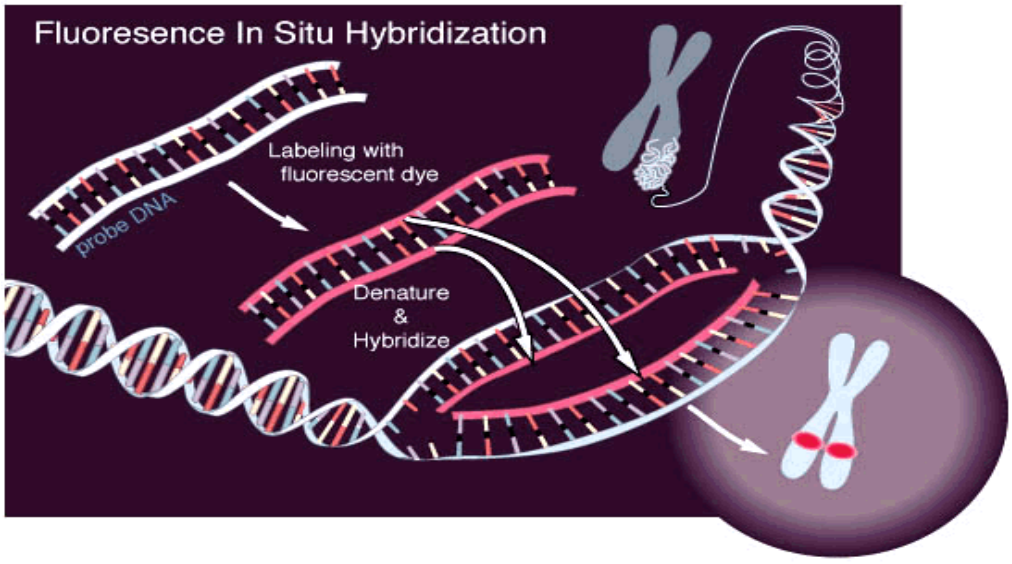
سرطان

و

آزمايشات مولكولي وسيتوژنتيك

تشخيص ناهنجاريهاي كروموزومي



به مناسبت همایش آشنایی با تکنیک FISH جهت دیاگنوز و پروگنوز سرطان

روابط عمومی آزمایشگاه مرکزی فردیس

۱۸ تیر ۱۳۸۸

تومور ، تکثیر غیر قابل کنترل سلول بخاطر اختلال ژنـی و کرومـوزومی است . این تکثیر بـی رویـه سـلولی چنانچـه دریـک محـل صـورت گیـرد ایجـاد " تومور" نموده و اگر به سایر ارگانها متاستاز یابد مبدل به " سرطان " می گردد . ایـن اخـتلالات ژنـی – کرومـوزومی در سـلول ، دو دسـته تغییـرات شمارشـی (بـه اشـکال Monosomy , Trisomy , Polysomy) و سـاختاری (بـه اشـکال Deletion , Translocation ,Inversion) را در کروموزوم ها ایجـاد نمـوده کـه متعاقبـا به ژنهای درون کروموزوم ها انتقـال یافتـه و قابلیـت تومـورزایی را درون سـلول هـا تکـوین می نماید . عوامـل سـرطانزا (Carcinogene) و شـکننده ژن (Clastogene) بـا نفـوذ در هسته سلول می توانند تغییرات و ناهنجاریهای مختلفی را در ژنوم و کروموزوم ایجاد نماینـد که خود منجر به تغییر در بیان ژنها گشته و باعث فعال شدن ژنهای سـرطانزا (Oncogene) و یـا غیـر فعـال شـدن ژنهـای سـرکوب کننـده سـرطان (Tumor Suppressor gene) می گردد و نهایتا به تولید تومور و سرطان می انجامد .

MOLECULAR CHANGES OF POTENTIAL USE IN TUMOR DIAGNOSIS

Molecular Marker	Examples
Microsatellite analysis	
LOH and MSI	Bladder cancer cytology
Oncogenes or TSGs mutations	
Ha-ras mutation	Bladder cancer cytology
Ki-ras mutation	Bronchopulmonary cytology
Oncogene translocations	
EWS-FLI-1 [t(11;22)]	Ewings sarcoma
EWS-ERG [t(21;22)]	Ewings sarcoma, pPNETS
PAX3-FKHR [t(2;13)]	Alveolar rhabdomyosarcoma
EWS-WT1 [t(11;22)]	Desmoplastic small round cell tumor
SYT-SSX [t(X;18)]	Synovial sarcoma
Oncogene expression	
Telomerase	Bladder cancer cytology
Detection of viral targets	
HPV	Endocervical neoplasia cytology

LOH, loss of heterozygosity
MSI, microsatellite instability
TSG, tumor suppressor gene
pPNETS, peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood

انواع ناهنجاریهای کروموزومی بطور کلی عبارتند از :

الف - ناهنجاریهای شمارشی (Numerical Aberration)

ب - ناهنجاریهای ساختاری (Structural Aberration)

در ادامه به شرح و تفصیل هریک از انواع ناهنجاریهای فوق می پردازیم .

- **ناهنجاریهای شمارشی در کروموزوم ها عبارتند از تغییر در شمارش و تعداد کروموزوم ها که به دو صورت بوجود می آید .**

۱- افزایش ضریب کروموزومی (Polyploidy) **که در انسان معمولا بصورت سه برابر شدن** (Triploidy) **و یا چهار برابر شدن ضریب کروموزوم ها** (Tetraploidy) **بوجود می آید و معمولا منجر به سقط جنین می گردد .**

۲- نقص شمارش کروموزومی (Anueploidy) **که در انسان بصورت سه کروموزومی**(Trisomy) **و تک کروموزومی** (Monosomy) **بوجود می آید و معمولا باعث ناقص الخلقه شدن نوزاد می گردد .**

- **ناهنجاریهای ساختاری در کروموزوم ها عبارتند از تغییر در ساختمان کروموزوم ها در اثر شکستگی که به دو صورت بوجود می آید .**

۱- شکستگی در کروموزوم ها و جابجایی قسمتی از یک کروموزوم به کروموزومی دیگر (Translocation)

۲- شکستگی در کروموزوم ها و حذف قسمتی از یک کروموزوم و از دست رفتن مواد ژنتیک (Deletion)

تغییرات ساختاری فوق نه تنها مواد ژنتیک را در کروموزوم ها تغییر مکان می دهند (تغییر در توالی اسید های نوکلئیک در کروموزوم) بلکه شکل ظاهری کروموزوم ها را نیز تحت تاثیر قرار می دهند و منجر به تولید کروموزوم حلقوی (Ring Chromosome) **، تکرار در توالی یک DNA یا قسمتی از کروموزوم** (Duplication) **، برعکس شدن توالی ژنها در کروموزوم** (Inversion) **و نیز تقسیم عرضی کروموزوم بجای تقسیم طبیعی طولی که کروموزومی با ساختار جدید بنام کروموزوم نیمه شبیه** (Isochromosome) **را بوجود می آورد، می گردند .**

مکانیسم تولید تومور (Tumorogenesis)

تغییرات شمارشی و ساختاری در ژنها و کروموزوم ها بصورت ترکیب دو ژن (Gene Fusion) **، تکثیر یک ژن خاص** (Gene Amplification) **و یا تغییر در ساختار کلی توالی DNA موجود در ژن** (Mutation) **منجر به تغییرات دربیان ژن**

(Gene Expression) و به تبع آن فعال کردن ژنهای سرطانزا (Oncogene) و یا غیرفعال کردن ژنهای سرکوب کننده سرطان (Tumor Suppressor Gene) می گردد .فعال شدن ژنهای سرطانزا و یا غیر فعال شدن ژنهای سرکوب کننده سرطان منجر به تولید و تکثیر غیر قابل کنترل سلولها و بافت ها در یک ارگان خاص شده و سپس این سلولهای تکثیر یافته جهت محافظت خود در برابر سیستم دفاعی بدن ، پوششی را به دور خود ایجاد نموده و در آن به تکثیر غیر قابل کنترل خود ادامه داده و بتدریج یک توده سلولی یا تومور را تولید می کند . به مرور زمان در اثر پاره شدن پوشش محافظتی مذکور ، سلولهای توموری وارد سیستم گردش خون شده و متاستاز داده و منجر به سرطان می گردد . در سرطانهای خونی ، سلولهای بدخیم در مغز استخوان تشکیل شده و مستقیما وارد جریان خون می گردد .

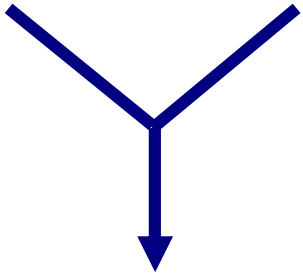
GENES ASSOCIATED WITH INHERITED CANCER SYNDROMES

Condition	Gene(s)	Gene Classification	Location/Type of Tumors
Breast and/or ovarian cancer	BRCA1 and BRCA2	Tumor suppressor	Breast*, ovary*, colon, prostate,
Familial adenomatous polyposis (FAP)	APC	Tumor suppressor	Colon*, small bowel, stomach, bone, CNS, soft tissue
Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)	hMSH2, hMLH1, PMS1, PMS2, hMSH3, hMSH6	Mismatch repair	Right side of colon*, endometrium*, stomach, ovary, small bowel, transitional cell, sebaceous, CNS
Renal cancer	VHL	Tumor suppressor	Kidney*, hemangioblastoma, phaeochromocytoma
Neurofibromatosis types I/II	NF1, NF2	Tumor suppressor	CNS*, myeloid leukemia
Nevoid basal cell carcinoma	PTC	Development and cellular proliferation	Skin*, CNS
Inherited prostate cancer	BRCA1, HPC1, others	Tumor suppressor	Prostate*
Familial melanoma	MLM1, CDKN2A, CDK4	Cell cycle regulator, oncogene (CDK4)	Skin*, pancreas
Multiple endocrine neoplasia (MEN2A/B)	RET	Oncogene	Thyroid* and adrenal glands
Li-Fraumeni syndrome	P53	Tumor suppressor	Bone, soft tissue, breast, brain, adrenal gland, leukemia
Tuberous sclerosis	TSC1, TSC2	Tumor suppressor	Hamartomas of skin, CNS, heart, kidney
Retinoblastoma	RB1	Tumor suppressor	Eye*, bone, soft tissue, brain, skin
Rhabdoid predisposition	HSNF5/INI1	Tumor suppressor	CNS, kidney
Xeroderma pigmentosum	XP	DNA repair	Skin
Bloom's syndrome	BLM	Helicase (DNA ligation)	Leukemia, GI carcinoma
Ataxia telangiectasia	ATM	Cell cycle regulator	Leukemia, lymphoma, GI carcinoma

* Most common location of tumors

روند کلی ایجاد سرطان

Clastogene (Carcinogene) + Normal Cells / Tissues



Chromosomal Aberrations
(Numerical or Structural)

Alteration in Gene Structure and Function

Alteration in Gene Expression
(Activation of Oncogene)

Tumorogenesis

Tumor

Metastasis

Cancer

تست های مولکولی و سیتوژنتیک تشخیص ناهنجاریهای کروموزومی

پیشرفت های جدید اطلاعاتی در مورد ساختار ژنوم انسان ، انقلابی شگرف در تشخیص ، پیش بینی و درمان انواع بیماری های مربوط به ناهنجاری های کروموزومی را به ارمغان آورده است . تست های جدید آزمایشگاهی که بر اساس اسیدهای نوکلئیک پایه ریزی شده اند بمثابه وسایل تشخیصی با دقت و حساسیت (Sensitivity) بسیار بالا (> 90%) و نیز ویژگی (Specificity) بسیار بالا (> 95 %) در تشخیص انواع بیماری های ارثی ژنتیک نظیر Cystic Fibrosis و Down Syndrome و Hemochromatosis و Sickle Cell Anemia و Turner Syndrome و همچنین انواع سرطان ها (Soft and Solid Tumors) و بیماریهای عفونی خطرناک نظیر Tuberculosis و Hepatitis و AIDS کمک شایانی می نماید . تست های جدید علاوه بر امکان پذیر نمودن تشخیص قطعی " Canclusive Diagnosis "در پیگیری روند بیماری " Prognosis" و شناسائی اهداف خاص معالجه ای " Therapeutic Targets " برای داروهای مختلف ضد سرطان و همچنین ارزیابی روند معالجه " Therapeutic Assessment " بیماری و نیز تائید رادیو – شیمی درمانی اکثر سرطان ها اطلاعات بسیاری را در اختیار پزشکان قرار می دهند .

ASSOCIATIONS BETWEEN MOLECULAR CHANGES AND PROGNOSIS

Tumor	Alteration	Association
Bladder cancer	LOH RB	High grade/muscle invasion
	Genomic alterations 2q–, 5p+, 5q–, 6q–, 8p–, 10q–, 18q–, 20q+	Higher grade
Breast cancer	Plasma DNA similar to tumor DNA	Poor prognosis
	Allelic loss at 1p22–p31	Lymph node metastasis, tumor size >2 cm
Cervical carcinoma	LOH on chromosome 1	Advanced stage
Colorectal cancer	LOH at 18q21	Recurrence/poor survival (Dukes B & C)
	p53 expression	Recurrence/poor survival (Dukes A)
	MI and K-*ras* mutations in normal-appearing colonic mucosa micrometastases	Predictive of colorectal cancer
		Decreased survival (50 vs. 91%)
	P16-hypermethylation	Shorter survival in T3N0M0 tumors
Gastric cancer	LOH p53	Invasive potential
	LOH of 7q (D7S95)	Poor prognosis
Gliomas	Chromosome 22q loss	Astrocytoma progression
HNSCC	LOH of 14q	Poor outcome
	LOH on 2q	Poor prognosis
	LOH at 17p	Chemoresistance
Melanoma	LOH in plasma	Advanced stage/tumor progression
Neuroblastoma	N-*myc* amplification	Poor prognosis
	TRK-A expression	Good prognosis
Neuroblastomas, 4s	N-*myc* amplification, 1p deletion,17q gains, elevated telomerase activity	Poor outcome (*not independent*)
NSCLC	Allelic imbalances on 9p	Poor prognosis
	Reduced Fhit protein expression	Poor prognosis (stage I)
	LOH 11p13	Poor prognosis
PNET	LOH of 17p	Metastatic disease
	c-*myc* amplification	Poor prognosis
Prostate cancer	LOH on 13q	Advanced stage
Retinoblastoma	LOH at RB1 locus	Tumoral differentiation, absence of choroidal invasion

(a) Modified from Table 1 in reference 85
Abbreviations: HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma
LOH, loss of heterozygosity
NSCLC, non-small cell lung cancer
PNET, primitive neuroectodermal tumor
RB, retinoblastoma gene

برخی از این تست های نوین آزمایشگاهی عبارتند از :

الف – تست Real - Time PCR

در جریان واکنش Polymerase Chain Reaction (PCR)توالی مشخصی از اسیدنوکلئیک هدف که توالی هدف خوانده می شود بارها و بارها تکثیر یافته بطوریکه در انتهای واکنش PCR مقدار آن به حد قابل تشخیص می رسد که در گذشته با یک الکتروفورز ساده در ژل آگاروزیا آکریل آمید و بدنبال آن ر نگ آمیزی ساده با اتیدیوم بروماید قابل سنجش بود و امروزه پیشرفت های فنی صورت گرفته در عرصه تجهیزات و نیز شیمی مواد فلورسنت ، منجر به تحول چشمگیری در PCR گردیده است . مجموعه این پیشرفت ها ظهور تکنولوژی نسبتاً پیچیده ای با کاربردهای فراوان را باعث شد که آن را Real-Time PCR می خوانند . در این تکنیک ترموسایکلرهای مورد استفاده PCR مجهز به توانائی های بهتر و کارآمدتری در اجرای برنامه های حرارتی بوده و با ردیاب های نوری ویژه و فلورسنت امکان ادغام واکنش PCR و ردیابی همزمان نتیجه واکنش را برای کاربر فراهم نموده است . هدف در این تکنولوژی نوین نه فقط رد یابی وجود و یا عدم وجود توالی مورد نظر در محصول PCR بوده (Qualitative PCR)بلکه امکان اندازه گیری بسیار دقیق و صحیح مقدار اولیه توالی هدف در نمونه های مجهول (Quantitative PCR) نیز می باشد.

نظر به اینکه جابجایی مواد ژنتیک در هسته سلول و حذف قسمتی از توالی DNA از عوامل اصلی ترکیب ژن و تکثیر ژن در کروموزومها و نیز مکانیسم اصلی تولید تومور و سرطان می باشد ، تکنیک PCR بهترین وسیله برای شناسائی نوع جابجائی مواد ژنتیک (Translocation) و پیدا کردن موتاسیون در توالی اسید نوکلئیک می باشد .

برخی از مهمترین کاربردهای PCR و علی الخصوص Real –Time PCRعبارتند از :

۱- تعیین وجود عامل بیماری زا

۲- تعیین نوع و مقدار عامل بیماری زا

۳- ردیابی موتاسیون ها ، پلی مورفیسم ها و ژنوتایپینگ

۴- تعیین هویت و شناسائی گونه و جنس در مطالعات تاکسونومیک

۵- پزشکی قانونی و طب جنائی

۶- تعیین بقایای بیماری

۷- تشخیص بیماریهای ژنتیک و سرطان ها

۸- تحقیقات ژن درمانی

ب - تست های سیتوژنتیک و کاریوتایپینگ

سیتوژنتیک علم مطالعه ساختمان کروموزم هاست . در این علم کروموزم ها با استفاده از تکنیک های نوار گذاری (Banding) و با شیوه های مختلف سیتوژنتیک مولکولی مورد تحلیل و بررسی قرار می گیرند . جفت و جور کردن کروموزم ها (Karyotyping) برای بررسی کمی و کیفی کروموزوم ها و رنگ آمیزی های مختلف (G,Q,R-bandings) در تشخیص کروموزوم های مختلف ، زمینه بررسی سیتوژنتیک انواع سلولهای توموری را به وجود می آورد . این تکنیک ها در بررسی سلولهای مغز استخوان ، خون و مایعات جنینی (CVS and Amniotic Fluid) نیز کاربردهای اساسی دارند .

ج- تست Fluorescence In- Situ Hybridization (FISH)

این تکنیک یک ابزار بسیار دقیق در مطالعات سیتوژنتیک و ارائه تفسیر کامل از ارزیابی جابجایی کروموزوم ها ، شکستگی و حذف کروموزوم ها ، تکثیر ژن های مختلف و شناسائی ژن های ترکیب شده می باشد .

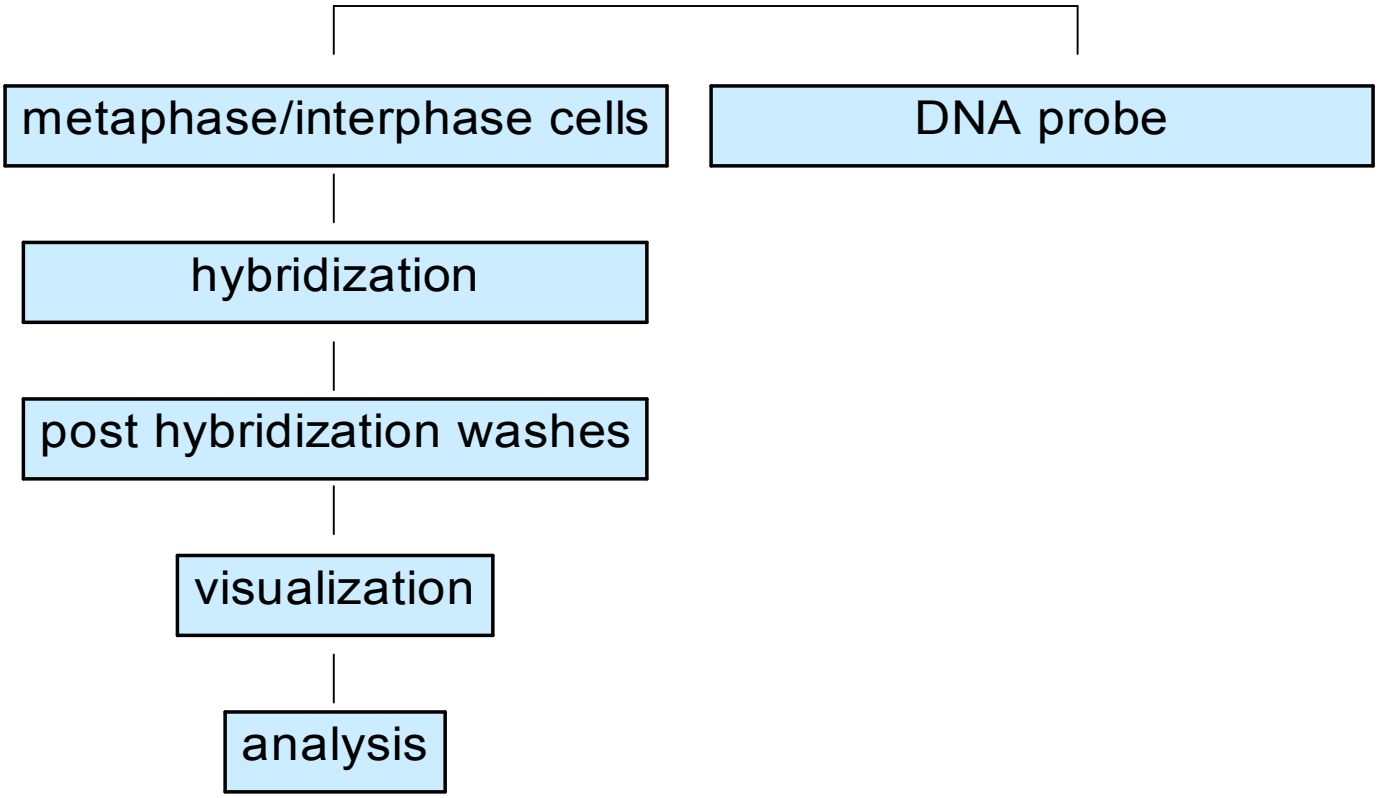
FISH : A definition

"... is a technique that enables the morphological demonstration of specific DNA or RNA sequences in individual cells in tissue sections, single cells or chromosome preparations . "

Heinz Hofler

from " Principles of in situ Hybridization " (1990)

FISH



Clinical Applications of FISH

- characterization of structural abnormalities
- aneuploidy & polyploidy analysis
- cancer specific chromosome aberrations
- analysis of archived, fixed tissues

د – تست (HR-CGH) High Resolution Comparative Genomic Hybridization

در این آزمایش مولکولی جدید ، انواع مختلفی از شکستگی ها و حذف های کوچک کروموزومی (Microdeletions) که توسط دیگر تست های مولکولی قابل تشخیص نمی باشند ، به طور غیر قابل وصفی با دقت و ویژگی بسیار بالا شناسائی می گردند .

☆ ☆ ☆ ☆ ☆

در پایان به اطلاع می رساند که آزمایشگاه مرکزی فردیس اقدام به راه اندازی بخش های جدید تشخیص مولکولی نظیر Real-Time PCR و FISH با بهره گیری از امکانات پیشرفته و مطابق با استانداردهای FDA و پروتکل های Association of Genetic Technologists (AGT) نموده است و آماده است تا علاوه بر انجام تست های فوق الذکر ، چگونگی تفسیر و ارزیابی آنها را نیز به صورتی واضح و روان دراختیار پزشکان محترم قرار دهد .

آزمایشگاه مرکزی فردیس

(مجتمع تخصصی)

کلینیکال - آناتومیکال

FARDIS CENTRAL LAB

(Specialty Complex)

Clinical – Anatomical

کرج ، فردیس ، فلکه دوم ، خیابان پانزدهم ، پلاک ۳۵

تلفکس : ۵- ۶۵۴۱۹۰۰

E.mail : info@fardislab.com

تهیه شده در کمیته مستند سازی و آموزش

تیر ۱۳۸۸