

Expression of death receptor (Fas) , and it's specific ligand (FasL)in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

تعبير مستقبل الموت FAS ورابطه النوعي FAS LIGAND في الخلايا السرطانية للمثانة البولية

م.د. مي خليل اسماعيل * أ.م.د. غنيمه صادق محمد* أ.م.د. خالد طارق النائب**
*جامعة بغداد / كلية العلوم / قسم علوم الحياة
**جامعة النهرين / كلية الطب / فرع الاحياء المجهرية

الخلاصة

صممت هذه الدراسة باستخدام 36 نموذجاً نسيجياً مطموراً بشمع البرافين مأخوذاً من مرضى مصابين بسرطان الخلايا الانتقالية في المثانة (TCC) Transitional cell carcinoma 27 مريضاً كانوا من الذكور و 9 من الإناث تراوحت اعمارهم بين 35 و 97 سنة ، ووفقاً الى التقارير المرضيه النسيجية صنفت الانسجة السرطانية الى درجات (I, II, III) وكل درجة ضمت 12 خزعة سرطانية , كما صنفت الى مراحل (Ta, T1, T2) تحتوي كل مرحلة على (3, 25, 8) خزعة سرطانية على التوالي بالاضافة إلى 10 نماذج نسيجية طبيعية مأخوذة من معهد الطب العدلي تعود ل 6 ذكور و 4 اناث تراوحت اعمارهم بين 36 و 65 سنة. خضعت جميع النماذج لتقنية التهجين الموضعي *in situ hybridization* لغرض التحري عن التعبير الموضعي للحمض الرايبوي الرسول mRNA لكل من مستقبل الموت Fas ورابطه النوعي Fas ligand .

أظهرت نتائج هذه الدراسة ان نسبة إصابة الذكور إلى الإناث بسرطان الخلايا الانتقالية هي 3:1 وأن معدل أعمار المصابين كان 60 سنة. واعتماداً على نتائج التهجين الموضعي لكل من مستقبل الموت Fas ورابطه النوعي FasL ظهرت زيادة معنوية في التعبير عنهما في الانسجة السرطانية عندما قورنت بالانسجة الطبيعية ($P < 0.05$) و ($P < 0.05$) بالتتابع كما لوحظ ان تعبير الخلايا السرطانية الانتقالية عن FasL يتناسب طردياً مع تقدم كل من درجة الورم ومرحلته Tumor grade and stage فهناك فرق معنوي في التعبير عن FasL بين الدرجة الاولى والثالثة ($P < 0.05$) وبين المرحلة T1 و T2 ($p < 0.05$) . اما تعبير هذه الخلايا عن المستقبل Fas فقد لوحظ انه يتناسب عكسياً مع تطور درجات الورم ومراحله فهناك فرق معنوي في تعبير هذه الخلايا عن Fas بين درجة وأخرى ($p < 0.05$) وبين مرحلة وأخرى ($p < 0.05$) . في الوقت الذي لم يظهر فيه تعبير الخلايا للمقاوية عن Fas و FasL اختلافاً مع تطور درجات الورم ومراحله ($P > 0.05$) و ($P > 0.05$) بالتتابع . نستنتج من الدراسة ان التعبير المفرط للخلايا السرطانية عن الرابط النوعي لمستقبل الموت Fas له علاقة بتقدم اورام الخلايا الانتقالية للمثانة البولية واجتياحها .

الكلمات المفتاحية: المثانة البولية, سرطان الخلايا الانتقالية , Fas, FasL, التهجين الموضعي.

SUMMARY

This study was designed by using 36 paraffin embedded tumor tissues obtained from TCC patients, and 10 normal bladder tissues obtained from forensic medicine institute.

All specimens undergone to in situ hybridization technique for *in situ* mRNA expression detection of Fas and Fas L ; results of this study reveled that a high significant expression in malignant tissues compaired with normal tissues ($p < 0.05$), ($P > 0.05$) respectively. Moreover ,FasL expression on transitional malignant cells has a linear increase with tumor grade and stage progression ; there was a significant difference in FasL expression between grade I and grade III ($P < 0.05$) and between stage T1 and T2 ($P < 0.05$) . while we found an inverse relation between Fas expression on these cells and tumor grades and stages progression ; there was a significant difference among grades and among stages ($P < 0.05$), ($P < 0.05$) respectively. while there was no significant differences in Fas /FasL expression on lymphocytes and tumor grade and stage progression ($P > 0.05$), ($P > 0.05$) respectively.

A highly significant liner relation was showed between Fas L expression on transitional malignant cells tumor grade and stage progression ($p < 0.01$), ($p < 0.01$) respectively .

From this study we conclude that overexpression of FasL are correlated with TCC invasion and progression.

Key words: urinary bladder, transitional cell carcinoma, Fas, Fas ligand, *in situ* hybridization.

المقدمة

يعد سرطان المثانة البولية Urinary bladder cancer خامس ورم خبيث مسبب للوفاة في العراق وفي العالم [1,2] بينما يحتل المرتبة الرابعة كأكثر سرطان إصابة للذكور في العالم بعد سرطان البروستات والرئة والسرطان القولوني المستقيمي [3] والثالث بين الذكور في العراق [1] وهو مرض خبيث يصيب فئات عمرية مختلفة لاسيما كبار السن خصوصاً في العقدين السادس والسابع من العمر [4] ويدعى أحياناً بمرض المسنين Disease of the elderly. إن أحد أشكال سرطان المثانة البولية وأكثرها شيوعاً هو سرطان الخلايا الانتقالية (TCC) Transitional cell carcinoma إذ يشكل أكثر من 90% من حالات سرطان المثانة؛ وهو يصنف إلى درجات Grades ومرحل Stages وفقاً إلى أنظمة تصنيف عالمية تعكس درجة اجتياح الورم لطبقات نسيج المثانة [5]. إن من متطلبات ديمومة الخلايا السرطانية وانتشارها تطوير آليات وستراتيغيات خاصة تمكنها من الهروب والاختفاء من المسح المناعي المناط بالجهاز المناعي [6] وهذه العملية التي يطلق عليها أيضاً immune evasion أو immune privilege هي حسيطة وجود آليات متنوعة منها التعبير عن Fas ligand، وهي وسيلة دفاع فتاكة بالخلايا المعبرة عن المستقبل Fas عموماً وبالخلايا التائية تحديداً وبذلك تقي الخلايا الورمية نفسها من هجوم الخلايا للمفاوية [7-9] ينتمي كل من FasL, Fas إلى عائلة TNF receptor, TNF Ligand على التوالي، إذ يلعب نظام FasL/Fas دوراً أساسياً في عملية تحفيز القتل المبرمج apoptosis والتخلص من الخلايا للمفاوية التائية التي تتعرف على المستضدات الذاتية فضلاً عن تكاثر الخلايا للمفاوية البائية أو موتها بالإضافة إلى تطور الأورام [10-12].

Fas (CD95, AP0.1) هو بروتين سكري غشائي من النمط الأول (Type1 membrane glycoprotein)؛ وزنه الجزيئي 48 كيلو دالتون؛ يُعبر عنه بشكل طبيعي في أنسجة الإنسان المختلفة كالقلب والكبد والرئة والكلية كما يعبر عنه في الخلايا للمفاوية التائية والخلايا السرطانية أيضاً [13]؛ بينما يعود FasL (CD178) ذو الوزن الجزيئي 40 كيلو دالتون إلى النمط الثاني من البروتينات السكرية الغشائية Type II membrane glycoprotein. ويعتقد أن وجوده مقتصر على خلايا الجهاز المناعي كالخلايا التائية المنشطة وخلايا NK [14] بينما صار من الواضح الآن أن FasL يعبر عن نفسه أيضاً في الخلايا غير للمفاوية وفي أنواع عديدة من الأورام البشرية كالثدي والمبيض والمريء والرئة والقولون والمثانة والبروستات والبنكرياس والكبد والمعدة [15-17] في المناطق ذات الأمتياز المناعي مثل العين والخصية حيث يمنع الـ FasL الأستجابة المناعية في تلك المناطق من خلال تحفيز قتل الخلايا المناعية الانتهازية المترشحة [13]. إن هذه القابلية التي تتمتع بها الخلايا السرطانية تمثل طريقة فريدة في هروب الورم من الكشف والهجوم المناعي [18].

طرائق العمل:

أجريت هذه الدراسة خلال المدة بين شهر آب 2005 وأيار 2006 في مختبرات قسم علم الأمراض في كلية الطب / جامعة النهدين. جمعت 36 خزعة سرطانية مطمورة بشمع البرافين paraffin embedded biopsies تعود لمرضى مصابين بسرطان الخلايا الانتقالية في المثانة بالإضافة إلى التقارير المرفقة مع كل نموذج من مختبر الدكتور لؤي أدور خوري للتحليلات النسيجية في بغداد. كان 27 مريضاً من الذكور و9 من الإناث تراوحت أعمارهم بين 35 و97 سنة؛ ووفقاً إلى التقارير المرضية النسيجية صنفت الأنسجة السرطانية إلى درجات (I و II و III) وكل درجة ضمت 12 خزعة سرطانية، كما صنفت إلى مراحل (T2, T1, Ta) stages، تحتوي كل مرحلة على 3, 8, 25 خزعة سرطانية على التوالي. كما جمعت 10 خزع طبيعية Autopsies من معهد الطب العدلي ببغداد. كانت هذه النماذج العشرة تعود لـ 6 ذكور و 4 إناث تراوحت أعمارهم بين 36 و65 سنة.

قطعت الخزع المطمورة بشمع البرافين إلى شرائح بسماك 4 μm؛ وضعت هذه الشرائح على شرائح زجاجية موجبة الشحنة ثم صبغت بصبغتي Hematoxylin & Eosin وفحصت من قبل طبيب متخصص في الأمراض النسيجية لغرض أنتخاب أفضل المقاطع النسيجية ولتأكيد تشخيص درجة الورم Tumor grade ومرحلته Tumor stage. خضعت المقاطع النسيجية جميعها لفحص التهجين الموضعي in situ hybridization للتحري عن تعبير mRNA لكل من مستقبل الموت Fas ورابطه النوعي Fas L وذلك وفقاً للخطوات الموجودة في التعليمات المرفقة مع عدة التشخيص (Maxim biotec, USA).

مبدأ الأختبار

يرتبط المجس المَعْلَم بالبايوتين biotinylated probe بسلسلة DNA أو RNA الهدف ثم يشخص المجس الهجين بإضافة أنزيم Streptavidin-Alkaline phosphatase (Streptavidin-AP) وبعد إضافة الركيزة BCIP/NBT وهي 5-bromo-4-chloro-3-iodyl phosphate / nitro blue tetrazolium تظهر الإشارة signal بلون أزرق مائل إلى السواد في مواقع تواجد المجس الهجين. تم حساب الخلايا المعبرة عن Fas وFasL في كل من خلايا النسيج للمفاوية Lymphocytes والخلايا السرطانية Malignant cells باستخدام قوة التكبير 400x حيث تم حساب النسبة المئوية للخلايا الموجبة في 5 حقول واخذ المعدل mean الذي يمثل نسبة التعبير الموضعي عن mRNA [6,13].

التحليل الإحصائي:

تم أختبار الفروق المعنوية بين المعدلات في الأنسجة السرطانية والأنسجة الطبيعية باستخدام أختبار t عند مستوى معنوية 0.05، بينما أختبرت معنوية الفروق بين المجاميع (درجات الورم ومراحله) باستخدام أختبار ANOVA عند مستوى معنوية 0.05. [19].

النتائج :

1. التعبير الموضعي لمستقبل الموت Fas ورابطه النوعي FasL في أنسجة مرضى TCC والانسجة الطبيعية .

يوضح الجدول رقم 1 معدلات التعبير الموضعي لـ mRNA FasL و Fas في كل من الانسجة السرطانية والانسجة الطبيعية وفيه نلاحظ ان التعبير عن مستقبل الموت Fas اظهر ارتفاعاً معنوياً في الانسجة السرطانية عما هو عليه في الانسجة الطبيعية ($P < 0.05$) بينما نجد ان هناك فروقاً عالية المعنوية في التعبير عن FasL بين نوعي النسيج اذ تعبر الانسجة السرطانية عن معدلات FasL عالية في الوقت الذي ينخفض فيه معدل التعبير بشكل واضح جداً في الانسجة الطبيعية ($P < 0.05$) . كما ان ايجابية التعبير عن Fas و FasL ظهرت في نماذج الانسجة السرطانية والطبيعية جميعها (100%) .

جدول رقم 1: التعبير الموضعي لكل من المستقبل Fas ورابطه النوعي Fas Ligand في أنسجة مرضى TCC

والانسجة الطبيعية .

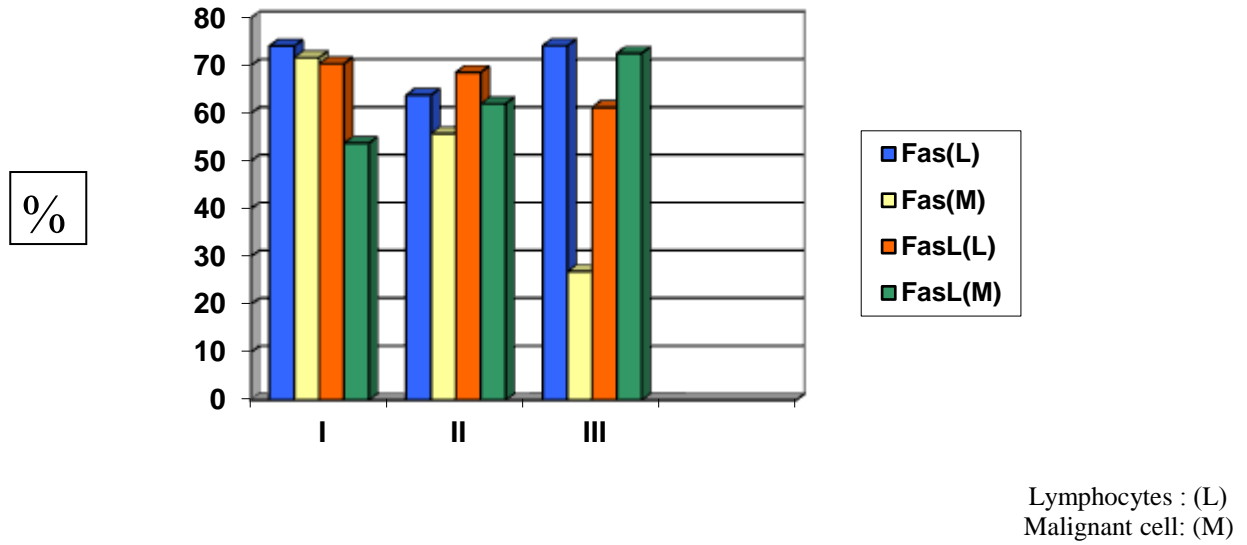
المعنوية	المعدل % ± الانحراف المعياري	الانسجة	
P<0.05	22.09 ± 51.44	*TCC	Fas
	4.60 ± 23.50	**NT	
P<0.05	12.49 ± 62.78	TCC	FasL
	1.07 ± 2.60	NT	

* TCC : أنسجة مرضى سرطان الخلايا الانتقالية في المئانة وعددها 36
 ** NT: الانسجة الطبيعية Normal tissues وعددها 10

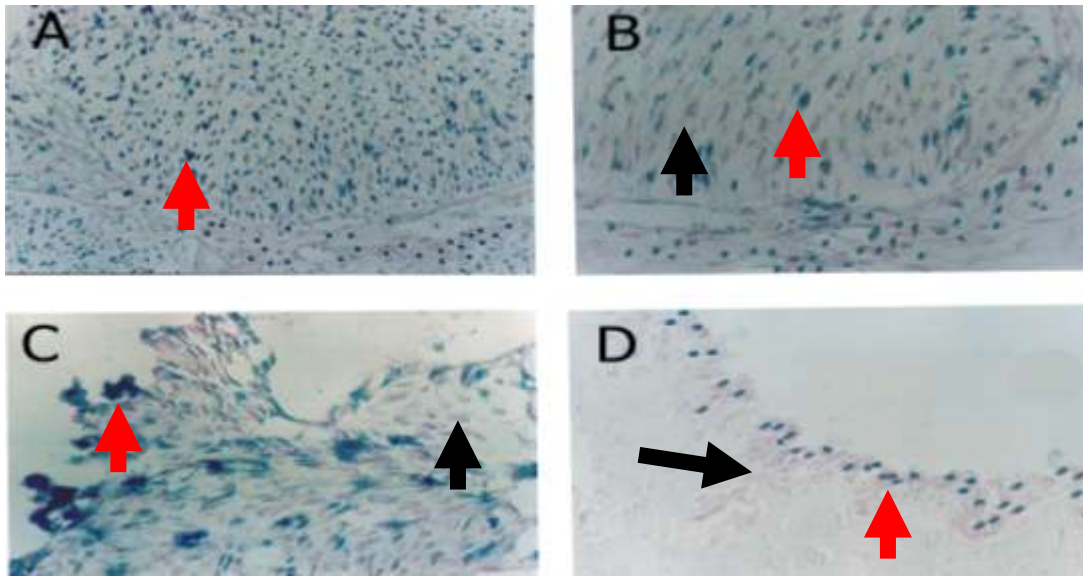
2- التعبير الموضعي لـ mRNA مستقبل الموت Fas ورابطه النوعي FasL خلال تطور درجات الورم ومراحله

2-1 التعبير عن مستقبل الموت Fas ورابطه النوعي FasL في خلايا الانسجة السرطانية

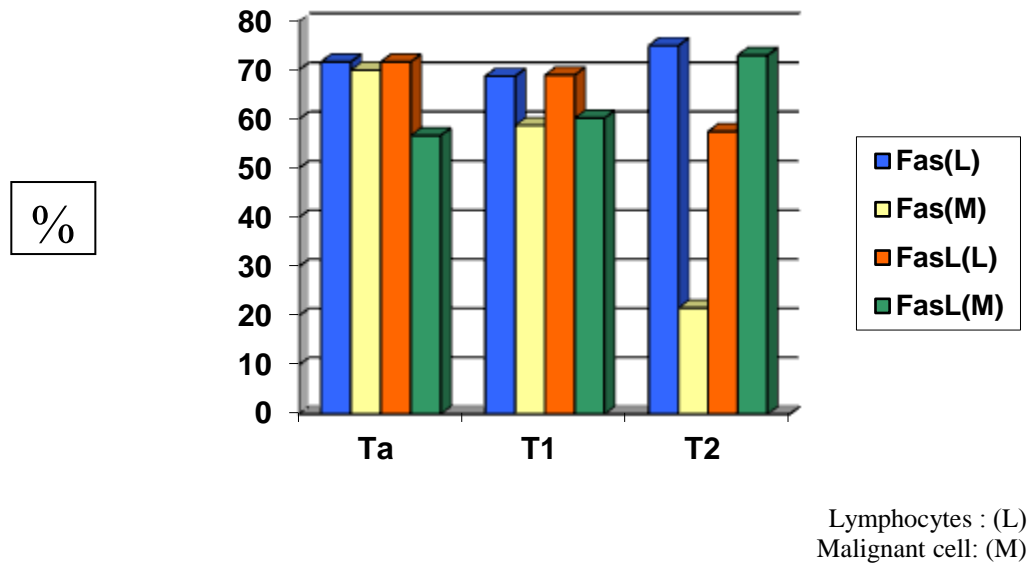
يتضح من الشكل رقم 1 التعبير الموضعي لكل Fas و FasL خلال تطور درجات الورم Tumor grades وفيه نجد ان معدل التعبير عن المستقبل Fas في الخلايا السرطانية يتضاءل كلما تقدمت درجة الورم ($P < 0.05$) بينما لا يتأثر تعبير الخلايا للمفاوية المترشحة للورم (TILs) عن هذا المستقبل بتطور درجات الورم ($p > 0.05$) . خلافاً لتعبير الخلايا السرطانية عن FasL فهو يزداد بزيادة تقدم درجة الورم ($P < 0.05$) في الوقت الذي لم يتأثر فيه تعبير الخلايا للمفاوية عن FasL بتطور درجة الورم ($P > 0.05$) . وما ينطبق على درجات الورم ينطبق على مراحلها أيضاً ؛ فلو لا حظنا الشكل رقم 2 نجد ان تعبير الخلايا السرطانية عن Fas يتناسب عكسياً مع مرحلة الورم Tumor stage ($p < 0.05$) بينما يتناسب التعبير عن FasL طردياً مع مرحلة الورم ($P < 0.05$) في حين لم تظهر الخلايا للمفاوية في تعبيرها عن Fas و FasL أي اختلاف معنوي خلال تطور مراحل الورم ($P > 0.05$) .



شكل رقم 1 التعبير الموضعي للمستقبل Fas والمستقبل FasL والرابط النوعي FasL خلال تطور درجات الورم Tumor grades

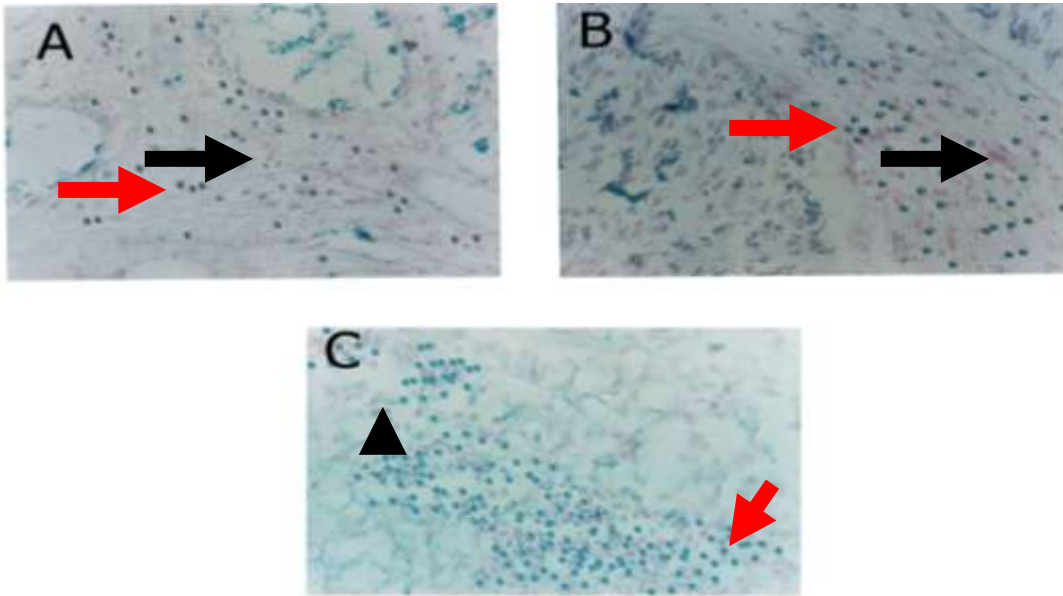


التعبير الموضعي للمستقبل Fas للمستقبل FasL والرابط النوعي FasL خلال تطور درجات الورم Tumor grades
 (اللون الاحمر) وصيغة NFR (اللون الوردى) في الخلايا السالبة (اللون الاسود).
 A: نسيج سرطاني من الدرجة الأولى Grade I (200X): B, نسيج سرطاني من الدرجة الثانية Grade II (400X)
 C: نسيج سرطاني من الدرجة الثالثة Grade III (400X): D, نسيج طبيعي (400X)



شكل رقم 2: التعبير الموضعي للمستقبل Fas والرابط النوعي FasL خلال تطور مراحل الورم Tumor stages

2-2 التعبير عن مستقبل الموت Fas ورباطه النوعي FasL في الخلايا اللمفاوية المترشحة للورم TILs ان ارتشاح الخلايا اللمفاوية إلى نسيج الورم ما هو إلا تعبير عن مقاومة الثوى host لوجود الورم وقد اظهرت الانسجة السرطانية جميعها وبالغاة 36 ايجابية التعبير عن FasL في الخلايا اللمفاوية ؛ إلا ان هذا لا يعني بالضرورة ان تكون هذه الخلايا كفوءة في قتل الخلايا السرطانية . وما يدعونا لافتراض عدم كفاءة الخلايا اللمفاوية في قتل الخلايا السرطانية هو زيادة معدل التعبير عن FasL في الخلايا اللمفاوية على معدل التعبير عن Fas في الخلايا السرطانية خلال تطور درجات الورم ومراحله ورغم ذلك اخفقت في الحد من نمو الورم ويتضح ذلك من خلال الفروق الطفيفة بين FasL في الخلايا اللمفاوية وبين Fas في الخلايا السرطانية في الدرجات I وII والمراحل Ta وT1 والفروقات الكبيرة بين FasL في الخلايا اللمفاوية وبين Fas في الخلايا السرطانية في الدرجة III والمرحلة المتقدمة T2 (الشكل رقم 1 والشكل رقم 2).



التعبير الموضعي للـ(Fas) في الخلايا اللمفاوية المترشحة الى نسيج المثانة السرطاني باستخدام BCIP/NBT (اللون الازرق) في الخلايا الموجبة (السهم الاحمر) وصبغة NFR (اللون الوردى) في الخلايا السالبة(السهم الاسود).A: نسيج سرطاني من الدرجة الأولى Grade I, B: نسيج سرطاني من الدرجة الثانية Grade II, C: نسيج سرطاني من الدرجة الثالثة Grade III : قوة التكبير (C-A) : (400X).

المناقشة :

تتفق نتائجنا الحالية مع غيرها من الدراسات ؛ فقد اشار Perabo إلى وجود علاقة طردية بين تعبير الخلايا السرطانية الانتقالية عن FasL وبين تطور درجة الورم كما اقترنت زيادة التعبير عن FasL بتقدم مرحلة الورم ؛ فقد احتل سرطان الخلايا الانتقالية المجتاح TCC Invasive (المراحل T2-T4) اعلى نسبة للتعبير عن FasL مقارنة بـ TCC السطحي Superficial (المراحل T1,Ta) [20] كما وتتفق مع ماوجده Mizutani الذي لاحظ وجود تراكيز عالية من FasL الذائب (sFasL) Soluble FasL في مصول مرضى TCC المجتاح مقارنة بالسطحي ، وكذلك الحال بالنسبة لاورام الدرجة الثالثة مقارنة بالدرجات الاولى والثانية [21]. بينما اظهرت نتائج استخدام تقنية Immunohistochemistry ان أعلى نسبة للتعبير عن Fas في سايوتوبلازم الخلايا السرطانية الانتقالية كانت في الدرجة الاولى من الورم (I) تليها الدرجات الثانية والثالثة وبنسب متقاربة ؛ كما اظهرت الخلايا للمفاوية المترشحة للورم نتيجة ايجابية في التعبير عن Fas و FasL ايضاً [22] . من الجدير بالملاحظة سلوك الخلايا السرطانية في التعبير عن Fas و FasL كلما تقدمت درجة الورم ومرحلته ؛ ففي الوقت الذي ينخفض فيه تعبير هذه الخلايا عن المستقبل Fas يزداد التعبير عن FasL بالمقابل وهذا ربما يعكس محاولة الخلايا السرطانية في حماية نفسها من الكشف المناعي للثوى منذ المراحل الاولى لتطور الورم ولعل فرط التعبير عن FasL من قبل الخلايا السرطانية يجعل الورم في حالة حصانة من هجوم الخلايا المناعية إذ ان للـ FasL تأثير تثبيطي لخلايا مناعية واسعة الطيف كالخلايا التائية T cells والبائية B cells والطبيعية القاتلة NK cells والخلايا العدلة Neutrophils والوحيدة Monocytes فجميعها حساسة للقتل الذي يتسببه الـ FasL [23]. في هذه الدراسة اظهرت الخلايا السرطانية جميعها تعبيراً ايجابياً عن مستقبل الموت Fas ورابطه النوعي FasL ومع ذلك لم تشهد الخلايا السرطانية انتحاراً Suicide ولم تقتل من قبل الخلايا السرطانية المجاورة لها fratruicide كما لم تتأثر بوجود FasL على الخلايا للمفاوية المترشحة للورم وهذا يؤكد مقاومة الخلايا السرطانية للقتل الذي يتوسطه Fas . إن الخلايا السرطانية تمتلك العديد من الاستراتيجيات اللازمة للهروب من الوجود المناعي ومنها افتقار التعبير عن مستقبل الموت Fas و فرط التعبير عن FasL [7,8] إلا ان نتائج هذه الدراسة بينت ان الخلايا السرطانية جميعها عبرت بشكل ايجابي عن المستقبل Fas وهذا ربما يلفت الانتباه إلى وجود آليات أخرى لجأت إليها الخلايا السرطانية غير فقدان التعبير عن Fas كحدوث طفرة Mutation في الجين المشفر للـ Fas الذي يؤدي إلى تغيير الوظيفة الطبيعية للمستقبل Fas وهي توصيل اشارة الموت Death singal إلى الخلية الحاملة له . وقد اشارت بعض الدراسات ان حوالي 28% من خلايا TCC ظهرت فيها طفرات في الموقع 10q24.1 من الكروموسوم وهو الموقع الذي يقع ضمنه جين Fas [24]. ان حدوث طفرة في الجين المعبر عن Fas لوحظ في انسجة سرطانية اخرى مقاومة للقتل مثل Multiple myeloma و Non-Hodgkins Lymphoma بالاضافة إلى انسجة سرطانية صلدة كسرطان المعدة Gastric Cancer [25,26] . ولربما يعزى نجاح الخلايا السرطانية الانتقالية في الهروب من الهجوم المناعي إلى انتاج Fas الذائب sFas لانه يعمل على معادلة FasL الموجود على سطوح الخلايا للمفاوية كإحداً بذلك الفعالية السمية القاتلة لخلايا الورم [6,15] سيما وان sFas قد سجل مستويات عالية في مصول مرضى سرطان المثانة وسرطان الكلية جميعهم [20,27] . من ذلك نجد أن تعبير الخلايا السرطانية عن FasL يعد من اهم متطلبات تلك الخلايا للهروب من الهجوم المناعي اولاً ولتطور الورم ثانياً وهذا يعني زيادة قابلية الورم على الاجتياح والانتشار فقد لوحظ وجود علاقة بين تعبير خلايا سرطان المريء عن FasL وبين انتشار الورم إلى العقد للمفاوية [28]. كما وان زيادة معدل التعبير عن FasL في الخلايا السرطانية الانتقالية في الدرجات والمراحل المتقدمة (stage T2, Grade III) ربما يعكس كفاءة هذه الخلايا في تحدي مناعة الثوي اكثر من خلايا الورم في الدرجات والمراحل الاولى؛ وهذا قد يقودنا للقول بان فرط التعبير عن FasL في الخلايا السرطانية في الدرجات والمراحل المتقدمة يرتبط بتدهور الوضع الصحي للمريض ؛ فالفاعل بين الورم والثوي يلعب دوراً مهماً في التنبؤ بحصيلة توجه المرض في العديد من السرطانات البشرية ومنها سرطان المثانة [29]. لقد وجد من خلال إجراء عدد من التجارب في الجسم الحي *in vivo* وفي الزجاج *in vitro* ان الخلايا السرطانية الانتقالية المعبرة عن FasL تمتلك قدرة هائلة في قتل الخلايا للمفاوية المعبرة عن Fas . كذلك فقد لوحظ ان خلايا TCC وخلايا سرطان القولون المعبرة عن FasL كفوءة في قتل الخلايا للمفاوية المترشحة الورم (TILs) وان TILs القريبة من الخلايا السرطانية المعبرة عن FasL تكون فاقدة لفعاليتها خلافاً لـ TILs القريبة من الخلايا السرطانية غير المعبرة عن FasL فهي تتسم بحيويتها وفعاليتها [17,30] كما ان العديد من الدراسات اثبتت ان الخلايا المعزولة من الانسجة السرطانية البشرية الصلدة Solid tumors تتسم بعوز وظيفي Functional deficiency مقارنة بتلك المعزولة من الدم المحيطي Peripheral blood [31] وان هذا العوز الوظيفي يتراوح ما بين فقدان التام للاستجابة للمحفزات Mitogens وتثبيط فعاليتها السمية ضد الورم Antitumor cytotoxicity وانتاج الحركيات الخلوية Cytokines [32]. ان من احدى متطلبات تخفي الخلايا السرطانية من الكشف المناعي هو فقدان تعبير تلك الخلايا لاشارات التنشيط المشاركة Costimulatory signals اللازمة لتنشيط الخلايا للمفاوية ؛ ويبدو ان هذه الاستراتيجية تسهم في تثبيط فعالية الخلايا للمفاوية في قتل خلايا الورم فقد لوحظ ان TILs الحساسة للـ FasL تفقد السلسلة زيتا CD3 Zeta chain المسؤولة عن نقل اشارة التنشيط للخلية [33] . ومن خلال نتائج دراستنا الحالية ؛ لعل ارتفاع معدل التعبير عن كل من Fas و FasL في الخلايا للمفاوية المترشحة للورم يكون سبباً وراء اخفاق تلك الخلايا في السيطرة على الورم ربما نتيجة انتحارها وقتل بعضها المعبر عن Fas من قبل البعض الآخر المعبر عن FasL .

- 1- Iraqi cancer registry ,2004.
- 2- Haynes, M.D.; Martin, T.A.; Jenkins , S.A.; Kynaston ,H.G. Matthews ,P. N. and Jiang , W.G. [2005] . Tight junctions and bladder cancer [Review] .Inter. mol.16 : 3-9
- 3- Roomi ,M.W. ;Ivanov ,V.; Niedzwiecki and Rath, M. [2004] . Antitumor effect of nutrient synergy on human bladder cancer cell lines T-24 .Dr. Mathias Rath research . Sep . 23-25 .
- 4- Kadhim , H.S.[2004] . Molecular and immunopathogenesis of bladder cancer with and without schistosomiasis . Academic dissertation . AL- Nahrain university . College of medicine . Baghdad .
- 5- Rosai ,J.[1996] . Ackerman's surgical pathology . 8th[ed]. Vol.1 . PP:11 85-1211 .
- 6- Murakami , M.; Sasaki, T.; Miyata , H .; Yamasaki ,S .; Kuwahara , K. and Chayama , K. (2004) .Fas and Fas ligand : expression and soluble circulating levels in bile duct carcinoma . Oncology reports .11:1183-1186 .
- 7- Brajskovic ,G.R. (2005) .Apoptosis in malignant diseases .Arch .Oncol . 13(1) : 19-22 .
- 8- Liu , J.; Wang .Q .; Wang ,X.; Sun,Y.; Chen, X.Y.; Kong , Q.; Zhang , K.; and Li, H.(2003) . Apoptosis of bladder cancer cell induced by short –term and Low –dose mitomycin – C: potential molecular mechanism and clinical implication .Int. J. Mol . Med .11:389-394 .
- 9- Odoux ,Ch. ; Albers , A.; Amoscato , A.A. ;Lotze ,M.T.; and Wong , M.K.K(2002) . TRAIL, FasL and a blocking anti-DR5 antibody augment paclitaxel induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer .Int.J.Cancer .97:458-465.
- 10- Wajant ,H. ;Pfizenmaier , K. and Scheurich, P.(2003).Non apoptotic Fas signaling. Cytokine and growth factor reviews.14:53-66.
- 11- Mishima , K.; Nariai , Y.and Yoshimura , Y. (2003). Carboplatin induced Fas (APO -1/ CD 95)- dependent apoptosis of human tongue carcinoma cells :sensitization for apoptosis by up regulation of FADD expression . Int . J. Cancer . 105: 593- 600 .
- 12- Pauline , G. ; Milner ,A.E. ; Green, N.K. ; Eliopoulos , A.G. and Young , L.S. (2003). Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand . J.Immunol. 170:677-685.
- 13- Nozoe ,T.; Yasuda , M.; Honda ,M.; Inutsuka , S.; and Korenaga ,D.(2003).Fas ligand expression is correlated with metastasis in colorectal carcinoma . Oncology . 65:83-88.
- 14- Nagata, S.and Golstein ,P.(1995). The Fas death factor . Science .267:1449-1456.
- 15- Stumm , S. ; Meyer , A. ; Lindner , M.; Bastert , G.; Wall wiener , D. and Gückel , B. (2004) . Paclitaxel treatment of breast cancer cell lines modulates Fas/Fas ligand expression and induces apoptosis wich can be inhibited through the CD40 receptor . Oncology . 66 :101-111.
- 16- Zhang , X. ;Miao ,X. ; Sun , T. ; Tan , W. ;Qu,S. ; Xiong , P. ; Zhou, Y. and Lin ,D. (2005). Functional polymorphisms in cell death pathway genes Fas and FasL contribute to risk of lung cancer .J.of medical genetics.42:479-484.
- 17- Houston ,A.; Waldron –Lynch, F.D.; Bennett ,M.W.; Roche , D.; OSullivan ,G.C.; Shanahan, F.; and O'Connell , J.(2003) . Fas ligand expression in colon cancer is not associated with increased apoptosis of tumor cells in vivo . Int . J. cancer .107: 209- 214 .
- 18- O'Connell , J. ; Houston ,A.; Bennett , M.W. ;O'sullivan , G.C. and shanahan , F.(2001) . Immune privilege or inflammation ? insights into the Fas Ligand enigma . Nat. Med. 7:271-274.
- 19- Sorlie, D.E. (1995).Medical biostatics and epidemiology; Examination and board review .first ed. Norwalk, Connecticut,Appleton and lange .PP:47-88.
- 20- Perabo , F.G. ; Kamp , s. ; Schmidt , D. ; Lindner , H. ; Steiner , G. ; Mattes , R.H. ; Wirger, A. ; Pegelow , K. ; Albers , P.; Kohn , E.C. ; Ruecker , A.V. and Mueller , S.C.(2001). Bladder cancer cells aquire competent mechanisms to escape Fas-mediated apoptosis and immune surveillance in the course of malignant transformation . BJC. 84(10):1330-1338 .
- 21- Mizutani, Y .;Yoshida,O. and Bonavida ,B.(1998).Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer .J.Urol .160:571-576.

- 22- Lee ,S.H.; Lee , J.Y.; Park .W.S.; Kim ,S.W.;Jang, J.J.; and Yoo, N.J. (1999 B). Transitional cell carcinoma express high levels of Fas ligand in vivo . *BJU international* . 83: 698-702.
- 23- Arai , H. ; Chan , D ; Bishop , and Nabel , G.J. (1997) .Inhibition of the alloantibody response by CD95 ligand .*Nat.Med.*3: 843-848 .
- 24- Lee, S, H . ; Shin , M . S . ; Park , W.S.; Kim, S.U.; Dong, S.M.; Pi, J.H.; Lee, H.K.; Kim, H.S.; Jang, J.J.; Kim, C.S.; Kim, S.H.; Lee,J.Y. and Yoo, N.T.(1999 A) . Alteration of Fas (APO-1/ CD95) gene in transitional cell carcinoma of urinary bladder . *Cancer Res.*59, July , 1, 3068-3072.
- 25- Sang , P. ; Ra ,O. ; Sil , K.;Young , P. ; Hyung ,L. ; Sun ,S. ; Young , K.; Kyung ,L. ;Jin , Y.and Young , L. (2001) . Somatic mutations in the death domain of the Fas gene in gastric cancer. *J.Pathol* .193:162-168 .
- 26- Muschen ,M.; Re,D.; Brauninger ,A.; Wolf, J.; Hansmann, M.; Diehl, V.; Kuppers , R. and Rajewsky , K.(2000). Somatic mutation of the CD95 gene in Hodgkin and Reed –Sternberg cells .*Cancer Res.*15:5640-5643.
- 27- Nonomura , N.; Nishimura , K.; Ono,Y.; Fukui ,T. ;Harada , Y. and Takaha , N.(2000). Soluble Fas in serum from patients with renal cell carcinoma .*Urology* .55:151-155.
- 28- Younes,M.;Schwartz, M.R. ; Ertan , A. ; Finnie , D. and Younes , A.(2000). Fas ligan expression in esophageal carcinomas and their lymph node metastasis . *Cancer* .88:524-528.
- 29- Erola , A.K.; Soini , Y. and Paakko , P. (2000) A high number of tumor infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size , low tumor stage , and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma . *clinical cancer research* . 6;May : 1875 - 1881.
- 30- Chopin , D. ; Moniri ,R.B. ; Maille ,P. ;Belda , M.L . ; Groux , B.M. ; Merendino , N.; Lecerf , L. ; Stoppacciaro , A.and Velotti , F. (2003) . Human urinary bladder transitional cell carcinomas aquire the functional Fas ligand during tumor progression . *Am.j.Pathol* . 162;(4) : 1139 -1149 .
- 31- Gastman , B.R. ;Atarashi , Y.; Reichert , T.E.; Saito , T.;Balkir, L.; Rabinowich , H. and whiteside , T,L. (1999) . Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck , and it promotes apoptosis of Lymphocytes . *Cancer Research* ,59, October 15 :5356-5364.
- 32- Reichert , T. ; Rabinowich ,H. ;Johnson , J. and Whiteside ,T. (1998) . Human immune cells in the tumor microenvironment mechanisms responsible for signaling and functional defects .*J.Immunother* .21:295-306 .
- 33- O'Connell,J. ; Bennett ,M.W. ; O'Sullivan ,G.C. ; O'Callaghan ,J.Collins, J.K. and Shanahan , F.(1999). Expression of Fas (APO-1/CD95) Ligand by human breast Cancers : significance for tumor immune privilege . *Clin . and diag. Lab .Imm.*6 ;(4) 457-463 .