

تعیین ناهنجاری های عددی و ساختاری در مجموعه کروموزوم های موش های صحرایی مبتلا به سرطان پوست و بررسی مناطق متناظر آن ها در کروموزوم های انسان

دکتر ملک سلیمانی مهرانجانی*، دکتر احمد همتا**، دکتر سید محمد علی شریعت زاده***

*دانشیار گروه زیست شناسی- دانشگاه اراک، ایران، **استادیار گروه زیست شناسی- دانشگاه اراک، ایران، ***استاد گروه زیست شناسی- دانشگاه اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۸/۵/۱۹ تاریخ تایید: ۱۹/۲/۱۹

چکیده:

زمینه و هدف: القاء سرطان پوست در موش های صحرایی نژاد SD ایجاد تومورهایی را می نماید که از نظر فیزیولوژیکی و شیمیایی شباهت های زیادی با تومورهای پوستی در انسان دارد. لذا این مطالعه با هدف تعیین ناهنجاری های عددی و ساختاری در مجموعه کروموزوم های موش های صحرایی مبتلا به سرطان پوست و بررسی مناطق متناظر آن ها در کروموزوم های انسانی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۲/۵ mg ماده ی کارسینوژنیک (7,12-Dimethylbenz[α]anthracene) DMBA به طریق زیر جلدی به موش صحرایی نژاد اسپراگ داوولی (SD) تزریق شد. سپس تومورهای ایجاد شده در گروه های مورد آزمایش با روش های هیستوپاتولوژی، ایمنوهیستوشیمی و کشت سلول مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از سلول های حاصل از کشت سلولی به تهیه کروموزوم های متافازی اقدام و نواربندی گیمسا انجام گردید. با کمک پایگاه های اطلاعاتی، ژن های ساکن در نواحی تغییر یافته شناسایی گردید و همچنین جهت تعمیم نقش احتمالی آنها به انسان از روش مقایسه ی ژنومیک استفاده شد.

یافته ها: تغییرات کروموزومی غیر اتفاقی و متداول در بین حداقل ۱۵ سلول متافازی شامل: افزایش عددی کروموزوم های شماره ۸، ۹، ۱۰، ۱۸ و کاهش عددی در کروموزوم های شماره ۴، ۶، ۱۲، ۱۶ و همچنین تغییرات ساختاری از جمله حذف در کروموزوم های شماره ۱، ۴، ۵، ۶، ۱۷ ثبت گردید. همبستگی کروموزوم های مارکر در مدل های کروموزومی دیپلوئیدی و تریپلوئیدی، مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به تغییرات ساختاری ویژه مشاهده شده در کروموزوم های متافازی و با در نظر گیری بررسی مقالات مختلف، پیش بینی می گردد ژن های SRD5A2، BCAM، SIRT2، AKT2، MLANA، RHOB، CANX و TERT در بروز سرطان پوست دخالت داشته باشند. همچنین پیشنهاد می گردد که ناهنجاری های ساختاری کروموزومی گزارش شده در این پژوهش که محل استقرار احتمالی ژن های دخیل در این سرطان می باشند مورد کنکاش بیشتری واقع گردد تا ژن های کاندید بیشتری برای بررسی دقیق تر مشخص گردد.

واژه های کلیدی: ۱۲، ۷، دی متیل بنزآنتراسن، سرطان پوست، نواربندی گیمسا، موش صحرایی نژاد SD.

مقدمه:

می دهد، رشد رو به افزایش تعداد مبتلایان به این بیماری در سطح جهانی (۲) و به خصوص در کشور ما می باشد به طوری که سالیانه بیش از ۷۰۰۰۰ مورد به خیل بیماران سرطانی افزوده و بیش از ۴۰۰۰۰ نفر نیز به کام مرگ می روند و در حال حاضر بیش از ۲۰۰۰۰۰ بیمار سرطانی در کشور وجود دارد و عامل بیش از ۱۲ درصد از مرگ ها در سرتاسر جهان و ایران است (۳).

سرطان به انواع مختلفی از بیماری ها (شامل بیش از ۱۰۰ نوع) اطلاق می شود که حاصل رشد و تکثیر بی رویه و بی برنامه سلول های بدن است که تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی ایجاد می شود (۱). دغدغه ای که امروزه سرطان را به عنوان یک معضل بهداشتی در سطح جهان معرفی می کند و مبارزه با آن را جزو اولویت های بهداشتی درمانی قرار

^۱نویسنده مسئول: اراک-دانشگاه اراک- دانشکده علوم پایه- گروه زیست شناسی-تلفن: ۰۹۱۸۱۶۱۷۰۹۸، E-mail:m-soleimani@araku.ac.ir

مشخص شود و ژن های آن نواحی جهت پیشنهاد ژن های کاندید با توانایی و احتمال دخالت زیاد برای مطالعات دقیق تر ارایه شود.

روش بررسی:

آماده سازی حیوانات و میزان دوز ماده کارسینوژن:

در این مطالعه تجربی رت های نر از نژاد SD با میانگین وزنی 10 ± 150 گرم از موسسه ی سرم سازی رازی خریداری شد. قبل از شروع آزمایش، جهت سازگاری حیوانات با محیط به مدت یک هفته و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت 22 ± 3 و دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس ها در اتاق حیوانات نگهداری شدند. ۲۰ سر موش صحرایی از جنس نر وقتی به سن ۵۴-۵۰ روزگی رسیدند بطور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی کنترل و تیمار تقسیم شدند. به گروه تیمار ۲mg DMBA حل شده در ۰/۵ میلی لیتر روغن کنجد به صورت زیر جلدی تزریق گردید و به گروه کنترل نیز ۰/۵ میلی لیتر روغن کنجد زیر جلدی تزریق شد. رت ها هر روز از نظر ایجاد تومور مورد بازرسی و کنترل قرار گرفتند. پس از حدود ۸ هفته اولین نشانه های تومور در رت مشاهده شد و در هفته نهم با رعایت موازین اخلاقی در رابطه با کار با حیوانات بافت های توموری از بدن حیوان خارج شد و از آنها جهت پژوهش حاضر استفاده گردید.

مراحل آماده سازی تومور برای مطالعات:

پس از پایان دوره ی تیمار (رسیدن تومور به اندازه ی کمی بزرگتر از نخود) در هر یک از اعضای گروه تیمار، حیوانات توسط دی اتیل اتر بیهوش شدند و در شرایط استریل تومور بطور کامل خارج گردید و ۱/۳ تومور حاصل را برای مطالعات ایمنو هیستوشیمی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده و ۲/۳ آن برای کشت سلول استفاده شد.

جهت مطالعه هیستوپاتولوژیکی با استفاده از دستگاه اتوماتیک (اتوتکنیکون مدل Leica Histokinette از تومورها برش هایی با ضخامت ۵-۸ میکرون تهیه و سپس با استفاده از ائوزین و هماتوکسین هاریس رنگ -

سرطان پوست یکی از شایع ترین تومورهای بدخیم در انسان است (۴) این بیماری در تمام نقاط دنیا گزارش می شود و اکثر آنها از جمله کارسینوم سلول سنگفرشی و سلول های قاعده ای پوست به علت رادیوتراپی و تابش اشعه ماوراء بنفش نور خورشید ایجاد می شود (۵).

DMBA (7,12-Dimethylbenz[α]anthracene) یک

کارسینوژن آزمایشگاهی ویژه ی آلی و جزء هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH) می باشد که به اشکال مختلف در محیط زیست و همچنین در انواع غذاهای سرخ کرده نیز وجود دارد (۶). این ماده با تغییرات ساختاری که در آن داده شده است، در آزمایشگاه جهت تقلید تومور زایی در حیوانات آزمایشگاهی استفاده می شود و همچنین به عنوان مدلی از آلاینده های محیطی نیز عمل می کند. موش های صحرایی نژاد اسپراگ داوولی (SD) بدلیل اینبرید بودن از نظر ژنتیکی شباهت بسیار زیادی با یکدیگر دارند، لذا استفاده از آنها از ناهمگونی موجود در ژنوم انسان که موجب پیچیده شدن تفسیر نتایج می گردد تا اندازه ای جلوگیری می نماید. همچنین استفاده از موش صحرایی به عنوان مدل از تاثیر بسیاری از فاکتورهای محیطی جلوگیری به عمل می آورد. با اینکه تحقیقات زیادی در زمینه سرطان در انسان انجام شده ولی هنوز اطلاعات کافی برای ترسیم Vogel gram سرطان یعنی مکانیسم های ژنتیکی دقیق تبدیل سلول طبیعی به سلول سرطانی وجود ندارد. از آنجایی که سرطان پوست ایجاد شده در موش صحرایی از نظر هیستوپاتولوژیکی و ایمنو هیستوشیمی شبیه به سرطان پوست انسانی می باشد و این نکته در مقالات دیگر نیز تایید شده است لذا تغییرات ژنومیک آنها نیز بایستی شباهت های زیادی با یکدیگر داشته باشد. بنابراین در این تحقیق ناهنجاری های کروموزومی مشاهده شده در رت های مبتلا مورد بررسی قرار گرفته تا بدین طریق با هم ترازای نمودن توالی های نوکلئوتیدی این نواحی در موش های صحرایی و از طریق پایگاه های اطلاعاتی معتبر، با توالی نوکلئوتیدی ژنوم انسان، مقایسه گردد و نواحی مشابه آنها در انسان

گستره کروموزومی و رنگ آمیزی کروموزوم ها:

۱-۲ قطره از محلول حاوی سلول ها با پیبت پاستور و از فاصله ی ۳۰ سانتی متری بر روی لام انداخته شد و جهت رنگ آمیزی ابتدا لام ها را درون تریپسین $37^{\circ}C$ به مدت ۳۰-۱۰ ثانیه قرار داده و سپس جهت شستشو به ظرف حاوی بافر سرد PBS منتقل شد و سپس در محلول رنگ گیمسا آماده به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در نهایت با بافر PBS مجدداً شستشو و پس از خشک شدن زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تشخیص و تعیین نواحی کروموزومی تغییر یافته در رت های مبتلا به سرطان پوست، اقدام به تعیین توالی های نوکلئوتیدی آنها با استفاده از پایگاه های اطلاعاتی مانند NCBI شد. توالی های بدست آمده با توالی ژنوم انسان و با استفاده از ابزار BLAST موجود در سایت ذکر شده مقایسه گردید و نواحی متناظر آنها در انسان مشخص شد. لذا بدین طریق اطلاعات بدست آمده از موش های صحرایی مبتلا به سرطان، به قطعات کروموزومی انسانی متناظرشان منتقل گردید. سپس با استفاده از همان پایگاه اطلاعاتی اقدام به تهیه ی لیست ژن های موجود در نواحی مربوطه گردید که به عنوان ژن های پیش فرض برای بررسی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX41 از مجموعه های کروموزومی دارای شرایط مطلوب برای مطالعات بعدی عکس گرفته شد. سپس عکس های حاوی کروموزوم های متافازی بوسیله ی نرم افزار Leica CW4000 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:

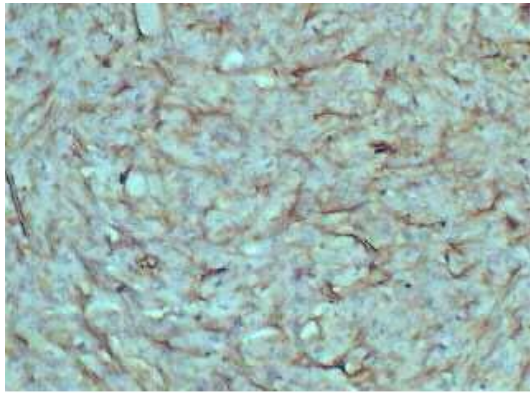
نتایج حاصل از مطالعه ی هیستوپاتولوژیکی تومورهای القایی نشان داد که اپیدرم پوست و همچنین تمام غدد و ضامثم پوست نیز به طور کامل از بین رفته اند. سلول های میتوزی و هسته های برجسته با استناد به مطالعات هیستوپاتولوژیکی ویژگی های کامل یک تومور پوستی را دارا می باشد (تصویر شماره ۱).

آمیزی انجام شد. پس از حدود ۸ هفته اولین نشانه های تومور در رت ها مشاهده شد و در هفته ی نهم، با رعایت موازین اخلاقی در رابطه با کار با حیوانات بافت های توموری از بدن حیوان خارج شد و از آنها جهت پژوهش حاضر استفاده گردید.

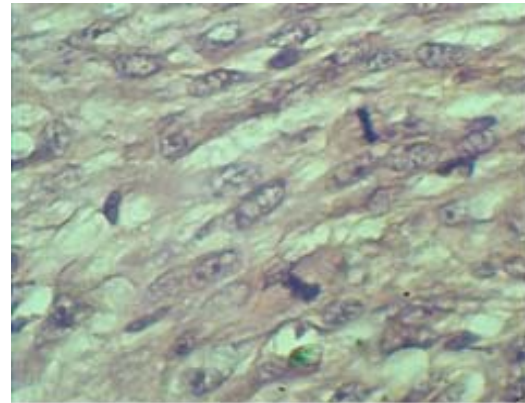
در این پژوهش از دو آنتی بادی PCNA [(Proliferating Cell Nuclear Antigen)(Clone pc10 Code NI1529)] و Pan cyto creatin خریداری شده از شرکت Dako Denmark A/s استفاده گردید.

مراحل انجام این تکنیک با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده آنتی بادی انجام گرفت و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

تومورها از رت خارج و با رعایت شرایط استریل شده و در زیر هود لامینار و در محیط HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)، به قطعات ریز خرد شدند و سپس با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی را دور ریخته و محیط کشت (Dulbeccos Modified Eagle Medium) DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) به پلیت سلولی اضافه شد و به فلاسک های ۲۵ ml منتقل گردید. برای افزایش کروموزم های متافازی در محیط کشت یا Mtotic index حدود ۴۰ لاندا از محلول کلشی سین ۱۰ mg/mL (Sigma-Aldrich) (C9754) به محیط کشت حاوی سلول اضافه شد و بمدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار گرفت. بعد از جدا سازی سلول های کشت شده از فلاسک، داخل لوله سانتریفوژ ریخته شدند و با دور ۱۲۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند و بر روی پلیت سلولی حاصل، محلول ۰/۰۷۵ M KCl، اضافه گردید و ۴۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی را برداشته و روی رسوب فیکساتیو کارنوی (۱ قسمت اسیداستیک و ۳ قسمت متانول) اضافه شد و سپس سانتریفوژ گردید. این عمل ۳ بار تکرار شد. سپس رسوب حاصل در مقدار مناسبی از فیکساتیو حل گردید.



تصویر شماره ۳: سلول های تومورال بافت پوست با بزرگنمایی ۴۰۰x در حضور Pan-Cytokeratin و ماده رنگ زای DAB



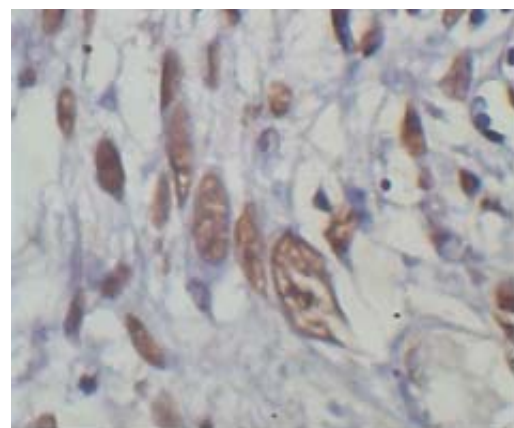
تصویر شماره ۱: برشی از بافت توموری پوست با بزرگنمایی ۴۰۰x در رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین

یک از اسلایدها حداقل ۶۰-۵۰ مجموعه کروموزومی مناسب مورد مطالعه دقیق قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که، عدد کروموزومی سلول های مطالعه شده در سه مدل کروموزومی قرار می گیرد، که در آن ۳۸ سلول مطالعه شده دارای مدل کروموزومی دیپلوئیدی و ۴۸ سلول دارای مدل کروموزومی تریپلوئیدی و بالاخره ۱۰۴ عدد از مجموعه های کروموزومی مطالعه شده دارای مدل تراپلوئیدی بودند.

تغییرات کروموزومی ایجاد شده در تومورهای القایی، طیف وسیعی از ناهنجاری های ساختاری را شامل می گردد و بطور واضح، کروموزوم های شماره ۱۰، ۸، ۹، ۱۸ دچار افزایش (gain) و کروموزوم های شماره ۴، ۱۶، ۱۲ و ۶ دچار گم شدگی (Loss) در تعداد کروموزوم ها گردیده اند (جدول شماره ۱). علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف در کروموزوم ها شماره ۱، ۵، ۶، ۱۷ و ۴ و همینطور کروموزوم های مارکر در مدل های کروموزومی دیپلوئیدی و تریپلوئیدی مشاهده شد. بخش های HSR (Homogenous Staining Region) که از نظر سیتوژنتیکی نشانه ای از فزون یابی ژن (هایی) در آن ناحیه می باشد بر روی کروموزوم شماره ۱ سلول های مطالعه شده رویت گردید (q12-q31). با استفاده از پایگاه های اطلاعاتی اینترنتی اقدام به مقایسه ی توالی های نواحی آسیب دیده در کروموزوم های موش صحرایی مبتلا به سرطان پوست با توالی های ژنوم انسان گردید و مکان های

نتایج حاصل از برهمکنش آنتی بادی های PCNA و Pan-Cytokeratin نشان داد بافت هایی که اقدام به کشت سلولی آنها شد تومورهای بدخیم بوده است. میزان بیان آنتی ژن PCNA در سلول های توموری افزایش شدیدی داشته که نشان دهنده سنتز بیش از حد این آنتی ژن در بافت توموری پوست می باشد (تصویر شماره ۲). نتیجه مثبت بودن رنگ - آمیزی Pan-Cytokeratin نشان دهنده ی منشاء اپیتلیالی سلول های سرطانی و نشانه کارسینوما بودن بافت توموری می باشد (تصویر شماره ۳).

بررسی نواریندی های کروموزومی با رنگ گیمسا نشان داد که برخی از نواحی کروموزومی به طور مکرر در مجموعه های سلولی مختلف دچار تغییراتی، مانند افزایش (تریزومی، آمپلیفیکاسیون) یا کاهش در نسخه های ژنی (مانند حذف) گردیده اند. در هر



تصویر شماره ۲: سلول های تومورال بافت پوست با بزرگنمایی ۴۰۰x در حضور آنتی بادی PCNA و ماده رنگ زای DAB

جدول شماره ۱: تغییرات عددی و ساختاری سلول های متافازی مطالعه شده در موش های صحرایی مبتلا به سرطان پوست و آدرس سیتوژنتیکی و تعداد ژن های وجود در قطعات متناظر آنها در کروموزوم های انسانی

تعداد ژن ها در انسان	همولوژی در انسان	امپلیفیکاسیون	انحرافات عددی		تغییرات ساختاری	تعداد سلول مطالعه شده	عدد کروموزومی	
			افزایش	کاهش			طیف	مدل
۵۹۷۱	19(q12;q13-42)							
۲۱۹	15(q26.1;q25.2)	HSR(q121-q31)	۱۰		1del(q21-q31)	۱۵	۳۵-۵۰	دیپلوئید
۹۸	15(q12;q11.1)							
---	---			۴	Der14;mar	۲۳		
۵۰۰	19(q13;q13-43)		۸		1del(q11-q22);mar	۲۱	۵۱-۷۵	تری پلوئید
۲۲۸	2(q25.3;q16.3)			۱۶	6del(q12-q16)	۲۵		
	قطعات مختلف بر روی کروموزوم های ۱۱، ۱۴، ۱۰ و ۱							
۷۶	9(q13;q21-13)		۹	۱۲	1del(q35-q52);	۲۸		
۲۱۲	9(q24.1;q24.3)							
	15(q12;q11.1)						۷۸-۸۸	ترا پلوئید
---	قطعات مختلف بر روی کروموزوم های ۹ و ۱				5del(q32-q35);	۱۹		
۱۴۱	5(P15.3;P15.31),		۱۸		۱۷P-	۲۲		
۷۸	5(q35.2;q35.3)							
---	قطعات مختلف بر روی کروموزوم های ۳ و ۲			۶	4del(q32-q35);	۳۵		

توسعه و وسعت زیادی یافته است. این مدل های بیولوژیکی که بیماری های انسان را تقلید می کنند، تفاوت های ژنتیکی کمتری با یکدیگر دارند، لذا از پیچیدگی های ژنتیکی که مربوط به تفاوت های فردی می باشد (۹، ۸)، جلوگیری به عمل می آید. دلیل بسیار مهم دیگر آنکه، با توجه به انتشار توالی های نوکلئوتیدی موجودات مختلف در پایگاه های اطلاعاتی در اینترنت، امکان تعمیم اطلاعات ژنتیکی و تغییرات کروموزومی ایجاد شده در یک موجود بر اثر بیماری به موجود دیگر، فراهم شده است.

نتایج بدست آمده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و مشاهده ی مستقیم بافت ها در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد که، پاتولوژی برخی از مشخصه های

سیتوژنتیکی آنها در کروموزوم های انسانی مشخص گردید (جدول شماره ۱) (۷). با بررسی های انجام شده در سایت های معرفی کننده ژن های سرطانی (Atlas of genetics and Cytogenetics in oncology and Hematology) مشخص گردید که، از بین ۲۱۴۹ ژن یافت شده در نواحی تغییر یافته، تعداد ۷۳۸ ژن (۳۴٪) آنها به عنوان ژن های سرطانی به ثبت رسیده اند لذا آنها نیز می توانند به لیست ژن های کاندید اضافه گردند.

بحث:

در دهه های اخیر، مطالعه بر روی مدل های بیولوژیکی که از قرابت های ژنتیکی با انسان برخوردار می باشند، در بیماری های پیچیده ژنتیکی مانند سرطان،

بیوشیمیایی تومورهای بدست آمده از موش های صحرائی در این تحقیق، شباهت دقیقی با تومورهای پوستی در انسان دارد، لذا از نظر تنوریکی نیز باید از لحاظ مکانیسم های ژنتیکی مسبب بوجود آمدن تومور نیز شباهت های زیادی با مکانیسم های مشابه در انسان داشته باشد. مشاهده سه مد کروموزومی مختلف در سلول های مطالعه شده نشان داد که: توده های سلولی سرطانی تمایل به افزایش عدد کروموزومی به سوی تراپلوئیدی را دارند چنانچه حدود ۵۴٪ درصد سلول ها دارای چنین مدل کروموزومی می باشند. لذا در پژوهش حاضر نواحی سیتوژنتیک درگیر در کروموزوم های رت تعیین و با نواحی مشابه آن در انسان مقایسه شد و با توجه به محل این توالی ها بر روی کروموزوم های انسانی ژن های آنها نیز مشخص گردید. در بررسی مقالات بدست آمده از پایگاه های اینترنتی حضور و دخالت برخی از این ژن ها در سرطان های مختلف انسانی به اثبات رسیده است، لذا آنها می توانند ژن های کاندید مناسبی برای بررسی دخالتشان در سرطان پوست باشند، که در ذیل به تعدادی از آنها اشاره می شود.

حذف قطعه (q21;q31) کروموزوم شماره یک قابل مقایسه با بخش دیستال و پروکسیمال بازوی بلند کروموزوم ۱۵ و بازوی q کروموزوم ۱۹ کروموزوم های انسانی است. این حذف در رت شامل ناحیه 19(q12;q13.42) و 15(q26.1;q25.2) و 15(q12;q11.1) و حذف در Idel(q11;q22) از مجموعه سلول های با مدل کروموزومی تری پلوئیدی نیز شامل 19(q13;q13.42) در انسان می باشد. این نواحی به ترتیب حدود ۹۸، ۲۱۹ و ۵۹۷ ژن دارد که از بین این ژن ها، ژن هایی که وظیفه اصلی آنها در بروز سرطان های مختلف در مقالات ذکر گردیده است اشاره می شود. ژن AKT2 (v- akt murine) از جمله ژن های ناحیه 1q22 رت می باشد که در انسان در ناحیه 19q13.2 قرار دارد این ژن یک انکوژن مشهور می باشد و یک پروتئین متصل شونده به زیر خانواده سرین/ترئونین کیناز را کد می کند این ژن در سرطان تخمدان به عنوان یک انکوژن قوی ذکر شده است (۹). HSR ها در کروموزوم ها نماد وجود انکوژن ها

در آن ناحیه کروموزومی می باشند که با محل سیتوژنتیکی این ژن نیز همخوانی دارد همچنین نقش ژن AKT2 در بروز سرطان های رحم و پستان به عنوان یک پیش برنده تومور (۱۰) و در سرطان پانکراس مورد تأیید قرار گرفته است (۱۱). ژن BCAM (Basal cell adhesion molecule (Lutheran group) blood) که شروع توالی آن از ۵۰۰۰۴۱۷۸ تا ۵۰۰۱۶۵۱۸ می باشد که در سرطان پوست دخیل می باشد (۱۲، ۱۳) و ژن SIRT2 (Sirtuin silent mating type (S. cerevisiae) information regulation 2 homolog) یک ژن سرکوبگر تومور انسانی در گلیوما می باشد نیز در این منطقه کروموزومی قرار دارد و از طریق تنظیم میکروتوبول های شبکه ای و به احتمالی با ایجاد مارکرهای مولکولی جدید عمل می کند. هر گونه جهش که منجر به اختلال در عملکرد این ژن از جمله کاهش یا حذف شود در ایجاد و پیشبرد سرطان سلول های گلیوما در مغز نقش دارد (۱۴). از آنجا که این ژن یک ژن سرکوبگر تومور در مغز می باشد و با توجه به سرعت رشد و تکثیر سلول های سرطانی در پوست رت و متاستاز در آن می تواند یکی از عوامل موثر در سرطان بر اساس متاستاز پوست در مغز باشد.

در بررسی های انجام شده حذف شدگی در قسمت پروکسیمال (q12;q16) کروموزوم ۶ رت ملاحظه گردید که با قسمت دیستال (P25.3:P16.3) ۲ انسانی همولوژی دارد. این ناحیه حدود ۲۲۸ ژن دارد. بر طبق مقالات بررسی شده، ژن RHOB (Ras Homolog Gene Family, Member B) که به عنوان واسطه گر آپوپتوز در سلول هایی که بعد از آسیب رسیدن به DNA تغییر شکل می دهند، ایفای نقش می کند و در سرطان ریه (۱۵، ۱۶) نقش دارد و از دیگر ژن ها steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide SRD5A2 2(3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 2) می باشد که تبدیل تستسترون به هورمون جنسی مردانه را کاتالیز می نماید و کاهش بیان این ژن در مقایسه با بافت نرمال در سرطان پروستات به اثبات رسیده است که

با افزایش چند ژن دیگر از جمله Hepsin و AMACR در ارتباط است بررسی شده است (۱۷). با توجه به مستقر بودن ژن SRD5A2 و RHOB در ناحیه ی q13 کروموزوم ۶ رت که در موش های صحرایی تیمار شده دچار حذف شدگی شده است می تواند، تأکیدی بر دخالت این ژن و یا ژن های مهم دیگری در این ناحیه، در بروز سرطان پوست در موش های تیمار شده با DMBA باشد.

قطعه (q35-q52) کروموزوم ۱ رت با قطعات مختلفی بر روی کروموزوم های ۱۱، ۱۴، ۱۰ و ۹ انسانی همولوژی دارد و همولوژی احتمالی آن با قطعات (q13;q21.13) و (q24.1;q24.3) بر روی کروموزوم ۹ انسانی تأیید شده است. این نواحی حدود ۲۱۲ ژن دارد به عنوان مثال ژن MLANA (Melan-A protein) که به همراه ژن های دیگر از جمله S100، HMB45 و Tyrosinase در ملانوم بدخیم متاستاز دهنده به طور هموزیگوت حذف می گردد (۱۸) حذف این ژن در سرطان ملانوم در انسان می تواند موید صحت حذف به وجود آمده در سرطان پوست القاء با DMBA در موش صحرایی باشد.

حذف ناحیه میانی کروموزوم ۵ (5del(q32;q35) در سلول های تتراپلوئیدی مطالعه شده، دیده شد. این بخش معادل قطعات کوچکی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ و بخش دیستال بازوی کوتاه کروموزوم ۱ انسان تشابه توالی نوکلئوتیدی دارد. لذا بدلیل پراکندگی قطعات همولوگ بر روی کروموزوم های انسانی و همچنین کوچک بودن این قطعات، امکان مقایسه ی توالی بخش های همولوگ بین رت و انسان وجود نداشت.

حذف ناحیه میانی کروموزوم ۵ (5del(q32;q35) در سلول های تتراپلوئیدی مطالعه شده، دیده شد. این بخش معادل قطعات کوچکی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ و بخش دیستال بازوی کوتاه کروموزوم ۱ انسان تشابه توالی نوکلئوتیدی دارد. لذا بدلیل پراکندگی قطعات همولوگ بر روی کروموزوم های انسانی و همچنین کوچک بودن این قطعات، امکان مقایسه ی توالی بخش های همولوگ بین رت و انسان وجود نداشت.

ناحیه (Pter,12) در بازوی کوتاه کروموزومی ۱۷ دارای Synteny با چهار قطعه بر روی کروموزوم ۹، دو قطعه بر روی کروموزوم ۵ و نیز دو قطعه بر روی کروموزوم شماره ۶ ترتیب توالی های مشترک دارد. این نواحی در کروموزوم ۵ به ترتیب حدود ۷۸ و ۱۴۱ ژن دارد. ژن TERT

حذف ناحیه میانی کروموزوم ۵ (5del(q32;q35) در سلول های تتراپلوئیدی مطالعه شده، دیده شد. این بخش معادل قطعات کوچکی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ و بخش دیستال بازوی کوتاه کروموزوم ۱ انسان تشابه توالی نوکلئوتیدی دارد. لذا بدلیل پراکندگی قطعات همولوگ بر روی کروموزوم های انسانی و همچنین کوچک بودن این قطعات، امکان مقایسه ی توالی بخش های همولوگ بین رت و انسان وجود نداشت.

نتیجه گیری:

در هر حال تغییرات مشاهده شده در موش های مبتلا ثابت بوده و در بروز سرطان پوست در رت ها موثر بوده است، لذا وجود این تغییرات ساختاری و عددی و به عبارت دیگر افزایش یا کاهش مقدار ژنوم موجود در سلول های سرطانی، بایستی انعکاسی از تغییرات در ژن های این نواحی باشد. از آنجایی که شناسایی دقیق ژن های دخیل در بروز سرطان در درمان های مؤثرتر و همچنین یافتن افراد مستعد و غربالگری آن ها در آینده تاثیر بسیاری خواهد داشت پیشنهاد می گردد ژن های نواحی تغییر یافته در کروموزوم های ذکر شده در نتایج این تحقیق برای مطالعات بیشتر مورد بررسی مولکولی و دقیق تر قرار گیرند.

تشکر و قدردانی:

فراهانی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری رساندند
تشکر و قدردانی می گردد.

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک جهت
تامین هزینه های مالی این پژوهش و همچنین آقای مهدی

منابع:

1. Shojaie Tehrani H. [Epidemiology of acute noncontiguous and contiguous diseases. Tehran: Samat Pub; 2007. p: 125-9.]Persian
2. Farmer RD, Lawreson R. Medical epidemiology of public health. 5th ed. NewYork: Blackwell Pub. 2004; p: 86.
3. Raesi P, Nasiri-pour AA, Azimi R. Cancer registry of hospitals in Islamic Republic of Iran and comparison with USA. J Yazd Shahid Sadoghi Univ of Med Sci. 2006; 14(1): 23-32.
4. Marks R. An overview of skin cancer incidence and causation. Cancer. 1995; 75(2): 607-12.
5. Philip R. Caseson perry robins. Malignant tumors of the skin: McCarthy plastics surgery. NewYork: Saunders Co. 1990; p: 3615-62.
6. Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. Mechanism of 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. Jpn J Pharmacol. 2001; 86: 302-9.
7. Kelman Z. PCNA: Structure, functions and interactions. Oncogene. 1997; 14: 625-40.
8. Al-Dhaheri WS, Hassouna I, Al-Salam S, Karam SM. Characterization of breast cancer progression in the rat. ANNALS (Annals of the NewYork Academy of Sciences) 2008 Sep; 1138(1): 121-31.
9. Adamovic T, Hamta A, Roshani L, Lu Xuchun RD, Helou K, Klinga-Levan K, et al. Rearrangement and allelic imbalance on chromosome 5 leads to homozygous deletions in the CDKN2A/2B tumor suppressor gene region in rat endometrial cancer. Cancer Genet Cytogenet. 2008 Jul; 184(1): 9-21.
10. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. Int J Cancer. 1995; 64(4): 280-5.
11. Altomare D, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Tanno S, Skele KL, et al. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. J Cell Biochem. 2003; 88(1): 470.
12. Schon M, Klein CE, Hogenkamp V, Kaufmann R, Wienrich BG, Schon MP. Basal-cell adhesion molecule (B-CAM) is induced in epithelial skin tumors and inflammatory epidermis, and is expressed at cell-cell and cell-substrate contact sites. J Invest Dermatol. 2000 Dec; 115(6): 1047-53.
13. Drewniok C, Wienrich BG, Schon M, Ulrich J, Zen Q, Telen MJ, et al. Molecular interactions of B-CAM (basal-cell adhesion molecule) and laminin in epithelial skin cancer. Arch Dermatol Res. 2004 Jul; 296(2): 59-66.
14. Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Sep; 309(3): 558-66.
15. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, et al. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. Int J Cancer. 2007 Feb; 120(3): 543-51.
16. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. Clin Cancer Res. 2004 Apr; 10(8): 2742-50.

17. Luo J, Dunn TA, Ewing CM, Walsh PC, Isaacs WB. Decreased gene expression of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate cancer: implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. *Prostate*. 2003 Oct; 57(2): 134-9.
18. Gao Z, Stanek A, Chen S. A metastatic melanoma with an unusual immunophenotypic profile. *Am J Dermatopathol*. 2007 Apr; 29(2): 169-71.
19. Li YR, Wu JM, Wang L, Huang X, Shi J, Hu LH. Human telomerase reverse transcriptase expression and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2005 Apr; 125(4): 409-14.
20. Dissemond J, Busch M, Kothen T, Mors J, Weimann TK, Lindeke A, et al. Differential down regulation of endoplasmic reticulum-residing chaperones Calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma. *Cancer Lett*. 2004 Jan; 203(2): 225-34.

Received: 22/Aug/2009

Accepted: 9/May/2010

Determination of numerical and structural chromosomal changes in skin cancer in rat and finding comparable parts in human

Soleimani-MehrNejani M (PhD)^{*1}, Hamta A (PhD)^{**}, Shariatzadeh SMA (PhD)^{***}

^{*}Associated professor, Biology Dept., Arak University, Arak, Iran,

^{**}Assistant professor, Biology Dept., Arak University, Arak, Iran,

^{***}Professor, Biology Dept., Arak University, Arak, Iran.

Background and aim: Rat and human skin tumors have high similarity in physiology and show comparable biochemical responsiveness. In this study we have recorded numerical and structural chromosomal changes in metaphases chromosomes in induced-breast cancer in rats.

Methods: In this experimental study, a carcinogenic substance (7,12-Dimethylbenz[α] anthracene, DMBA) (2.5 mg) was subcutaneously injected to SD rats. Since tumors were appeared in effected rats, they became subjects for histopathology and imunohistochemistry studies as well as cell culture, metaphase chromosomal preparations and finally G-banding staining.

Results: The data showed some un-randomly numerical and structural changes in different number of chromosomes. We found a gain in chromosomes number 8, 9, 10, 18 and a loss of numerical chromosomal changes in chromosomes number 4, 6, 12, 16 Deletion was seen in chromosomes number 1, 4, 5, 6, 17 and marker chromosomes in diploid and triploid model of analyzed chromosomal sets.

Conclusion: According to our reported chromosomal changes and also published articles, we predict that SRD5A2, BCAM, SIRT2, AKT2, MLANA, RHOB, CANX, TERT are probably involved in development of skin cancer. In addition, we recommend that the genes located in these chromosomal segments, which have been reported in these studies, should be subjected to more investigations.

Keywords: 7,12-Dimethylbenz[α] anthracene (DMBA), G-banding, Skin cancer, SD rat strain.

¹Corresponding author:
Biology Dept., Faculty of
Sciences, Arak University,
Arak, Iran.
Tel:
09181617098
Email:
m_soleimani@araku.ac.ir