استفاده از روش دورگ‌گیری فلوئورسانس در جا (FISH) در بررسی رخداد آسیبهای کروموزومی در سلولهای لنفوبلاستوییدی اتاکسی تلانژکتیازی

حسین مزدارانی Ph.D*

* دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکده علوم پزشکی ـ گروه رادیولوژی

* آدرس مکاتبه: تهران ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکده علوم پزشکی ـ گروه رادیولوژی

چکیده

* **هدف:** دو رگ‌گیری فلوئورسانس درجا (FISH)، شناسایی توالیهای خاص با طولهای متفاوت را در نواحی کروموزومی یاکل کروموزوم در سلولهای اینترفاز یا متافاز میسر می‌سازد. پیشرفتهای جدید در این فن‌آوری موجب نقشه‌برداری سریع و تعیین موقعیت قطعه‌های DNA بر روی یک باند کروموزوم متافازی می‌شود. روش FISH مبتنی بر چند مرحله است که شامل آماده‌سازی و نشاندار کردن پروب، دورگ‌گیری پروب و آماده‌سازی کروموزوم و آشکارسازی نشانه‌ها و تصویرگیری است. در این تحقیق با استفاده از این روش سلولهای لنفوبلاستوییدی اتاکسی تلانژکتیازی (A-T) که به عوامل کلاستوژن و موتاژن فیزیکی و شیمیایی حساسیت بیشتری نسبت به سلولهای نرمال نشان می‌دهند مورد بررسی قرار گرفت.

* **نوع مطالعه:** مطالعه تجربی

* **مواد و روشها:** سلولهای A-T و نرمال در محیط RPMI-1640 کشت داده شد و تحت تابش اشعه گاما در مرحله G_1 و G_2 چرخه سلول قرار گرفت. پس از تیمار با دموکلسین و آماده‌سازی متافازها به روش استاندارد، لام میکروسکوپی تهیه شد. برای بررسی کروموزومهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ این سلولها با استفاده از پروب کروموزوم کامل روش FISH انجام شد. برای هر نمونه با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسانس Zeiss متصل به رایانه حداقل ۵۰ متافاز مورد بررسی قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** مشاهدات مبین آن است که فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی در سلولهای A-T و نرمال قبل و بعد از تابش‌گیری برای کروموزومهای مورد بررسی به‌طورکلی کم بوده است. به‌هرحال رخداد فراوانی بیشتر آسیبهای کروموزومی در سلولهای A-T شامل جابه‌جایی، تریزومی، جابه‌جایی روبرتسونی و شکست کروماتیدی مشهود است.

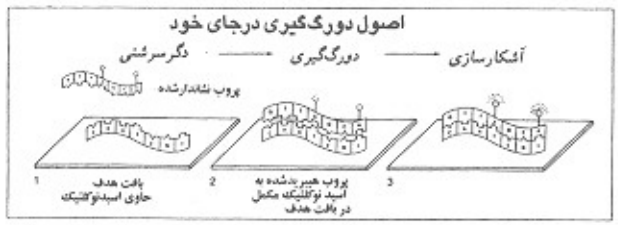
* **نتیجه‌گیری:** در روشهای متداول سیتوژنتیکی، مشاهده تغییرات متفاوت کروموزومی همیشه با انجام یک روش میسر نیست. حساسیت آشکارسازی روش FISH به کروموزومهای رنگ‌آمیزی شده محدود می‌شود امّا همانگونه که برای سلولهای A-T مشاهده شد، FISH یکی از مؤثرترین روشهای بررسی انواع تغییرات کروموزومی پایدار و ناپایدار محسوب می‌شود. این روش نه تنها می‌تواند کاربرد گسترده‌ای در نقشه‌برداری ژنوم انسان و دیگر ارگانیسمها داشته باشد، بلکه می‌تواند در سیتوژنتیک بالینی، ژنتیک سلولهای سوماتیک، تشخیص سرطان و بررسی‌های بیان ژن نقش مهمی داشته باشد.

گل واژگان: روش FISH، آسیبهای کروموزومی، اتاکسی تلانژکتیازی.

مقدمه

روش دورگ‌گیری فلوئورسانس در جا (FISH)[1] یکی از مهیج‌ترین و کارآمدترین ابزارهای تحقیقاتی است که در سالهای اخیر توسعه یافت و به پیشرفت تحقیقات بنیادی و پزشکی کمک شایانی نمود. در ابتدا روش دورگ‌گیری در جا توسط گال و پاردو[2] در سال ۱۹۶۹ (۱) با استفاده از پروبهای RNA نشاندار شده با رادیواکتیو معرفی شد و یک سال بعد،از توالیهای تکراری مثل DNA ماهواره در محل سانترومر کروموزومهای موش نقشه‌برداری شد. در حالی که متدولوژی in situ یک ابزار قوی برای نقشه‌برداری ژن به شمار می‌رفت، زمینهٔ ایجاد شده با پروبهای ایزوتوپی با امولسیون فتوگرافیک حساس باعث محدودیتهایی در مکان‌یابی دقیق توالی هدف گردید. برای رفع این محدودیتها پروبهای غیر ایزوتوپی طراحی شدند که توانایی مکان‌یابی دقیق، ساده و سریع هدفهای هسته‌ای را فراهم نمود. یکی از این موارد استفاده از پروبهای نشاندار شده با بیوتین[3] بود که در روشهای سیتولوژیکی با آویدین ـ فلوئورسانس قابل آشکارسازی است.

حساسیت روش in situ به سرعت افزایش یافت، طوری که امروزه در بعضی از آزمایشگاهها قادرند هدفهایی از DNA با اندازه‌های کوچکتر از 1Kb تا بیش از چند مگاباز را با اطمینان نقشه‌برداری کنند. به علاوه روشهای آشکارسازی با استفاده از چند رنگ مختلف به طور همزمان امکان بررسی قطعه‌های مختلف مولکول DNA را میسر می‌سازد. بنابراین، روش دورگ‌گیری در جای اولیه به سیستم دورگ‌گیری فلوئورسانس غیر ایزوتوپی(FISH) که بسیار کارآمدتر بود توسعه یافت که اساس آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود. از FISH برای تحقیق در زمینه‌های مختلف بیولوژیک استفاده شده است.



شکل ۱: اساس روش دورگ‌گیری در جای خود فلوئورسانس

در ژنتیک پزشکی، شناسایی شکستهای کروموزومی برای تشخیص کاریوتیپهای خاص مسئول بیماریهای انسان، اساسی است. روش FISH مثل نقاشی کروموزوم (۲)، راه مؤثری را برای شناسایی آسیبهای کروموزومی فراهم آورد و به طور گسترده‌ای در بررسی‌های عددی و ساختاری کروموزوم تا شناسایی ناهنجاریهای کروموزومی ناشی از تابش‌گیری و آنالیز سیتوژنتیکی بالینی متداول، مورد استفاده قرار گرفت.

Meltzer و همکاران (۱۹۹۳) (۳) نشان دادند که بعضی از حذفهای انتهایی ناشی از جابه‌جائی زیرتلومری (جابه‌جائی کریپتی)[4] هستند که در سلولهای سالم و بدخیم، فراوانی بالایی از آنها مشاهده می‌شود. سرعت و دقت FISH دلیلی بر ایده‌آل بودن این روش جهت استفاده در غربالگری وسیع است. نرخ آشکارسازی با این روش برای آنپلوییدی‌ها، ۷۳/۳٪ با دقت ۹۳/۹٪ گزارش شده است. سودمندی این روش به آنالیز کروموزومهای میتوزی محدود نمی‌شود. شناسایی کروموزومها در مراحل مختلف میوز، درک رفتار جدایی، جابه‌جایی‌های متقابل تمامی کروموزومهای میوزی و تشخیص بالینی حائز اهمیت است (۴).

در بررسی حاضر با استفاده از روش FISH رخداد ناهنجاری بین کروموزومهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ در سلولهای لنفوبلاستوییدی سالم و اتاکسی تلانژکتیازی، قبل و بعد از تابش اشعه در مراحل G_1 و G_2 چرخه سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. اتاکسی تلانژکتیازی (A-T) سندروم ژنتیکی مغلوب اتوزومی انسان است که از مشخصه‌های آن تلانژکتیازی Occulocataneous و اتاکسی پیشروندهٔ مغز است؛ دو خصوصیتی که اول بار توسط Boder و Sedgwick در سال ۱۹۵۸ معرفی شد (۵)، خصوصیات بالینی مهم آن اختلال در سیستم عصبی حرکتی (۶) و نقص در سیستم ایمنی است (۷). انسیدانس هموزیگوس A-T در آمریکا تقریبا" یک در ۱۰۰/۰۰۰ نفر بوده و پیش‌بینی شده است که ۱ درصد کل افراد جامعه ناقل ژن A-T هستند که این ژن به صورت اثر ژنتیکی اتوزومال مغلوب به ارث می رسد (۸) و با افزایش فراوانی نئوپلاسم‌های بدخیم به ویژه از نوع لنفوپرولیفراتیو همراه است (۹). امروزه اتفاق نظر کلی وجود دارد که بیماران مبتلا به A-T به اثرهای سیتوتوکسیک و کلاستوژنیک پرتوهای یونساز و دیگر عوامل آسیب‌رسان به DNA مانند بلئومایسین، حساسیت بیشتری نسبت به افراد سالم نشان می‌دهند؛ همچنین اختلالاتی در شرایط in vivo و in vitro از خود بروز می‌دهند که متناسب با نقص‌هایی در متابولیسم DNA و یا حفظ تمامیت ژنوم از جمله افزایش فراوانی شکستهای خودبخودی کروموزومها و فراوانی بالای نوترکیبی بین کروموزومها است (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴). لنفوسیتهای بیماران A-T نیز حساسیت پرتویی بیش از حد از خود نشان می‌دهند. این حساسیت با سنجش قابلیت لنفوسیتهای تابش دیده در پاسخ به تحریک PHA (فیتوهماگلوتینین)[5] (۱۵) و یا با تابش دودمانهای سلولی لنفوبلاستوییدی و سنجش قابلیت تشکیل کلونی آنها نشان داده شد. مبانی مولکولی افزایش حساسیت سلولهای A-T به عوامل ژنوتوکسیک درک نشده است. هنوز اتفاق‌نظر کلی برای وجود نقص در سیستم ترمیم مولکول DNA در A-T وجود ندارد، چراکه با روشهای مختلف بیوشیمیائی و اندازه‌گیری تعداد پارگیهای تک‌رشته‌ای یا هر دو رشتهٔ DNA، موفق به نشان دادن اختلال در سیستم ترمیم DNA نشده‌اند (۱۶، ۱۷)؛ امّا ناهنجاریهای ساختاری کروماتین، اختلال در ترمیم که بر کیفیت ترمیم تأثیر می‌گذارد و اختلالات تمایزی، به عنوان

1. Fluorscent in situ hybridization
2. Gall and Pardue
3. Biotin
4. Cryptic translocations
5. Phytohemaglutinin

توجیهی برای فنوتیپ A-T گزارش شده است (۱۸، ۱۹). اخیراً نقص در سیستم ترمیم نوترکیبی dsb[1] ایجاد شده در DNA در سلولهای A-T نشان داده شده است(۲۰).

در سلولهای کشت شدهٔ مبتلایان به A-T افزایش ناهنجاری کروموزومی به صورت خودبخودی و یا پس از مواجهه با عوامل ژنوتوکسیک و کلاستوژنیک مشاهده شده است. اولین موارد رخداد ناهنجاری خودبخودی سیتوژنتیکی در سلولهای A-T در سال ۱۹۶۶ گزارش شد (۲۱) و یک سال بعد A-T نیز مانند برخی دیگر از سندروم‌ها مثل آنمی فانکونی و سندروم بلوم که رخداد شکستهای خودبخود کروموزومی در آنها بیش از افراد سالم است، به عنوان سندروم ناهنجاری کروموزومی طبقه‌بندی شد (۲۲). ناهنجاریهای کروموزومی به شکلهای مختلف و برای بیشتر کروموزومها از جمله شکستهای کروماتیدی، شکاف و تبادل کروماتیدی، قطعه‌های بدون سانترومر و دی‌سانتریک گزارش شد، همچنین Cohen و همکارانش (۲۳) نشان دادند که سطح شکستهای کروموزومی خودبخودی در فیبروبلاستهای A-T سه برابر بیشتر از سلولهای سالم است. اگرچه در بعضی از بیماران A-T آسیبهای ناپایدار کمی دیده می‌شود امّا همهٔ آنها سطوح بالایی از جابه‌جایی‌های کروموزومی پایدار را نشان می‌دهند (۲۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیشتر جابه‌جائی‌ها مستلزم شکست کروموزوم ۱۴ و دیگر کروموزومها است و رخداد این جابه‌جائی‌ها بیشتر بین کروموزومهای ۷ و ۱۴ مشاهده شده است. O'connor و همکارانش (۲۵) نشان دادند که جابه‌جایی‌های بیشتری بین کروموزومهای ۱۴ و ۷ در لنفوسیتهای T و B روی می‌دهند ولی در سلولهای لنفوبلاستوییدی و یا فیبروبلاستی پوست بیماران A-T، چنین چیزی مشاهده نشد.

مواد و روشها

* کشت سلول

سلولهای لنفوبلاستوییدی نرمال (NC) و اتاکسی تلانژکتازی (A-T) در محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) حاوی ۱۵٪ سرم جنینی گاو (FCS)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین و L-گلوتامین کشت داده شد. رشد این سلولها در ابتدا کند بوده ولی پس از عادت به محیط کشت و شرایط in vitro سریع شده و بایستی هر هفته پاساژ داده شود. سلولها در فلاسک‌های $25cm^2$ به تعداد 1×10^6 سلول در ۱۰ml محیط، کشت داده شد و به مدت دو روز در دمای $37^{\circ}C$ در انکوباتور CO_2دار نگهداری شد. سلولها در فاز G_2 چهار ساعت قبل از میتوز تحت تابش ۰/۳۸۵ Gy[2] اشعه گاما و در مرحله G_1 تحت تابش ۱Gy اشعه گاما قرار گرفتند. از سلولهای G_1 یک هفته بعد از تابش‌گیری محصول‌برداری شد. یک ساعت و نیم قبل از برداشت سلولها ۱۰μl محلول Democolcine برای توقف سلولها در مرحلهٔ متافاز به محیط کشت اضافه شد.

* تابش دهی

تابش اشعه گاما در یک دستگاه IBL 437C، CS-۱۳۷، تابش کنندهٔ اشعه گاما (Bio-International) انجام شد. دوز اشعه با روش دوزیمتری سولفات فرّو (۲۳) اندازه‌گیری شد. آهنگ دوز مورد استفاده تقریباً ۴Gy/min بود.

* تهیه کروموزومهای متافازی وانجام روش FISH

از سلولهای کشت شدهٔ شاهد و تابش دیده در مراحل G_2 و G_1 به ترتیب در زمانهای ۴ ساعت و یک هفته بعد از تابش اشعه نمونه‌گیری به عمل آمد. یک ساعت‌ونیم قبل از نمونه‌برداری ۱۰۰μl با غلظت نهایی ۰/۰۴$\mu g/ml$ دموکلسین به محیط اضافه شد. سلولها در دمای $2^{\circ}C$ سانتریفوژ و در محلول هیپوتونیک ۰/۰۷۵m/L KCL به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد. پس از سانتریفوژ مجدد، سلولها با ۱۰ml محلول فیکساتیو کارنوی[3] که متشکل از ۳ حجم متانول و ۱ حجم اسیداستیک گلاسیال است، تثبیت شدند. سلولها دوبار دیگر در محلول فیکساتیو شستشو داده شدند و در جریان قوی هوای سرد روی لام زاویه‌دار، گسترهٔ متافازی تهیه شد. لامها پس از تهیه در فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری شدند. قبل از انجام روش FISH، لامها به مدت ۲۴ ساعت بر روی سطح داغ دستگاه PCR با دمای $54^{\circ}C$ قرار داده شدند تا برای hybridization آماده شوند.

* انجام روش FISH

به طور کلی این روش در دو مرحله انجام شد:

الف: دورگ‌گیری: در این مرحله لامها به مدت ده دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس با اتانول خالص با غلظتهای ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد به مدت ده دقیقه برای هر غلظت، شستشو و در دمای اتاق خشک شدند. لامها در coplin jar حاوی ۷۰ درصد Formamide و ۲×SSC به مدت دو دقیقه در دمای $65^{\circ}C$ بن ماری قرار داده شدند که پس از گذشت این زمان، فوراً به اتانول ۷۰ درصد سرد شده در فریزر منتقل و به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. شستشوی لامها با اتانول ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نیز تکرار گردید. به منظور نقاشی کروموزومهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ سلولهای سالم و اتاکسی تلانژکتیازی، ۱۵μl از پروب کروموزوم کامل[4] (Cambio/UK) هر یک از کروموزومهای موردنظر به لوله‌های eppendorf منتقل و به مدت ده دقیقه در دمای $65^{\circ}C$ در بن‌ماری قرار داده شدند، سپس انکوباسیون پروبها در بن‌ماری $37^{\circ}C$ به مدت یک ساعت ادامه یافت. پس از اتمام زمان انکوباسیون پروبها با یکدیگر مخلوط شده و روی لام قرار داده شدند. با قرار دادن یک لامل بر روی لام، پروبها کاملاً در

1. Double strand break

۲. گری (Gy; Gray)، واحد دز جذبی تشعشع معادل جذب یک ژول انرژی تشعشعی در یک کیلوگرم از هر نوع محیط مادی است.

3. Carnoy´s Fixative

4. Whole chromosome

سطح لام پخش و منتشر شد. لامها به مدت یک شب در هوای مرطوب در گرمخانه ۳۷°C قرار داده شد.

ب: آشکارسازی[1]: پس از انجام دورگ‌گیری در گرمخانه، لامها خارج شده و لامل از روی لام برداشته شد. لامها دوباره در محلول ۵۰ درصد Formamide به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۵°C و پس از آن به مدت ده دقیقه در محلول ۲xSSC شستشو داده شدند. ۱۰۰μl محلول شیر بدون چربی روی هر لام منتقل شد و به مدت نیم ساعت در هوای مرطوب قرار داده شدند. سپس ۱۰۰μl رنگ Texas Red روی هر لام قرار داده و انکوباسیون به مدت نیم ساعت دیگر در هوای مرطوب ادامه یافت. پس از این مرحله لامها ۳ بار در محلول شستشوی متشکل از ۲۰xSSC، ۱۰% Tween و آب مقطر، هر بار به مدت ده دقیقه شستشو داده شدند. انکوباسیون لامها با ۱۰۰μl بیوتین به مدت نیم ساعت در هوای مرطوب ادامه یافت که متعاقب آن شستشو در محلول شستشو انجام و سپس رنگ‌آمیزی با Texas Red بار دیگر تکرار شد. سپس لامها در محلول شستشو و PBS آبکشی شده، پس از عبور از اتانول ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد، در هوای اتاق خشک گردیدند.

لامهای آماده شده با رنگ فلوئورسانت Dapi[2] رنگ‌آمیزی شدند و پس از شستشو در محلول ۲xSSC در دمای اتاق خشک شدند. ۱۵μl از نگهدارندهٔ رنگ فلوئورسانت (Vectashield) به روی هر لام منتقل شده و روی لامها با لامل پوشانده شد. برای آنالیز کروموزومها از میکروسکوپ فلوئورسانت Zeiss متصل به دوربین ویدئویی Microimager استفاده شد. این سیستم مجهز به سه صافی Dapi، FITC و Rhodmmine است. تصویر میکروسکوپی به یک برنامهٔ کامپیوتری Smart capture VP (Vysis ,UK) منتقل شد و مورد بررسی قرار گرفت. کروموزومهای نشاندار شده با FITC، به رنگ سبز و کروموزومهای نشاندار شده با بیوتین Texas Red، به رنگ قرمز زیر میکروسکوپ فلوئورسانس مشاهده می‌شوند. در این بررسی کروموزومهای شماره ۱ و ۷ به رنگ قرمز و کروموزومهای ۴ و ۱۴ به رنگ سبز نشاندار شده بودند.

یافته‌ها

در این بررسی چهار کروموزوم شمارهٔ ۱، ۴، ۷ و ۱۴ رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجایی که انتقال توأم پروبهای هر چهار کروموزوم بر روی یک لام موجب ایجاد زمینه و کاهش قدرت تفکیک می‌شود (شکل ۲ ،پانل C)، مخلوطی از دو پروب را بر روی هر لام منتقل نموده و کروموزومهای ۱ و ۴ و کروموزومهای ۷ و ۱۴ جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند.

در پانل A شکل ۲ تصاویری از کروموزومهای شماره ۱ و ۴ سلولهای نرمال مشاهده می‌شود. در این تصویر که بخشی از آن متعلق به متافاز دیگری است، کروموزومهای ۱ به رنگ قرمز و کروموزومهای شماره ۴ به رنگ سبز، به وضوح قابل مشاهده هستند. در بررسی متافاز ۵۰ سلول نرمال، هیچ‌گونه اختلال کروموزومی در بین کروموزومهای موردنظر مشاهده نشد. بررسی سلولهای سالم تابش دیده با دوز ۰/۳۸۵ گری اشعه گاما، در مرحله G_2 نیز اختلالهای خاصی را در این کروموزومها نشان نداد؛ امّا در سلولهای تابش دیده در مرحله G_1 با دوز یک‌گری اشعه گاما و نمونه‌گیری بعد از یک هفته دو پدیده جالب مشاهده شد. در یکی از متافازها حذف یکی از بازوهای کروموزوم شماره یک از محل سانترومر مشاهده شد (شکل ۲، پانل B) و مورد دیگر آنکه دو کروموزوم شماره ۱۴ از محل سانترومر به یکدیگر متصل شده و یک کروموزوم متاسانتریک را در اثر یک جابه‌جایی روبرتسونی تشکیل دادند (شکل ۲، پانل D). در بررسی کروموزومهای شماره ۱ و ۴ و همچنین ۷ و ۱۴ سلولهای نرمال تابش دیده اختلال خاص دیگری مشاهده نگردید.

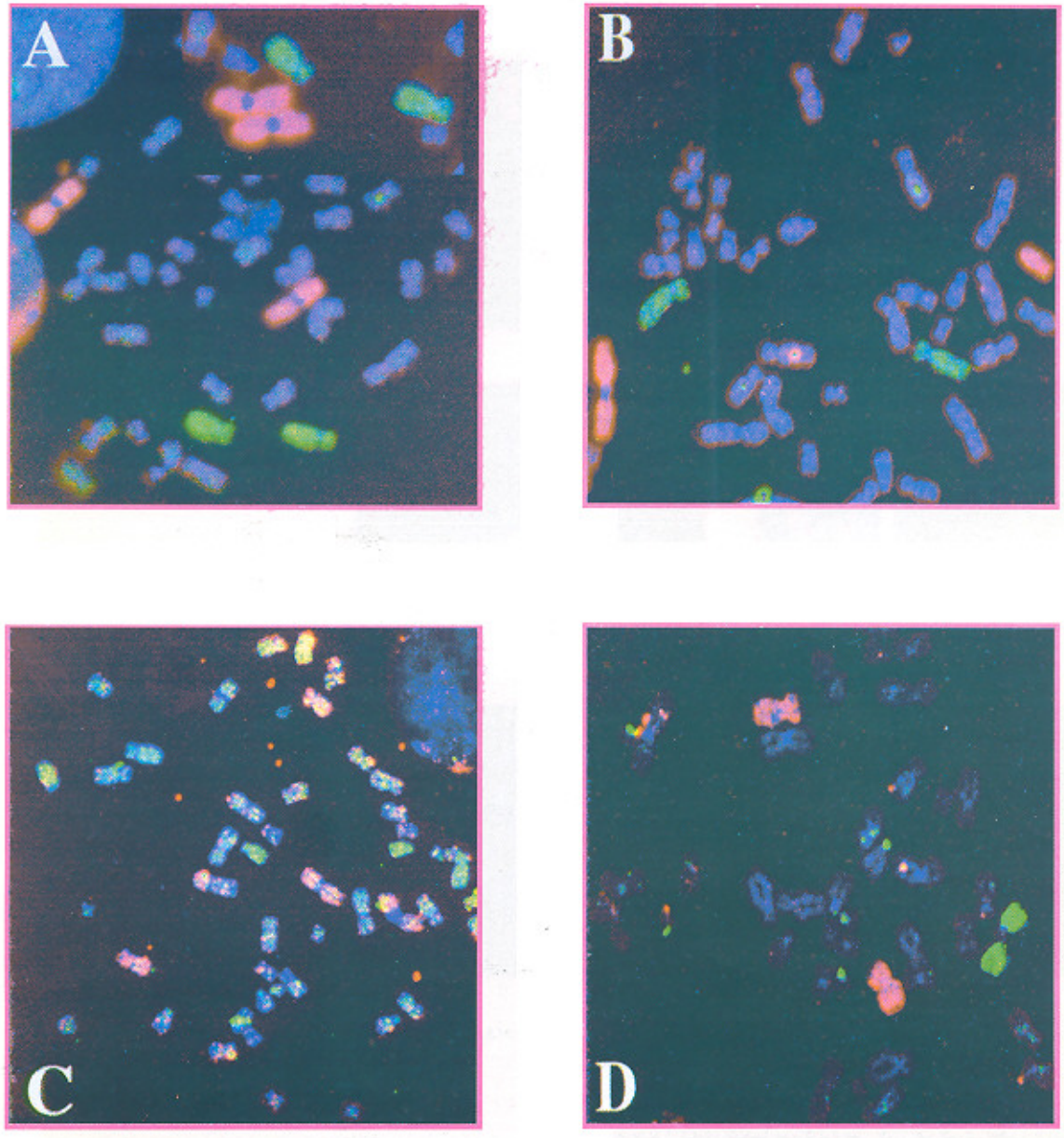
بررسی سلولهای A-T نیز با آنالیز ۵۰ متافاز برای هر نمونه شاهد و تابش دیده در مراحل G_1 و G_2 انجام شد. با هیبریدیزاسیون و رنگ‌آمیزی مناسب، کروموزومهای موردنظر به وضوح قابل مشاهده و هرگونه اختلالی به آسانی قابل تشخیص بود. پانل A شکل ۳ نمونه‌ای از کروموزومهای شماره ۱ و ۴ رنگ‌آمیزی شده در سلولهای A-T را نشان می‌دهد.

در بررسی سلولهای شاهد A-T آنگونه که انتظار می‌رفت فراوانی بالایی از رخداد جابه‌جایی بین کروموزومهای ۷ و ۱۴ مشاهده نشد، لیکن در یک مورد حذف بازوی q کروموزوم شماره ۴ و اضافه شدن آن قطعه به کروموزوم نامشخص دیگر (پانل B شکل ۳، پیکان حذف و اضافه شدن قطعهٔ کروموزومی رانشان می‌دهد) و حذف بخشی از بازوی کروموزوم ۱ و اضافه شدن آن به کروموزوم دیگر (پانل C، شکل ۳) مشاهده شد. در سلولهای A-T تابش دیده درمرحلهٔ G_1 مسلماً باید فراوانی رخداد شکستهای کروماتیدی نسبت به سلولهای نرمال بیشتر باشد. با بررسی متافازها با رنگ فلوئورسانس Dapi، تعداد زیادی از این آسیبها در کروموزومهای مختلف مشاهده شد امّا تنها یک مورد از شکستهای کروماتیدی مربوط به کروموزوم شماره ۱ می‌شد که تصاویر آن در شکل ۳ پانلهای D و E نشان داده شد. تصویر E رنگ‌آمیزی Dapi رانشان می‌دهد و با دقت در این تصویر می‌توان چند مورد شکست کروماتیدی را در کروموزومهای مختلف مشاهده کرد که پیکان شکست کروماتیدی کروموزوم شمارهٔ ۱ را نشان می‌دهد.

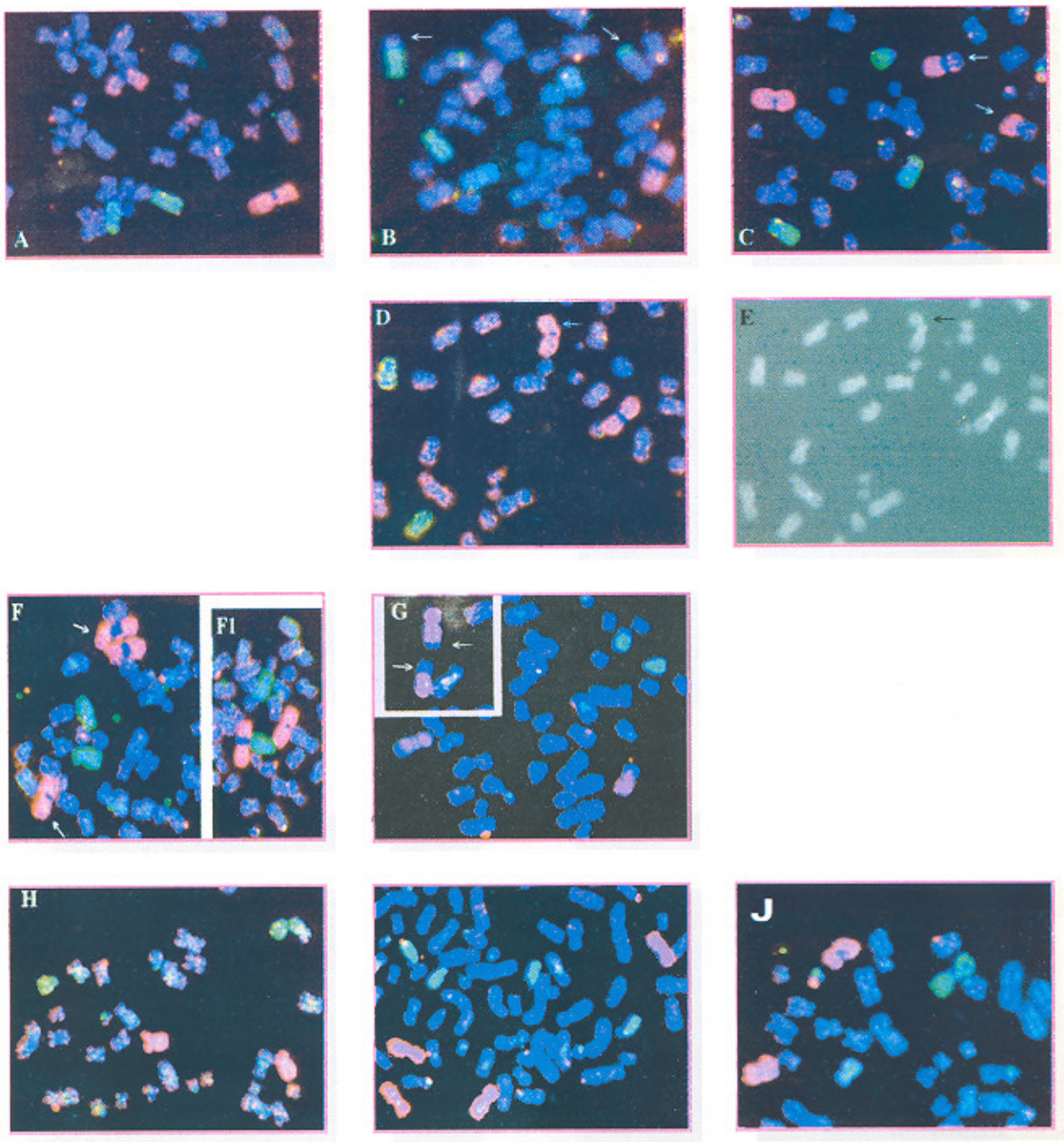
در بررسی متافازهای تابش دیده در مرحله G_2 با دوز یک گری اشعه گاما و نمونه‌گیری پس از یک هفته عمدتاً مواردی از آسیبهای کروموزومی پایدار مشاهده شده که شامل تغییرات عددی یا ساختمانی کروموزومها بوده است. شکل ۳، پانل F یک نمونه رخداد تریزومی کروموزوم شماره یک را نشان می‌دهد (تصویر F_1 کروموزومهای سالم شماره ۱ و ۴ A-T را نشان می‌دهد). در تصویر پانل G شکل ۳، رخداد حذف در بازوهای p و q کروموزوم شماره ۷ در دو سلول، نشان داده شده است. در این تصویر مشاهده می‌شود که بخش کوچکی از بازوهای q و تقریباً تمامی بازوی P کروموزوم ۷ حذف شده است. در پانل H تریزومی کروموزوم شماره ۱۴ مشاهده می‌شود که البته رخداد تریزومی

1. Detection
2. 4,6-diamidno-2-phenylindole

نمی‌تواند صرفاً به دلیل تابش‌گیری از اشعه باشد زیرا این پدیده در نتیجهٔ تغییر در عملکرد دوک سلولی در هنگام تقسیم روی می‌دهد. پانل I شکل ۳ رخداد endoreplication را نشان می‌دهد که از هر نسخه کروموزومهای ۷ و ۱۴، چهار کروموزوم دیده می‌شود که در واقع یک سلول تتراپلوییید است. ناهنجاری دیگر مشاهده شده ترپزومی کروموزوم شماره ۱۴ است. همانگونه که در تصویر L نشان داده شد، دو کروموزوم شماره ۱۴ با اتصال در محل سانترومر طی یک جابه‌جایی روبرتسونی، کروموزومی متاسانتریک را ایجاد نمودند. رخداد ناهنجاریهای کروموزومی در بین کروموزومهای مورد بررسی در سلولهای نرمال و A-T در حدی نبود که بتوان آنها را از نظر آماری مورد مقایسه قرار داد.



شکل ۲: تصاویری از نقاشی کروموزومهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ در سلولهای نرمال. A: کروموزومهای ۱ و ۴ سالم؛ B: حذف بازوی کروموزوم ۱؛ C: نقاشی هر چهار کروموزوم در یک متافاز؛ D: جابه‌جایی روبرتسونی بین کروموزومهای ۱۴.



شکل ۴: تصاویری از نقاشی کروموزومهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ در سلولهای A-T. A: کروموزومهای ۱ و ۴: B و C: جابه‌جایی؛D و E: شکست کروماتیدی؛ F: تریزومی؛ G: جابه‌جایی H: تریزومی I: تتراپلوییدی و J. جابه‌جایی روبروتسونی همراه با تریزومی ۱۴

بحث

پرتوهای یونساز، اشعه فرابنفش، عوامل آلکیله کننده و دیگر کارسینوژنهای موتاژنیک توانایی القاء آسیبهای کروموزومی در شرایط in vivo و in vitro را دارنـــد. انـواع آسـیبهای ایـجاد شـده (کروموزومی و کروماتیدی) بستگی به ماهیت آسیبهای DNA و مرحلهٔ چرخهٔ سلول دارد. آسیبهای ایجاد شده معمولاً با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا و یا نواربندی گیمسا مورد بررسی قرار می‌گیرد. اخیراً با استفاده از روش دورگ‌گیری فلوئورسانس در جا (FISH) که در آن از مخزنهای ژنی خاص هر کروموزوم استفاده می‌شود، آسیبهای کـروموزومی در جزئیات بسیار بیشتری مورد بررسی قرار می‌گیرد.

در این تحقیق، کروموزومهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ بر مبنای بررسی‌هایی که در مورد نقاط آسیب‌پذیر کروموزومهای همستر چینی به تشعشع، با

روش نواربندی-G، برای حذفهای انتهایی و تبادل انجام شد (۲۷) و همچنین تحقیقی که Azzalin و همکارانش (۲۸) برای تشخیص تکرارهای شبه تلومری بین کروموزومی در کروموزومهای انسان با روش FISH انجام دادند، انتخاب شدند. نقاط آسیب‌پذیرتر در این کروموزومها بیشتر بوده و احتمال آشکارسازی این نقاط با روش FISH بهتر گزارش شده است. نتایج حاکی از آن است که فراوانی ناهنجاریهای مشاهده شده در سلولهای A-T بیش از سلولهای نرمال است (تصاویر شکلهای ۲ و ۳).

از آنجایی که اثر اشعه تصادفی است و هر کروموزوم می‌تواند به عنوان یک هدف مورد اصابت قرار گیرد، احتمال آسیب دیدن چند کروموزوم خاص کم می‌شود. از طرف دیگر نشان داده شد که سلولهای نرمال قادر به ترمیم آسیبهای کروماتیدی ایجاد شده در مرحله G_2 چرخهٔ سلول هستند (۲۹)، لذا انتظار می‌رود که تعداد آسیبها در سلولهای نرمال پس از تابش دوز کم اشعه در حد ۰/۳۸۵Gy کاهش یافته و در کروموزومهای مورد بررسی در این مطالعه دیده نشوند. مسلماً سلولهایی که در مرحله G_1 تحت تابش یک‌گری اشعه قرار گرفته‌اند، طی مدت یک هفته فرصت کافی برای ترمیم آسیبها را دارا بوده و سلولهایی که احتمالاً دچار آسیبهای کروموزومی جدی شده‌اند با رخداد مرگ میتوزی از جامعهٔ سلولی مورد بررسی حذف شدند. همانگونه که در شکل ۲ دیده می‌شود، فراوانی و تنوع آسیبهای کروموزومها در سلولهای A-T بیشتر از سلولهای نرمال بوده و بیشتر آسیبها از نوع پایدار هستند.

اگر چه جابه‌جایی بین کروموزومها در سلولهای تابش ندیدهٔ A-T، بین کروموزوم ۴ و کروموزوم نامشخص دیگر و همچنین کروموزوم ۱ و کروموزوم نامشخص دیگری مشاهده شد (شکل ۳ پانلهای B و C)، امّا بررسی‌های انجام شده با لنفوسیتهای T و B نشان می‌دهد که جابه‌جایی‌ها و وارونگی‌ها در سلولهای A-T ترجیحاً بین کروموزومهای ۱۴ و ۷ رخ می‌دهد (۳۰). در عین حال O'connor و همکارانش (۲۵) عدم رخداد جابه‌جایی بین کروموزومهای ۱۴ و ۷ را برای سلولهای لنفوبلاستوییدی و یا فیبروبلاستی پوست بیماران A-T گزارش کرده‌اند و مشاهدات در این تحقیق که با سلولهای لنفوبلاستوییدی انجام شده مؤید آن است. پانلهای D و E شکل ۳ شکستهای کروماتیدی در کروموزوم شماره ۱ را پس از تابش G_2 در سلولهای A-T، نشان می‌دهند. حساسیت سلولهای A-T در مرحلهٔ G_2 حداقل دو برابر سلولهای نرمال است، امّا در عین حال نشان داده شد که سلولهای A-T نیز همچون سلولهای نرمال قادر به ترمیم شکستهای کروماتیدی هستند(۱۴). از آنجایی که اثر تشعشع اثری تصادفی است و منحصر به کروموزوم خاصی نمی‌شود، بنابراین احتمال رخداد شکست در کروموزومهای مورد بررسی نیز کم است و به همین جهت تنها یک مورد آسیب در کروموزوم شماره ۱ مشاهده شده است. اگرچه در سلولهای تابش دیده در مرحلهٔ G_1، رخداد تریزومی مانند تریزومی کروموزوم شماره ۱ (پانل F، شکل ۳) و تتراپلوییدی (پانل I، شکل ۳) مشاهده شد، نمی‌تواند ناشی از تشعشع باشد چرا که هر یک با مکانیزمهای خاص خود ایجاد می‌شوند و تا به حال گزارشی وجود ندارند که نشان دهد تشعشع بر دوک سلول تأثیر می‌گذارد و موجب آنپلوییدی می‌شود. مشاهدهٔ جابه‌جایی روبرتسونی در سلولهای A-T (شکل ۳، پانل J) و سلولهای نرمال (شکل ۲، پانل D) بین کروموزومهای ۱۴ پدیدهٔ نادری است. Pandita و همکاران (۳۱) رخداد این نوع جابه‌جایی که مستلزم اتصال end-to-end کروموزومها است را در سلولهای لنفوبلاستوییدی نرمال و A-T نشان دادند؛ همچنین طبق بررسی‌های آنان فراوانی رخداد جابه‌جایی روبرتسونی در سلولهای A-T بیش از سلولهای نرمال بوده است. مکانیزمهای مختلفی در تشکیل جابه‌جایی‌های روبرتسونی دخالت دارند که کوتاه شدن یا حذف تلومر یکی از آنهاست (۳۲) و برای سلولهای A-T نشان داده شد که اندازهٔ تلومر آن نسبت به سلولهای نرمال کوتاهتر و فعالیت تلومرازی آن کمتراست (۳۱).

مشاهدات انجام شده در این بررسی حاکی از سهولت تشخیص انواع ناهنجاریهای کروموزومی در ژنوم انسان با استفاده از روش FISH است که ممکن است خودبخود یا تحت‌تأثیر عواملی چون پرتوها ایجاد شوند. روش FISH با بهره‌گیری از پروبهای خاص کروموزومی به درک منشاء بروز آسیبهای کروموزومی کمک شایانی نمود. قدرت تفکیک و دقت این روش در مقایسه با روشهای متداول دیگر بسیار بالا است و امروزه با استفاده از این روش به این نتیجه می‌رسیم که آنچه را به عنوان آسیب در کروموزومها مشاهده می‌شوند تنها بخشی از همهٔ وقایعی است که در یک سلول رخ می دهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر P.E.Bryant استاد دانشگاه سنت‌آندروس انگلستان که امکان انجام این تحقیق را در آزمایشگاه خود برایم میسر نمودند و همچنین آقای دکتر P. Slijepcevic متخصص روش FISH که از نظرات و مشورتهای ارزشمند ایشان بهره‌مند شدم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Gall JG, Pardue M.L; Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 63: 378-383, 1969.

2. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J; Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4 .Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 9138-9142, 1988.

3. Meltzer PS, Guan XY, Trent JM; Telomere capture stabilizes chromosome breakage. Nature Genetics, 4: 252-255, 1993.

4. Goldman ASH, Hulten MA; Chromosome in situ suppression hybridization in human male meiosis. J.

Med. Genet., 29: 98-102, 1992.
5. Boder E, Sedgwick RP; Ataxia-telangiectasia; A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, occulocataneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. Pediatrics, 21: 526-554, 1958.
6. Sedgwick RP, Boder E. Ataxia- telangiectasia. Handb. Clin. Neurol., 16:347-423, 1991.
7. Harnden DG; The nature of ataxia-telangiectasia: Problems and prespectives. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med., 66(Suppl.): 513-519, 1994.
8. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL; Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. N. Engl. J. Med., 325: 1831-1836, 1991.
9. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL; Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. N. Engl. J. Med., 316: 1289-1294, 1987.
10. Cohen MM, Levy HP; Chromosome instability syndromes. Adv. Hum. Genet., 18:43-149, 1989.
11. Meyn MS; High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. Science (Washignton DC), 26: 1327-1330, 1993.
12. Kobayashi Y, Tycko B, Soreng AL, Sklar J; Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia-telangiectasia. J. Immunol.,147: 3201- 3209, 1991.
13. Lipkowitz S, Stern MH, Kirsh IR; Hybrid T-cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasia lymphocytes. J. Exp. Med., 172: 409-418, 1990.
14. Mozdarani, H. and Bryant, P.E; Kinetics of chromatid aberrations in G_2 ataxia telangiectasia cells exposed to x-rays and ara A. Int. J. Radiat.Biol., 55; 71-84, 1989.
15. Agarwal SS, Brown DQ, Katz EJ, Loeb LA; Screening for deficits in DNA repair by the response of irradiated human lymphocytes to phytohemaglutinin. Cancer Research, 37: 3594-3598, 1977.
16. Vincent RA, Sheridan RB, Huang PC; DNA strand breakage in ataxia- telangiectasia fibroblast-like cells. Mutation Research, 33: 357-366, 1975.
17. Fornance AJ, Little JB; Normal repair of DNA single-strand breaks in patients with ataxia-telangiectasia. Biochemica et Biophysica Acta., 607: 432-437, 1980.
18. Painter, R.B. and Young, B.R; Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation, Proc. Natl. Acad. Sci.,USA ,77: 7315-7317, 1980.
19. Mc Kinnon PJ; Ataxia telangiectasia; an inherited disorder of ionizing radiation sensitivity in man. Hum. Genet., 75: 197-208, 1987.
20. Dar ME, Winter TA, Jorgensen TJ; Identification of defective illegitimate recombinational repair of oxidatively-induced DNA double-strand breaks in ataxia-telangiectasia cells. Mutation Research, 384: 169-179, 1997.
21. Hecht F, Koler RD, Rigas DA, Dahnke GS, Case MP, Tisdale V, Miller RW; Leukemia and lymphocytes in ataxia-telangiectasia. Lancet, 2: 1193, 1466.
22. Gropp A, Flatz G; Chromosome breakage and blastic transformation of lymphocytes in ataxia-telangiectasia. Human Genetick, 5: 77-79, 1967.
23. Cohen MM, Shaham M, Dagan J, Shmulei E, Kohn G; Cytogenetic investigations in families with ataxia-telangiectasia. Cytogenetics and Cell Genetics, 15: 338-356, 1975.
24. Taylor AMR, Oxford JM, Metcalfe JA; Spontaneous cytogenetic abnormalities in lymphocytes from thirteen patients with ataxia-telangiectasia. Int. J.Cancer. 27: 311-319,1981
25. O'connor RD, Brown MG, Francke V; Immunologic and karyotypic studies in ataxia- telangiectasia; specificity of break points on chromosomes 7 and 14 in lymphocytes from patients and relatives. In Bridges, B.A. and Harnden, D.G.(Eds.): Ataxia-telangiectasia- A cellular and molecular link between cancer, neuropathology and -immune-deficiency. New York, Wiley, PP: 13-21. 1985.
26. Frankenberg D; A ferrous sulfate dosemeter independent of photon energy in the range from 25 Kev up to 50 Mev. Physics in Medicine and Biology,14: 597-605, 1469.
27. Slijepcevic P, Natarajan AT; Distribution of radiation- induced G_1 exchange and terminal deletion breakpoints in Chinese hamster chromosomes as detected by G- Banding. Int. J. Radiat. Biol., 66: 747-755, 1994.
28. Azzalin CM, Mucciolo E, Bertoni L, Giulotto E; Fluorescence in situ hybridization with a synthetic (T2 AG3)n polynucleotide detects several intra-chromosomal telomere-like repeats on human chromosomes. Cytogenetics and Cell Genetics, 78: 112-115, 1997.

29. Mozdarani H, Bryant PE; The effect of 9-B-D-arabinofuranosyl adenine on the formation of X-ray induced chromatid aberrations in x-irradiated G_2 human cells. Mutagenesis, 2: 371-374, 1987.
30. Aurias A, Dutrillaux B, Buriot D, Lejeune J; High frequencies of inversions and translocations of chromosomes 7 and 14 in ataxia telangiectasia. Mutation Research, 69: 369-374, 1980.
31. Pandita TK, Pathak S, Geard CR; Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. Cytogenetics and Cell Genetics, 71: 86-93, 1995.
32. Slijepcevic P; Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. Chromosoma,107: 136-140,1998.