

معرفی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های کاندید در بروز سرطان پستان به روش مطالعه‌ی سیتوژنتیکی سرطان القایی

دکتر احمد همتا^۱، دکتر سید محمدعلی شریعت‌زاده^۲، دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی^۳، فاطمه سیفی^۴

نویسنده‌ی مسئول: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست‌شناسی a-hamta@araku.ac.ir

دریافت: ۸۷/۹/۱ پذیرش: ۸۹/۱۰/۷

چکیده

مقدمه: کشف تغییرات کروموزومی که در تشکیل سلول‌های نئوپلاستیک و تومورهای بدخیم دخالت دارد یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیقات در سرطان‌شناسی می‌باشد. در این تحقیق به مطالعه سرطان پستان ایجاد شده در موش‌های نژاد SD پرداخته شد و با روش‌های بیوانفورماتیک نواحی مشابه آن‌ها در کروموزوم‌های انسان مورد شناسایی و پیشنهاد قرار گرفت.

روش‌ها بررسی: در این پژوهش از موش صحرایی نژاد SD به عنوان مدل حیوانی جهت القای سرطان پستان استفاده گردید که طی آن ۱۰ میلی‌گرم از ماده کارسینوژنیک DMBA به رت‌های تحت تیمارخورانده شد. بعد از انجام روش هیستوپاتولوژی و ایمنوهایستوشیمی بر روی تومورها، اقدام به کشت سلول و تهیه کروموزوم‌های متافازی شد. بعد از رنگ آمیزی، GTG سلول‌های سرطانی با ایدئوگرام رت مقایسه گردید. بر اساس چگونگی تغییرات و محل آن‌ها و با کمک پایگاه‌های اطلاعاتی، لیستی از ژن‌ها و همچنین نقش احتمالی آن‌ها را با توجه به روش مقایسه‌ی ژنومیک بین موش صحرایی و انسان مورد مطالعه قرار گرفت. با مطالعه کروموزوم‌های متافازی، بیشترین و مشترک‌ترین تغییرات کروموزومی اتفاق افتاده در بین مجموعه‌های کروموزومی ثبت گردید.

نتایج: تغییرات کروموزومی ایجاد شده طیف وسیعی از ناهنجاری‌های عدی و ساختاری را شامل می‌گردید و به‌طور واضح، کروموزوم‌های شماره ۳، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۷ دچار افزایش و کروموزوم‌های شماره ۳، ۹، ۱۲ و ۱۵ دچار گم‌شدگی در تعداد کروموزوم‌ها گردیده بودند. علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف شدگی در کروموزوم‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۲۰ همچنین اضافه شدگی در کروموزوم‌های ۱۱، ۱۵ و ۱۹ به‌طور غیر اتفاقی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با استفاده از روش‌های مقایسه‌ی ژنومیک و مطالعه مقالات علمی در ارتباط با ژن‌های مستقر در نواحی کروموزومی تغییر یافته، پیشنهاد می‌گردد که ژن‌های ABO, ZFX3, RRM2B, CXAD, LCP1, HPR, CALB2, UBR5, HACE1, TGFBR, PRKD1, FOXA1, PRDM1, REG3A, EPSTI1, TNFSF1, ABL1 احتمالاً می‌توانند از جمله مهم‌ترین ژن‌ها در بروز سرطان پستان در مدل ایجاد شده باشند، لذا این گروه از ژن‌ها و ژن‌های مرتبط با آن‌ها برای مطالعات بیشتر و دقیق‌تر توصیه می‌گردند.

واژگان کلیدی: رت نژاد SD، DMBA، سرطان پستان، نواربندی گیمسا

مقدمه

می‌گردد و از اهداف اصلی در مطالعات سیتوژنتیک مولکولی است (۱). با وجود انجام درمان‌های تهاجمی وسیع و

بازآرایی کروموزومی، مسوول بخش عظیمی از جهش‌هایی است که منجر به بی‌نظمی در عملکرد ژن‌ها

۲- دکترای تخصصی جین‌شناسی و بافت‌شناسی، استاد دانشگاه اراک

۴- کارشناس ارشد سلولی تکوینی، دانشگاه اراک

۱- دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، استادیار دانشگاه اراک

۳- دکترای تخصصی جین‌شناسی و بافت‌شناسی، دانشیار دانشگاه اراک

تلاش‌های زیاد برای غربالگری مبتلایان به سرطان پستان، هنوز سرطان پستان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در کشورهای پیشرفته دنیا می‌باشد (۲). با توجه به گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی، سرطان پستان رتبه‌ی اول را در بین زنان ایران داشته است (۳). مکانیسم‌ها و تغییر رفتارهای ژنی بسیاری برای تبدیل سلول‌های طبیعی اپیتلیال به سلول‌های سرطانی کارسینومایی مورد نیاز می‌باشد. شناسایی آن‌ها در سطح کروموزومی می‌تواند در یافتن ژن‌های احتمالی در بروز و پیشرفت سرطان مربوطه بسیار نقش مهمی داشته باشد. انتخاب مدل حیوانی مناسب به دلیل زمینه‌های ژنتیکی مشابه تاثیر به سزایی در حذف تفاوت‌های ژنتیکی مبتلایان به یک بیماری پیچیده‌ی ژنتیکی مانند سرطان خواهد داشت. DMBA (7,12-Dimethyl Benz[α]Anthracene) نوعی هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای و سنتتیک می‌باشد و در واقع، نوعی کارسینوژن آزمایشگاهی ویژه است که به‌طور گسترده در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی برای مطالعه‌ی سرطان به‌کار می‌رود (۴). در این تحقیق با استفاده از DMBA در رت‌های نژاد SD ایجاد سرطان پستان گردید. تغییرات کروموزومی ایجاد شده در رت‌های مبتلا، مورد بررسی قرار گرفت و نواحی مشابه آن‌ها در انسان بازیابی و به عنوان ژن‌های کاندید با توانایی و احتمال دخالت زیاد برای مطالعات دقیق‌تر ارایه شد.

روش بررسی

رت‌های ماده‌ی بالغ از نژاد SD با میانگین وزنی 150 ± 10 گرم) از موسسه‌ی سرم سازی رازی خریداری شد. قبل از شروع آزمایش، جهت سازگاری حیوانات با محیط، آن‌ها به مدت یک هفته و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه‌ی حرارت 22 ± 3 درجه‌ی سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌ها در اتاق حیوانات نگهداری شد. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای

انستیتوی بین المللی سلامت انجام شد. حیوانات به‌طور اتفاقی به ۲ گروه تقسیم شدند که سپس نشانه‌گذاری شده، به گروه اول ($n=10$) به عنوان گروه کنترل ۰/۵ سی‌سی روغن کنجد به صورت گاواژ دهانی داده شد. به گروه دوم ($n=10$) به عنوان گروه تیمار محلول حاوی ۱۰ میلی گرم DMBA که در ۰/۵ سی‌سی روغن کنجد حل گردیده بود، گاواژ داده شد. این دارو ۲ بار در طول ۲ هفته‌ی متوالی، در روز و ساعت مشخص به حیوان خورانده شد. رت‌ها هر روز از نظر ایجاد تومور مورد بازرسی و کنترل قرار می‌گرفتند.

تشریح رت‌ها و برداشت تومور: پس از پایان دوره‌ی تیمار (رسیدن تومور به اندازه‌ی مطلوب) در هر یک از رت‌های گروه تیمار، حیوانات توسط دی‌اتیل اتر بیهوش شدند، ناحیه‌ی اطراف تومور تراشیده، پس از شکافتن ناحیه‌ی اطراف تومور و در شرایط استریل تومور به‌طور کامل خارج گردید. ۱/۳ تومور حاصل برای مطالعات ایمنوهِستوشیمی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و ۲/۳ آن برای کشت سلول استفاده شد. در تمامی موارد کار با حیوانات، موازین اخلاقی در کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

مطالعات پاتولوژیکی و ایمنوهِستوشیمی (IHC):

تومور به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد رار داده شد. تومورها با استفاده از دستگاه اتوماتیک (اتوتکنیکوم مدل Leica Histokinette) مورد پاساژ بافتی قرار گرفتند و پس از آن از نمونه‌ها برش‌هایی با ضخامت ۳ میکرون تهیه گردید و سپس رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی با استفاده از ایوزین و همتوکسین (E&H) انجام شد. در این پژوهش از دو آنتی‌بادی خریداری شده از شرکت (Dako Denmark A/s) (Dako [ER (Estrogen Receptor) (Clone 1D5 Code N1529) PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Clone pc10 Code N1529)]) استفاده گردید.

حاوی کروموزوم‌های متافازی به‌وسیله‌ی 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 (National Center for Biotechnology Information) شد. توالی‌های به‌دست 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 به‌دست آمده از موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان، به قطعات کروموزومی انسانی متناظرشان منتقل گردید. سپس با استفاده از همان پایگاه اطلاعاتی و همچنین Genecart اقدام به تهیه‌ی لیست ژن‌های موجود در نواحی مربوطه نمودیم که به‌عنوان ژن‌های پیش فرض برای بررسی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

مشاهدات ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژیکی تومورهای

الفایی: پس از حدود ۱۲ هفته اولین نشانه‌های تومور در رت‌ها مشاهده شد و در هفته‌ی سیزدهم، هنگامی که تومورها به اندازه‌ی یک نخود شده بودند، حیوان توسط اتر بیهوش شده، بافت‌های توموری خارج شدند و از آن‌ها جهت پژوهش حاضر استفاده گردید. برش‌های تهیه شده از بافت‌های طبیعی و توموری توسط روش هیستوپاتولوژی مورد مطالعه قرار گرفت، که همگی با توجه به خصوصیات مرفولوژیکی بافتی مؤید بافت تومورال بدخیم بودند. همانطور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود، مجراها و لوبول‌ها به صورت جزایری در بافت چربی قرار دارند و در شکل ۱-ب فضاهای غدد مانند تغییر شکل یافته‌ای دیده می‌شود، که به‌وسیله‌ی سلول‌های اپیتلیال توموری در یک ردیف قرار گرفته‌اند و تمایل به تمایز غده‌ای بافت توموری را دارند و هر

مراحل انجام این تکنیک با توجه به دستور العمل شرکت سازنده‌ی آنتی بادی انجام گرفت.

کشت و تهیه‌ی سلول از بافت و جمع‌آوری سلول‌ها (Harvest): تمامی مراحل ذکر شده در زیر، با رعایت شرایط استریل و در زیر هود لامینار انجام پذیرفت. تومورها از رت خارج و به ۱۰ سی‌سی از محیط HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) داخل فالكون، منتقل شد و پس از خرد کردن و ریز کردن قطعات بافت محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد FBS منتقل شد. برای افزایش کروموزم‌های متافازی در محیط کشت یا Mitotic Index حدود ۴۰٪ از محلول کلشی سین استاندارد به محیط کشت داخل فلاسک اضافه شد و به‌مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت سپس سلول‌ها به محلول ۰/۰۷۵ M KCl اضافه گردید و ۴۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی برداشته شد و روی رسوب، فیکساتیو کارنوی (۱ قسمت اسیداستیک و ۳ قسمت متانول) اضافه شد و سپس سانتریفوژ گردید. بعد از ۳ بار شستشو با فیکساتیو، مقداری از فیکساتیو را بر رسوب باقی گذاشته، رسوب در فیکساتیو حل گردید و بر روی لام چکانده شد. جهت رنگ آمیزی ابتدا لام‌ها را درون تریپسین ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه قرار داده، سپس جهت شستشو به ظرف حاوی بافر سرد PBS (Phosphate Buffered Saline) منتقل شد و سپس در محلول رنگ گیمسای 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 گرفتند.

جمع‌آوری اطلاعات و بررسی بیوانفورماتیکی داده‌ها: با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX41 از مجموعه‌های کروموزومی دارای شرایط مطلوب برای مطالعات بعدی عکس گرفته شد. سپس عکس‌های

دو نشانه‌های تشخیصی آدنوکارسینوما می‌باشد. در شکل ۱-ج، سلول‌های توموری نشان دهنده‌ی هستک‌های بزرگ و برجسته و الگوی کروماتینی وزیکولی می‌باشند. نتایج پاتولوژیکی نشان داد، تومورهای مورد مطالعه تمایز یافته و به صورت دستجات نامنظم سلول‌های توموری و حالت کپه‌ای قرار داشته، اندازه‌ی سلول‌ها تقریباً یکنواخت بود و تمایز به سمت تشکیل غدد فراوان و پیشرفته را داشتند.

نتایج حاصل از مطالعات ایمنوهیستوشیمی (IHC) توسط آنتی بادی‌های ER و PCNA: در این مطالعه، عملکرد برخی از این ژن‌ها با اثربخشی آنتی‌بادی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آزمون‌های ایمنوهیستوشیمی آن‌ها بدین شرح بود. در شکل ۲، برهمکنش آنتی بادی ER با بافت نرمال و تومورال پستان رت از طریق مطالعات ایمنوهیستوشیمی نشان داده شده است. چنانچه شکل ۲-الف نشان می‌دهد، سلول‌های طبیعی در نمونه‌های مورد مطالعه، واکنش ضعیفی با آنتی‌بادی ER نشان داده‌اند، بنابراین بافت نرمال برای گیرنده‌های این آنتی‌بادی مثبت بوده، ولی در مقایسه با بافت تومورال بسیار ضعیف است. شکل ۲-ب نشان می‌دهد که برش سلول‌های مجرای تومورال در پستان موش‌های تیمار شده با آنتی‌بادی ER واکنش مثبت شدیدی داشته است که پیکان‌ها به هسته‌های مثبت اشاره دارند. شکل ۳-الف نشان می‌دهد که واکنش سلول‌های طبیعی به دست آمده از موش‌های کنترل با آنتی‌بادی PCNA مثبت بسیار ضعیف بوده، تعدادی از سلول‌ها رنگ پذیری کمی را دارند. نتیجه‌ی استفاده از آنتی‌بادی PCNA بر روی بافت تومورال در شکل ۳-ب نشان داده شده است، چنانچه مشاهده می‌شود، واکنش سلول‌های اپی‌تلیال توموری با PCNA مثبت بوده، هسته‌ها رنگ‌پذیری شدید و پراکنده‌ای را نشان می‌دهند.

مطالعات سیتوژنتیکی: تغییرات کروموزومی در تومورهای در حال رشد مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل‌های

کروموزومی بر روی اسلایدهای حاوی کروموزوم‌های متافازی تهیه شده از تومورهای القایی کشت داده شده، با استفاده از روش G-Binding انجام گرفت. بسیاری از دسته‌های کروموزومی در مجموعه‌های سلولی مختلف و به طور مکرر و غیر اتفاقی دچار تغییرات عددی و یا ساختمانی شده بودند. تغییرات سیتوژنتیکی حاصل در مجموعه‌ی کروموزوم‌های سرطانی رت‌های تیمار شده با DMBA به طور خلاصه در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه، ۲۲۹ مجموعه‌ی کروموزومی متافازی که دارای ویژگی‌های مطلوب، از جمله: عدم روی هم افتادگی کروموزومی که گاهی منجر به عدم تشخیص دقیق ناهنجاری‌های کروموزومی می‌گردد، عدم نزدیکی پخش‌های کروموزوم‌های متافازی با یکدیگر و داشتن نواربندی کروموزومی واضح و مشخص، مورد بررسی سیتوژنتیکی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که، عدد کروموزومی سلول‌های مطالعه شده در سه مدل کروموزومی قرار گرفت، از این میان ۹۵ عدد در مدل کروموزومی دیپلوئیدی و ۳۴ عدد در مدل کروموزومی ترپلوئیدی و ۱۰۰ عدد نیز در مدل کروموزومی تراپلوئیدی قرار داشت. این تغییرات عددی نشان می‌دهند که توده‌های سلولی سرطانی تمایل به افزایش عدد کروموزومی به سوی تراپلوئیدی را دارند، چنانچه حدود ۴۴ درصد سلول‌ها دارای چنین مدل کروموزومی بودند. تغییرات کروموزومی ایجاد شده طیف وسیعی از ناهنجاری‌های ساختاری را نیز شامل می‌گردید و به طور واضح، کروموزوم‌های شماره ۳، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۷ دچار افزایش (Gain) و کروموزوم‌های شماره ۳، ۹، ۱۲ و ۱۵ دچار کم شدگی (Loss) در تعداد کروموزوم‌ها گردیده بودند (جدول ۱). علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف شدگی در کروموزوم‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۶، ۷ و ۲۰ و همچنین اضافه شدگی در کروموزوم‌های ۱۱، ۱۵ و ۱۹ به طور غیر اتفاقی مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات کروموزومی مشاهده شده در تومورهای حاصل از القای سرطان در موش‌های صحرایی نژاد SD و مقایسه‌ی نواحی متناظر آن‌ها در کروموزوم‌های انسانی

ردیف	تعداد ژن‌ها در انسان افزایش	همولوژی در انسان	امپنیفیکاسیون	انحرافات عددی		تغییرات ساختاری	تعداد سلول مطالعه شده N=71	عدد کروموزومی	
				افزایش	کاهش			مدل	طیف
								۳۵-۴۸	دیپلوئید
۱		قطعات پراکنده بر روی کروموزوم‌های ۱۶ و ۱۰	HSR(16)(q12)			19q+	۱۶		
۲	۱۸۵	1(p22.3;p11.1)	HSR(10)(q26-q31)	۳	۱۲	Del2(q32-q42)	۳۳		
۳	۲۳۷ ۱۰۴	9(q33.2;qter) 13(q13-q32)			۹/۳	3(-p),15(+q)	۲۲		
۴							N=81	۵۰-۷۵	تریپلوئید
۵	۹۸ ۱۱۷	6(q21;q22.32) 2(p13.3;p11.1)		۱۲	۴	Del(4)(q33-q41) Del(20)(q1-q13)	۱۸		
۶							N=68	۷۸-۸۸	تتراپلوئید
۷	۱۷۱ ۱۲۱	14(q11.2;q21.2) 14(q22.2;q24.1)		۴	۱۵	Del(6)(q21-32)	۲۵		
۸	۱۳۰	8(q22.2;qter)				Del(7)(q22-32)	۹		

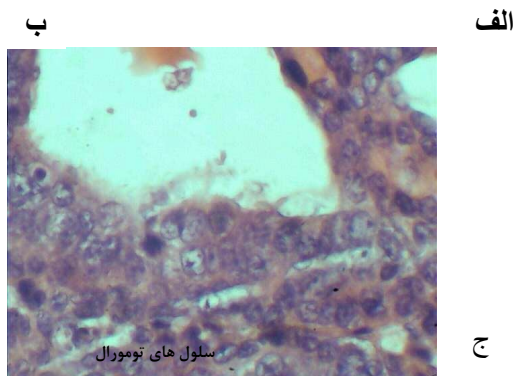
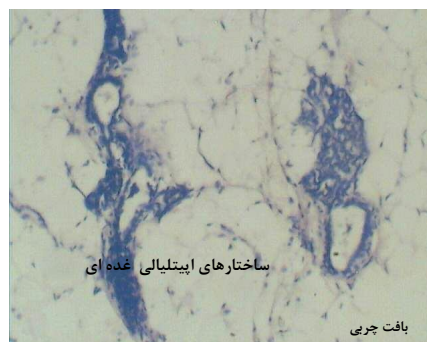
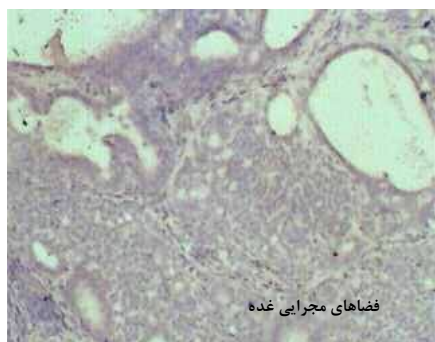
بحث

در این مطالعه دو آنتی‌بادی برای روش ایمونوهیستوشیمی به‌کاربرده شد. آنتی‌بادی ER (Estrogen Reseptor) پروتئین ER دایمری با وزن مولکولی ۶۵ کیلودالتون است که به عنوان عناصر گیرنده‌ی هورمونی شناخته شده است. در طول مدت اتصال استروژن، ER تحریک رونویسی ژنی را القا کرده از این رو به عنوان فاکتور Enhancer القایی شناخته شده است و رشد تومور پستانی را در میان تکثیر سلولی وابسته به ER افزایش می‌دهد (۵). درحقیقت این آنتی‌بادی در هر دو بافت نرمال و تومورال با آنتی ژن مربوطه واکنش نشان می‌دهد (۶). در این تحقیق نیز آنتی ژن مورد نظر در نمونه‌ی نرمال بافت پستانی رت به این آنتی‌بادی پاسخ ضعیفی داده که نشانه‌ی وجود مقدار کمی از آنتی ژن مربوطه در سلول‌های نرمال می‌باشد. اما در برش‌های تهیه شده از نمونه‌های سرطانی با شدت زیادی به این آنتی‌بادی پاسخ داده است، که نشانه‌ی وجود مقدار زیادی از آنتی ژن‌های مربوطه در سلول‌های سرطانی می‌باشد (شکل ۱). آنتی‌بادی

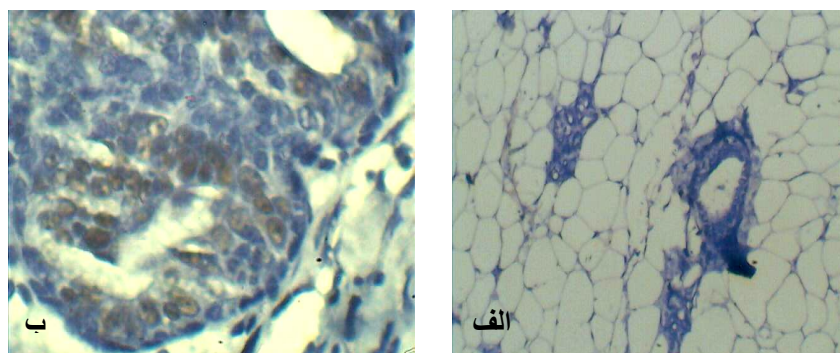
بخش‌های HSR که از نظر سیتوژنتیکی نشانه‌ای از فزون‌یابی ژن (هایی) در آن ناحیه می‌باشد، بر روی کروموزوم‌های شماره ۱۰ و ۱۶ سلول‌های متافازی مطالعه شده رویت گردید (جدول ۱). با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی اقدام به مقایسه‌ی توالی‌های نواحی آسیب دیده در کروموزوم‌های موش صحرایی مبتلا به سرطان پستان با توالی‌های ژنوم انسان (BLAST) شد و مکان‌های سیتوژنتیکی آن‌ها در کروموزوم‌های انسانی (جدول ۱) و همچنین ژن‌های مستقر در آن‌ها نیز مشخص گردید. بر طبق اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI تا زمان انجام این تحقیق حدود ۲۳۷ ژن در این قطعه‌ی کروموزومی وجود داشت که دارای عملکردی مشخص و معین می‌باشند. با بررسی‌های انجام شده در سایت‌های معرفی کننده ژن‌های سرطانی مانند (Atlas Cytogenetic) مشخص گردید که، از بین ۱۶۹۰ ژن یافت شده در نواحی تغییر یافته، تعداد ۳۲۰ (۱۹ درصد) آن‌ها به عنوان ژن‌های سرطانی به ثبت رسیده‌اند، لذا آن‌ها نیز می‌توانند به لیست ژن‌های کاندید اضافه گردند.

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigene) پروتئینی با وزن مولکولی ۳۶ کیلودالتون به عنوان سایکلین، پلی پپتید درون هسته‌ای تعریف شده است. این پروتئین توسط سلول‌های در حال تقسیم بیان شده، حداکثر سنتز آن در طول فاز S چرخه‌ی سلولی می‌باشد. PCNA فاکتوری ضروری در همانندسازی بوده، در شروع و پیشرفت چرخه‌ی سلولی دخالت می‌نماید (۷). طبق گزارشات به دست آمده نسبت سلول‌های تومورال نوع بدخیم نشاندار شده، نسبت به نوع خوش خیم بیشتر می‌باشد و این آنتی‌بادی ابزار بسیار خوبی برای طبقه‌بندی انواع تومورها می‌باشد (۸). این آنتی‌بادی وضعیت تهاجمی بودن یا نبودن سلول‌های توموری را نشان می‌دهد، که به عنوان شاخص تکثیر سلولی در نظر گرفته می‌شود (۹). نتایج ایمونوهیستوشیمی با این آنتی‌بادی نشان داد که هسته‌ها در بافت تومورال رنگ پذیری شدید

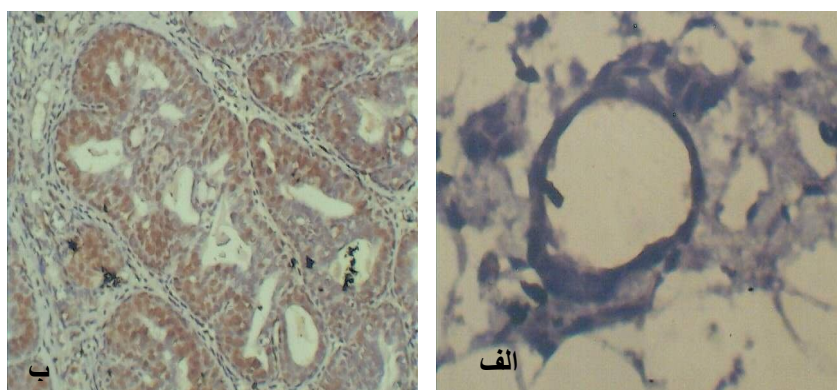
و پراکنده‌ای را دارند که نشانه‌ی رشد و نمو زیاد سلول‌های توموری بود. بیان این آنتی ژن در سلول‌های نرمال به مقدار کم انجام می‌گیرد و در واکنش با آنتی‌بادی PCNA واکنش مثبت ضعیفی را نشان می‌دهد ولی این آنتی ژن در سلول‌های توموری بیان ژنی زیادی داشته، که این موضوع نشان دهنده‌ی رشد و تکثیر زیاد سلولی می‌باشد. این ویژگی در شکل ۳- الف مربوط به تومور در مقایسه با شکل ۳- ب مربوط به بافت کنترل نیز مشاهده می‌گردد. مثبت بودن PCNA در نمونه‌های توموری استفاده شده در این تحقیق نشان دهنده‌ی رشد و تمایز کافی تومورها بود، همچنین بیان شدید PCNA در سلول‌های توموری نشان دهنده‌ی سنتز شدید DNA در سلول بوده که منتج به این نتیجه‌گیری می‌شود، که سلول‌های سرطانی در حال رشد و تقسیم سلولی شدید بودند.



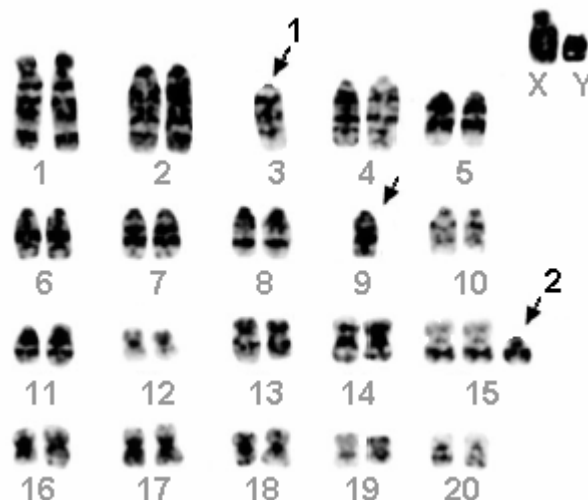
شکل ۱: الف) برشی که از بافت طبیعی پستان با بزرگنمایی ۱۰۰x با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ایزون تهیه شده است. (ب) برشی از بافت توموری پستان با بزرگنمایی ۱۰۰x، با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ایزون قابل مشاهده است. (ج) برشی از بافت توموری پستان با بزرگنمایی ۴۰۰x در رنگ آمیزی هماتوکسیلین ایزون دیده می‌شود



شکل ۲. (الف) بافت طبیعی پستان را با بزرگنمایی $\times 100$ در حضور آنتی بادی ER و رنگزای DAB نشان می دهد. (ب) سلول های تومورال از بافت مجرای پستان با بزرگنمایی $\times 200$ در رنگ آمیزی با حضور آنتی بادی ER و رنگزای DAB می باشد. فلش ها نشان دهنده هسته ی سلول های مثبت هستند.



شکل ۳. (الف) سلول های اپیتلیال مجرای در بافت پستان نرمال با بزرگنمایی $\times 100$ در رنگ آمیزی با حضور آنتی بادی PCNA و رنگزای DAB نشان داده شده است. (ب) سلول های اپیتلیال ساختارهای مجرای در بافت پستان تومورال با بزرگنمایی $\times 100$ در رنگ آمیزی با حضور آنتی بادی PCNA و رنگزای DAB دیده می شود.



شکل ۴: کاریوگرام یک سلول متافازی، در سرطان پستان القای شده توسط DMBA در موش های صحرایی نژاد SD نشان داده شده است. این تومور منوزومی کروموزوم ۳، همچنین افزایش بازوی بلند کروموزوم ۱۵ (فلش ۲)، حذف بازوی کوتاه کروموزوم ۳ (فلش ۱) و منوزومی کروموزوم ۹ (فلش RNO9) را نشان می دهد.

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 می‌آید. دلیل بسیار مهم دیگر آنکه، 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 پستانی در انسان دارد، لذا از نظر تیوریکی نیز باید از لحاظ مکانیسم‌های ژنتیکی مسبب به وجود آمدن تومور نیز شباهت‌های زیادی با مکانیسم‌های مشابه در انسان داشته باشد. نتایج به دست آمده نشان داد که، عدد کروموزومی سلول‌های مطالعه شده در سه مدل کروموزومی قرار گرفت، که ۷۱ عدد در مدل کروموزومی دیپلوئیدی و ۱۸ عدد در مدل کروموزومی ترپلوئیدی و ۶۸ عدد نیز در مدل کروموزومی تراپلوئیدی قرار داشت. این تغییرات عددی نشان می‌دهند که توده‌های سلولی سرطانی تمایل به افزایش عدد کروموزومی به سوی تراپلوئیدی را دارند، چنانچه حدود ۴۳ درصد سلول‌ها دارای چنین مدل کروموزومی می‌باشند.

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 بررسی مقالات به دست آمده از پایگاه‌های اینترنتی، 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 ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد. **اضافه شدگی در بازوی بلند کروموزوم 19:** اولین تغییر مشاهده شده افزایش در بازوی بلند کروموزوم ۱۹ در رت‌های تحت تیمار با DMBA بود، که این تغییر در رت، با قطعات پراکنده‌ای از کروموزوم‌های شماره ۱، ۴، ۱۰، ۱۶ و ۱۹ انسانی همولوژی داشت و در حقیقت بزرگترین قطعه‌ی آن بر روی کروموزوم ۱۶ بخش q22.2-qter انسان قرار دارد و تا زمان انجام این پژوهش دارای حدود ۲۶۱ 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 پستان مشخص گردد. ژن‌هایی که در ادامه ذکر می‌گردد با توجه به مقالات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی آورده شده است. ژن CALB2 (Calbindin 2) در رت و انسان به ترتیب دارای جایگاه سیتوژنتیک 19q12 و 16q22.3 می‌باشد. ژن مذکور یک انکوژن است که در سرطان‌های مختلفی نظیر روده‌ی بزرگ دخیل می‌باشد (۱۰)، از آنجایی که ناحیه‌ی سیتوژنتیکی این ژن بر روی کروموزوم ۱۹ رت نیز دچار افزایش گردیده است، لذا می‌تواند نقش مؤثری نیز در بروز سرطان در رت‌های مورد مطالعه داشته باشد. ژن HPR (Haptoglobin-Related Protein) ژن دیگری است که در این ناحیه تغییر یافته قرار دارد، که به ترتیب در محدوده‌هایی همانند ژن فوق در انسان و رت، جای دارد، که این انکوژن در سرطان‌های اولیه و متاستاتیک پستان در انسان اهمیت دارد، بیان HPR پتانسیل بدخیمی بودن تومور را افزایش می‌دهد (۱۱). ژن ZFH3 (Zinc Finger Homeobox 3) همانند ژن‌های ذکر شده در بالا در محدوده‌های فوق واقع شده است که با نام اختصاری ATBF1 شناخته شده، طبق مطالعات انجام شده در سرطان‌های پستان (۱۲) و گوارش

دهانی، کاهش می‌یابد (۱۶)، از آنجایی که در یافته‌های ما نیز ناحیه‌ی استقرار این ژن دچار حذف‌شدگی شده بود، ژن ABO می‌تواند در بروز و پیشرفت سرطان پستانی نیز مؤثر باشد و به‌عنوان یکی از ژن‌های هدف، مورد نظر قرار گیرد. در محدوده‌ی حذف شده‌ی کروموزوم ۳ ژن ABL1 نیز قرار گرفته است. جایگاه سیتوژنتیکی آن در رت، 3p12 و در انسان 9q34.12 است و از جمله وظایف این ژن، دخالت در تنظیمات رونویسی در مرحله‌ی میتوز چرخه‌ی سلولی می‌باشد و دخالت این ژن در سرطان‌هایی مثل پستان (۱۷)، پروستات (۱۸) و کارسینومای سلول‌های فلسی دهانی (۱۹)، به اثبات رسیده است.

اضافه شدگی در بازوی بلند کروموزوم ۱۵: این قطعه‌ی کروموزومی با ناحیه q13-q32 کروموزوم ۱۳ انسانی دارای توالی نوکلئوتیدی مشابهی می‌باشد. این محدوده ۱۰۴ ژن دارد که از این مجموعه تعدادی به‌عنوان ژن‌های سرطانی در مقالات مختلف از آن‌ها نام برده شده است. ژن TNFSF11 (Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily Member 11) که محل سیتوژنتیکی آن در رت 15q11 است، و در تمایز سلولی نقش دارد، جایگاه سیتوژنتیک آن در انسان 13q14.11 بوده، در سرطان متاستاتیک پستان به مغز استخوان (۲۰) و همچنین بیان این ژن در سرطان پروستات افزایش می‌یابد (۲۱). ژن EPST1 (Epithelial Stromal Interaction 1 (Breast)) نیز در مکان سیتوژنتیکی، نظیر ژن فوق قرار دارد که مقالاتی در رابطه با دخالت این ژن و نقش فزونی‌یابی آن در سرطان پستان به‌وسیله‌ی القا توسط برهم کنش بافت اپیتلیال استرومایی (۲۲) وجود دارد. از آنجایی که تغییر مشاهده شده بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۵ نیز اضافه شدگی ماده‌ی وراثتی را نشان می‌دهد، لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد، که این ژن نیز از جمله ژن‌های هدف بر روی کروموزوم‌های موش صحرایی دارای سرطان بوده است و زیاد شدن

(۱۳) دچار فزونی‌یابی شده است و به دلیل این که این ناحیه در مطالعات ما نیز در محدوده‌ی اضافه شدگی واقع شده است، انتظار می‌رود که با این تغییر، بیان ژن‌های دخیل در این نواحی افزایش یابد و لذا تغییرات سیتوژنتیکی مشاهده شده در این پژوهش تأکیدکننده‌ی نتایج به‌دست آمده در مقالات فوق می‌باشد.

حذف در قطعه‌ی (2(q32-42): این ناحیه معادل بخش پروکسیمال بازوی کوچک کروموزوم ۱ انسانی (p22.3-q11) می‌باشد. ناحیه‌ای که ۱۸۵ ژن دارد و در میان آن‌ها ژن زیر که در فرایند سرطان دخالت دارد، به‌عنوان مثال ذکر می‌گردد. ژن TGFB3 دارای مکان کروموزومی 1p22.1 در انسان است که نقش سرکوب‌گر تومور در سرطان پستان دارد (۱۴). لازم به ذکر است، که وجود یک سرکوب‌گر تومور دیگر در ناحیه‌ای که در موش‌های سرطانی حذف‌شدگی را نشان می‌دهد، تأکید بیشتری بر این دارد که این تغییرات ساختمانی مشاهده شده در کروموزوم‌های متافازی اتفاقی نبوده، بلکه براساس الگوی منظم و براساس نیاز سلول‌های سرطانی به حذف برخی از ژن‌ها و یا افزایش برخی دیگر از ژن‌ها تغییر یافته است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد، که مطالعه‌ی سیتوژنتیکی سلول‌های سرطانی در به‌دست آوردن اطلاعات لازم از چگونگی تغییرات ژنومیک نقش مفید و مؤثری دارد.

حذف در بازوی کوچک کروموزوم ۳: در انسان با بخش دیستال بازوی بلند کروموزوم ۹ که در واقع همان بخش q33.2-qter است، همولوگ می‌باشد. در این محدوده حدود ۲۳۷ ژن وجود دارد، که از بین این ژن‌ها، ژن‌هایی که وظیفه‌ی اصلی آن‌ها در بروز سرطان‌های مختلف در مقالات ذکر گردیده است اشاره می‌شود. ژن ABO: جایگاه سیتوژنتیکی این ژن بر روی کروموزوم ۳ رت قطعه‌ی p13 و در انسان 9q34.2 می‌باشد. برطبق جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی، بیان این ژن در سرطان‌هایی مانند مثانه (۱۵) و تومورهای

نسخه‌برداری از این ژن هم در سرطان پستانی انسانی نیز می‌تواند مؤید دخالت این ژن در بروز و پیشرفت سرطان در موش‌های تحت تیمار باشد. همچنین ژن LCP1 (Lymphocyte Cytosolic Protein 1 (L-Plastin)) در مکان سیتوژنتیکی همانند ژن‌های فوق قرار دارد این ژن، یک انکوژن می‌باشد و در بروز، القا، تکثیر و تهاجمی بودن سرطان روده (۲۳) نقش دارد و در سرطان تخمدان (۲۴) و ملانوم (۲۵) هم مؤثر می‌باشد. تغییرات این ژن به‌صورت فزون‌یابی در سرطان‌های مختلف بوده است، لذا باتوجه به این که ناحیه‌ای از این ژن که در رت وجود دارد نیز دچار اضافه شدگی شده است، لذا این احتمال تقویت می‌گردد، که این ژن در بروز سرطان پستان در موش‌های صحرایی نیز دخالت داشته باشد و بنابراین به‌عنوان ژن هدف می‌تواند انتخاب گردد.

حذف در جایگاه کروموزومی (4(q33-41): این قطعه‌ی کروموزومی معادل بخش پروکسیمال بازوی کوچک کروموزوم ۲ انسانی (p13.3-11.1) می‌باشد و حدود ۱۱۷ ژن مختلف را در خود جای داده است، که به حضور برخی از ژن‌های مسبب سرطان در این ناحیه اشاره می‌گردد. از جمله ژن‌های دخیل در سرطان در این ناحیه REG3A است که این ژن در جایگاه 2p12 انسانی و 4q33-34 رت واقع شده، و در تکثیر سلولی نقش دارد و در سرطان گوارشی در مراحل اولیه (۲۶) عمل می‌کند. کاهش بیان این ژن در مقالات مختلف، می‌تواند مؤید انتخابی حذف شدن این قطعه‌ی کروموزومی در کروموزوم‌های سلول‌های سرطانی باشد.

حذف در محدوده‌ی کروموزومی (20(q12-13): از جمله تغییر کروموزومی دیگری که در سلول‌های متافازی مشاهده گردید، حذف در ناحیه‌ی q12-qter کروموزوم ۲۰ رت بود که معادل بخش میانی بازوی بلند کروموزوم ۶ انسانی (q21-q22.33) می‌باشد. ۹۸ ژن مشخص در این قطعه کروموزومی وجود دارد که در زیر به برخی از ژن‌های

مؤثر در بروز سرطان‌های مختلف براساس مقالات بررسی شده، اشاره می‌گردد. ژن HACE1 در مکان سیتوژنتیکی 6q21 انسانی قرار دارد، که در رت در جایگاه کروموزومی 20q13 مستقر است، در سرطان‌های مختلف نقش سرکوب‌گر تومور را دارد (۲۷). بنابراین، حذف در این ناحیه در موش صحرایی هم نشان‌دهنده‌ی حذف کامل این ژن سرکوب‌گر توموری و یا ژن‌های الگو با عملکرد مشابه می‌تواند باشد. ژن بعدی که در رت و انسان در همین نواحی واقع شده است PRDM1 (PR Domain Containing 1, with ZNF Domain) نام دارد، و نقش تنظیمی در رونویسی از پروموتور RNAPolII دارد، و در سرطان خون (۲۸) نقش دارد.

حذف در قطعه‌ی کروموزومی (6(q21-32): حذف شدگی در ناحیه‌ی 21-32 کروموزوم ۶ رت، یک ناهنجاری کروموزومی بوده که در بین سلول‌های تتراپلوئید مطالعه شده مشاهده گردیده است و معادل دو قطعه‌ی کروموزومی q21.2; q11.2; و q24.1; q22.2 بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۴ انسانی می‌باشد. این دو ناحیه به ترتیب ۱۷۱ و ۱۲۱ ژن با عملکرد مشخص دارند. برطبق مقالات بررسی شده، برای محدوده‌ی اول ۲ ژن در ارتباط با سرطان معرفی شده است و برای محدوده‌ی دوم نیز، ژنی مطابق با این تغییر گزارش نشده است. ژن PRKD1 (Protein Kinase D1) در رت و انسان به ترتیب دارای جایگاه سیتوژنتیکی 6q22 و 14q12 می‌باشد و در تکثیر سلولی نقش مهمی داشته، همچنین نقش مؤثری در بروز سرطان پروستات وابسته به آندروژن دارد (۲۹). همچنین ژن FOXA1 (Forkhead Box A1) در محل کروموزومی 14q21.1 در انسان قرار دارد و در رت نیز در کروموزوم 6q23-24 واقع شده است و با نام مستعار HNF3A نیز شناخته می‌شود. از آنجا که رسپتورهای آندروژنی در تکوین و پیشرفت سرطان پروستات نقش دارد، این ژن در سرطان پروستات، عملکرد رسپتورهای آندروژنی را مهار می‌کند (۳۰)

مختلف و بر روی کروموزوم‌های مختلف مانند ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۱۱، ۱۵، ۱۹ و ۲۰ 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 به‌عنوان ژن‌های سرکوب‌گر توموری مانند UBR5، HACE1، TGFBR3 و ژن‌های انکوژن مانند LCP1، HPR، CALB2 و RRM2B و همچنین ژن‌های ABO، ZFH3، TNFSF11، PRKD1، FOXA1، EPSTI1، PRDM1، REG3A، ABL1 نیز به‌عنوان ژن‌های دخالت کننده و موثر در سرطان‌های مختلف معرفی گردیدند. لذا، با توجه به ماهیت عملکردی این ژن‌ها و تغییرات ساختاری مشاهده شده در کروموزوم‌های درگیر در شکل‌گیری سرطان پستان در موش صحرایی همخوانی بسیار شگفت‌انگیزی مشاهده می‌گردد، که نشان از وجود مکانیسم‌های ژنتیکی مشترک در بروز سرطان پستان در رت و انسان دارد که مطالعه بر روی رت‌ها به‌علت تشابه ژنتیکی اعضای تشکیل دهنده گروه‌های تیمار و کنترل موجب می‌گردد تا پیچیدگی‌های ژنتیکی غالب بر بروز سرطان تا حدودی ساده گردند. برخی از پایگاه‌های اطلاعاتی مشخصات و ویژگی‌های ژن‌های دخیل در سرطان‌های مختلف را ارائه داده‌اند (مانند Cytogenetic Atlas). لذا با مقایسه و جستجو در این سایت‌ها ژن‌های مستقر در نواحی کروموزومی حاصل از این تحقیق مشخص گردید که از مجموع حدود ۱۶۹۰ ژن مستقر در کروموزوم‌های انسانی کاندید برای دخالت در بروز سرطان پستان، تعداد ۳۲۰ (۱۹ درصد) به‌عنوان ژن سرطانی نامگذاری شده است، که جهت تحقیقات دقیق‌تر می‌توانند به‌کار برده شوند و به احتمال بسیار قوی، تعداد زیادی از آن‌ها از جمله ژن‌هایی خواهند بود، که با همکاری با یکدیگر و دخالت در تشکیل مکانیسم‌های مختلف در تبدیل سلول‌های نرمال به سلول‌های توموری، نقش مؤثر و

حذف شدگی در محدوده ی (q22-33): حذف در ناحیه ی q22-q33 کروموزوم ۷ موش صحرایی که معادل بخش q22.2-qter کروموزوم ۸ انسانی می‌باشد، نیز در بین مجموعه‌های کروموزومی تتراپلوئید مشاهده گردید. این قطعه دارای حدود ۱۳۰ ژن می‌باشد. در این ناحیه می‌توان از ژن RRM2B (Ribonucleotide Reductase M2 B (TP53 Inducible)) نام برد. ژنی که به ترتیب در محل‌های کروموزومی 8q22.3 و 7q22 در انسان و رت قرار دارد و در کاهش اکسیداتیو و همانندسازی و تعمیر DNA فعالیت می‌نماید. سطح بیان این ژن در سلول‌های سرطانی می‌تواند به‌عنوان مارکری برای پیش‌بینی پتانسیل بدخیمی باشد (۳۱). یک دسته از ژن‌هایی که در بروز سرطان دخیل می‌باشد، ژن‌های مؤثر در ترمیم DNA می‌باشد، لذا وجود ژن RRM2B در محدوده ی تغییر یافته کروموزومی می‌تواند، نشانه ی مؤثر بودن این ژن در سرطان پستان القا شده در موش‌های صحرایی نژاد SD باشد، بنابراین احتمالاً به‌عنوان ژن هدف در این ناحیه، دچار تغییر شده است. ژن Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 5 با نام اختصاری UBR5 نیز در تکثیر سلولی اثر داشته، جایگاه‌های آن در رت و انسان مطابق ژن فوق بوده، در سرطان‌های پستان و تخمدان (۳۲) به‌عنوان ژن سرکوب‌گر تومور عمل می‌نماید. وجود ژن سرکوب‌گر کننده ی توموری UBR5 در ناحیه ی q22-33 کروموزوم ۷ با حذف شدگی مشاهده شده در این کروموزوم مطابقت دارد، چرا که حذف آلل‌های این ژن می‌تواند در عدم کارکرد صحیح این ژن مؤثر بوده، لذا شرایط برای بروز تومور فراهم می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با استناد به مطالب ذکرشده پیرامون ژن‌های پیشنهادی دخیل در سرطان پستان می‌توان نتایج را به شکل زیر خلاصه نمود. در تغییرات کروموزومی مشاهده شده در موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان پستان، بیش از ۱۶۹۰ ژن در نواحی

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک جهت تامین هزینه‌های مالی این پژوهش و همچنین از آقای فراهانی به دلیل همکاری در بخش آزمایشگاهی طرح، تشکر و قدردانی می‌گردد.

کلیدی دارند، هرچند بررسی این ژن‌ها نیاز به، طراحی و اجرای پروژه‌های تحقیقی وسیعی دارد. همچنین بروز سرطان و تأثیر ژن‌های مختلف در بروز آن از پیچیدگی‌های بسیار زیادی برخوردار می‌باشد، ولی نتایج این پژوهش می‌تواند در گشودن برخی از این رازها در آینده کمک کننده باشد، چرا که شناسایی دقیق ژن‌های دخیل در بروز سرطان در درمان‌های قطعی‌تر و مؤثرتر در آینده تأثیر زیادی خواهد داشت.

References

- 1- Calasanz MJ, Cigudosa JC. Molecular cytogenetics in translational oncology: when chromosomes meet genomics. *Clin Transl Oncol*. 2008; 10: 20-29.
- 2- American Cancer Society. Breast cancer facts & figures. Atlanta, American Cancer Society Inc. 2007-2008.
- 3- Center of management of noncontiguous diseases. IRAN Ministry of Health and Medical Education. [Cancer Registry Report]. 2004: 20-55.
- 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; 63: 302-9.
- 5- Ueda M, Takagi H, Onodera H, et al. Enhancing effects of beta-estradiol 3-benzoate but not methoxychlor on the promotion/progression stage of chemically-induced mammary carcinogenesis in ovariectomized rats. *Jpn J Cancer Res*. 2002; 93: 752-9.
- 6- Ciocca DR, Vargas Roig LM. Estrogen receptors in human nontarget tissues: Biological and clinical implications. *Endocrine Reviews*. 1995; 16: 35.
- 7- Ogle TF, Dai D, George P, Mahesh VB. Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat. *Biol Reprod*. 1997; 57: 495-506.
- 8- Ma DF, Katoh R, Zhou H, Wang PY. Promoting effects of milk on the development of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in rats. *Acta Histochem Cytochem*. 2007; 40: 61-7.
- 9- Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*. 1990; 162: 285-94.
- 10- Vonlanthen S, Kawecki TJ, Betticher DC, Pfefferli M, Schwaller B. Heterozygosity of SNP513 in intron 9 of the human calretinin gene

(CALB2) is a risk factor for colon cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27: 79-88.

11- Shurbaji MS, Pasternack GR, Kuhajda FP. Expression of haptoglobin-related protein in primary and metastatic breast cancers. A longitudinal study of 48 fatal tumors. *Am J Clin Pathol.* 1991; 96: 238-42.

12- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. ATBF1-a messenger RNA expression is correlated with better prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 191-8.

13- Cho Y, Song JH, Kim CJ, et al. Genetic alterations of the ATBF1 gene in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 4355-9.

14- Dong M, How T, Kirkbride KC, et al. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2007; 117: 206-17.

15- Orntoft TF, Meldgaard P, Pedersen B, Wolf H. The blood group ABO gene transcript is down-regulated in human bladder tumors and growth-stimulated urothelial cell lines. *Cancer Res.* 1996; 56: 1031-36.

16- Gao S, Worm J, Guldberg P, et al. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004; 109: 230-7.

17- Srinivasan D, Sims JT, Plattner R. Aggressive breast cancer cells are dependent on activated Abl kinases for proliferation, anchorage-independent growth and survival. *Oncogene.* 2008; 27: 1095-105.

18- Davoodpour P, Landström M, Welsh M. Reduced tumor growth in vivo and increased c-Abl activity in PC3 prostate cancer cells overexpressing the *Shb* adapter protein. *BMC Cancer.* 2007; 7: 61-5.

19- Yanagawa T, Harada H, Iwasa S, et al. c-Abl expression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2000; 36: 89-94.

20- 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: 541-6.

21- Chen. G. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *J Korean Med Sci.* 2006; 107: 289-98.

22- Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Villadsen R., Petersen OW. Identification of EPSTI1, a novel gene induced by epithelial-stromal interaction in human breast cancer. *Genomics.* 2002; 79: 703-10.

23- Foran E, McWilliam P, Kelleher D, Croke DT, Long A. The leukocyte protein L-plastin induces proliferation, invasion and loss of E-cadherin expression in colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2006; 118: 2098-104.

24- Chung I, Schwartz PE, Crystal RG, Pizzorno G, Leavitt J, Deisseroth AB. Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Ther.* 1999; 6: 99-106.

- 25- Klemke M, Rafael MT, Wabnitz GH, et al. Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells. *Int J Cancer*. 2007; 120: 2590-9.
- 26- Choi B, Suh Y, Kim WH, Christa L, Park J, Bae CD. Downregulation of regenerating islet-derived 3 alpha (REG3A) in primary human gastric adenocarcinomas. *Exp Mol Med*. 2007; 39: 796-804.
- 27- Zhang L, Anglesio MS, O'Sullivan M, et al. The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers. *Nat Med*. 2007; 13: 1060-9.
- 28- Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, et al. Shipp MA, Dalla-Favera R. Inactivation of the PRDM/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006; 203: 311-7.
- 29- Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Hemstreet GP, Balaji KC. Protein kinase C mu is down-regulated in androgen-independent prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 307: 254-60.
- 30- Lee HJ, Hwang M, Chattopadhyay S, Choi HS, Lee K. Hepatocyte nuclear factor-3 alpha (HNF-3alpha) negatively regulates androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 367: 481-6.
- 31- Liu X. Metastasis-suppressing potential of ribonucleotide reductase small subunit p53R2 in human cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 6337-44.
- 32- Clancy JL, Henderson MJ, Russell AJ, et al. The human orthologue of the hyperplastic discs tumour suppressor gene, is amplified and overexpressed in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2003; 22: 5070-81.

Introduction and Bioinformatic's Evaluation of Candidate Genes in Breast Cancer Using Cytogenetic Studies of Cancer Induction

Hamta A¹, Shariatzadeh SMA², Soleimani M², Seifi F¹

¹Dept. of Biology Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

²Dept. of Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

Corresponding author: Hamta A, Dept. of Biology Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

Email: a-hamta@araku.ac.ir

Received: 22 Nov 2009

Accepted: 28 Dec 2010

Background and Objective: Discovery of genetic changes which contribute to cellular neoplastic and malignant tumor transformation is one of the major aims in oncology researches. The aim of this study was to investigate the DMBA-induced breast cancer in SD rat strains using bioinformatical methods and also to find their homologous regions in human chromosomes.

Materials and Methods: In this research, we used SD rat strains as a suitable model for DMBA-induced breast cancer. We gavaged the rats twice with 10 mg DMBA solved in 0.5 ml sesame oil. After tumors appeared in DMBA-treated rats, they were subjected to histopathology and immunohistochemistry studies, cell culture, metaphase chromosomal preparation, and finally G-banding stain. According to databases, we collected genes in the affected area and prepared a gene list by comparing genome of the rats and human in changed chromosomal segments.

Results: Our data showed numerical and frequent structural changes in different number of chromosomes. For example, we found recurrent gain in chromosomes 3, 4, 8, 12, 17, loss in chromosomes 3, 9, 12 and 15, also deletion in chromosomes 2, 3, 4, 6, 7, 20 and addition in chromosomes 11, 15 and 19.

Conclusion: According to these chromosomal changes and based on bioinformatics studies we predict that the genes *TGFBR3*, *HACE1*, *UBR5*, *CALB2*, *HPR*, *LCP1*, *RRM2B*, *ABO*, *ZFHX3*, *TNFSF11*, *ABL1*, *EPSTI1*, *PRDM1*, *REG3A*, *FOXA1* and *PRKD1*, probably may contribute to the development of breast cancer.

Keywords: *Breast cancer, SD rat, Chromosomal changes, G-banding*