

تغییرات کروموزومی ایجاد شده در بروز سرطان پوست القایی در موشهای صحرائی

دکتر سید محمد علی شریعت زاده^۱، دکتر احمد همتا^{۲*}، دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی^۳، زهرا رسولی^۴

۱- استاد، دکترا تخصصی جنین شناسی و بافت شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

۲- استادیار، دکترا تخصصی ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

۳- دانشیار، دکترا تخصصی جنین شناسی و بافت شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

۴- کارشناسی ارشد سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت ۸۸/۴/۲۴ تاریخ پذیرش ۸۸/۶/۱۱

چکیده

مقدمه: سرطان پوست یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین سرطان‌های رایج در جهان است. این بیماری رتبه اول در بین مردان و رتبه دوم در بین زنان را به خود اختصاص داده است. این مطالعه با هدف تعیین تغییرات کروموزومی ایجاد شده در بروز سرطان پوست القایی در موش‌های صحرائی صورت گرفت.

روش کار: در این پژوهش بنیادی، ۲۰ موش صحرائی نژاد اسپراگودالی به طور تصادفی به دو گروه مساوی آزمایش و کنترل تقسیم شدند. در گروه آزمایش با استفاده از تزریق زیر جلدی ۲/۵ میلی گرم ماده کاسینوزینیک ۱۲ و ۷ دی متیل بنزآلفا آنتراسن ایجاد سرطان پوست شد. تومورهای ایجاد شده در گروه‌های مورد آزمایش به محیط کشت منتقل و کروموزوم‌های متافازی تهیه گردید. سپس رنگ آمیزی باندینگ انجام گرفت و ژن‌های مستقر در آنها شناسائی گردید. همچنین از روش مقایسه ژنومیک جهت تعیین نقش احتمالی آنها به انسان استفاده شد. روش‌های هستیوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی برای شناسائی و تعیین مراحل توموری به کار گرفته شد.

نتایج: بیشترین و مشترک‌ترین تغییرات کروموزومی در بین مجموعه‌های کروموزومی مطالعه شده به ثبت رسید چنانچه افزایش عددی در کروموزوم‌های شماره ۱، ۱۵ و ۱۷ و کاهش عددی در کروموزوم‌های شماره ۱، ۷، ۱۰ و ۱۵ مشاهده شد. علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف در کروموزوم‌های شماره ۱، ۴، ۸، ۹، ۱۰، ۱۵ و ۱۷ و اضافه شدگی در کروموزوم ۱۵ مشاهده گردید.

نتیجه گیری: پیش‌بینی می‌گردد ژن‌های *CDKN1C*، *BRMS1*، *DKK3*، *PTCH1*، *PRKCDBP*، *CST6*، *KLF4* و *CASP2*، *HRAS*، *EEF1A1*، *CDKN2B*، *DMP1*، *CD81* در بروز سرطان پوست دخالت دارند.

واژگان کلیدی: ۱۲ و ۷ دی متیل بنزآلفا آنتراسن، سرطان پوست، نواربندی گیمسا، موش‌های صحرائی نژاد اسپراگودالی

*نویسنده مسئول: اراک، سردشت، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: a-hamta@araku.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از بیماری‌های شایع مزمن و غیر واگیر است. تمام اشکال سرطان علت ۹ درصد از مرگ و میرها را در سراسر جهان تشکیل می‌دهند. سرطان در جهان بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی دومین علت عمده مرگ است. برابر آمارهای منتشره در مجموع سالانه ۵۰ میلیون مرگ در جهان روی می‌دهد که بیش از ۵ میلیون از آنها به انواع مختلف سرطان نسبت داده می‌شود (۱). آنچه حتی از میزان مرگ و میر ناشی از سرطان دردناکتر است، رنج عاطفی و جسمانی حاصل از آن می‌باشد. از طرفی گام‌های بلند و موفقیت آمیزی در درک سبب شناسی و اساس مولکولی سرطان برداشته نشده است (۲) سرطان‌زایی یک روند ژنتیکی است که منجر به تغییر شکل و رفتار سلول می‌شود. ارزیابی این تغییرات در سطح مولکولی ممکن است اولین وسیله تشخیص و کنترل این ضایعات باشد. تعیین اختلال کروموزومی در پیش‌بینی رفتار و تعیین میزان بقاء بیمار نیز به ما کمک می‌کند (۳).

سرطان پوست در اکثر کشورهای دنیا در ردیف شایع‌ترین سرطان‌هاست (۴). ضایعه‌های سرطان پوست چون در معرض دید هستند به سرعت جلب توجه می‌کنند (۵). در این تحقیق تلاش شد تا تغییرات کروموزومی ایجاد شده در بروز سرطان پوست القایی در موش صحرائی (رت) مورد بررسی قرار گرفته و نواحی مشابه آنها در انسان ارزیابی گردد. در نهایت ژن‌های آن نواحی جهت پیشنهاد ژن‌های کاندید با توانایی و احتمال دخالت زیاد برای مطالعات دقیقتر ارائه شود.

روش کار

در طی یک مطالعه بنیادی رت‌های نرمال از نژاد اسپراگودالی (Sporague Dawley- SD) با میانگین وزنی 150 ± 10 گرم از موسسه‌ی سرم سازی رازی خریداری شد. قبل از شروع آزمایش، جهت سازگاری با محیط، حیوانات به مدت یک هفته در اتاق حیوانات در شرایط ۱۲

ساعت تاریکی - ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌ها نگهداری شدند ۲۰ عدد موش صحرائی از جنس نر از نژاد SD در سن ۵۰ - ۵۴ روزگی، به طور اتفاقی به دو گروه ده تایی کنترل و آزمایش تقسیم شدند. به گروه آزمایش ۲/۵ میلی‌گرم و ۷ و ۱۲ دی متیل بنز آلفا آنتراسن (7,12 Dimethyl Benz [α] Anthracene -DMBA) حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر روغن کنجد به صورت زیر جلدی و به گروه کنترل ۰/۵ میلی‌لیتر روغن کنجد زیر جلدی تزریق شد. DMBA یک کارسینوژن آزمایشگاهی ویژه آلی و از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - PAH) می‌باشد (۴). این ماده در آزمایشگاه صرفاً جهت تومور زایی در حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌شود. تزریقات دارو ۲ بار در طول ۲ هفته متوالی، در روز و ساعت مشخص ادامه یافت. رت‌ها هر روز از نظر ایجاد تومور مورد بازرسی و کنترل قرار می‌گرفتند. پس از پایان دوره آزمایش (رسیدن تومور به اندازه کمی بزرگ‌تر از نخود) هر یک از اعضای گروه آزمایش، توسط دی‌اتیل اتر بیهوش شدند. ناحیه‌ی اطراف تومور تراشیده شده و پس از شکافتن ناحیه اطراف آن، تومور در شرایط استریل به طور کامل خارج گردید. یک سوم تومور حاصل برای مطالعات ایمنوهیستوشیمی در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و دو سوم آن برای کشت سلول استفاده گردید.

جهت آماده سازی تومور برای مطالعات پاتولوژیکی و ایمنوهیستوشیمی (Immuno Histo Chemistry-IHC) تومور به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس تومورها با استفاده از دستگاه اتوماتیک اتوتکنیکوم مدل لیکاهیسستوکتیک (Leica Histokinette) مورد پاساژ بافتی قرار گرفتند و پس از آن از نمونه‌ها برش‌هایی با ضخامت ۵-۸ میکرون تهیه گردید. نهایتاً رنگ آمیزی

مقاطع بافتی با استفاده از ائوزین و هماتوکسیلین هاریس (Eosin & Haris Hematoxilin) انجام شد.

در این پژوهش جهت انجام تکنیک ایمنوهیستوشیمی از دو آنتی‌بادی خریداری شده از شرکت داکو (Dako Denmark A/s) (Dako) استفاده گردید که عبارتند از:

Von Willebrand factor (Clone F8/86 Code N1505 RTU) و pan cytoctatin.

مراحل انجام این تکنیک با توجه به دستور العمل شرکت سازنده آنتی‌بادی داکو انجام گرفت.

برای انجام روند تکثیر سلول‌های سرطانی نیز تومورها از رت خارج و به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) داخل فالكون، منتقل شد و پس از خرد کردن و ریز کردن قطعات بافت به فالكون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل و با دور ۱۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته و محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM (Fetal Bovine Medium) ۱۰ درصد Serum) FBS اضافه شد و به فلاکس‌های ۲۵ میلی‌لیتر منتقل گردید. تمامی مراحل ذکر شده، با رعایت شرایط استریل و در زیر هود لامینار انجام پذیرفت. برای افزایش کروموزوم‌های متافازی در محیط کشت یا (Mitotic Index) حدود ۴۰ میلی‌لیتر از محلول کلشی سین به محیط کشت داخل فلاسک اضافه شد و بمدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از جدا سازی سلول‌های کشت شده از فلاکس، داخل لوله سانتریفوژ ریخته شدند و با دور ۱۲۰۰ در دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند و بر روی رسوب محلول ۰/۰۷۵ مولار کلرید پتاسیم (KCl) اضافه گردید و ۴۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت. بعد از سانتریفوژ مایع رویی برداشته و روی رسوب فیکساتیو کارنوی (فیکساتیو ۱ قسمت اسیداستیک و ۳ قسمت متانول) اضافه شد و سپس سانتریفوژ گردید. این عمل ۳ بار تکرار شد. بعد از ۳ بار شستشو با فیکساتیو،

مقداری از فیکساتیو را بر رسوب باقی گذاشته و رسوب در فیکساتیو حل گردید. سپس حدود ۳-۴ قطره محلول با پیپت پاستور و از فاصله ۳۰ سانتی‌متری بر روی لام انداخته شد. جهت رنگ آمیزی ابتدا لام‌ها را درون تریپسین ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۳۰ ثانیه قرار داده و سپس جهت شستشو به ظرف حاوی بافر سرد (Phosphate Buffered Saline-PBS) منتقل شد و سپس در محلول رنگ گیمسا آماده به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در نهایت با بافر PBS مجدداً شستشو گردید و پس از خشک شدن زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

جهت جمع‌آوری اطلاعات و بررسی بیو انفورماتیکی داده‌ها، با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX41 از مجموعه‌های کروموزومی دارای شرایط مطلوب برای مطالعات بعدی عکس گرفته شد. سپس عکس‌های حاوی کروموزوم‌های متافازی بوسیله‌ی نرم افزار Leica CW4000 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

پس از تشخیص و تعیین نواحی کروموزومی تغییر یافته در رت‌های مبتلا به سرطان پستان، اقدام به تعیین توالی‌های نوکلئوتیدی آنها با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی مانند NCBI شد. توالی‌های به دست 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 به دست آمده از موش‌های صحرائی مبتلا به سرطان، به قطعات کروموزومی انسانی متناظرشان منتقل گردید. سپس با استفاده از همان پایگاه اطلاعاتی و دیگر پایگاه‌ها اقدام به تهیه لیست ژن‌های موجود در نواحی مربوطه نمودیم که بعنوان ژن‌های پیش فرض برای بررسی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

پس از حدود ۸ هفته اولین نشانه‌های تومور در رت‌ها مشاهده شد و در هفته‌ی نهم، هنگامی که تومورها به اندازه یک نخود شده بودند (شکل ۱). حیوان با رعایت

موازین اخلاقی و توسط اتر بیهوش شده و بافت های توموری خارج شدند و از آنها جهت پژوهش حاضر استفاده گردید. در شکل ۲ تصویر تومور ایجاد شده در یک موش صحرایی گروه آزمایش را نشان می دهد که با استناد به مطالعات پاتولوژیک ویژگی های کامل یک تومور پوستی را دارا می باشد.



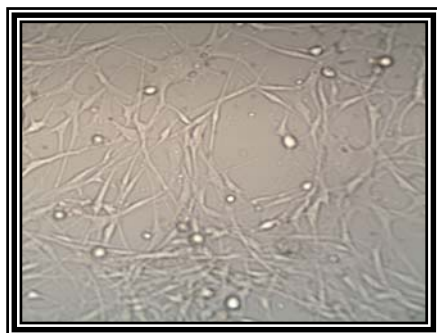
شکل ۱. تومور ایجاد شده در یکی از موش های صحرایی گروه تیمار



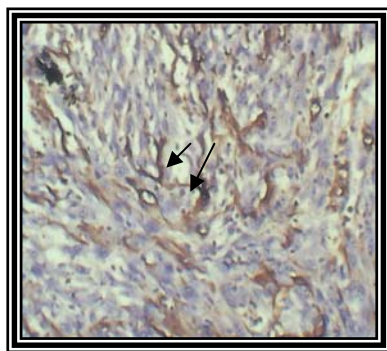
شکل ۲. برشی که از بافت تومورال پوست با بزرگنمایی $\times 100$ با رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین تهیه شده است. اپیدرم پوست زخمی شده و از بین رفته است تمام غدد و ضمام پوست نیز به طور کامل از بین رفته است. پیکان های بلند نشان دهنده سلول های میتوزی و پیکان کوتاه نیز هسته های برجسته را نشان می دهد.

در فرایند ایجاد تومور، ژن ها و در نتیجه محصولات حاصل از بیان آنها رفتارهای متفاوتی را از خود نشان می دهند که در واقع منجر به ساخت پروتئین های خاص در جهت پیشرفت تومور می شود. در این مطالعه عملکرد برخی از این ژن ها با اثربخشی آنتی بادی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت تا جهت تعیین نوع و مرحله تومور

استفاده گردد. مشاهده شد که بافت هایی که اقدام به کشت سلولی آنها گردید (شکل ۳) از نوع تومورال بدخیم کارسینومای سنگفرشی بوده که نتایج حاصل از آزمون های ایمنو هیستوشیمی آنها بدین شرح می باشد: در شکل ۴ بافت توموری پوست القاء شده به وسیله DMBA بعد از رنگ آمیزی با آنتی وون و ویلبراند (Von Willebrand Factor -VWF) قابل مشاهده خواهد بود. رنگ پذیری سیتوپلاسمیک سلول های توموری اشاره به فعالیت رنگ زائی در تومور دارد. در شکل ۵ نیز نتایج حاصل از برهم کنش آنتی بادی پان سیتوکراتین (Pan-Cytokeratin) با بافت تومورال پوست رت را نشان می دهد. نتیجه مثبت بودن این رنگ آمیزی نشان دهنده منشأ اپیتلیالی بودن سلول های سرطانی و کارسینوما بودن بافت توموری می باشد.



شکل ۳. تصویری از سلول های توموری در حال تکثیر و رشد در محیط کشت که برای تهیه اسلایدهای حاوی کروموزوم های متافازی استفاده شدند.

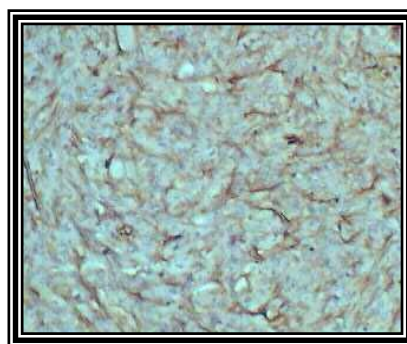


شکل ۴. سلول های تومورال بافت پوست با بزرگنمایی $\times 100$ در حضور آنتی بادی VWF و ماده ی رنگ زای DAB دیده می شود

کروموزوم‌های شماره ۱، ۷، ۱۰ و ۱۵ دچار گم شدگی (Loss) در تعداد کروموزوم‌ها گردیده اند (جدول ۱). علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف در کروموزوم‌ها شماره ۱، ۴، ۸، ۱۰، ۹، ۱۵ و ۱۷ اضافه شدگی در کروموزوم‌ها ۱۵ به طور غیر اتفاقی مشاهده گردید.

با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی اینترنتی اقدام به مقایسه‌ی توالی‌های نواحی آسیب دیده در کروموزوم‌های موش صحرایی مبتلا به سرطان پستان با توالی‌های ژنوم انسان شد و مکان‌های سیتوژنتیکی آنها در کروموزوم‌های انسانی (جدول ۱) (شکل ۶) و بر روی آیدئوگرام موش صحرایی (شکل ۷) مشخص گردید. به عنوان مثال حذف در ناحیه پروکسیمال کروموزوم ۱۷ که در شکل ۶ نشان داده شده است قابل مقایسه با ناحیه q22 کروموزوم شماره ۹ انسانی می‌باشد. این محدوده بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه‌های اینترنتی حدود ۱۰۷ ژن می‌باشد.

با بررسی‌های انجام شده در سایت‌های معرفی کننده ژن‌های سرطانی مانند <http://atlasgeneticsoncology.org> مشخص گردید که از بین ۲۴۵۸ ژن یافت شده در نواحی تغییر یافته، تعداد ۶۴۲ ژن (۲۶ درصد) آنها به عنوان ژن‌های سرطانی به ثبت رسیده‌اند لذا آنها نیز می‌توانند به لیست ژن‌های کاندید اضافه گردند.



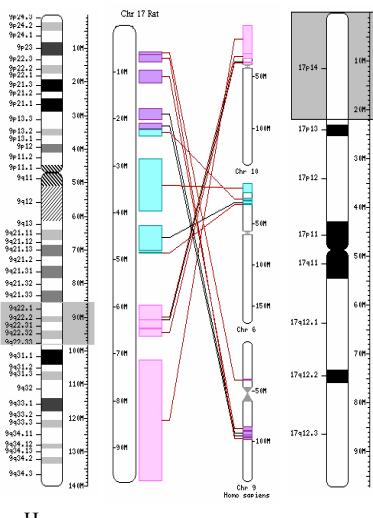
شکل ۵. سلول‌های تومورال بافت پوست با بزرگنمایی $400 \times$ در حضور آنتی بادی Pan-Cytokeratin و ماده‌ی رنگ‌زای DAB دیده می‌شود.

تغییرات کروموزومی در تومورهای در حال رشد با استفاده از روش کلاسیک سیتوژنتیک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که برخی از نواحی کروموزومی به طور مکرر در مجموعه‌های سلولی مختلف دچار تغییراتی مانند افزایش (مانند تریزومی، آمپلیفیکاسیون) یا کاهش در نسخه‌های ژنی (مانند حذف) گردیده‌اند. بررسی بر روی اسلایدهای حاوی کروموزوم‌ها متافازی تهیه شده از تومورهای القایی کشت داده شده انجام گرفت. نتایج نشان داد عدد کروموزومی سلول‌های مطالعه شده در سه مد کروموزومی قرار می‌گیرد که در آن ۵۷ سلول مطالعه شده دارای مد کروموزومی دیپلوئیدی و ۴۸ سلول دارای مد کروموزومی تریپلوئیدی و بالاخره ۸۵ مجموعه‌های کروموزومی مطالعه شده دارای مد تتراپلوئیدی بودند.

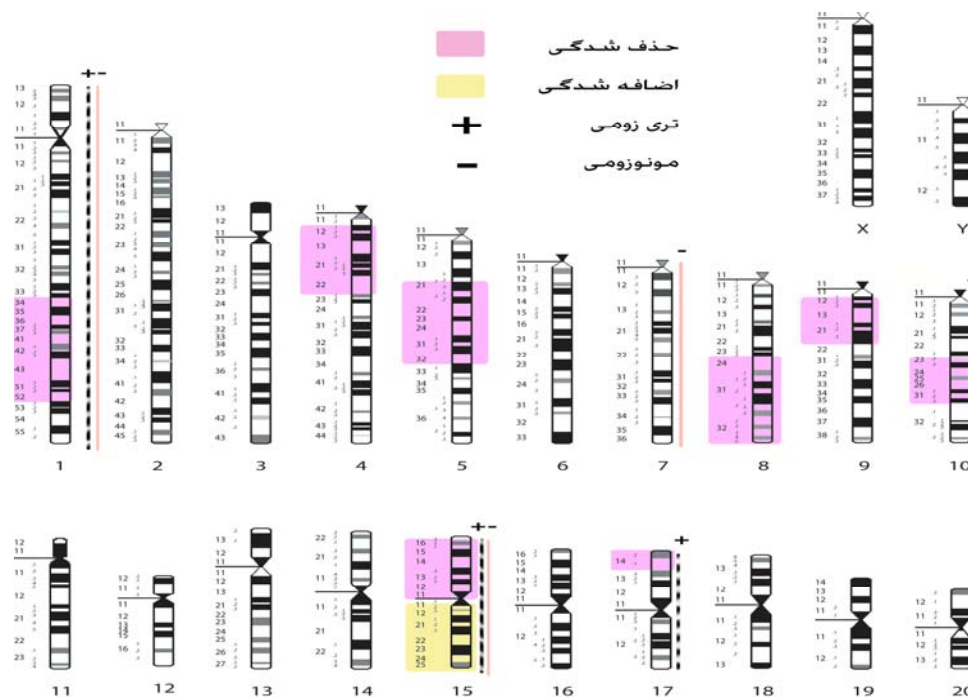
تغییرات کروموزومی ایجاد شده طیف وسیعی از ناهنجاری‌های ساختاری را شامل می‌گردد به طور واضح کروموزوم‌ها شماره ۱، ۱۵ و ۱۷ دچار افزایش (gain) و

جدول ۱. تغییرات سیتوژنتیکی، مشاهده شده در سلول های سرطانی القاء شده در موش های صحرانی نژاد SD توسط 7,12-DiMethylBenz[α]Anthracene (DMBA) و مقایسه آن ها با کروموزوم های متناظر انسانی

تعداد ژن ها	همولوژی در انسان		انحرافات عددی		تغییرات ساختاری	تعداد سلول	عدد کروموزومی	
	در انسان		کاهش	افزایش			مدل	طیف
35~50 دیپلوئید N=57								
107	9(q22.1;q22.33)		1		17 del(p14)	17		
-----	-----		7		Der16-t(9,16)	21		
269	11(q11;q12.3)				1del(q34-q52)	19		
353	11(p15.5;p15.1)							
69	10(q26.3;qter)							
51~75 تری پلوئید N=48								
349	7(q21.12;q22.1)		1	15	4 del(q12-q22)	23		
190	7(q31.31;q36.1)							
225	13(q13.2;q32)				15 q+	25		
78~88 تترا پلوئید N=85								
134	15(q15.3;q15.23)		15		8 del(q24-q32)	24		
101	17(p13-p11.2)			10	10 del(q23-q31)	27		
140	17(q11-q12)							
105	17(q21.32-q23.1)							
-----	قطعات مختلفی بر روی کروموزوم های 10 و 13 و 14		17		15p-	34		



شکل ۶. در شکل سمت راست، ناحیه خاکستری حذف شدگی را در ناحیه پروکسیمال کروموزوم ۱۷ رت نشان می دهد که از ۰ Mb تا ۲۲ Mb و معادل حذف شدگی ۱۷p۱۴ می باشد. در شکل وسط همولوگ این نواحی را در کروموزوم های انسانی و در شکل سمت چپ این ناحیه در بخش 9(22.1;22.33) در کروموزوم ۹ انسانی مشخص شده است.



شکل ۷. تغییرات کروموزومی اعم از عددی و ساختاری بر روی ایدئوگرام کروموزوم های رت نشان داده شده است. همچنین افزایش عددی کروموزوم با علامت مثبت و کاهش عددی آن با علامت منفی نشان داده شده است.

بحث

سنگفرشی بیان می‌شود و نتیجه مثبت بودن این رنگ آمیزی و رنگ پذیری شدید سیتوپلاسمی نشان دهنده منشا اپیتلیالی بودن سلول‌های سرطانی و نشانه‌ی کارسینوما بودن بافت توموری القاء شده با DMBA می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی، بافت‌های مورد استفاده برای کشت سلول از تومورهای بدخیم کارسینومای سنگفرشی پوست بوده و شباهت کامل با تومورهای مشابه در انسان دارد چنانچه در مقالات نیز این مورد تأیید قرار گرفته است (۷). در دهه‌های اخیر مطالعه بر روی مدل‌های بیولوژیکی که از قرابت‌های ژنتیکی با انسان برخوردار می‌باشند، در بیماری‌های پیچیده ژنتیکی مانند سرطان، توسعه و وسعت زیادی یافته است. این مدل‌های بیولوژیکی که بیماری‌های انسان را تقلید می‌کنند، تفاوت‌های ژنتیکی کمتری با یکدیگر دارند لذا از پیچیدگی‌های ژنتیکی که مربوط به تفاوت‌های فردی می‌باشد جلوگیری به عمل

در این مطالعه دو آنتی بادی برای روش IHC به کار برده شد که شامل آنتی بادی وون و ویلبراند و آنتی بادی پان سایتو کراتین می‌گردید بیان ایمونوهیستوشیمیایی فاکتور وون و ویلبراند ابزار مفیدی برای تشخیص تومورهای با منشأ اندوتلیالی است. این آنتی بادی در مکانیسم آنژیوژنز (رگ زایی) بافت تومورال نقش دارد (۶). در لام‌های استفاده شده در آزمایش ایمونوهیستوشیمی که با این آنتی بادی مورد ارزیابی قرار گرفتند، سلول‌های اپیتلیال طبیعی رنگ پذیری کمی را با آنتی بادی وون و ویلبراند آنتی بادی نشان داده‌اند به خصوص در لایه‌های بازال و درم و همچنین اپیدرم که معمولاً با فاکتور وون و ویلبراند واکنش نشان داده و رنگ می‌گیرند. ولی رنگ پذیری سیتوپلاسمیک سلول‌های توموری با این آنتی بادی بسیار زیاد بود و اشاره به فعالیت رگ زایی در تومور دارد. آنتی بادی پان سایتو کراتین در سلول‌های توموری با منشا اپیتلیومی و ناشی از سلول‌های

می‌آید. دلیل بسیار مهم دیگر آن که با توجه به انتشار توالی‌های نوکلئوتیدی موجودات مختلف در پایگاه‌های 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 به دست آمده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و مشاهده مستقیم بافت‌ها در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد که پاتولوژی برخی از مشخصه‌های بیوشیمیایی تومورهای به دست آمده از موش‌های صحرایی در این تحقیق شباهت دقیقی با تومورهای پوستی در انسان دارد لذا از نظر تئوریک نیز باید از لحاظ مکانیسم‌های ژنتیکی مسبب به وجود آمدن تومور نیز شباهت‌های زیادی با مکانیسم‌های مشابه در انسان داشته باشد.

نتایج بیان‌گر این بود که عدد کروموزومی سلول‌های مطالعه شده در سه مدل کروموزومی قرار می‌گیرد که در آن ۵۷ سلول مطالعه شده دارای مدل کروموزومی دیپلوئیدی و ۴۸ سلول دارای مدل کروموزومی تریپلوئیدی و بالاخره ۸۵ مجموعه کروموزومی مطالعه شده دارای مدل تتراپلوئیدی قرار داشت. تغییرات عددی نشان می‌دهند که توده‌های سلولی سرطانی تمایل به افزایش عدد کروموزومی به سوی تتراپلوئیدی را دارند. چنانچه حدود ۴۵ درصد سلول‌ها دارای چنین مدل کروموزومی می‌باشند. لذا در پژوهش حاضر نواحی سیتوژنتیک درگیر در کروموزوم‌های رت تعیین و با نواحی مشابه آن در انسان مقایسه شد، لذا با توجه به محل این توالی‌ها بر روی کروموزوم‌های انسانی ژن‌های آنها نیز مشخص گردید. در بررسی‌های گذشته نیز حضور و دخالت برخی از این ژن‌ها در سرطان‌های مختلف انسانی به اثبات رسیده است، لذا آنها می‌توانند ژن‌های کاندید مناسبی برای بررسی دخالتشان در سرطان پستان باشند، که در ذیل به تعدادی از آنها اشاره می‌شود.

حذف در بازوی کروموزومی (P14) 17 del یکی از موارد فوق است. حذف در ناحیه پروکسیمال کروموزوم ۱۷ که قابل مقایسه با ناحیه میانی کروموزوم

شماره ۹ انسانی می‌باشد شامل ناحیه‌ی (9q21.31; q22.3) در انسان است. هم‌چنین ژن‌های موجود در این توالی نیز تعیین شدند که تا زمان این پژوهش محدوده‌ای دارای حدود ۱۰۷ ژن بود. این گروه از ژن‌ها در انواع مختلف سرطان‌ها دخالت دارند. لذا می‌توانند ژن‌های کاندید مناسبی برای مطالعات دقیق‌تر و مولکولی باشند تا نقش آنها در بروز و پیشرفت سرطان پوست مشخص گردد. از بین آن‌ها ژن‌های زیر به عنوان مثال و با توجه به مقالات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی آورده شده است. جایگاه ساتیوژنتیک ژن (Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor2 ROR2) در رت 17p14 می‌باشد که این ژن در انسان در مکان 9q22.31 قرار دارد و در تومورهای زیادی از جمله نوئید بازال سل کارسینوما سندریم و همراه با ژن PTCH عمل می‌کند (۸). ژن دیگری که در این ناحیه تغییر یافته قرار دارد ژن patched homolog 1 (PTCH1 (Drosophila)) است که این ژن در انسان در مکان 9q22.32 قرار دارد. از نام‌های مستعار این ژن می‌توان به NBCCS و BCNS اشاره کرد. این ژن یک تومور ساپرسور ژن می‌باشد و جهش در این ژن سرکوبگر تومور موجب پیشرفت و توسعه بازال سل کارسینوما پراکنده در پوست می‌شود (۹). یکی از ژن‌های مهم در انواع سرطان پوست می‌باشد که حذف و هرگونه اختلال در عملکرد آن در روند تومورزایی موثر است و در انواع سرطان پوست از جمله نوئید بازال سل کارسینوما سندریم (۱۰، ۱۱) نقش دارد، لذا تغییرات سیتوژنتیکی مشاهده شده در این پژوهش تأکیدکننده نتایج به دست آمده در مقالات فوق است.

حذف در قطعه کروموزومی (q34;q52) 1 del مورد دیگری است. حذف 1q34;q52 از سلول‌های سرطانی القاء شده با DMBA مشاهده گردید. این ناحیه تقریباً معادل p15 و (q11;q12) کروموزوم ۱۱ و نیز با ناحیه دیستال کروموزوم شماره ۱۰ انسان نیز همولوژی دارد. این محدوده‌ها به ترتیب حدود ۲۶۹ و ۳۵۳ و در کروموزوم ۱۰ حدود ۶۹ ژن دارد که از این مجموعه تعدادی به عنوان

ژن‌های سرطانی در مقالات مختلف نام برده شده است. از جمله ژن *v-Ha-ras Harvey rat sarcoma HRAS* (viral cognate homolog) که در ناحیه 1P41 موش صحرایی قرار دارد این ژن در ناحیه q34 کروموزوم ۱۱ انسانی تعیین محل شده است و یک انکوژن و متعلق به گروه فامیلی ژن‌های RAS می‌باشد که جزء ژن‌هایی است که در تغییر شکل ژن‌های رتروویروس‌های سارکوما‌ی پستانداران نقش دارد. محصولات آنی که توسط این ژن‌ها می‌شوند نقشی در سیگنال‌های مسیر انتقالی دارند. این ژن‌ها می‌توانند به GTP و GDP متصل شوند و خاصیت ذاتی *GTPase* دارند (۱۲، ۱۳) این ژن در ۴۰ درصد از سرطان‌های روده (۱۴) و در سرطان تیروئید (۱۵) نقش دارد. هم‌چنین ژن *(Cathepsin D)* یکی دیگر از ژن‌های به دست آمده از مطالعات انجام شده می‌باشد که از ژن‌های ناحیه 1P41 در رت می‌باشد و این ژن در انسان در ناحیه 11p15.5 قرار دارد و اسید پرتنازهای فعال در داخل سلول را غیر فعال کرده و ممکن است در بیماری‌های متعددی از جمله سرطان پستان و احتمالاً در آلزایمر نیز درگیر باشد (۱۶) این ژن در سرطان پستان و در متاستاز آن به پوست نقش دارد (۱۷). ژن دیگری که در این ناحیه از نظر سرطانی اهمیت دارد ژن *(cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1C 1p41 p57Kip2)* می‌باشد که در مکان سیتوژنتیکی 1P41 موش صحرایی و در انسان در ناحیه 11p15.5 مکان یابی شده است و یک ژن سرکوبگر تومور است و به عنوان بازدارنده چرخه‌های متعدد *g1* / کمپلکس *CDK* (چرخه *E-CDK2* و *D2-CDK4* و چرخه *A-CDK2*) و به مقدار کمتر در چرخه میتوزی *B-CDC2* عمل می‌کند. یکی از نام‌های مستعار این ژن *p57KIP2* می‌باشد. در ناحیه که این ژن وجود دارد دو ژن *(IGF-II)* و *H19* نیز موجود است که به نظر می‌آید در نئوپلاسم فوق کلیوی درگیر باشند. با آنالیز بیان تومورسارپرسور ژن متداول *p57KIP2* به وسیله نرتن بلات در سلول‌های نرمال و هایپرپلازی شده فوق کلیوی و تومور فوق کلیوی مشخص گردیده است که

بیان mRNA ژن *p57KIP2* در بافت فوق کلیوی به وسیله *H19* افزایش و ژن *IGF-II* اثر منفی بر روی بیان آن دارد. دو ژن *p57KIP2* و *H19* در بافت نرمال به فروانی بیان می‌شوند ولی بیان آن‌ها در بافت تومورال فوق کلیوی بسیار پایین است (۱۸). ژن مهم دیگری که در این ناحیه مستقر است ژن *(protein kinase C, delta binding PRKCDBP)* (protein) می‌باشد که با استناد به مطالعات انجام شده در رت در ناحیه 1P33 و در انسان در ناحیه 11p15.4 مکان یابی شده است. یک ژن سرکوبگر تومور می‌باشد. بیان پایین این ژن در سلول پستان، ریه و تخمدان در نتیجه یک هایپرمتیلاسیون در ناحیه‌ی پروموتور ژن می‌باشد (۱۹) و اثر حذف یا بیان پایین در اثر متیلاسیون پروموتور این ژن در سرطان ریه (۱۹، ۲۰) و سرطان پستان (۱۹) به وضوح مشخص شده است از دیگر ژن‌های این ناحیه که ژن سارپرسور متاستاز کاندید می‌باشد ژن *CD81* (*CD81 molecule*) است که مانند ژن قبل در همان مکان سیتوژنتیکی قرار دارد این ژن در مقالات مختلفی با نام *KAI1* به کار برده شده است. بیان پایین این ژن در سرطان‌های مختلف سیستم ریوی و دستگاه تناسلی و ملانوم می‌تواند یکی از عوامل متاستاز باشد (۲۱). هم‌چنین حذف و یا کاهش این ژن در اثر تغییراتی که در یک سلول سرطانی رخ می‌دهد، در متاستاز و توسعه سرطان کبد شایان ذکر است (۲۲). ژن *DKK3* (*dickkopf homolog 3 Xenopus laevis*) نیز از نظر سرطان اهمیت دارد. این ژن در ناحیه 1q33 رت و در انسان در مکان 11p15.3 قرار دارد و با نام *REIC* در مقالات ذکر شده است و بیان پایین این ژن در سرطان سلول‌های کبدی و دیگر سرطان‌ها و احتمالاً به عنوان ژن سرکوبگر تومور عمل می‌کند (۲۳). در سرطان ریه ژن *Wnt/beta-catenin* در یک مسیر انکوژنی نقش فعال کننده دارد و ژن *DKK3* در این مسیر یک نقش بازدارندگی برای ژن *Wnt/beta-catenin* را ایفا می‌کند و در نتیجه هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن *DKK3* بیان آن به شدت در تومورهای ریه کاهش می‌یابد. هم‌چنین حذف این ژن در

سرطان ریه منجر به پیشبرد مسیر آنکوژنی فوق و در نتیجه سرطانی شدن سلول ریه می‌شود (۲۴). از دیگر ژن‌های سرکوبگر تومور در این ناحیه تغییر یافته ژن BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) می‌باشد. این ژن در انسان از نظر سیتوژنتیکی در مکان 11q13.1 قرار دارد و از متاستاز ممانعت می‌کند و در پستان نقش اساسی را ایفا می‌کند (۲۵) و ناهنجاری‌ها در این ژن در سرطان تخمدان (۲۶) و هم‌چنین در ملانوم به عنوان یک تومور یا متاستاز ساپرسور عمل می‌کند (۲۷). این ناحیه کروموزومی دارای تعداد زیادی از ژن‌های مهم در بروز و پیشرفت سرطان است که بر نقش موثر این قطعه کروموزومی در سرطان‌ها تأکید دارد. در این ناحیه هم‌چنین ژن CST6 (cystatin E/M) به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور عمل می‌کند و در جلوگیری از شکل‌گیری یا توسعه سرطان موثر می‌باشد و در همان مکان سیتوژنتیکی ژن قبل قرار دارد بیان کم این ژن که می‌تواند با متیلاسیون یا حذف شدگی در انواع مختلف سرطان پستان مداخله نماید (۲۸).

از آنجایی که حداقل شش ژن سرکوبگر در ناحیه 1del(q34;q52) موجود است، از طرفی ژن‌های سرکوبگر توموری (TSG) در هنگامی که دچار حذف شدگی شده باشند، موجب ظهور و پیشرفت تومورها می‌گردند هم‌چنین وجود این تعداد ژن سرکوبگر شناخته شده در ناحیه‌ای که در ناهنجاری‌های گزارش شده در پژوهش حاضر، دچار حذف شدگی شده است، تأکیدی به دخالت مؤثر این قطعه کروموزومی در بروز و پیشرفت سرطان پوست دارد، لذا می‌تواند حاوی ژن‌های مهم کاندید باشد که برای بررسی بیشتر، توسط روش‌های مولکولی مورد مطالعه دقیق‌تر واقع شود.

حذف در بازوی کروموزومی (4del (q12;q22) مورد بعدی است. در کروموزوم ۴ ناحیه (q12;q22) در سلول‌های توموری رت مورد مطالعه دیده شد که این ناحیه تشابه توالی با دو ناحیه از کروموزوم ۷ انسانی را نشان

می‌دهد که عبارت از (q21.12;q22.1) و (q31.31;q36.1) می‌باشند. این نواحی به ترتیب حدود ۱۹۰ و ۳۴۹ ژن است و براساس مطالعه مقالات مختلف ژن Factor 1) DMTF1 در رت در ناحیه 4q13 و در انسان در ناحیه 7q21.12 قرار دارد و با نام اختصاری DMP1 نیز شناخته می‌شود. این ژن به وسیله ژن Ras-Raf signaling و از طریق عملکرد ژن p53-dependent Arf، توقف چرخه سلولی را القاء می‌کند. از دست رفتن هتروزیگوسیتی در ژن DMP1 تقریباً در ۳۵ درصد از سرطان‌های ریه در انسان مشهود است این ژن یک سرکوبگر تومور موثر در سرطان ریه در انسان و موش می‌باشد (۲۹). ژن 2 (caspase 2) CASP2 (apoptosis-related cysteine peptidase) نیز در محدوده تغییرات کروموزومی یاد شده واقع شده است. این ژن در آپوپتوز نقش دارد و در سرطان ملانوم موثر است (۳۰). وجود ژن سرکوبگر تومور و ژن موثر در آپوپتوز در ناحیه حذف شده می‌تواند موید صحت حذف ایجاد شده در این ناحیه باشد.

تغییر بعدی مشاهده شده در سلول‌های سرطانی متافازی اضافه شدگی در بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۵ می‌باشد (اضافه شدگی بازوی کروموزومی +15q) توالی بازوی بلند کروموزوم ۱۵ با بخش مرکزی بازوی بلند کروموزوم 13(q13.2;q32) انسان تشابه دارد. این ناحیه حدود ۳۲۵ ژن دارد. با توجه به مقالات بررسی شده بیان ژن TNFSF11 (tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11) در سرطان پستان (۳۱) و هم‌چنین افزایش بیان آن با تهاجم و پیشرفت سرطان پرستات بدخیم مرتبط می‌باشد (۳۲). این اضافه شدگی به کروموزوم ۱۵ می‌تواند منجر به افزایش بیان یک ژن در شرایط داخل سلولی گردد. ژن RB1 (RetinoBlastoma 1) در سرطان‌های مختلفی از جمله تخمدان (۳۳) نقش دارد. ژن کاندید دیگر ATP7B (ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide) بیان زیاد این ژن در سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سلول‌های

زیادی انجام گرفته است. این امکان وجود دارد که ناحیه وسیعی که دچار حذف شدگی شده و توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به ژن‌های خاصی می‌باشد نیز دچار فزونی بابتی ژنی شده باشد.

مشاهده دیگر حذف در بازوی کروموزومی 10del (q23-q31) می‌باشد. این ناحیه با قسمت وسیعی از طول بازوی بلند و بازوی کوچک کروموزوم ۱۷ یعنی به طور تقریب (p13;p11.2)، (q11; q12) و (q21.32;q23.1) انسانی همولوژی دارد. این نواحی به ترتیب دارای حدود ۲۰۱ و ۱۴۰ ژن است. در این ناحیه می‌توان ژن NF1 (neurofibromin 1) را به عنوان کاندیدای دخیل در سرطان معرفی نمود این ژن در رت در ناحیه 10q25 و در انسان نیز در مکان سیتوژنتیکی 17q11.2 قرار دارد. این ژن محرک فعالیت GTPase ژن RAS می‌باشد و در سرطان وراثتی neurofibromatosis به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور نقش موثر دارد. از طرفی در تمام کسانی که جهش در این ژن را دارند تومور اعصاب محیطی به آرامی توسعه می‌یابد (۴۰)، لذا حذف در ناحیه q23;q31 کروموزوم ۱۰ موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان پوست می‌تواند توجه‌کننده‌ی ژن سرکوبگر توموری مهمی در این ناحیه باشد.

حذف در بازوی کروموزومی 15p- از دیگر مشاهدات فوق است. ۱۳ قطعه مختلف این بازو بر روی پنج کروموزوم مختلف انسانی (۳، ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۴) قرار می‌گیرد. لذا به دلیل پراکندگی قطعات هومولوگ بر روی کروموزوم‌های انسانی و هم‌چنین کوچک بودن این قطعات، امکان مقایسه توالی بخش‌های هومولوگ بین رت و انسان وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

در تغییرات کروموزومی مشاهده شده در موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان پوست، بیش از ۲۰۴۲ ژن در نواحی مختلف و بر روی کروموزوم‌های متاثر شده از

سنگفرشی دهانی در متاستاز و روند رو به رشد سلول‌های سرطانی دخیل می‌باشد (۳۴). ژن دیگر OLFM4 (OlfactoMedin 4) می‌باشد و به میزان زیاد در سلول‌های سرطانی بیان می‌شود و یک روش تشخیصی مناسبی برای سرطان بوده و در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان ریه و روده نقش موثر دارد (۳۵). از آنجائی که تغییر مشاهده شده بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۵ نیز اضافه شدگی ماده وراثتی را نشان می‌دهد، لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این ژن‌ها نیز از جمله ژن‌های هدف بر روی کروموزوم‌های موش صحرایی دارای سرطان بوده است و زیاد شدن نسخه برداری از این ژن در سرطان پوست انسانی نیز می‌تواند مؤید دخالت این ژن در بروز و پیشرفت سرطان در موش‌های تحت آزمایش باشد. این امر می‌تواند مثالی برای وجود ژن‌ها و مکانیسم‌های پیچیده مشترک دیگری نیز بین موش صحرایی مبتلا و سرطان پوست در انسان باشد.

مورد بعدی حذف در ناحیه del(q24-q32) کروموزوم ۸ 8del(q24-q32) که معادل بخش میانی بازوی کوتاه و هم‌چنین قسمت میانی بازوی بلند کروموزوم ۳ در انسان می‌باشد. این نواحی حدود ۱۳۴ ژن دارد. ژن‌های زیر با توجه به مقالات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی آورده شده است. ژن protein inhibitor of activated STAT, 1) PIAS1 گزارش شده است که این ژن به عنوان یک E3-type SUMO ligase برای ژن سرکوبگر تومور p53 خدمت می‌کند و احتمال می‌رود که دومین N - ترمینی این ژن به خوبی p53 با DNA واکنش برقرار سازد (۳۶). کاهش بیان این ژن به همراه ژن SRC1 در روند شکل‌گیری سرطان پرستات دخیل می‌باشد (۳۷). حذف صورت گرفته در کاهش بیان ژن موثر است. بیان ژن (mitogen-activated protein kinase kinase 5) MAP2K5 در سرطان پرستات بدخیم افزایش می‌یابد (۳۸) و در سرطان پستان نیز افزایش داشته است (۳۹). ناحیه‌ای که ما تشخیص داده‌ایم دچار حذف ماده وراثتی شده، ژن مذکور دچار افزایش بیان شده است یعنی از این ژن نسخه برداری

حوریه داود زاده، سرکار خانم محمودی و آقای فراهانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Shojaie Tehrani H. [Epidemiology of acute noncontiguous and contiguous diseases]. Tehran: Samat; 2007. p.153.
2. Cotran R, Kummur V, Robbins S, Robbins Martin S, Greenberg J. *Burket's Oral Medicine*. 10th ed. Philadelphia: J B Lippincott; 2003. P. 195.
3. Rooney De editor. *Human cytogenesis: constitutional analysis*. 3rd ed. London: Oxford; 2001. P. 11-28.
4. 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.
5. Carner K. Basal and squamous cell carcinoma. *Prim care* 2000; 27: 447-58.
6. Sehested M, Hou-Jensen K. Factor VIII-related antigen as an endothelial cell marker in benign and malignant diseases. *Virchows Arch Pathol Anat*:1981; 391:217-25.
7. Al-Dhaheri Wafa S, Imam H, Al-Salam S, Karam Sherif M. Characterization of breast cancer progression in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1138 (1): 121-31.
8. Ivieri C, Maraschio P, Caselli D, Martini C, Beluffi G, Maserati E, Danesino C. Interstitial deletion of chromosome 9, int del(9)(9q22.31-q31.2), including the genes causing multiple basal cell nevus syndrome and Robinow/Brachydactyly 1 syndrome. *Eur J Pediatr* 2003; 162(2): 100-3.
9. Ratner D, Peacocke M, Zhang H, Ping XL, Tsou HC. UV-specific p53 and PTCH mutations in sporadic basal cell carcinoma of sun-exposed skin. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44(2): 293-7.
10. Minami M, Urano Y, Ishigami T, Tsuda, H, Kusaka J, Arase S. Germline mutations of the

تغییرات ساختاری مختلف مانند ۱، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۵، ۱۰ و ۱۷ مشاهده گردید. در هر ناحیه با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی ژن‌های سرطانی که در سرطان‌های مختلف انسانی دخالت آنها در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است، آورده شد. در بین این ژن‌ها، ژن‌های زیادی به عنوان ژن‌های سرکوبگر توموری مانند CST6، BRMS1، DKK3، PTCH1، PRKCDBP، CDKN2B و DMP1، CD81، CDKN1C، ژن‌های انکوژن مانند HRAS، EEF1A1 و هم‌چنین ژن‌های موثر در آپوپتوز شامل CASP2 وجود داشت که با توجه به ماهیت عملکردی این ژن‌ها و تغییرات ساختاری مشاهده شده در کروموزوم‌های درگیر در ایجاد سرطان پوست در موش صحرائی، مطابقت زیادی با کروموزوم و ژن‌های انسانی مشاهده می‌شود. این امر نشان از وجود مسیرهای ژنتیکی مشترک در بروز سرطان پوست در رت و انسان دارد لذا به احتمال بسیار قوی، تعداد زیادی از ژن‌های موجود در تغییرات کروموزومی که همولوژی آنها در انسان تایید شده است از جمله ژن‌هایی می‌باشند که با عمل متقابل بر یکدیگر و با دخالت در مکانیسم‌های مختلف در تبدیل سلول‌های نرمال به سلول‌های سرطانی نقش مؤثر و کلیدی داشته باشند. از این رو این گروه از ژن‌ها می‌توانند به عنوان ژن‌های هدف در تغییرات کروموزومی مشاهده شده عمل کرده باشند و یا ژن‌های دیگری در این قطعات کروموزومی مستقر می‌باشند که عملکرد آنها شناخته نشده است. چنانچه بسیاری از ژن‌های این نواحی هنوز به صورت کد نامگذاری شده‌اند و تحقیقات آینده نقش و عملکرد آنها را روشن خواهد ساخت.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک برای کمک مالی به این تحقیق تشکر می‌گردد. هم‌چنین از سرکار خانم فرح طالب بیگی، سرکار خانم

- PTCH gene in Japanese patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dermatol Sci* 2001; 27(1): 21-6.
11. Lü Y, Zhu HG, Ye WM, Zhang MB, He D, Chen WT. A new mutation of PTCH gene in a Chinese family with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Chin Med J* 2008; 121(2): 118-21.
12. Williams JG, Pappu K, Campbell SL. Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2003; 100: 6376-6381.
13. Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem* 1997; 272: 4323-4326.
14. Salbe C, Trevisiol C, Ferruzzi E, Mancuso T, Nascimbeni R, Di Fabio F, Salerni B, Dittadi R. Molecular detection of codon 12 K-RAS mutations in circulating DNA from serum of colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers* 2000; 15(4): 300-7.
15. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco, C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6): 2745-52.
16. Redecker B, Grosch HW, Hasilik A. Molecular organization of the human cathepsin D gene. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 423-431.
17. Inoue H, Kawada A, Takasu H, Maruyama R, Hata Y, Hiruma M, Tajima S, Ishibashi A. Cathepsin D expression in skin metastasis of breast cancer. *J Cutan Pathol* 1998; 25(7): 365-9.
18. Liu J, Kahri AI, Heikkilä P, Voutilainen R. Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II and H19 in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6): 1766-71.
19. Xu XL, Wu LC, Du F, Davis A, Peyton M, Tomizawa Y, Maitra A, Tomlinson G, Gazdar AF, Weissman BE, Bowcock AM, Bazer R, Minna JD. Inactivation of human SRBC located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region in breast and lung cancers *Cancer Res*. 2001; 61(21): 7943-9.
20. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Geradts J, Xu X, Seidl S, End-Pfützenreuter A, Lang G, Heller G, Zielinski CC, Gazdar AF, Minna JD. Expression of the candidate tumor suppressor gene hSRBC is frequently lost in primary lung cancers with and without DNA methylation. *Oncogene* 2005; 24(41): 6249-55.
21. White A, Lamb PW, Barrett JC. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene* 1998; 16(24): 3143-9.
22. Inoue G, Horiike N, Onji M. The CD81 expression in liver in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2001; 7(1): 67-71.
23. Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, Namba M. A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268(1): 20-4.
24. Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, Zhang L. Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* 2000; 29(1): 84-92.
25. Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131(3): 91-8.
26. Zhang S, Lin QD, DI W. Suppression of human ovarian carcinoma metastasis by the metastasis-suppressor gene BRMS1. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(2): 522-31.
27. Shevde LA, Samant RS, Goldberg SF, Sikaneta T, Alessandrini A, Donahue HJ, Mauger DT, Welch DR. Suppression of human melanoma metastasis by the metastasis suppressor gene, BRMS1. *Exp Cell Res* 2000; 273(2): 229-39.
28. Ai L, Kim WJ, Kim TY, Fields CR, Massoll NA, Robertson KD, Brown KD. Epigenetic silencing of the tumor suppressor cystatin M occurs during breast cancer progression. *Cancer Res* 2000 66(16): 7899-909.

29. Mallakin A, Sugiyama T, Taneja P, Matisse LA, Frazier DP, Choudhary M, Hawkins GA, D'Agostino RB Jr, Willingham MC, Inoue K. Mutually exclusive inactivation of DMP1 and ARF/p53 in lung cancer. *Cancer Cell* 2007; 12(4): 381-94.
30. Zanon M, Piris A, Bersani I, Vegetti C, Molla A, Scarito A, Anichini A. Apoptosis protease activator protein-1 expression is dispensable for response of human melanoma cells to distinct proapoptotic agents. *Cancer Res* 2004; 64(20): 7386-94.
31. Park HR, Min SK, Cho HD, Kim DH, Shin HS, Park YE. Expression of osteoprotegerin and RANK ligand in breast cancer bone metastasis. *J Korean Med Sci* 2003; 18(4): 541-6.
32. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 2006; 107(2): 289-98.
33. Todd MC, Sclafani RA, Langan TA. Ovarian cancer cells that coexpress endogenous Rb and p16 are insensitive to overexpression of functional p16 protein. *Oncogene* 2000; 19(2): 258-64.
34. Miyashita H, Nitta Y, Mori S, Kanzaki A, Nakayama K, Terada K, Sugiyama T, Kawamura H, Sato A, Morikawa H, Motegi K, Takebayashi Y. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a chemoresistance marker in human oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin. *Oral Oncol* 2003; 39(2): 157-62.
35. Koshida S, Kobayashi D, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N. Specific overexpression of OLFM4 (GW112/HGC-1) mRNA in colon, breast and lung cancer tissues detected using quantitative analysis. *Cancer Sci* 2007; 98(3): 315-20.
36. Okubo S, Hara F, Tsuchida Y, Shimotakahara S, Suzuki S, Hatanaka H, Yokoyama S, Tanaka H, Yasuda H, Shindo H. NMR structure of the N-terminal domain of SUMO ligase Pias1 and its 39-interaction with tumor suppressor p53 and A/T-rich DNA oligomers. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31455-61.
37. Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Jänne OA, Tammela TL, Vessella RL, Palvimo JJ, Visakorpi T. Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(3): 1032-40.
38. Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, Leung HY. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 2004; 22(9): 1381-9.
39. Song H, Jin X, Lin J. Stat3 upregulates MEK5 expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 2004; 23(50): 8301-9.
40. Rutkowski JL, Wu K, Gutmann DH, Boyer PJ, Legius E. Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 2000; 9(7): 1059-66.

Determination of chromosomal changes in DMBA-induced skin cancer in SD rat strains

Shariatzadeh SMA¹, Hamta A², Soleimani Mehranjani M³, Rasooli Z⁴

1- Professor, Embryologist, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

2- Assistant Professor, Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

3- Associated Professor, Embryologist, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

4- MSc. of Developmental Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran.

Received 15 Jul, 2009 Accepted 2 Sep, 2009

Abstract

Background: Skin cancer is one of the most important cancers in the world. This cancer is more common in men than women. We survey chromosomal changes in DMBA-induced skin cancer in SD rat strains.

Methods and Materials: In this fundamental study, 20 SD rat strains were randomly divided into case and control group. DMBA (2.5 mg) was injected to SD rat strains subcutaneously; therefore skin cancer model for studies was created. Tumors became subjects for cell culture and metaphase chromosomal were prepared. Finally G-banding were stained. We have also transmitted genomic information from rat to human using suitable databases and Gene were determined.

Results: Data showed numerical and frequent structural changes in different number of chromosomes. For example; gain in chromosomes number 1, 15, 17 and loss in 1, 7, 15, and also structural changes like deletion was seen in chromosomes number 1, 4, 8, 10, 15, 17, and addition in chromosome number 15.

Discussion: It is predicted that CST6 ,PRKCDBP ,PTCH1 ,DKK3 , ,BRMS1 ,CDKN1C ,CD81 , DMP1 ,CDKN2B ,EEF1A1 , HRAS ,CASP2 ,KLF4 probably cause skin cancer.

Key words: DMBA, Skin Cancer, SD Rat Strain

*Corresponding author;

Email: a-hamta@araku.ac.ir

Address: Department of biology, faculty of basic sciences, Arak University, Sardasht, Arak, Iran