأخلاقيّة في جامعة دمشق على الدّراسة، كما تمّ جمع العيّنات بشكل معمّى (anonymous) بحيث لم تطّلع الباحثة على أسماء المريضات ولا على بياناتهم (باستثناء العمر).

3-2-3- مراحل الدّراسة

شملت الدّراسة ثلاث مراحل رئيسة وهي:

المرحلة الاولى: أمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء والّتي ضمّت:

أوّلاً: جمع العيّنات المحفوظة من الأرشيف

ثانياً: جمع العيّنات الطّازجة وتثبيتها وتحضيرها

ثالثاً: استخلاص الدنا الجينوميّ

رابعاً: التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز

المرحلة الثّانية: التّقصّي عن الطّفرات والّتي ضمّت:

أوّلاً: جمع العيّنات الطّازجة

ثانياً: تثبيت العيّنات الطّازجة وتحضيرها واستخلاص الدنا الجينوميّ وتضخيم exon 2-MED12

ثالثاً: إجراء تفاعلات سلسلة للشّدف المضخّمة بالاعتماد على طريقة سلسلة سانجر

المرحلة الثّالثة: تحليل النّتائج

3-2-3-1- المرحلة الأولى: أمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء

أ- جمع العيّنات المحفوظة من الأرشيف

تمّ في البداية جمع ودراسة 12 عيّنة محفوظة بالبرافين لأورام عضليّة ملساء رحميّة مستأصلة من 12 مريضة من أرشيف مستشفيي التّوليد والبيروني الجامعيّين. حقّقت العيّنات معايير الاشتمال، إذ تمّ استخدام العيّنات أصولاً بعد قطعها وتلوينها بالهيماتوكسيلين والأيوزين (Hematoxylin and Eosin, H&E, Merck) وتشخيص ورم عضليّ أملس رحميّ سليم. لكنّها كانت ذات ظروف تثبيت وإسجاء غير معروفين، بما فيها نسبة المثبّت ومدّة التّثبيت، حيث لا يتمّ تسجيل ذلك بشكل روتينيّ في مختبرات الباثولوجيا. تمّ قطع أنسجة إضافيّة من كل ورم باستخدام مشراح (microtome, Leica Biocut 2035) (الشّكل 12) ورفعت على شرائح مجهر زجاجيّة (الشّكل 13)، وتمّ استخلاص الدنا الجينوميّ منها لتضخيم exon 2-MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز.

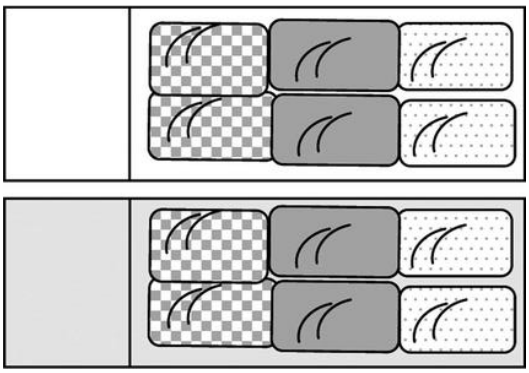
ب- جمع العيّنات الطّازجة وتثبيتها وتحضيرها

تمّ الحصول على 5 أورام عضليّة ملساء رحميّة طازجة من مريضة خضعت لعمليّة استئصال رحم في مستشفى التّوليد الجامعيّ بشكل معمّى. تمّ أخذ مقاطع بحجوم متماثلة من الأورام (14 ± 2 مم × 11 ± 2 مم)، وتثبيتها على الفور في الفورمالين المدروء بنسبة 6٪ في درجة حرارة الغرفة لمدّة 22 ساعة.

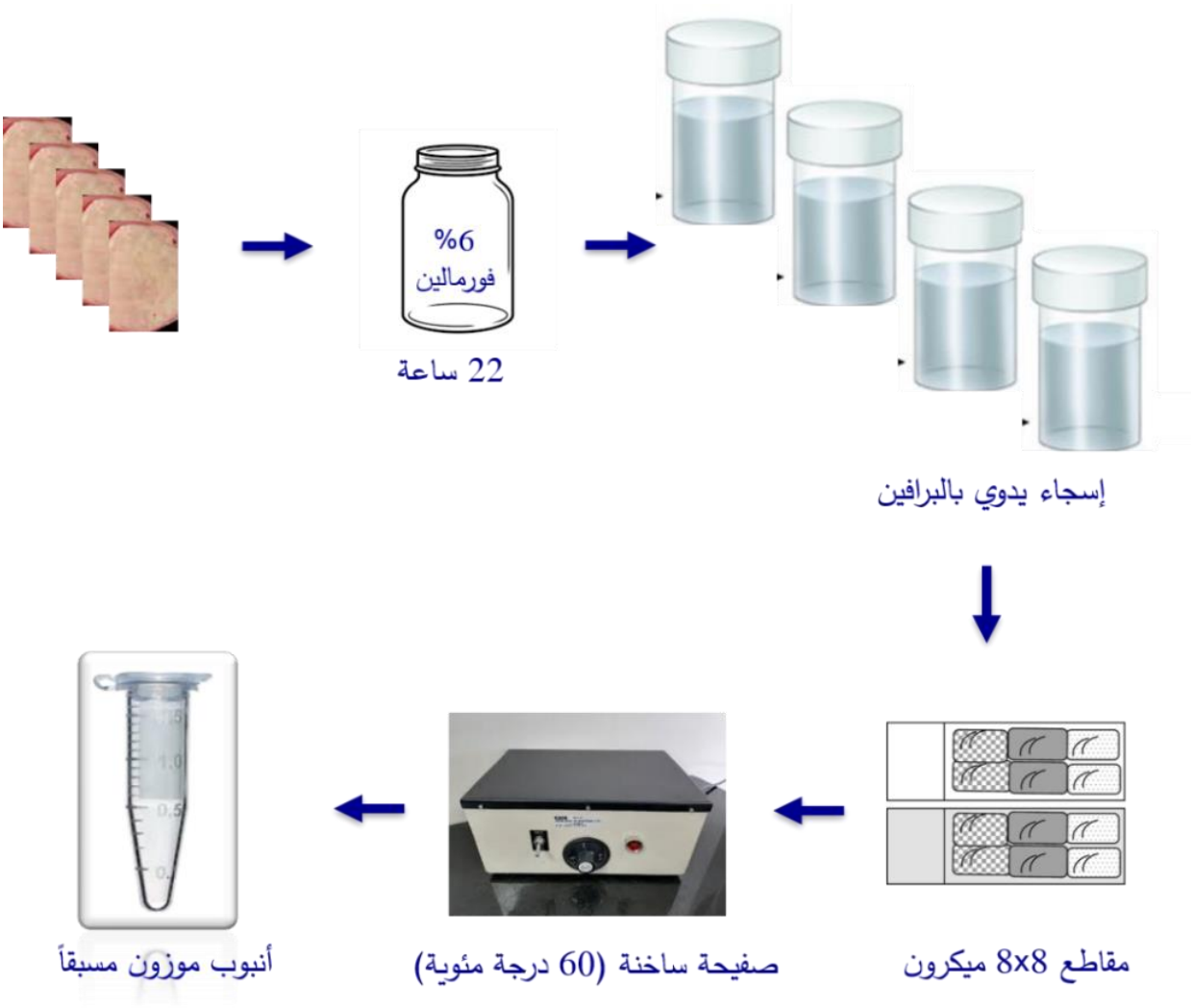
بعد مضي الوقت المحدّد تمّ إسجائها في البرافين بشكل يدويّ في المستشفى الوطني الجامعيّ على الشّكل الآتي: ماء (15 دقيقة)، إيثانول 80% (ساعتين) (Sigma–Aldrich)، إيثانول 100% (ساعتين)، كزيلين (مرّتين، كلّ منهما ساعتين) (Riedel–De Hean AG, Seelze–Hannover)، برافين (مرّتين، كلّ منهما ساعتين).

بعد انتهاء عمليّة الإسجاء، تمّ قطع ثمانية مقاطع بسماكة ثمانية ميكرومتر (8x8 ميكرون) من كلّ ورم بالمشراح، ورُفعت المقاطع على شرائح مجهر زجاجيّة. تمّ وضع الشّرائح الزجاجيّة على صفيحة ساخنة درجة حرارتها 60 درجة مئويّة لمدّة 10 دقائق لإذابة البرافين، ثمّ نُقلت مقاطع كلّ عيّنة باستخدام الكشط الخفيف بمشرط إلى أنبوب سعة 1.5 مل سجّل عليه اسم العيّنة وتمّ وزنه بشكل مسبق وتسجيل القيمة. تمّ إعادة وزن الأنبوب مع النّسيج باستخدام نفس الميزان الدّقيق (Sartorius) وحساب وزن النّسيج الصّافي، ويوضّح الشّكل التّالي خطّة العمل (الشّكل 14).

الشّكل 12. صورة مشراح (microtome).



الشّكل 13. شكل توضيحيّ لسلايدات رُفعت عليها مقاطع نسيجيّة مثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين [http://dx.doi.org/10.3233/CBM–2010–181].



الشّكل 14. شكل توضيحيّ لخطة العمل في تحضير العيّنات الطّازجة وأمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء.

تمّ قطع مقاطع إضافيّة (بسماكة 5 ميكرومتر) من كلّ عيّنة وتلوينها بالهيماتوكسيلين والأيوزين (H&E) باستخدام جهاز تلوين أنسجة آليّ (Tissue Stainer, MEDITE, England) (الشّكل 15)، وتمّ فحص الأنسجة الملونة تحت المجهر (Olympus BX41) باستخدام التّكبير x40 لدراستها ووضع التّشخيص.

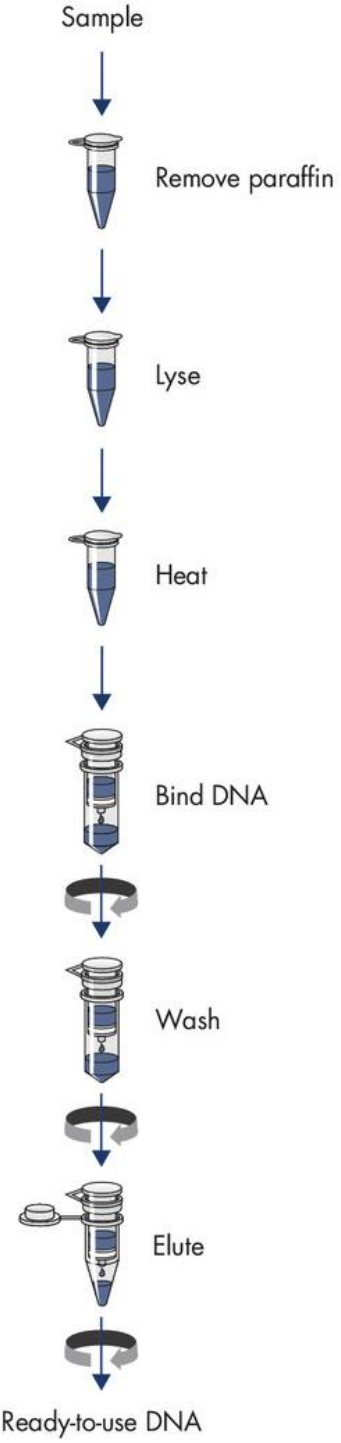
الشّكل 15. صورة للجهاز الآليّ المستخدم في تلوين الأنسجة.

ج- استخلاص الدنا الجينوميّ

تمّ استخلاص الدنا الجينوميّ من الأنسجة باستخدام عتيدة استخلاص (extraction Kit) متوفّرة تجاريّاً (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit# 56404, Qiagen, Dusseldorf, Germany) وفقاً لتوصيات الشّركة المصنّعة والّتي تنصّ على ما يلي (الشّكل 16):

- ❖ تُوضع الأنسجة ضمن أنبوب إبندورف سعة 2 مل ويضاف 1 مل من الكزيلين، ويتمّ الحضن مع التّحريك المستمرّ باستخدام جهاز الرّجاج / الدوّارة Vortex (VELP-SCIENTIFICA) لمدّة 10 ثواني، ثمّ يثقّل المزيج لمدّة دقيقتين بأعلى سرعة (14000xg) وبدرجة حرارة الغرفة، ويتمّ التّخلّص من السّائل الطّافي بشكل تام.
- ❖ يُضاف 1 مل من الإيثانول 96-100% ويتمّ المزج بالتّحريك المستمرّ، ثمّ يثقّل المزيج لمدّة دقيقتين بسرعة 14000xg وبدرجة حرارة الغرفة، ويتمّ التّخلّص من السّائل الطّافي بشكل تام.

❖ يُفتح غطاء الأنبوب ويُحضن الأنبوب بدرجة حرارة 37 درجة مئويّة لمدّة 10 دقائق، بحيث يتمّ التّخلّص من جميع آثار الإيثانول.



الشّكل 16. مخطّط ترسيميّ لعمليّة استخلاص الدنا من النّسيج الموضوع بالبرافين [https://www.qiagen.com].

- ❖ تُعلّق الرّسابة في 180 ميكرولتر من محلول الدّارئة (ALT)، ويضاف 20 ميكرولتر من إنزيم البروتيناز (Proteinase K)، ويتمّ المزج بالتّحريك المستمرّ.
- ❖ يُضاف للمزيج خرزات (beads) للمساعدة على تحطيم النّسيج، ويُحضن المزيج لمدّة 1 ساعة بدرجة حرارة 56 درجة مئويّة مع التّحريك المستمرّ كلّ 10 دقائق حتّى كامل انحلال النّسيج.
- ❖ يُحضن مزيج النّسيج لمدّة 1 ساعة بدرجة حرارة 90 درجة مئويّة، ثمّ يثقّل الأنبوب بأعلى سرعة لمدّة 5 ثواني (لجمع المزيج في أسفل الأنبوب).
- ❖ يُحضّر كميّات متساوية من محلول الدّارئة (AL) والإيثانول 96–100%، ويضاف 400 ميكرولتر منه لمزيج النّسيج، ويتمّ المزج مباشرة بالتّحريك المستمرّ حتّى يتحقّق المزج التّام، ثمّ يثقّل الأنبوب بأعلى سرعة لمدّة 5 ثواني.
- ❖ يُنقل المزيج إلى عمود الفصل الميكرويّ (QIAamp MinElute column) المتوضّع في أنبوب تجميع بسعة 2 مل، ويثقّل لمدّة 1 دقيقة بسرعة 6000xg بدرجة حرارة الغرفة للسّماح للدنا الجينوميّ بالارتباط بالعمود.
- ❖ يتمّ التّخلّص من السّائل المتدفّق (flow–through) بنقل عمود الفصل الميكرويّ إلى أنبوب تجميع نظيف.
- ❖ يُضاف 500 ميكرولتر من محلول الدّارئة (AW1) إلى عمود الفصل الميكرويّ، ويثقّل لمدّة 1 دقيقة بسرعة 6000xg بدرجة حرارة الغرفة. ويتمّ التّخلّص من السّائل المتدفّق بنقل عمود الفصل الميكرويّ إلى أنبوب نظيف.
- ❖ يُضاف 500 ميكرولتر من محلول الدّارئة (AW2) إلى عمود الفصل الميكرويّ، ويثقّل لمدّة 1 دقيقة بسرعة 6000xg بدرجة حرارة الغرفة. ويتمّ التّخلّص من السّائل المتدفّق بنقل عمود الفصل الميكرويّ إلى أنبوب نظيف.
- ❖ يُثقّل عمود الفصل الميكرويّ لمدّة 3 دقائق بسرعة 14000xg بدرجة حرارة الغرفة لتجفيف عمود الفصل بشكل كامل. ويتمّ نقل عمود الفصل الميكرويّ إلى أنبوب إبندورف سعة 1.5 مل نظيف.
- ❖ يُفصل (elute) الدنا الجينوميّ من كلّ عيّنة بكميّات متساوية من دارئة الفصل / الشّطف (elution buffer) حيث يُضاف بحذر في مركز العمود 40 ميكرولتر من محلول الدّارئة (ATE)، ويتمّ الحضن لمدّة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.

❖ يُثقّل العمود وأنبوب الإبندورف لمدّة 1 دقيقة بسرعة 14000xg بدرجة حرارة الغرفة، ويتمّ التّخلّص من عمود الفصل.

❖ يُحفظ أنبوب الإبندورف الحاوي على الدنا الجينوميّ المستخلص بدرجة حرارة −80 درجة مئويّة.

تمّ قياس تركيز ونقاوة / جودة (purity/quality) الدنا المستخلص بواسطة جهاز Nanodrop (الشّكل 17) (Nanodrop−2000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)، وباستخدام دارئة الفصل (ATE) كشاهد (blank). تمّ استخدام 100 نانوغرام من الدنا المستخلص في عمليّة التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز.

تعدّ نسبة تماصّ (absorbance) 280/260 مؤشراً على نقاوة الدنا. وتبيّن في دراسة سابقة أنّ نسبة التّماصّ (1.6−2.00) تشير إلى نقاوة جيّدة للدنا المستخلص من العيّنات النّسيجيّة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين، بينما تدلّ النّسبة 1.8 على نقاوة مثلى (optimum) للدنا من أي مصدر بشكل عام [Lucena−Aguilar *et al.*, 2016].

الشّكل 17. صورة لجهاز Nanodrop.

د- التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز

أُستخدمت في عمليّة التّضخيم مجموعة من البادئات الّتي تضخّم exon 2-MED12 وهي (البادئة الأماميّة / التقدّميّة forward primer 5'-GCCCTTTCACCTTGTTCCTT-3' والبادئة العكسيّة reverse primer 5'-AAGCTGACGTTCTTGGCACT-3') (Vivantis, Malaysia [Mäkinen *et al.*, 2013]، بالإضافة لمزيج التّفاعل الرّئيسيّ الحاوي على إنزيم التّفاعل والنّوكليوتيدات (PCR One master mix, GeneDirex, USA). حيث تمّ تحضير محلول أمّ (stock solution) لكلّ بادئة على حدة بتركيز 100 ميكرومول، وذلك بحلّها بماء عقيم أحادي التّقطير بكميّة مناسبة حسب تركيز البادئة المحدّد من قبل الشّركة المصنّعة. ومن ثمّ تمّ تحضير محلول ممدّد بتركيز 10 ميكرومول من المحلول الأمّ في الماء العقيم، لكلّ بادئة على حدة.

تمّ تحضير مزيج تفاعل التّضخيم في الحجيرة الخاصّة بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز (UV PCR Chamber) (الشّكل 18) على الثّلج وبحجم نهائي 25 ميكرولتر لكلّ تفاعل كما يلي: 12.5 ميكرولتر من PCR One master mix، 2 ميكرولتر من مزيج البادئتين النّوعيتين الأماميّة والعكسيّة (بتركيز 10 ميكرومول لكلّ منهما)، 10.5 ميكرولتر ماء مقطّر أحاديّ التّقطير ومعقّم، ثمّ أضيف إلى ذلك الحجم المناسب والمقابل لـ 100 نانوغرام من الدنا الجينوميّ المستخلص. تضمّنت كلّ تجربة شاهداً سلبياً استُبدِلَ فيه الدنا الجينوميّ بالحجم ذاته من الماء المقطّر (nuclease-free water) لمراقبة التّلوث.

تمّ إجراء التّضخيم باستخدام جهاز المدوّر الحراريّ thermocycler (Eppendorf Mastercycler) (الشّكل 19) حسب البرنامج الزّمنيّ والحراريّ التّالي:

- 5 دقائق في الدّرجة 95 درجة مئويّة لفكّ التّشافع / التّمسّخ البدئي (initial denaturation).
- 35 دورة تضمّ كل منها ما يلي:
  - 30 ثانية في الدّرجة 95 درجة مئويّة لفكّ التّشافع / التّمسّخ (denaturation)،

- 30 ثانية في الدّرجة 65 درجة مئويّة لإعادة التّشافع / التّلدين (annealing)،
- 30 ثانية في الدّرجة 72 درجة مئويّة لإطالة / تمديد السّلسلة (extension).

❖ 5 دقائق في الدّرجة 72 درجة مئويّة للإطالة النّهائيّة (final extension).

❖ ويتمّ الاحتفاظ بالتّفاعل في الدّرجة 4 درجة مئويّة.

الشّكل 18. صورة للحجيرة الخاصّة بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز.

الشّكل 19. صورة لجهاز المدوّر الحراريّ.

تمّ إجراء رحلان كهربائيّ (electrophoresis) لمنتجات التّفاعل في جهاز رحلان أفقي (Peqlab, USA) (الشّكل 20) على هلامة أغاروز (agarose, GeneDirex, USA) بتركيز 3%. حيث تمّ أخذ 4 ميكرولتر من كلّ تفاعل ومزجه مع 4 ميكرولتر من صبغة التّحميل (loading dye) مضافاً لها 0.5 ميكرولتر من محلول مادّة الايثيديوم بروميد (ethidium bromide, 10 mg/ml in H2O, Sigma–Aldrich, USA) وتمّ تحميل الكميّة كاملة في آبار الهلامة.

تمّ توثيق صورة الهلامة باستخدام جهاز إضاءة بالأشعة فوق البنفسجيّة (Wealtec UV transilluminator) وكاميرا (Olympus) (الشّكل 21) لتحديد أطوال الأمبليكون/المُضَخَّم النّوويّ (amplicon)، ورؤية الصّورة على شاشة جهاز الكمبيوتر. حيث تمّ الحكم على نجاح عمليّة التّضخيم من خلال ظهور عصائب (bands) يتوافق طولها مع طول الشّدفة المضخّمة (amplified) (191 زوجاً قاعديّاً) (191 bp) مقابل 3 ميكرولتر من سلّم الدنا الحجميّ القياسيّ بفواصل 100 bp (DNA ladder, Thermo Scientific, GeneRuler, 0.5 µg/µL).

الشّكل 20. صورة لجهاز الرّحلان الكهربائيّ.

الشّكل 21. صورة لجهاز إضاءة بالأشعة فوق البنفسجيّة مع نظام توثيق الجل والكاميرا.

3-2-3-2- المرحلة الثّانية: التّقصّي عن الطّفرات

بعد الاطمئنان إلى أمثلة شروط التّثبيت والإسجاء والانتقاء ونجاح عمليّات الاستخلاص والتّضخيم، تمّ الانتقال إلى تنفيذ هدف البحث الرّئيسيّ وهو التّقصّي عن طفرات exon 2-MED12 من خلال الخطوات العمليّة التّالية:

أ- جمع العيّنات الطّازجة

تمّ جمع 16 ورم عضليّ أملس من أرحام تسع مريضات، خضعت ثمانية منهن لعمليّات استئصال رحم. كان لدى جميع المريضات أورام عضليّة ملساء رحميّة متعدّدة وبأحجام مختلفة ولكن تمّ اختيار عيّنات هذا الجزء من الدّراسة بحيث تكون صغيرة الحجم بشكل خاصّ (≤25 مم). فتمّ جمع عدّة أورام عضليّة ملساء (ورمين أو أكثر) من أرحام خمس مريضات، وورم عضليّ أملس رحميّ مفرد من أرحام أربع مريضات. تراوحت أحجام الأورام من 8 إلى 25 مم في أكبر قطر لها (متوسط 14.94 مم).

ب- تثبيت العيّنات الطّازجة وتحضيرها واستخلاص الدنا الجينوميّ وتضخيم exon 2-MED12

تمّ تثبيت العيّنات الطّازجة على الفور في الفورمالين المدروء بنسبة 4-6% لمدّة 22+/-2 ساعة في درجة حرارة الغرفة، وبعد مضي الوقت المحدّد تمّ إسجاؤها في البرافين بشكل يدويّ في المستشفى الوطني الجامعيّ، على الشّكل الوارد آنفاً. في صباح اليوم التّالي تمّ قطع 8 مقاطع بسماكة 8 ميكرومتر (8x8) من كلّ ورم، ورُفعت المقاطع على شرائح مجهر زجاجيّة ومن ثمّ تمّ استخلاص الدنا الجينوميّ منها وتضخيم exon 2-MED12 بالطّريقة المفصّلة أعلاه وباستخدام نفس البادئات وشروط التّضخيم.

كذلك، تمّ الحكم على نجاح عمليّة التّضخيم من خلال ظهور عصائب يتوافق طولها مع طول الشّدفة المضخّمة (191 bp) مقابل سلّم الدنا الحجميّ القياسيّ على هلامة أغاروز 3%. بعد التّأكّد من وجود الشّدف المطلوبة في منتجات التّفاعل تمّ تحضير التّفاعل الخاص بالسّلسلة للعيّنات الموافقة.

ج- إجراء تفاعلات سلسلة للشّدف المضخّمة بالاعتماد على طريقة سانجر

تمّ إرسال ما يعادل 200 نانوغرام/ميكرولتر من منتجات التّفاعل و10 بيكومول/ميكرولتر من البادئة الأماميّة لكلّ تفاعل إلى شركة ماكروجن (Macrogen, Seoul, Korea) وفقاً لتعليمات الشّركة، وذلك لسلسلة الدنا والكشف عن

طفرات exon 2–MED12 بطريقة سانجر Sanger. ويعتمد مبدأ الطّريقة على إجراء تفاعل التّضخيم مع استخدام أربعة حوامل كيميائيّة متفلورة ذات أطوال موجات إصدار مختلفة لوسم شدف الدنا، بالإضافة لنوكليوتيدات خاصّة (ddNTPs) قادرة على إنهاء التّفاعل، بحيث تكون كلّ من النّوكليوتيدات الأربعة الخاصّة موسومة كذلك بإحدى الحوامل المتفلورة. تفصل الشّدف المتفلورة بالرّحلان الكهربائيّ ضمن أنبوب شعريّ، ويتمّ تمييز الشّدف النّاتجة عن إنهاء التّفاعل حسب طول موجة الإصدار الخاصّة بالحامل.

3-2-3-3- المرحلة الثّالثة: تحليل النّتائج

تمّت قراءة تسلسل (sequence) الشّدف المدروسة باستخدام برنامج Chromas 2.5، وتمّ تدقيقها بشكل يدويّ للتّأكد من صحّة القراءة. تمّت مقارنة النّتائج عن طريق محاذاة (alignment) تسلسلات المرضى مع تسلسل النّمط السّويّ لـexon 2–MED12 المتوفّر عبر الإنترنت من NCBI (NG_012808.1) باستخدام برنامج Geneious 4.8.4 للتّمييز بين الطّفرات.

تمّ تقديم النّتائج كما في الدّراسات العالميّة المماثلة على أساس وجود طفرة أو عدم وجودها. في طفرة الادخال تمّ الحصول على تسلسلات بروتين افتراضيّة مختلفة لـ exon 2–MED12 تُظهر انزياح إطار مفتوح أثناء التّرجمة انطلاقاً من روامز الدنا (codons) والّتي تحوي ضمناً طفرة الادخال وذلك من قاعدة البيانات Expasy (https://web.expasy.org/translate/)، وتمّ تدقيقها بشكل يدويّ للتّأكد من صحّة القراءة.

كذلك تمّ التّنبّؤ بالقدرة الإمراضيّة (pathogenicity) للطّفرات المكتشفة باستخدام برمجيّة (software) MutationTaster (https://www.mutationtaster.org/) والّتي تقيّم المتغيّرات في الدنا من حيث قدرتها على التّسبب بالأمراض. يستخدم البرنامج مُصَنِّف (classifier) يدعى بايز (Bayes) لحساب احتماليّة أن تكون الطّفرة إما تعدّد أشكال (polymorphism) غير ضار أو تغيّر ممرض. تصنّف البرمجيّة الطّفرات في واحدة من أربع فئات محتملة:

- ❖ تعدّد أشكال تلقائي (polymorphism automatic)، وتكون غير ضارة (harmless).
- ❖ تعدّد أشكال (polymorphism)، وتكون على الأرجح غير ضارة (probably harmless).
- ❖ مسبّبة للمرض (disease–causing)، وتكون على الأرجح مؤذية (probably deleterious).
- ❖ مسبّبة للمرض تلقائي (disease–causing automatic)، وتكون مؤذية (deleterious).

الفصل الرّابع

النَّتائج

4-1- نتائج أمثلة شروط التّثبيت ومعايير الانتقاء

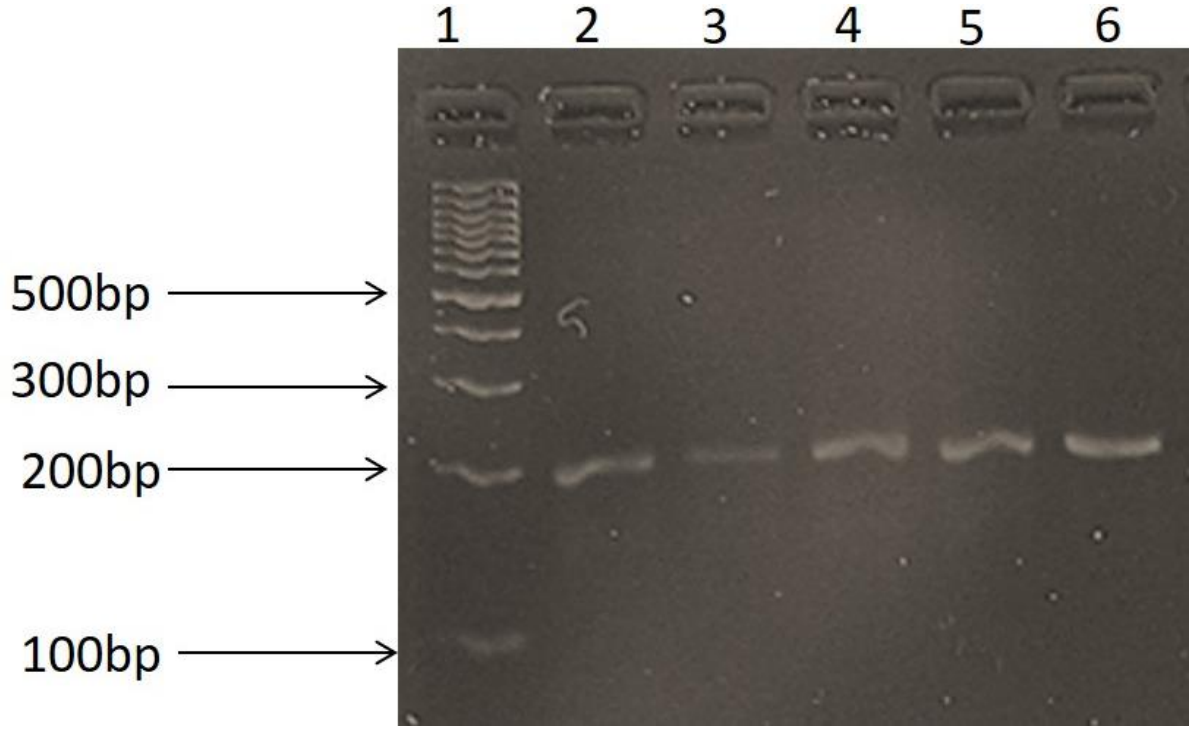
لم تنجح عمليّات الاستخلاص والتّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز للدنا الجينوميّ من أنسجة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المحفوظة في أرشيف مستشفيي التّوليد والبيروني الجامعيّين. هذه الأنسجة كانت ذات ظروف تثبيت وإسجاء غير معروفة، وفشلت عمليّة استخلاص الدنا من بعض الأنسجة، إذ لم تذوب الأنسجة في الكواشف، ولم يكن من الممكن إكمال بروتوكول الاستخلاص. بينما لم يتمّ تضخيم الدنا المستخلص من بعض الأنسجة الأخرى. ففي الحالات الّتي تمكّنا فيها من إكمال بروتوكول الاستخلاص والحصول على دنا جينوميّ، كان الدنا المستخلص رديئاً من حيث الجودة و/أو منخفض الكميّة (≥4 نانوغرام/ميكرولتر) وفشلت محاولة تضخيمه.

إلّا أنّ استخلاص الدنا وتضخيم exon 2-MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز من أنسجة الأورام الّتي تمّ جمعها بشكل طازج وتثبيتها وإسجاؤها يدويّاً كان ناجحاً، لجميع العيّنات الخمس. بالإضافة إلى ذلك، كان التّضخيم ممكناً من دنا منخفض التّركيز يصل إلى 7.7 نانوغرام/ميكرولتر (الجدول 2).

الجدول 2. جدول المعالم (parameters) المختارة لأمثلة شروط انتقاء الأنسجة. يوضّح الجدول معالم مختارة لسماكة المقاطع وعددها مقابل وزن الأنسجة وتركيز الدنا النّهائيّ المستخلص منها، إذ لا يوجد ارتباط مباشر بين تركيز الدنا ووزن الأنسجة من المقاطع الثّمانية.

العيّنة	سماكة المقاطع (ميكرومتر)	عدد المقاطع	وزن الأنسجة (ملغ)	تركيز الدنا المستخلص (نانوغرام/ميكرولتر)
أ	8	8	5	7.7
ب	8	8	10	33.2
ج	8	8	20	26.8
د	8	8	20	40.3
هـ	8	8	20	81.3

لقد قمنا أوّلاً بتحسين ظروف تثبيت الأنسجة من خلال اختيار تركيز الفورمالين (6%) ومدّة الحضانة (22 ساعة)، ثمّ قمنا بأمثلة معايير انتقاء المقاطع وبروتوكول العمل. إذ يوصي بروتوكول استخلاص الدنا من الشّركة المصنّعة (Qiagen) بالبدء بأخذ مقطعين من الأنسجة في التّجارب الأوّليّة ثمّ زيادتها تدريجيّاً بناءً على النّتائج. لقد فعلنا ذلك، ووجدنا أنّه بالنّسبة للعتيدة المستخدمة (56404)، كان عدد وسماكة المقاطع (8x8 ميكرومتر) مناسبة لإعطاء كميّة كافية من الدنا لتضخيم exon 2–MED12. تمّ استخدام تركيزات متساوية من الدنا المستخلص (100 نانوغرام) من العيّنات الـ 5 لعمليّة التّضخيم وتمّ إجراء التّضخيم في نفس الوقت لتجنّب "تأثير اليوم" وهي تغيّرات قد تظهر أحياناً عند العمل في أزمنة متباينة وتؤثّر في النّتائج. أظهرت جميع العيّنات عصائب تتوافق مع طول الشّدفة المضخّمة (191 bp) على هلامة الأغاروز 3٪ ممّا يشير إلى عمليّة تضخيم ناجحة (الشّكل 22).

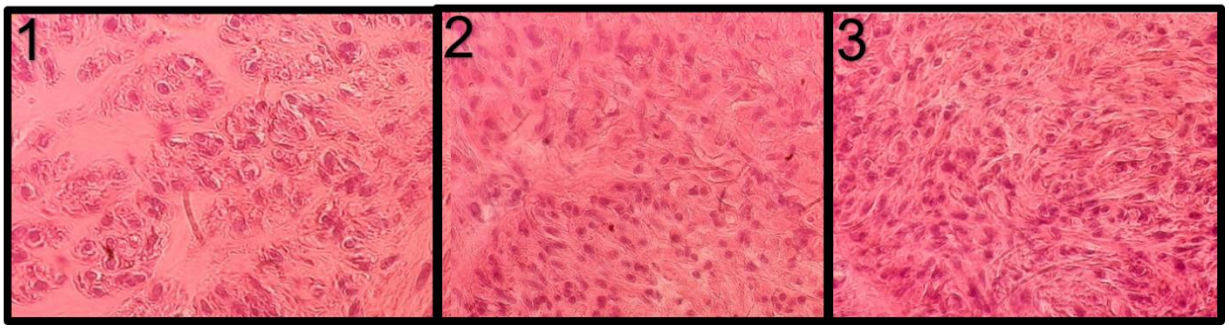


الشّكل 22. صورة لهلامة آغاروز 3% تُظهر نتائج الرّحلان الكهربائيّ للعيّنات المستخدمة في أمثلة شروط الدّراسة. تظهر الصّورة نتائج عمليّة الرّحلان الكهربائيّ لمنتجات تضخيم exon 2–MED12 والمنطقة المحيطة به (191 bp). يتوافق المسار 1 مع سلّم الدنا الحجميّ القياسيّ 100 bp، وتتوافق المسارات 2 إلى 6 مع العيّنات (أ) إلى (هـ) على التّوالي.

كان حجم المقاطع (14±2 مم × 11±2 مم) والسّماكة (8 ميكرومتر) والكميّة (8 مقاطع) متماثلاً بين العيّنات، ومع ذلك تباينت أوزان الأنسجة بشكل ملحوظ (5، 10، 20 ملغ). ورغم أنّه في نهاية عمليّة الاستخلاص تمّ فصل الدنا بنفس كميّة محلول الدّارئة (40 ميكرولتر)؛ لكن اختلف تركيز الدنا المستخلص من العيّنات.

توافق الحد الأدنى لتركيز الدنا (7.7 نانوغرام/ميكرولتر) مع أقلّ وزن للأنسجة (5 ملغ) لعيّنة واحدة (العيّنة أ)، إلّا أنّ تركيز الدنا المستخلص لم يرتبط بشكل مثاليّ بوزن الأنسجة لبقيّة العيّنات (الجدول 2). ومن المثير للاهتمام، أنّ العيّنتين (ب، د) تملكان تركيزات متقاربة من الدنا (33.2 و40.3 نانوغرام/ميكرولتر، على التّوالي)، إلّا أنّ وزن نسيج العيّنة (د، 20 ملغ) كان ضعف وزن العيّنة (ب، 10 ملغ). إضافة لذلك، كان للعيّنات (ج، د، هـ) نفس وزن الأنسجة (20 ملغ)، ولكنّ تركيز الدنا المستخلص من العيّنة (هـ) كان ضعف تركيز الدنا المستخلص من العيّنة (د)، وكان تركيز الدنا المستخلص من العيّنة (د) ضعف تركيز الدنا المستخلص من العيّنة (ج) تقريباً.

نظراً لأنّ حجم، وعدد، وسماكة مقاطع الأنسجة كان متماثلاً بين العيّنات ولكنّه لم يرتبط جيّداً بوزن الأنسجة أو بتركيز الدنا المستخلص، فقد استقصينا كثافة الخلايا في المقاطع كسبب محتمل للاختلافات الملحوظة. لقد تباينت كثافة الخلايا بالفعل بين العيّنات (وكذلك داخل نفس العيّنة) وارتبطت بشكل أفضل مع تركيز الدنا. كانت الخلويّة المنخفضة للأورام العضليّة الملساء الرّحميّة أكثر هيمنة في العيّنات النّسيجيّة (أ، ج). وكانت الخلويّة النّموذجيّة للأورام العضليّة الملساء الرّحميّة أكثر هيمنة في العيّنات (ب، د). وكان الخلويّة المرتفعة للورم العضليّ الأملس أكثر هيمنة في العيّنة (هـ) (الشّكل 23).



الشّكل 23. صور مجهريّة توضّح كثافة خلويّة مختلفة للأورام العضليّة الملساء في العيّنات المدروسة:

1. ورم عضليّ أملس ذو خلويّة منخفضة يمثّل كثافة الخلايا في العيّنتين (أ، ج).
2. ورم عضليّ أملس ذو خلويّة نموذجيّة يمثّل كثافة الخلايا في العيّنتين (ب، د).
3. ورم عضليّ أملس ذو خلويّة مرتفعة يمثّل كثافة الخلايا في العيّنة (هـ).

4-2- نتائج التّقصّي عن الطّفرات

عيانيّاً، كانت جميع الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المستأصلة (16 ورم من 9 مريضات) صلبة ومتجانسة وصغيرة (≤25 مم)، كما أبدت العيّنات مجهريّاً الشّكل النّموذجي الحزميّ للخلايا المغزليّة المنتظمة (الشّكل 4). تمّ جمع 14 ورماً من أرحام مستأصلة لثماني مريضات (تتراوح أعمارهنّ بين 33 و51 عاماً)، بينما تمّ عزل ورمين من رحم مريضة واحدة (#7) بدون استئصال الرّحم (عمرها 30 عاماً).

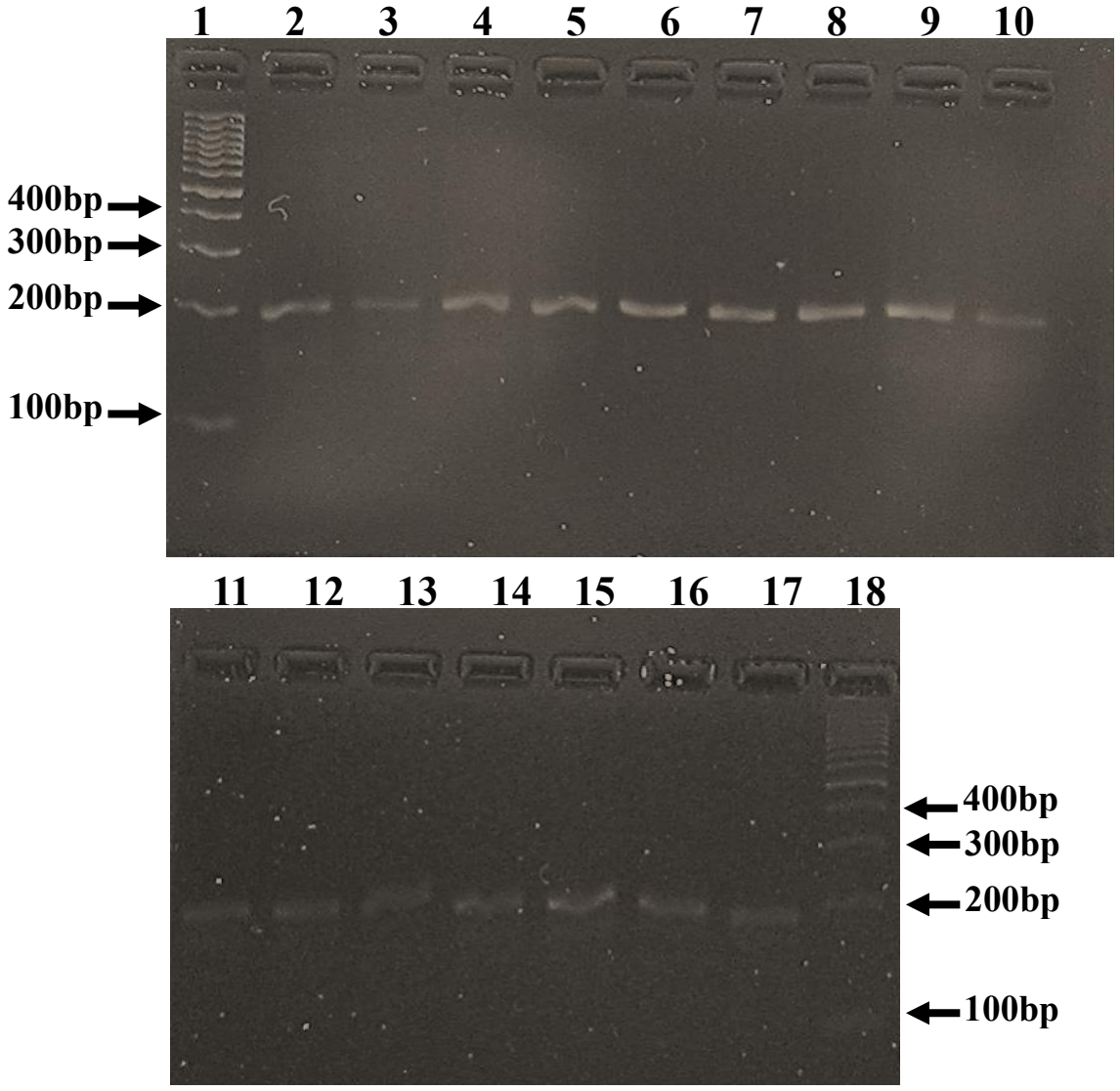
كان لدى جميع المريضات العديد من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة بأحجام مختلفة ولكن في البحث عن طفرات exon 2–MED12 تمّ اختيار عيّنات الدّراسة من الأورام صغيرة الحجم بشكل خاصّ (≤25 مم). تمّت دراسة أورام مفردة من أرحام أربع مريضات (#1، #2، #4، #6)، وورمين من أرحام أربع مريضات (#5، #7، #8، #9)، وأربعة أورام من رحم مريضة واحدة (#3) (الجدول 3).

الجدول 3. تقييم تسلسلات exon 2–MED12 الّتي تمّ تحديدها في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في مريضات الدّراسة.

يوضّح الجدول تسلسلات من 16 ورم تمّ جمعها من 9 مريضات. تمّ إعطاء التّسلسلات الّتي لم تظهر طفرات في exon 2– MED12 مصطلح سويّ. تحتوي ثلاث عيّنات من الأورام (2، 6، 14) على طفرات نقطيّة متغايرة الألائل (hetero) في الكودون 44 ممّا ينتج متغيّرات مغيّرة. وتكشف عيّنة الورم 14 عن إدخال قاعدة مفردة (G) في الكودون 35 ممّا قد يسبّب انزياح إطار التّرجمة. وتُظهر جميع الطّفرات المكتشفة قدرة إمراضيّة مسبّبة للمرض.

رقم المريضة بالدّراسة	رقم عيّنة الورم العضليّ الأملس الرّحميّ	عمر المريضة (سنة) عند استئصال الرّحم/الورم	قياس الورم (مم)	التّغيّر بالنّوكليوتيد	نمط المتغيّر	التّغيّر بالحمض الأمينيّ	القدرة الإمراضيّة للمتغيّر
1#	1	45	9	–	سويّ	–	–
2#	2	33	14	c.130 G>A Het.	طفرة مغيّرة	p.Gly44Ser	مسبّبة للمرض
3#	3	50	12	–	سويّ	–	–
	4		15	–	سويّ	–	–
	5		11	–	سويّ	–	–
	6		16	c.130 G>C Het.	طفرة مغيّرة	p.Gly44Arg	مسبّبة للمرض
4#	7	44	8	–	سويّ	–	–
5#	8	51	15	–	سويّ	–	–
	9		19	–	سويّ	–	–
6#	10	51	18	–	سويّ	–	–
7#	11	30	17	–	سويّ	–	–
	12		18	–	سويّ	–	–
8#	13	45	9	–	سويّ	–	–
	14		15	c.103insG	ادخال	–	مسبّبة للمرض
				c.130G>C Het.	طفرة مغيّرة	p.Gly44Arg	مسبّبة للمرض
9#	15	45	25	–	سويّ	–	–
	16		18	–	سويّ	–	–

خضعت الأورام الـ16 لشروط التّثبيت (فورمالين مدروء 4–6% لمدّة 22+/–2 ساعة في درجة حرارة الغرفة)، ومعايير الانتقاء للمقاطع (8x8 ميكرومتر) والّتي تمّت أمثلتها سابقاً، بالإضافة للإسجاء اليدويّ في البرافين. وأعطت هذه المعايير دنا ذا تركيز (>7.7 نانوغرام/ميكرولتر) وجودة (2.00–1.6=280/260) مناسبين لعمليّات التّضخيم والسّلسلة من جميع العيّنات بغضّ النّظر عن كثافة الخلايا فيها. تمّ فحص منتجات تفاعل التّضخيم على هلامة أغاروز 3% (الشّكل 24) قبل إرسالها للسّلسلة في شركة ماكروجن (Macrogen, Seoul, Korea).



الشّكل 24. صورة لهلامة أغاروز 3% تظهر نتائج عمليّة الرّحلان الكهربائيّ للعيّنات المستخدمة في التّقصّي عن الطّفرات. تظهر الصّورة نتائج تضخيم exon 2–MED12 والمنطقة المحيطة به (191 bp) من 16 عيّنة تمّ فحصها في الدّراسة. تتوافق المسارات 1 و18 مع سلّم الدنا الحجميّ القياسيّ 100 bp، وتتوافق المسارات 2 إلى 17 مع العيّنات 1 إلى 16 على التّوالي.

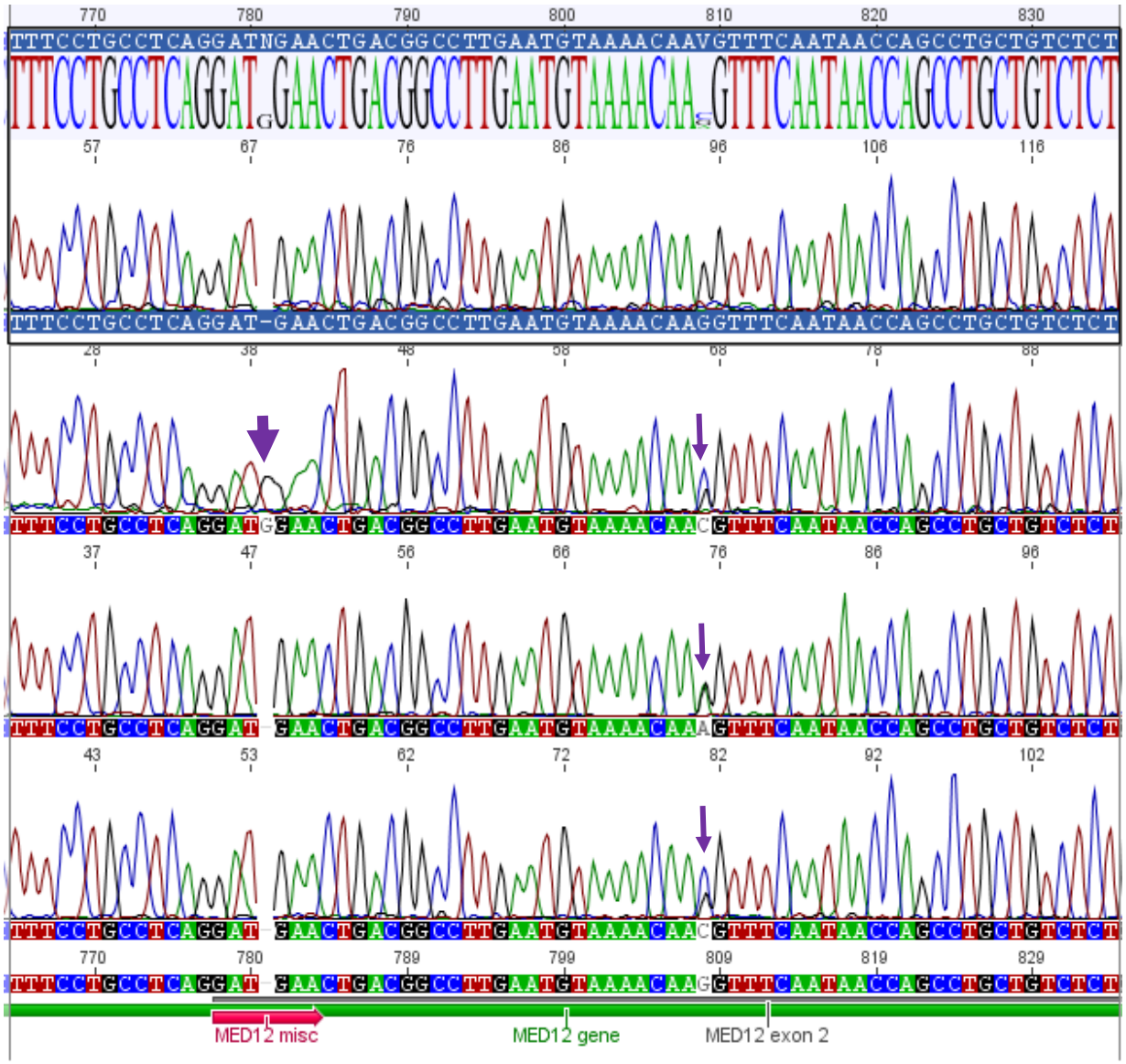
تمّت مقارنة تسلسلات الدنا لـ exon 2–MED12 من 16 عيّنة من مريضات الدّراسة مع تسلسل النّمط السّويّ (المسجل بالرّقم NG_012808.1 في قاعدة البيانات NCBI). وكشفت النّتائج عن طفرتين نقطيّة مفردة في الكودون 44 في عيّنتين (2، 6)، كلّ منهما من مريضة مختلفة (#2، #3 على التّوالي)، بالإضافة لطفرتين إحداهما في الكودون 44 (نقطيّة) والأخرى في الكودون 35 (إدخال) في عيّنة واحدة (14) من مريضة ثالثة (#8) (الجدول 3). بالتّالي، تمّ العثور على طفرات في 33.33% (9/3) من المرضى، أو 18.75% (16/3) من الأورام المستقصاة والّتي كانت بحجم 14–16 مم.

لدى مقارنة النّتائج مع الدّراسات العالميّة تبيّن أنّ هناك ثلاث طفرات مدروسة سابقاً (تلك الّتي في الكودون 44)، بالإضافة لطفرة جديدة غير معروفة سابقاً (الّتي في الكودون 35) فتمّ تسجيلها في البنك الجينيّ (GenBank) التّابع لقاعدة البيانات العالميّة NCBI في أوروبا، واليابان، والولايات المتّحدة الأمريكيّة (تحت رقم PP979487).

تتكّون الطّفرات النّقطيّة الثّلاثة (100%) من استبدالات (substitutions) مغيّرِة في الكودون الأكثر تحوّراً في exon 2–MED12 (الكودون 44) وفي الموضع 130. كان استبدالان منهما (66.6%) من نمط G>C (المريضتان #3، #8) واستبدال واحد (33.33%) من نمط G>A (المريضة #2).

أما الطّفرة الجديدة فكانت إدخال لقاعدة مفردة (G) في بداية الكودون 35 وفي الموضع 103 من الإكسون (عينة الورم 14، المريضة #8). من المتوقّع أن يتسبّب ادخال قاعدة مفردة في انزياح الإطار (frameshift) أثناء عمليّة التّرجمة بدءاً من الكودون 35 ليعطي بروتيناً متبدّلاً (altered) أو مبتوراً (truncated) (الشّكل 25 و26، الجدول 3).

تم التّنبؤ بقدرة الطّفرات الإمراضيّة باستخدام برمجيّة MutationTaster والّتي توقّعت أن تكون جميع الطّفرات الأربع ضمن فئة "على الأرجح مؤذية" وبالتّالي يشار إليها كطفرات مسبّبة للمرض (الجدول 3).



الشّكل 25. نتائج سلسلة MED12-exon 2 في عدد من عيّنات الدّراسة مقارنة بالجينوم المرجعي باستخدام أداة المعلوماتيّة الحيويّة Geneious 4.8.4. تمثّل المخطّطات من الأسفل إلى الأعلى: العينة 6 (c.130G>C، p.Gly44Arg)، العينة 2 (c.130G>A، p.Gly44Ser)، العينة 14 (طفرة نقطيّة c.130G>C، p.Gly44Arg وإدخال c.103insG)، وإحدى تسلسلات MED12-exon 2 السّويّة. تشير الأسهم الرّفيعة إلى مواقع الطّفرات النّقطيّة، ويشير السّهم الثّخين إلى موقع الإدخال.

الشّكل 26. مقارنة تسلسلات exon 2–MED12 في النّمط السّويّ والعيّنة 14 من الدّراسة والّتي أظهرت الطّفرة المزدوجة.

أ): يُظهر الشّكل مقارنة لتسلسل الدنا في النّمط السّويّ (WT) المأخوذ عن NCBI تحت رقم (NG_012808.1) (السّطر الأعلى) والتّسلسل في العيّنة 14 المسجّلة في قاعدة البيانات العالميّة NCBI تحت رقم (PP979487) (السّطر الأدنى). تمّ وضع خط تحت الاستبدالات، حيث يُلاحظ ادخال قاعدة مفردة (G) في الموقع 103 واستبدال قاعدة (G) بـ (C) في 130.

WT: G A T - G A A C T G A C

100 101 102 **103** 104 105 106 107 108 109 110 111

14: G A T G G A A C T G A C

WT: G T A A A A C A A G G T T T C

121 122 123 124 125 126 127 128 129 **130** 131 132 133 134 135

14: G T A A A A C A A C G T T T C

ب). يوضّح الشّكل تسلسل البروتين في النّمط السّويّ لـ exon 2–MED12 (105 قاعدة، 35 حمض أمينيّ):

GAT	GAA	CTG	ACG	GCC	TTG	AAT	GTA	AAA	CAA	GGT	TTC	AAT	AAC	CAG	CCT	GCT	GTC
D	E	L	T	A	L	N	V	K	Q	G	F	N	N	Q	P	A	V

TCT	GGG	GAT	GAG	CAT	GGC	AGT	GCC	AAG	AAC	GTC	AGC	TTC	AAT	CCT	GCC	AAG
S	G	D	E	H	G	S	A	K	N	V	S	F	N	P	A	K

ج). يوضّح الشّكل تسلسلات بروتين افتراضيّة لقراءة انزياح الإطار المفتوح (ORF) التّالي لإدخال قاعدة مفردة (c.103insG) في العيّنة 14 وذلك بالاعتماد على قاعدة البيانات Expasy (https://web.expasy.org/translate/). تمّ وضع خط تحت الطّفرات في المواقع c.130 وc.103 للتّمييز:

ORF1 (5'3' Frame 1):

GAT	GGA	ACT	GAC	GGC	CTT	GAA	TGT	AAA	ACA	ACG	TTT	CAA	TAA	CCA	GCC	TGC	TGT
D	G	T	D	G	L	E	C	K	T	T	F	Q	**Stop**	P	A	C	C

CTC	TGG	GGA	TGA	GCA	TGG	CAG	TGC	CAA	GAA	CGT	CAG	CTT	CAA	TCC	TGC	CAA
L	W	G	**Stop**	A	W	Q	C	Q	E	R	Q	L	Q	S	C	Q

ORF2 (5'3' Frame 2):

ATG	GAA	CTG	ACG	GCC	TTG	AAT	GTA	AAA	CAA	CGT	TTC	AAT	AAC	CAG	CCT	GCT	GTC
M	E	L	T	A	L	N	V	K	Q	R	F	N	N	Q	P	A	V

TCT	GGG	GAT	GAG	CAT	GGC	AGT	GCC	AAG	AAC	GTC	AGC	TTC	AAT	CCT	GCC	AAG
S	G	D	E	H	G	S	A	K	N	V	S	F	N	P	A	K

ORF3 (5'3' Frame 3):

TGG	AAC	**TGA**	CGG	CCT	**TGA**	ATG	**TAA**	AAC	AAC	GTT	TCA	ATA	ACC	AGC	CTG	CTG	TCT
W	N	**Stop**	R	P	**Stop**	M	**Stop**	N	N	V	S	I	T	S	L	L	S

CTG	GGG	ATG	AGC	ATG	GCA	GTG	CCA	AGA	ACG	TCA	GCT	TCA	ATC	CTG	CCA
L	G	M	S	M	A	V	P	R	T	S	A	S	I	L	P

لم يُظهر تسلسل exon 2–MED12 في بقيّة الأورام المستقصاة في الدّراسة وعددها 13 ورم أيّة طفرات، وبالتّالي تمّ تصنيف هذه الأورام على أنّها من النّوع السّويّ (WT). من المثير للاهتمام أنّ بعض هذه الأورام السّويّة قد تمّ جمعها من نفس الأرحام الّتي تمّ العثور على طفرات فيها (المريضتان #3، #8) (الجدول 3)، وهذا يؤكّد على الهويّة النّسيليّة المستقلّة والطّبيعة الجسميّة للطّفرات المكتشفة في exon 2–MED12 في دراستنا.

الفصل الخامس

المناقشة

يعدّ الورم العضليّ الأملس الرّحميّ مسؤولاً رئيسيّاً عن حالات استئصال الرّحم، ويسبّب بذلك مشكلة كبيرة لخصوبة الإناث في جميع أنحاء العالم. في دراسات حديثة، تمّ تقديم الطّفرات في جين الوحدة الفرعيّة 12 للمعقّد الوسيط (MED12) كأحد الأسباب الرّئيسيّة للورم العضليّ الأملس الرّحميّ، والّتي تمّت دراستها بدقّة في مختبرات البحوث وتمّ ذكرها في النّشرات العالميّة [Mäkinen *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2018; Buyukcelebi *et al.*, 2023]. ففي عام 2011، خلص تقرير موسّع إلى أنّ معدّل حدوث الطّفرات في جين MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة كان مرتفعاً بشكل ملفت جدّاً للنّظر (159 من 225 ورم، 71٪) [Mäkinen *et al.*, 2011a].

أصبح MED12 منذ ذلك الوقت وحتّى يومنا هذا موضع اهتمام وتقصّي في العديد من المختبرات البحثيّة حول العالم، وأثار الاكتشاف بحثاً واسع النّطاق حوله في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة. كان الاهتمام منصباً على الكشف عن المزيد من الطّفرات في MED12، والبحث في الدّور الّذي تلعبه أكثر الطّفرات تواتراً في تشكيل الورم العضليّ الأملس الرّحميّ. ومع ذلك، منذ 2011 وحتّى تاريخ إعداد هذه الأطروحة، لم يتمّ إجراء أيّة دراسة على الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في سوريّة لتحديد انتشارها، وإمراضيّتها، والآليّات الجزيئيّة الكامنة خلف نشأتها (بما في ذلك MED12)، ومدى تواتر هذه الآليّات.

على الرّغم من عدم وجود دراسات رسميّة حول انتشارها، فإنّ الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة ليست حدثاً نادراً في سوريّة، ويشهد على ذلك عدد عمليّات الاستئصال المعزولة للأورام أو المرافقة لاستئصال الرّحم والّتي يتمّ إجراؤها في المستشفيات يوميّاً وتسليمها لمختبرات الباثولوجيا للدّراسة ووضع التّشخيص النّهائيّ. ممّا يجعل دراسة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة بشكل عام وMED12 بشكل خاصّ مهمّاً للغاية. لذا قمنا بهذه الدّراسة الباثولوجيّة الجينيّة (والّتي تمّت على مرحلتين) لمعرفة حالة exon 2–MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المستأصلة من مريضات سوريّات.

بيّنت نتائجنا في المرحلة الأولى من الدّراسة والّتي قمنا فيها بتقصّي الدنا المستخلص من أنسجة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين والمحفوظة في أرشيف المستشفيات الجامعيّة أنّه غير مناسب لتضخيم exon 2–MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز. اعتماداً على هذه النّتائج، قمنا تالياً بالتّحقيق في الظّروف المعزّزة من خلال اختيار معايير تثبيت وانتقاء مثلى لعمليّات استخلاص دنا وتضخيم ناجحين.

تعدّ كميّة الورم وجودته من بين المتغيّرات الأكثر أهمّيّة والّتي تؤثّر على نجاح الاختبار الجزيئيّ، وبيّنت إحدى الّدراسات القريبة أنّ لظروف التّثبيت ومعالجة الأنسجة دوراً رئيسيّاً في تحديد جودة الورم وأهليّته لاختبار جزيئيّ ناجح [Uzun and Sarioglu, 2018]. ينطبق هذا على كلّ الأنسجة، ويبدو من نتائجنا أن الورم العضليّ الأملس الرّحميّ لا يشكّل استثناءً لهذه القاعدة.

كما أظهرت دراسات سابقة مساهمة العديد من العوامل في نجاح استخلاص الدنا وتضخيمه من أنسجة مثبّتة بالفورمالين ومسجّاة بالبرافين، بما في ذلك العامل المثبّت (التّركيز، درجة الحموضة، درجة الحرارة، والمدّة)، والتّخزين (الظّروف والمدّة). إذ يؤدّي الإخفاق في تطبيق الظّروف المناسبة إلى تدهور (deterioration) الدنا أو تشدّفه (fragmentation) وبالتّالي تدميره في العيّنة، ممّا يؤدي لفشل عمليّات استخلاصه وتضخيمه بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز وما يليها من عمليّات كسلسلة الدنا وغيرها [Campos *et al.*, 2012; Gupta, 2019].

وهذا ما بيّنته نتائج الدّراسة الأوليّة الّتي قمنا بها على 12 عيّنة من أورام عضليّة ملساء رحميّة محفوظة في أرشيف مستشفيي التّوليد والبيروني الجامعيّين والّتي لم يتمّ توثيق ظروف تثبيتها بما في ذلك نوع وتركيز المثبّت والأهم مدّة التّثبيت. إذ كانت عمليّة التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز غير ناجحة، ويمكن أن يعزى ذلك إلى تدهور الدنا وتدميره في هذه العيّنات فقد كانت جودة و/ أو كميّة الدنا المستخلص منخفضة جدّاً.

بالتّالي حاولنا البحث عن حل عدّة مرات، وفي مرحلة معيّنة فكّرنا في اللّجوء لاستخلاص الدنا من عيّنات طازجة مباشرة دون المرور بالتّثبيت والإسجاء بالبرافين وذلك باستخدام عتيدة استخلاص مختلفة والّتي اختبرناها ونجحت. لكن أخذنا بالاعتبار نقطتين هامّتين للاستمرار.

تتلخّص النّقطة الأولى في أنّ التّحليل الجينيّ الجزيئيّ للأنسجة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين أمر لا غنى عنه في عمليّات التّشخيص والبحث العلمي، إذ تشكّل هذه الأنسجة جزءاً لا يتجزّأ من الرّوتين اليوميّ في معظم المختبرات الباثولوجيّة التّشخيصيّة والبحثيّة في أنحاء مختلفة من العالم. فاستخدام الأنسجة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين شائع لأسباب منطقيّة عديدة، ومنها فرصة تطبيق الاختبارات على نفس الأنسجة على التّوازي (مثل الكيمياء الهيستولوجيّة المناعيّة والتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز)، وبالتّالي فرصة لمقارنة النّتائج. هذا بالإضافة إلى إمكانيّة استخدام الأنسجة المحفوظة بعد تعاقب الزّمن عليها وهذا ما تمّ تأكيده في دراسة سابقة [Oba *et al.*, 2022]، ممّا يتيح الإمكانيّة لاستمراريّة البحوث على نفس العيّنات وتطبيق طرق أكثر حداثة مع مرور الزّمن وتقدّم التّكنولوجيا.

أمّا النّقطة الثّانية وقد تكون الأهمّ، اعتقدنا أنّنا اكتشفنا السّبب الكامن وراء فشل عمليّة التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز للدنا المستخلص من عيّنات الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المحفوظة في أرشيف المشافي الجامعيّة وكان علينا المتابعة للتحقق من هذا الاعتقاد بالبحث عن حلّ والتّأكد من نتائج تطبيقه.

لذا قرّرنا أمثلة معايير تثبيت وإسجاء وانتقاء الأنسجة والّتي قد تختلف من مركز طبّي إلى آخر ومن نوع أنسجة إلى آخر. بناءً عليه، تمّ الحصول على عيّنات من أورام عضليّة ملساء رحميّة طازجة من مريضة مباشرة بعد أن خضعت لعمليّة استئصال رحم، وتمّ تثبيت الأورام في الفورمالين المدروء بنسبة 6٪ في درجة حرارة الغرفة بشكل فوريّ. انطلقنا من نسبة تثبيت (4–10٪) ومدّة (<24 ساعة) وتوافق ذلك مع ما ذكر في دراسة سابقة [Campos *et al.*, 2012] وبروتوكولات الشّركة المصنّعة لعتيدة الاستخلاص (Qiagen, Dusseldorf, Germany)، والّتي أشارت لضرورة التّقيّد بتركيز المثبّت ومدّة التّثبيت في الحدود المذكورة.

عادةً، يتمّ تشغيل بروتوكول الإسجاء بالبرافين بالجهاز الآلي في نهاية اليوم في المستشفى كي تكون العيّنات جاهزة في صباح اليوم التّالي للتّحضير لعمليّة القطع بالمشراح. لكن هذا الرّوتين لم يمنح دراستنا وقتاً كافياً للتّثبيت قبل الإسجاء. وللتّغلب على هذه العقبة والحفاظ على مدّة تثبيت أقلّ من 24 ساعة، تمّ إسجاء الأنسجة في البرافين يدويّاً في المستشفى الوطني الجامعيّ بعد مضي 22 ساعة على التّثبيت.

تمّت تجربة أعداد وسماكة مقاطع مختلفة وبيّنت النّتائج أنّ (8x8 ميكرومتر) كانت بداية جيّدة لإعطاء كميّة كافية من الدنا وضمان عمليّة تضخيم ناجحة بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز، لذا تمّت المحافظة عليها لكلّ العيّنات. لكن، على الرّغم من الحفاظ على عدد وسماكة مقاطع متطابقة بين العيّنات، أظهرت نتائجنا أنّ وزن الأنسجة وكميّة الدنا المستخلص بين العيّنات كانا مختلفين بشكلٍ كبير. كانت الحدود الدّنيا لوزن الأنسجة البدئيّة المستخدمة وتركيز الدنا المستخلص الّذي أعطى منتجاً مقبولاً في نهاية عمليّة التّضخيم 5 ملغ و7.7 نانوغرام/ميكرولتر، على التّوالي. يمكن أن يعزى الاختلاف الملحوظ في تركيز الدنا بين العيّنات إلى التّباين الواضح في كثافة الخلايا بين أنسجة الأورام في العيّنات المدروسة. هذا التّباين في خلويّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة شائع وقد تمّ ذكره في دراسة سابقة [Holdsworth-Carson *et al.*, 2016].

هدفت المرحلة الثّانية من الدّراسة إلى استكشاف حالة exon 2-MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المستأصلة من مريضات سوريّات. إذ تمّ الكشف في الدّراسات السّابقة عن غالبيّة طفرات MED12 في هذه الأورام في exon 2، وكان أكثرها شيوعاً الطّفرات المغيّرِة في الكودونات 35، و43، و44 [Mäkinen *et al.*, 2011a; Markowski *et al.*, 2012; Mäkinen *et al.*, 2013; Firdaus *et al.*, 2021]. وفقاً لذلك، ركّزنا في دراستنا في استقصاء الطّفرات في جين MED12 منذ البداية على exon 2.

إضافة لذلك، فقد ثبت أنّ طفرات exon 2-MED12 تُشاهد بشكل أكثر تواتراً في حالة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المتعدّدة والصّغيرة (<30 مم) [Heinonen *et al.*, 2017; Ishikawa *et al.* 2023]. وبالتّالي،

في هذه المرحلة من دراستنا، قمنا بجمع الأورام الصّغيرة (25≥ مم) من الأرحام الّتي احتوت على أورام عضليّة ملساء متعدّدة.

إنّ تمييز الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة الحاوية على طفرات في exon 2–MED12 من خلال التّقييم المجهريّ الباثولوجيّ وحده غير ممكناً. فعادةً، تُظهر الحالات المتحوّلة مورفولوجيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة النّموذجيّة نفسها من خلايا مغزليّة منتظمة، وغياب وجود النّخر، ومؤشّر انقسامي منخفض (3 ≥ انقسامات/10HPF)، وكميّات متفاوتة من التّليّف الهيالييني التّنكّسيّ، مع غياب للأنواع الفرعيّة غير المعتادة (المتغيّر مفرط الخلويّة، أو الظّهاريّ، أو المخاطيّ، أو اللّانمطيّ) [Mäkinen *et al.*, 2011a]. لذا تعدّ الدّراسات الجزيئيّة النّهج القياسيّ لاستقصاء الطّفرات في MED12 [Amendola *et al.*, 2024].

كشفت نتائج المرحلة الثّانية من الدّراسة والّتي تمّت على 16 ورم تمّ جمعها من 9 مريضات عن استبدالات قاعديّة في ثلاث من مريضات الدّراسة (مريضتان لديهما استبدال من نوع c.130G>C ومريضة واحدة لديها استبدال من نوع c.130G>A)، ممّا يعطي متغيّرات مفردة النّوكليوتيد ويؤدّي إلى طفرات مغيّرةٍ في الكودون 44.

تتوافق الاستبدالات القاعديّة المشاهدة في دراستنا في c.130 مع التّغييرات الّتي ذكرت في دراسات سابقة على exon 2–MED12 [Markowski *et al.*, 2012; Mäkinen *et al.*, 2013; Keneme *et al.*, 2019]. إذ لوحظت عمليّات الاستبدال في المواضع 130 و131 في الكودون 44 بشكل متكّرر، فكانت مسؤولة عن معظم التّبدلات القاعديّة في تلك الدّراسات (47.5% للموضع 131، و24.1% للموضع 130) [Mäkinen *et al.*, 2011a, Markowski *et al.*, 2012; Keneme *et al.*, 2019; Amendola *et al.*, 2024]. مع الإشارة إلى أنّ هذه الدّراسات قد استقصت أعداداً أكبر بكثير من العيّنات مقارنة مع دراستنا الحاليّة. مما يؤكّد مرّة أخرى على أنّ الكودون 44 هو أكثر كودون محافِظ (conserved) في جين MED12، ويملك دوراً محوريّاً بالغ الأهمّيّة في العمليّة البيولوجيّة لبروتين MED12 كما ذكر في دراسات سابقة [Bourbon, 2008; Turunen *et al.*, 2014].

إضافة إلى ذلك، تمّ الكشف في دراستنا في إحدى الحالات الحاوية على طفرة في الكودون 44 عن طفرة إضافيّة فريدة لم يرد ذكرها في الدّراسات السّابقة على exon 2–MED12 وهي إدخال لقاعدة مفردة (G) في الكودون 35 (c.103)، لذا تمّ تسجّيلها في البنك الجينيّ (تحت رقم PP979487). يُتوقّع أن يتسبّب إدخال قاعدة مفردة في انزياح إطار التّرجمة بدءاً من الكودون 35 وتغيير في تسلسل الأحماض الأمينيّة في البروتين النّاتج.

في الدّراسات السّابقة، تمّ الحكم على طفرات exon 2–MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة بأنّها طفرات جسميّة من خلال تواجدها في تلك الأورام وغيابها من عضلة الرّحم الطّبيعيّة أو دم المريضات اللّواتي خضعن للدّراسة [Mäkinen *et al.*, 2011a, Markowski *et al.*, 2012; Keneme *et al.*, 2019]، أو من خلال تباين تواجدها في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المستأصلة من نفس المريضة [Markowski *et al.*, 2012]. بالإضافة إلى ذلك، كانت الطّفرات الجسميّة في exon 2–MED12 ذات طبيعة متغايرة الألائل [Ajabnoor *et al.*, 2018].

اتفقت نتائج دراستنا مع هذه الدّراسات، إذ كانت الطّفرات الثّلاث المكتشفة في الدّراسة الحاليّة في الكودون 44 متغايرة الألائل. كما تعدّ هذه الطّفرات بمجملها جسميّة فقد تمّ اكتشاف أحدها في ورم واحد من ورمين في احدى الحالات المدروسة (المريضة #8) وفي ورم من أربعة أورام في حالة أخرى (المريضة #3). كانت بقيّة الأورام المستأصلة من هذه الأرحام (ورم من المريضة #8، وثلاثة أورام من المريضة #3) من النّمط السّويّ، ممّا يشير إلى أصل نسيلي مستقلّ لهذه الأورام. كما يقترح أنّ جينات قائدة أخرى مسؤولة عن إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة الّتي لا يشارك فيها exon 2–MED12 في دراستنا. بذلك تؤكّد الدّراسة أنّ بدء ونموّ كلّ ورم عضليّ أملس رحميّ هو حدث فرديّ ومعزول عن الأورام الأخرى.

بلغ معدّل تواتر الطّفرات في exon 2–MED12 في الدّراسة الحاليّة 18.75% (16/3 ورم) وهو أقلّ معدّل تمّ الإخبار عنه حتّى الآن في الدّراسات العالميّة. إذ تراوح معدّل حدوث الطّفرات في الدّراسات الأخرى، والّتي أجريت على أعداد متباينة من الأورام (50–225 ورم)، من 31–88% (الجدول 1).

على الرّغم من ارتفاع معدّل تواتر طفرات MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة الّتي تمّ استقصاؤها في مختلف الدّراسات، فإنّ عدد الأورام الخالية من طفرات MED12 مرتفع أيضاً (12–69%). وهذا يشير إلى عوامل أخرى غير مرتبطة بـ exon 2–MED12 أو حتّى عوامل غير مرتبطة بالجين MED12 كاملاً. تعدّ طفرات الإنترون 1 وطفرات الإكسون 1 في جين MED12 والّتي تم اكتشافها في دراسة سابقة من العوامل غير المرتبطة بـ exon 2–MED12 [Kämpjärvi *et al.*, 2014]. كما ذكرت دراسات سابقة بعض العوامل القائدة لتشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة غير المرتبطة بالجين MED12. تضمّ هذه العوامل الإفراط في التّعبير عن مجموعة high mobility group AT–hook 2 (HMGA2)، وفقدان ثنائي الألائل لهيدراتاز الفومارات (fumarate hydratase)، والطّفرات ثنائيّة الألائل في الجينات المرتبطة بـ neddylation of the Cullin 3–RING E3 ligase، والطّفرات الّتي تؤثّر على الجينات المرمّزة لأعضاء معقّد SRCAP [Mehine *et al.*, 2016 and 2022; Välimäki *et al.*, 2023]. جميع هذه العوامل قائدة وحصريّة كما هو الحال مع طفرات MED12، لكنّها تتواجد في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة بمعدلات تواتر أقلّ بكثير من معدّل تواتر طفرات MED12 [Mehine *et al.*, 2016].

بالتّالي، فعلى الرّغم من أنّ طفرات exon 2–MED12 هي التّغيير القائد في غالبيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في الدّراسات السّابقة [Makinen *et al.*, 2011a; 2017]، قد تكون جينات قائدة أخرى هي المسؤولة عن تشكّل هذه الأورام في المريضات السّوريّات مما يفسّر التّواتر المنخفض لطفرات exon 2–MED12 في دراستنا. سيتطلّب الكشف عن هذه الجينات بالطّبع اتباع طرق مختلفة عمّا قمنا به في هذه الدّراسة مثل سلسلة مجموعة جينات مستهدفة (رعيل panel) أو سلسلة الإكسوم (exome) كاملاً.

قد يعود السّبب في التّواتر المنخفض لطفرات exon 2–MED12 الملاحظ في دراستنا أيضاً إلى خصوصيّة العرق العربيّ (الإثنيّة ethnicity). فقد لوحظت في دراسات سابقة اختلافات عرقيّة في نسبة انتشار الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة، والعمر عند التّشخيص، والأعراض المصاحبة، والعمر عند استئصال الرّحم. كما سجّلت اختلافات في خصائص الورم من عدد وحجم العقيدات الحزميّة تبعاً للعرق. والأهمّ، فإنّ تواتر الطّفرات في exon 2–MED12

يختلف أيضًا حسب العرق ممّا قد يفسّر الدّور الّذي يلعبه العرق في إمراضيّة هذه الأورام [Parker, 2007; Okolo, 2008; Makinen *et al.*, 2011a and b; Sadeghi *et al.*, 2016; Ajabnoor *et al.*, 2018; Keneme *et al.*, 2019].

لا يمكن للأسف الخوض أكثر في أيّ دور قد يعزى للعرق العربيّ في التّواتر المنخفض لطفرات exon 2-MED12. إذ أنّ الأبحاث حول MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في 22 دولة عربيّة تشكّل مجمل الوطن العربيّ نادرة جدّاً. ممّا يجعل من غير الممكن استشارة دراسات على مجموعات من نفس العرق و يحرمنا بالتّالي من فرصة المقارنة معها وتدارس دور العرق العربيّ في إمراضيّة هذه الأورام. فبالإضافة إلى الدّراسة الحاليّة، هناك دراسة واحدة فقط ذات صلة بالموضوع وهي من المملكة العربيّة السّعوديّة وبلغ تكرار طفرات exon2-MED12 فيها 44% [Ajabnoor *et al.*, 2018]. بذلك تعدّ دراستنا الدّراسة الثّانية في الوطن العربيّ الّتي تستقصي حالة جين MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة.

إنّ توقّع التّأثيرات البيولوجيّة للمتغيّرات المختلفة الّتي تمّ الكشف عنها في exon 2-MED12 من خلال قراءة نتائج سلسلة الدنا فقط أمر صعب للغاية. لكن أصبح من الممكن من خلال استخدام أدوات حاسوبيّة (in silico) حديثة تعتمد على خوارزميّات معيّنة (algorithms) التّنبّؤ بمدى قدرة المتغيّرات على إحداث الأمراض [Schwarz *et al.*, 2014; Keneme *et al.*, 2019 and 2023]. يُتوقّع وفقاً لإحدى هذه الأدوات الحاسوبيّة الّتي استخدمناها (MutationTaster) أن تكون جميع الطّفرات المبلّغ عنها في الدّراسة الحاليّة مسبّبة للأمراض [Schwarz *et al.*, 2014]. وهذا التّنبّؤ يتّفق مع دراسات حديثة أخرى استقصت تأثير عدد من الطّفرات الشّائعة في الكودون 44 والموافقة للطّفرات الّتي تمّ الكشف عنها في دراستنا على بروتين MED12 النّاتج [Keneme *et al.*, 2019 and 2023].

قامت هذه الدّراسات عبر الأدوات الحاسوبيّة باستقصاء بنية البروتين للتّنبّؤ باستقراره ووظيفته وتفاعلاته. وقد أظهرت أنّ الطّفرات المغيّرِة (c.130 G>A وc.130 G>C) في الكودون 44 تسبّب تغيّرات هيئيّة (conformational) في البنية ثلاثيّة الأبعاد ممّا قد يؤدّي إلى تشوّه (deformation) وعدم استقرار وتغيّر في الوظيفة

البيولوجيّة لبروتين MED12. حيث تعمل الطّفرات المغيّرة في الكودون 44 (p.Gly44Arg وp.Gly44Ser) المكتشفة في دراستنا حسب هذه الدّراسات على تغيير بنية البروتين من α (في النّمط السّويّ) إلى β α، وهذا التّغيير البنيويّ سيجعل البروتين المترجم MED12 غير وظيفيّ، ممّا يؤكّد على أهمّيّة هذه الطّفرات في إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة [Keneme *et al.*, 2019 and 2023].

يؤدّي عادة ادخال قاعدة مفردة في تسلسل الدنا بشكل مشابه لما يحدث في دراستنا الحاليّة إلى انزياح إطار التّرجمة والحصول على منتج متبدّل أو مبتور. وهذا ما تقترحه جميع السّيناريوهات البديلة لقراءة انزياح الإطار مع الطّفرة الفريدة (c.103insG) في الكودون 35 (الشّكل 26). لكن وبغضّ النّظر عن تأثير طفرة c.103insG فإنّ البروتين النّاتج سيكون حُكماً غير وظيفيّ بسبب وجود طفرة مصاحبة (c.130 G>C) في الكودون 44 (p.Gly44Arg) حسب الدّراسات العالميّة السّابقة [Keneme *et al.*, 2019 and 2023].

تؤثّر نتائج البحوث الّتي تدرس MED12 في منظورنا لإمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة وتعمل أيضاً على تغيير كيفيّة معالجتنا لهذه الأورام. تشير التّقارير الحديثة إلى أنّه يجب مراعاة الفئات الفرعيّة الجزيئيّة عند تقييم علاجات الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة، حيث تتأثّر استجابة هذه الأورام للعلاج بالفئة الفرعيّة الجزيئيّة. فمثلاً استجابت الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة الحاوية على MED12 طافر للأسيتات أوليبريستال (ulipristal acetate)، وهو مؤثّر في مستقبل البروجسترون، بالانكماش بمقدار 4.4 مرّة أكثر مقارنة بالفئات الفرعيّة الجزيئيّة الأخرى والّتي لا تحتوي على MED12 طافر [Kolterud *et al.*, 2023; Milewska *et al.*, 2024].

يعزى هذا التّأثير إلى تفعيل مستقبل البروجسترون (progesterone receptor, PRA) المثبّط لانتساخ الجينات الواقعة تحت تأثير البروجسترون (كمستقبلات الهرمونات السّتيروئيديّة) وزيادة التّعبير عن PRA، وعلى العكس تثبيط مستقبل البروجسترون (PRB) المنشّط لانتساخ الجينات الواقعة تحت تأثير البروجسترون وخفض التّعبير عنه، بالإضافة إلى التّأثير سلباً على مسار إطلاق الإشارة لعامل النّموّ المحوّل (TGF−β) المذكور آنفاً. تحدث الاستجابة

بغضّ النّظر عن عمر المريضة أو عدد الولادات، وعن العدد الإجماليّ للأورام أو حجمها البدئيّ [Kolterud *et al.*, 2023; Milewska *et al.*, 2024].

يسلّط ما سبق الضّوء على أهمّيّة تحديد الآليّات الجزيئيّة القائدة لتشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة والواسمات البيولوجيّة المحتملة، مثل MED12، والّتي قد تشكّل مفتاح المعالجة غير الجراحيّة باستخدام الطّبّ الدّقيق وقد تؤدّي أيضاً إلى مناهج تشخيصيّة ووقائيّة مهمّة. ويؤكّد على أهمّيّة الدّراسة الحاليّة كأوّل محاولة للكشف عن الآليّات الجزيئيّة القائدة في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة لدى المريضات السّوريّات لتمكينهنّ في المستقبل من الاستفادة من الوسائل التّشخيصيّة المتقدّمة والوقائيّة والمعالجات المستهدفة.

الفصل السّادس

الاستنتاجات والتّوصيات

الدّراسة هي أوّل تقرير باثولوجي جينيّ من سوريّة وثاني دراسة من الوطن العربيّ يستقصي طفرات MED12 في الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة. حدّدت الدّراسة بعضاً من أهمّ المعايير الحاسمة لنجاح استخلاص الدنا من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين، ووثقت وجود طفرات في exon 2–MED12 في المريضات السّوريّات.

- ❖ تستنتج الدّراسة أنّ الدنا المستخلص من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين بعد أمثلة شروط التّثبيت (مدّة وتركيز المثبّت) ومعايير انتقاء المقاطع مناسب تماماً لعمليّة تضخيم exon 2–MED12 بواسطة التّفاعل السّلسليّ للبوليميراز.
- ❖ تَخلص الدّراسة إلى أنّ كلّ ورم من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة هو عيّنة فريدة من نوعها، وبالتّالي فإنّ وزن الأنسجة وكميّة المقاطع وسماكة المقاطع قد لا يعكسان خلويّة الورم أو تركيز الدنا فيها. لذلك، لا غنى عن هيستولوجيا الأنسجة عند اتخاذ القرار بشأن الاختيار النّاجح للأورام الّتي ستعطي عمليّة تضخيم مثمرة بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز.
- ❖ تؤكّد الدّراسة أنّ العيّنات النّادرة ذات الأنسجة الشّحيحة وكميّة الدنا الضّئيلة قد لا تزال مفيدة في عمليّة التّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز والاختبارات الجينيّة اللّاحقة.
- ❖ تجزم الدّراسة بوجود طفرات في exon 2–MED12 في المريضات السّوريّات، وهو الإكسون الّذي ثبت تورّطه في إمراضيّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في الدّراسات العالميّة، والمرشّح الأهمّ للاستهداف مستقبلاً بأدوات الطّبّ الدّقيق والشّخصيّ في إطار التّشخيص والعلاج والوقاية.
- ❖ تستنبط الدّراسة وجود آليّات أخرى بالإضافة إلى MED12 مسؤولة عن تشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة في المريضات السّوريّات.

وبناء على ما تقدّم توصي الدّراسة بما يلي:

1. توثيق ظروف التّثبيت (خاصّة النّسبة والمدّة) للأنسجة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين في مختبرات الباثولوجيا حتّى يتسنّى اتخاذ قرارات مستنيرة بشأن استخدام الأنسجة لاستخلاص الدنا والاختبارات الجينيّة اللّاحقة.
2. تقصّي هيستولوجيا النّسيج وكثافة خلويّة الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة قبل اتخاذ قرار بشأن استخدام العيّنة للدّراسات الجزيئيّة، أو يمكننا استخدام طرق بديلة مثل اختيار الأنسجة المرغوبة بطريقة التّشريح المجهريّ (microdissection) بشكل مباشر.
3. دراسة تأثير التّخزين من مدّة ودرجة حرارة وظروف على سلامة الدنا وإمكانيّة استخدام العيّنات المثبتّة والمسجّاة بالبرافين بعد تعاقب الزّمن والّذي لم يتسنّ لدراستنا استقصائه.
4. استقصاء مجموعة كبيرة من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة للتّوصل إلى معدّل انتشار وطبيعة طفرات MED12 في مجتمعنا. سيكون من المثير للاهتمام الكشف عن طفرات جديدة أخرى ومعرفة ما إذا كانت قابلة للاستهداف مستقبلاً من خلال الطّرائق التّشخيصيّة أو العلاجيّة أو الوقائيّة.
5. القيام ببحث أوسع للكشف عن جميع الآليّات الجزيئيّة الأخرى المساهمة في تشكّل الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة لدى المريضات السّوريّات في غياب وجود طفرات exon 2–MED12.

7- قائمة المراجع References:

- Ajabnoor, G. M. A., Mohammed, N. A., Banaganapalli, B., Abdullah, L. S., Bondagji, O. N., Mansouri, N., *et al.* Expanded somatic mutation spectrum of MED12 gene in uterine leiomyomas of Saudi Arabian women. Front. Genet. 2018;9:552.
- Al-Hendy, A., Myers, E. R., Stewart, E. Uterine Fibroids: Burden and Unmet Medical Need. Semin. Reprod. Med. 2017(a);35:473-480.
- Al-Hendy, A., Laknaur, A., Diamond, M. P., Ismail, N., Boyer, T. G., Halder, S. K. Silencing Med12 gene reduces proliferation of human leiomyoma cells mediated via Wnt/β-catenin signaling pathway. Endocr. 2017(b);158(3):592-603.
- Amendola, I. L. S., Spann, M., Segars, J., Singh, B. The Mediator Complex Subunit 12 (MED-12) Gene and Uterine Fibroids: A Systematic Review. Reprod Sci. 2024;31(2):291-308.
- Arici, A., Sozen, I. Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. Fertil. Steril. 2000;73:1006-11.
- Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D., Schectman, J. M. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. AJOG. 2003;188:100-107.
- Bourbon, H. M. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four module transcriptional mediator complex. Nucleic Acids Res. 2008;36:3993-4008.
- Bulun, S. E. Uterine Fibroids. NEJM. 2013;369:1344-1355.
- Buyukcelebi, K., Chen, X., Abdula, F., Elkafas, H., Duval, A. J., Ozturk, H., *et al.* Engineered MED12 mutations drive leiomyoma-like transcriptional and metabolic programs by altering the 3D genome compartmentalization. Nat. Commun. 2023;14(1):4057.
- Campbell, I. Uterine physiology. Anaesth. Intensive Care. 2005;6(3):76.
- Campos, P. F., Thomas, M. P., Gilbert, T. M. DNA Extraction from Formalin-Fixed Material. Methods and Protocols. Methods Mol. Biol. 2012;840.
- Cheng, L. C., Li, H. Y., Gong, Q. Q., Huang, C. Y., Zhang, C., Yan, J. Z. Global, regional, and national burden of uterine fibroids in the last 30 years: Estimates from the 1990 to 2019 Global Burden of Disease Study. Front Med (Lausanne). 2022;9:1003605.

- Coutinho, L. M., Assis, W. A., Spagnuolo-Souza, A., Reis, F. M. Uterine Fibroids and Pregnancy: How Do They Affect Each Other? Reprod. Sci. 2022;29:2145–2151.
- Crintea, A., Constantin, A. M., Motofelea, A. C., Crivii, C. B., Velescu, M. A., Coşeriu, R. L., *et al*. Targeted EGFR Nanotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. J Funct Biomater. 2023;14(9):466.
- Di Tommaso, S., Tinelli, A., Malvasi, A., Massari, S. Missense mutations in exon 2 of the MED12 gene are involved in IGF-2 overexpression in uterine leiomyoma. Mol. Hum, Reprod. 2014;20(10):1009-15.
- El-Andaloussi, A., Al-Hendy, A., Ismail, N., Boyer, T. G., Halder, S. K. Introduction of somatic mutation in MED12 induces Wnt4/β-catenin and disrupts autophagy in human uterine myometrial cell. Reprod. Sci. 2020;27(3):823-832.
- Ellis, H. Anatomy of the uterus. Anaesth. Intensive Care. 2005;6(3):74–75.
- Flake, G. P., Andersen, J., Dixon, D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. Environ Health Perspect. 2003;111:1037-54.
- Firdaus, R., Agrawal, P., Anagani, M., Vijayalakshmi, K., Hasan, Q. Multiple Mutations in Exon-2 of Med-12 Identified in Uterine Leiomyomata. J. Reprod. Infertil. 2021;22(3):201-209.
- Gupta, N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. J. Cytol. 2019;36(2):116-117.
- Heinonen, H. R., Sarvilinna, N. S., Sjöberg, J., Kämpjärvi, K., Pitkänen, E., Vahteristo, P., *et al.* MED12 mutation frequency in unselected sporadic uterine leiomyomas. Fertil. Steril. 2014;102:1137-42.
- Heinonen, H. R., Pasanen, A., Heikinheimo, O., Tanskanen, T., Palin, K., Tolvanen, J., *et al.* Multiple clinical characteristics separate MED12-mutation-positive and -negative uterine leiomyomas. Sci. Rep. 2017;7:1015.
- Holdsworth-Carson, S. J., Zhao, D., Cann, L., Bittinger, S., Nowell, C. J., Rogers, P. A. Differences in the cellular composition of small versus large uterine fibroids. Reprod. 2016;152(5):467-80.
- Ishikawa, H., Kobayashi, T., Kaneko, M., Saito, Y., Shozu, M., Koga, K. Rising stars: Role of MED12 mutation in the pathogenesis of uterine fibroids. J. Mol. Endocrinol. 2023;71(4):e230039.

- Islam, M. S., Protic, O., Stortoni, P., Grechi, G., Lamanna, P., Petraglia, F., *et al.* Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. Fertil. Steril. 2013;100: 178–193.
- Islam, M. S., Ciavattini, A., Petraglia, F., Castellucci, M., Ciarmela, P. Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. Hum. Reprod. Update. 2018;24:59–85.
- Je, E. M., Kim, M. R., Min, K. O., Yoo, N. J., Lee, S. H. Mutational analysis of MED12 exon 2 in uterine leiomyoma and other common tumors. IJC. 2012;131:E1044-7.
- Kämpjärvi, K., Park, M. J., Mehine, M., Kim, N. H., Clark, A. D., Butzow, R., *et al.* Mutations in Exon 1 highlight the role of MED12 in uterine leiomyomas. Hum. Mutat. 2014;35:1136-41.
- Katke, R. D., Pushpa, C., Asrani, S. Giant uterine leiomyoma (5 kg) with bunch of 45 fibroids: a challenging case during covid-19 pandemic. Obstet. Gynecol. Int. J. 2021;12(4):199-201.
- Keneme, B., Ciss, D., Ka, S., Dem, A., Sembene, P. M., Pape, M., *et al.* Prediction of the structure and mutations instability of the Med12 exon2 gene in uterine fibroids in Senegalese women. IJGG. 2019;7(3):80-87.
- Keneme, B., Sembene, M. Prediction by in silico tools of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNP) and 3-d protein structure prediction in the female MED12 gene associated with uterine leiomyomas. ARRB. 2023;38(10):11-23.
- Kim, J. J., Sefton, E. C. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. Mol. Cell Endocrinol. 2012;358:223–31
- Kolterud, Å., Välimäki, N., Kuisma, H., Patomo, J., Ilves, S. T., Mäkinen, N., *et al.* Molecular subclass of uterine fibroids predicts tumor shrinkage in response to ulipristal acetate. Hum. Mol. Genet. 2023;32(7):1063-1071.
- Koltsova, A. S., Efimova, O. A., Pendina, A. A. A View on Uterine Leiomyoma Genesis through the Prism of Genetic, Epigenetic and Cellular Heterogeneity. Int. J. Mol. Sci. 2023;24(6):5752.
- Kyle, D., Schwartz, L. Anatomy & histology. Pathology Outlines. Available at: https://www.pathologyoutlines.com/topic/uterusnormal.html. Accessed October 15th, 2024.
- Laughlin-Tommaso, S. K., Stewart, E. A. Moving toward individualized medicine for uterine leiomyomas. Obstet. Gynecol. 2018;132:961–971.

- Leak, S., Horne, G. A., Copland, M. Targeting BCR-ABL1-positive leukaemias. Camb Prism Precis Med. 2023;1:e21
- Lee, M., Cheon, K., Chae, B., Hwang, H., Kim, H. K., Chung, Y. J., *et al.* Analysis of MED12 mutation in multiple uterine leiomyomas in South Korean patients. Inter. J. Med. Sci. 2018;15(2):124-128.
- Lewis, T. D., Malik, M., Britten, J., Parikh, T., Cox, J., Catherino, W. H. Ulipristal acetate decreases active TGF-beta3 and its canonical signaling in uterine leiomyoma via two novel mechanisms. Fertil. Steril. 2019;111:806-15.
- Li, Z., Maeda, D., Kudo-Asabe, Y., Tamura, D., Nanjo, H., Hayashi, A., *et al.* MED12 is frequently mutated in ovarian and other adnexal leiomyomas. Hum. Pathol. 2018;81:89-95.
- Ligon, A. H., Morton, C. C. Leiomyomata: Heritability and cytogenetic studies. Hum. Rep. Update. 2001;7(1):8-14.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., Aguilar-Quesada, R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. Biopreserv Biobank. 2016;14(4):264-70.
- Machado-Lopez, A., Simón, C., Mas, A. Molecular and Cellular Insights into the Development of Uterine Fibroids. Int. J. Mol. Sci. 2021;22:8483.
- Mäkinen, N., Mehine, M., Tolvanen, J., Kaasinen, E., Li, Y., Lehtonen, H. J., *et al.* MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. Science. 2011(a);334:252-255.
- Mäkinen, N., Heinonen, H. R., Moore, S., Tomlinson, I. P., Van der Spuy, Z. M., Aaltonen, L. A. MED12 exon 2 mutations are common in uterine leiomyomas from South African patients. Oncotarget. 2011(b);2:966-9.
- Mäkinen, N., Vahteristo, P., Ka¨mpja¨rvi, K., Arola, J., Bu¨tzow, R., Aaltonen, L. A. MED12 exon 2 mutations in histopathological uterine leiomyoma variants. EJHG 2013;21:1300-1303.
- Mäkinen, N., Vahteristo, P., Bützow, R., Sjöberg, J., Aaltonen, L. A. Exomic landscape of MED12 mutation-negative and -positive uterine leiomyomas. IJC. 2014;134:1008-12.
- Mäkinen, N., Aavikko, M., Heikkinen, T., Taipale, M., Taipale, J., Koivisto-Korander, R., *et al.* Exome sequencing of uterine Leiomyosarcomas identifies frequent mutations in TP53, ATRX, and MED12. PLoS Genet. 2016;12:e1005850.

- Mäkinen, N., Kämpjärvi, K., Bützow, R., Vahteristo, P. Characterization of MED12, HMGA2, and FH alterations reveals molecular variability in uterine smooth muscle tumors. Mol. Cancer. 2017;16:10.
- Markowski, D. N., Bartnitzke, S., Löning, T., Drieschner, N., Helmke, B. M., Bullerdiek, J. MED12 mutations in uterine fibroids–their relationship to cytogenetic subgroups. Int. J. Cancer. 2012;131(7):1528–36.
- Markowski, D. N., Nimzyk, R., Belge, G., Löning, T., Helmke, B. M., Bullerdiek, J. Molecular topography of the MED12–deleted region in smooth muscle tumors: a possible link between non–B DNA structures and hypermutability. Mol. Cytogenet. 2013;6:23.
- Massague, J. TGF–beta signalling in context. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2012;13:616–30.
- Matsubara, A., Sekine, S., Yoshida, M., Yoshida, A., Taniguchi, H., Kushima, R., *et al.* Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumours. Histopathol. 2013;62:657–61.
- McGuire, M. M., Yatsenko, A., Hoffner, L., Jones, M., Surti, U., Rajkovic, A. Whole exome sequencing in a random sample of North American women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas. PloS one. 2012;7:e33251.
- McKendrick, M., Rajadurai, V., Weishaupt, J., Kasina, V. Hemoperitoneum caused by spontaneous rupture of a leiomyoma: A case report. Case Rep. Womens Health. 2024;42: e00609.
- Mehine, M., Kaasinen, E., Mäkinen, N., Katainen, R., Kämpjärvi, K., Pitkänen, E., *et al.* Characterization of uterine leiomyomas by whole–genome sequencing. NEJM. 2013;369: 43–53.
- Mehine, M., Mäkinen, N., Heinonen, H. R., Aaltonen, L. A., Vahteristo, P. Genomics of uterine leiomyomas: insights from high–throughput sequencing. Fertil. Steril. 2014;102(3):621–9.
- Mehine, M., Kaasinen, E., Heinonen, H. R., Mäkinen, N., Kämpjärvi, K., Sarvilinna, N., *et al.* Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016;113(5):1315–20.
- Mehine, M., Ahvenainen, T., Khamaiseh, S., Härkönen, J., Reinikka, S., Heikkinen, T., *et al.* A novel uterine leiomyoma subtype exhibits NRF2 activation and mutations in genes associated with neddylation of the Cullin 3–RING E3 ligase. Oncogenesis. 2022;11:52.

- Milewska, G., Ponikwicka-Tyszko, D., Bernaczyk, P., Lupu, O., Szamatowicz, M., Sztachelska, M., *et al.* Functional evidence for two distinct mechanisms of action of progesterone and selective progesterone receptor modulator on uterine leiomyomas. Fertil. Steril. 2024;122(2):341-351.
- Mittal, P., Shin, Y. H., Yatsenko, S. A., Castro, C. A., Surti, U., Rajkovic, A. Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. J. Clin. Invest. 2015;125(8):3280-4.
- Montgomery, G. W., Zondervan, K. T., Nyholt, D. R. The future for genetic studies in reproduction. Mol. Hum. Reprod. 2014;20:1-14.
- Moore, A. B., Yu, L., Swartz, C. D., Zheng, X., Wang, L., Castro, L., *et al*. Human uterine leiomyoma-derived fibroblasts stimulate uterine leiomyoma cell proliferation and collagen type I production, and activate RTKs and TGF beta receptor signaling in coculture. Cell Commun. Signal. 2010;8:10.
- Mousa, M., Al-Jefout, M., Alsafar, H., Kirtley, S., Lindgren, C. M., Missmer, S. A., *et al*. Prevalence of Common Gynecological Conditions in the Middle East: Systematic Review and Meta-Analysis. Front. Reprod. Health. 2021;3:661360
- Muawad, R., Dabbagh, R., Sabr, Y. Association of health and lifestyle factors with uterine fibroids among Saudi women: A case-control study. J. Taibah Univ. Med. Sci. 2022;17:1039-1046.
- Oba, U., Kohashi, K., Sangatsuda, Y., Oda, Y., Sonoda, K. H., Ohga, S., *et al.* An efficient procedure for the recovery of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. Biol. Methods Protoc. 2022;7(1):bpac014.
- Okolo, S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2008;22:571-588.
- Park, M. J., Shen, H., Spaeth, J. M., Tolvanen, J. H., Failor, C., Knudtson, J. F., *et al.* Oncogenic exon 2 mutations in Mediator subunit MED12 disrupt allosteric activation of cyclin C-CDK8/19. J. Biol. Chem. 2018;293(13):4870-4882
- Parker, W. H. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. Fertil. Steril. 2007;87:725-36.
- Patel, B., Elguero, S., Thakore, S., Dahoud, W., Bedaiwy, M., Mesiano, S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. Hum. Reprod. Update. 2015;21:155-7

- Ravegnini, G., Mariño-Enriquez, A., Slater, J., Eilers, G., Wang, Y., Zhu, M., *et al.* MED12 mutations in leiomyosarcoma and extrauterine leiomyoma. Mod. Pathol. 2013;26:743–749.
- Richter, W. F., Nayak, S., Iwasa, J. Taatjes, D. J. The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II. Nat Rev Mol Cell Biol 2022;23:732–749.
- Sadeghi, S., Khorrami, M., Amin-Beidokhti, M., Abbasi, M., Kamalian, Z., Irani, S., *et al.* The study of MED12 gene mutations in uterine leiomyomas from Iranian patients. Tumor Biol. 2016;37(2):1567-71.
- Sandberg, A. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyoma. Cancer Genet. Cytogen. 2005;158:1-26.
- Sant'anna, G. D. S., Brum, I. S., Branchini, G., Pizzolato, L. S., Capp, E., Corleta, H. V. E. Ovarian steroid hormones modulate the expression of progesterone receptors and histone acetylation patterns in uterine leiomyoma cells. Gynecol. Endocrinol. 2017;33:629–633.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Methods. 2014;11(4):361-2.
- Stewart, E. A., Laughlin-Tommaso, S. K., Gatherino, W. H., Lalitkumar, S., Gupta, D., Vollenhoven, B. Uterine fibroids. Nat. Rev. Dis. Primers. 2016;2:16043.
- Stewart, E. A., Nowak, R. A. Uterine fibroids: Hiding in plain sight. Physiol. (Bethesda). 2022;37(1):16-27.
- Swain, S. M., Shastry, M., Hamilton, E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. Nat Rev Drug Discov. 2023;22:101-126.
- Taatjes, D. J. The human mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. Trends Biochem. Sci. 2010;35:315–22.
- Turunen, M., Spaeth, J. M., Keskitalo, S., Park, M. J., Kivioja, T., Clark, A. D., *et al.* Uterine leiomyoma-linked MED12 mutations disrupt mediator-associated CDK activity. Cell Rep. 2014;7(3):654-60.
- Uzun, E., Sarioğlu, S. Techniques for Maximizing the Performance of Molecular Pathology Testing: Responsibilities of All Pathologists. Turk. J. Pathol. 2018;34:113-126.
- Vafaei, S., Alkhrait, S., Yang, Q., Ali, M., Al-Hendy, A. Empowering Strategies for Lifestyle Interventions, Diet Modifications, and Environmental Practices for Uterine Fibroid Prevention; Unveiling the LIFE UP Awareness. Nutr. 2024;16:807.

- Välimäki, N., Jokinen, V., Cajuso, T., Kuisma, H., Taira, A., Dagnaud, O., *et al.* Inherited mutations affecting the SRCAP complex are central in moderate-penetrance predisposition to uterine leiomyomas. Am J Hum Genet. 2023;110(3):460-474.
- Wang, H., Ye, J., Qian, H., Zhou, R., Jiang, J., Ye, L. High-resolution melting analysis of MED12 mutations in uterine leiomyomas in Chinese patients. Genet Test Mol Biomarkers 2015;19:162-6.
- Wu, J., Zou, Y., Luo, Y., Guo, J. B., Liu, F. Y., Zhou, J. Y., *et al.* Prevalence and clinical significance of mediator complex subunit 12 mutations in 362 Han Chinese samples with uterine leiomyoma. Oncol. Lett. 2017;14:47-54.
- Yang, Q., Ciebiera, M., Bariani, M. V., Ali, M., Elkafas, H., Boyer, T. G., *et al.* Comprehensive Review of Uterine Fibroids: Developmental Origin, Pathogenesis, and Treatment. Endocr. Rev. 2022;43:678-719.
- Ye, J., Wang, H., Chen, Y. B., Yuan, D. L., Zhang, L. X., Liu, L. MED12 mutation in patients with hysteromyoma. Oncol. Lett. 2015;9:2771-4.
- Zhang, Q., Ubago, J., Li, L., Guo, H., Liu, Y., Qiang, W., *et al.* Molecular Analyses of 6 Different Types of Uterine Smooth Muscle Tumors: Emphasis in Atypical Leiomyoma. Cancer. 2014;120:3165-77.
- Zhang, S., O'Regan, R., Xu, W. The emerging role of mediator complex subunit 12 in tumorigenesis and response to chemotherapeutics. Cancer. 2020;126(5):939-948.

8- ملاحق البحث:

ملخّص المقالة المنشورة في مجلّة العلوم الطّبيّة-جامعة دمشق

خلفيّة البحث وهدفه: تشكّل الطّفرات في exon 2-MED12 أحد الأسباب الرّئيسيّة القائدة لتكّون الورم العضليّ الأملس الرّحميّ. تعدّ الظّروف المناسبة للتّثبيت ضروريّة لنجاح استخلاص الدنا الجينوميّ وتضخيمه بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز. استكشفت الدّراسة ما إذا كان الدنا المستخرج من الأنسجة المحفوظة والمثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين مناسباً لتضخيم exon 2-MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز، وبحثت في الظّروف المعزّزة.

المواد والطّرائق: شملت الدّراسة 12 عيّنة ذات ظروف تثبيت وإسجاء غير معروفة لأورام عضليّة ملساء رحميّة مستأصلة من 12 مريضة. كانت العيّنات محفوظة في أرشيف مستشفيي التّوليد والبيروني الجامعيّين، بالاضافة لـ 5 أورام طازجة تمّ الحصول عليها من رحم مستأصل وتثبيتها في 6% من الفورمالين لمدّة 22 ساعة ثمّ إسجاؤها بالبرافين يدويّاً. كان حجم المقاطع النّسيجيّة وكميّتها وسماكتها مماثلاً بين العيّنات الطّازجة. تمّ استخلاص الدنا الجينوميّ والحكم على النّتائج من خلال تركيز وجودة الدنا المستخلص ونجاح تضخيم exon 2-MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز. تمّ الحصول على مقاطع إضافيّة لوّنت بالهيماتوكسيلين والأيوزين (H&E) لفحص الأنسجة تحت المجهر.

النّتائج: لم ينجح تضخيم exon 2-MED12 بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز واستخلاص الدنا من الأنسجة المؤرشفة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين، بينما كان التّضخيم من دنا مستخلص من العيّنات الطّازجة الّتي تمّ تثبيتها في الفورمالين وإسجاؤها بالبرافين يدويّاً ناجحاً، وذلك بتركيز دنا منخفض يصل إلى 7.7 نانوغرام/ميكرولتر (أو أكبر). لم يرتبط حجم المقطع وكميّته وسماكته بوزن النّسيج أو تركيز الدنا، لذا قمنا بالتّحقّق من كثافة الخلايا في المقطع كسبب معقول للاختلافات الملحوظة. تباينت كثافة الخلايا بالفعل في العيّنات، وارتبطت بشكل أفضل مع تركيز الدنا.

الاستنتاجات: أدّى تثبيت الأنسجة الأمثل (المدّة والتّركيز) إلى تضخيم exon 2-MED12 ناجح. يشكّل كلّ ورم من الأورام العضليّة الملساء الرّحميّة عيّنة فريدة من نوعها، ويجب أخذ هيستولوجيّة الأنسجة في الاعتبار من أجل استخلاص دنا وتفاعل سلسليّ للبوليميراز مثمرين. يمكن أن تكون العيّنات الاستثنائيّة والّتي تحتوي على أنسجة نادرة ودنا قليل التّركيز قابلة للتّضخيم بالتّفاعل السّلسليّ للبوليميراز ومناسبة للاختبارات الجينيّة الّتي تليه. توصي الدّراسة بتوثيق شروط التّثبيت والإسجاء للأنسجة المثبّتة بالفورمالين والمسجّاة بالبرافين، بحيث يمكن اتخاذ قرارات مستنيرة فيما يتعلّق باستخدامها لاستخلاص الدنا والاختبارات اللّاحقة.

ملخّص المقالة المنشورة في مجلّة Scientific Reports

Uterine leiomyomas (uLMs) are the most prevalent benign tumors of the female reproductive system. MED12 is one of the mediator complex subunits that has been implicated in uLMs pathogenesis. Somatic mutations in exon2-MED12 have been found in ~70% of uLMs. In this study, we investigated the status of exon2-MED12 in uLMs from Syrian patients. Sixteen leiomyomas from nine patients were assessed. Genomic DNA was isolated from tumors and exon2-MED12 was amplified by PCR and sequenced. Three specimens showed in frame point mutations consisted of missense substitutions in codon 44 (c.130). A novel insertion in codon 35 (c.103insG) was detected in one of the mutated cases and is expected to cause a frameshift in translation and an altered or truncated product. Some of the wild-type uLMs were collected from the same uteri that revealed mutations, which emphasizes the individuality of the uLM lesions and highlights the complexity of uLMs pathogenesis. The study is the first report from Syria on the topic and the second from the Arab world. It indicates genetic heterogeneity and independent clonal origin of the somatic mutations in exon2-MED12. In wild-type uLMs where exon2-MED12 mutations are absent, other players are in place and should be investigated.

صورة للطفرة المنشورة في قاعدة البيانات العالميّة NCBI

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

Nucleotide | Nucleotide | Search | Advanced | Help

GenBank | Send to:

Change region shown | Customize view

Homo sapiens mediator complex subunit 12-like (MED12) gene, partial sequence

GenBank: PP979487.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       PP979487                106 bp    DNA     linear   PRI 13-JAN-2025
DEFINITION  Homo sapiens mediator complex subunit 12-like (MED12) gene, partial
            sequence.
ACCESSION   PP979487
VERSION     PP979487.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 106)
  AUTHORS   Albitar,L., Al-Chatty,E. and Ahmad,F.
  TITLE     Detection of exon2-MED12 mutations in uterine leiomyomas from
            Syrian patients
  JOURNAL   Sci Rep 15 (1), 452 (2025)
   PUBMED   39747270
  REMARK    Publication Status: Online-Only
REFERENCE   2  (bases 1 to 106)
  AUTHORS   Albitar,L.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-JUL-2024) Pathology, Damascus University, Mezza,
            Damascus 00000, Syria
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..106
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="X"
                     /sex="female"
                     /tissue_type="uterine leiomyoma"
                     /geo_loc_name="Syria"
     gene            <1..>106
                     /gene="MED12"
     exon            1..106
                     /gene="MED12"
                     /number=2
     misc_feature    <1..>106
                     /gene="MED12"
                     /note="similar to mediator complex subunit 12"
     variation       4
                     /gene="MED12"
                     /note="results in a premature stop codon"
                     /replace=""
     variation       32
                     /gene="MED12"
                     /replace="g"
ORIGIN
        1 gatggaactg acggccttga atgtaaaaca acgtttcaat aaccagcctg ctgtctctgg
       61 ggatgagcat ggcagtgcca agaacgtcag cttcaatcct gccaag
//
```

Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

More about the MED12 gene
The initiation of transcription is controlled in part by a large protein assembly known as the preinitiation complex. A component of this pr...
Also Known As: ARC240, CAGH45, FGS1, H...

Related Information
Taxonomy
Gene

Recent activity
Turn Off | Clear
Homo sapiens mediator complex subunit 12-like (MED12) gene, partial sequence — Nucleotide
MED12 mediator complex subunit 12 [Homo sapiens] — Gene
See more...

Abstract

Uterine leiomyoma (ULM) is the most common benign gynecological tumor of reproductive age and a major cause of infertility and hysterectomy. Mutations in exon 2 of the mediator complex subunit 12 gene (exon 2-MED12) are one of the most important driving prerequisites for the genesis of ULM and are responsible for 31-88% of the cases worldwide. The research aimed to study the pathogenesis of ULM and the molecular mechanism of its formation by investigating the status of exon 2-MED12 in Syrian female patients. First, 12 archived samples with unknown formalin-fixation and paraffin-embedded conditions were investigated. Then, fixation and preparation conditions were optimized on 5 tumors to successfully extract genomic DNA. Finally, DNA was amplified by polymerase chain reaction and sequenced from 16 tumors to screen for mutations. DNA extraction and amplification from archived tissues was unsuccessful, but from 5 fresh tumors that were manually fixed and embedded, it was successful. Our results showed common somatic and heterozygous mutations in codon 44 but with lower frequency than in international studies. A novel (G) insertion mutation at codon 35 that is expected to cause a translational frameshift and an altered or truncated protein was also detected and registered in GenBank under the number PP979487. All revealed mutations in the study are classified as “disease-causing”. The research is the first genopathology study in Syria and the second study in the Arab world to investigate MED12 in ULMs. The positive results call for further studies on a larger sample to explore the frequency of exon 2-MED12 mutations and the molecular mechanisms contributing to tumor genesis in the Syrian population. Understanding the molecular mechanisms of ULMs is critical to revealing their pathogenesis and seeking non-surgical treatment in the future based on personalized and precision medicine that targets mutations and preserves the uterus at the reproductive age.

Key words: Codon 44; Codon 35; exon 2-MED12; Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE); Somatic mutation; Syria; Uterine leiomyoma (ULM).

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Medicine
Department of Pathology

Detection of MED12 gene-Exon 2 mutations of leiomyomas from hysterectomy specimens in an academic setting

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pathology

By

Lina Albitar

Supervisor
Dr. Eyad Al-Chatty
Faculty of Medicine
Damascus University

Co-Supervisor
Dr. Fariz Ahmad
Faculty of Medicine
Damascus University

1446/2024