

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

حسین مزارانی Ph.D.

\* دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه رادیولوژی

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

## چکیده

**\* هدف:** دورگ‌گیری فلئورسانس در جا (FISH)، شناسایی توالیهای خاص با طولهای متفاوت را در نواحی کروموزومی یا کل کروموزوم در سلولهای ایترفاز یا متافاز می‌سازد. پیشرفتهای جدید در این فن آوری 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 کلاستوزن و موتازن 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<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> 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 فلئورسانس 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 به‌طور کلی کم بوده است. به‌رحال 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 اما 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 ارگانیسما داشته باشد، بلکه می‌تواند در سیتوژنتیک بالینی، ژنتیک سلولهای سوماتیک، تشخیص سرطان و بررسی‌های بیان ژن نقش مهمی داشته باشد.

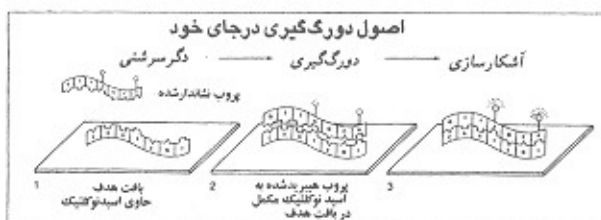
**کل واژگان:** روش FISH، آسیب‌های کروموزومی، اتاکسی تلانژکتیازی.

## مقدمه

روش دورنگ‌گیری فلوروسانس در جا (FISH) 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 دورنگ‌گیری در جا توسط گال و پارديو<sup>۲</sup> در سال ۱۹۶۹ (۱) با استفاده از پروبهای RNA نشاندار شده با رادیوآکتیو 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، زمینه 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<sup>۳</sup> بود که در روشهای سیتولوژیکی با آویدین - فلوروسانس 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 دورنگ‌گیری در جای اولیه به سیستم دورنگ‌گیری فلوروسانس 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.

۱۴۰



شکل ۱: اساس روش دورنگ‌گیری در جای خود فلوروسانس

در ژنتیک پزشکی، شناسایی شکستهای کروموزومی برای تشخیص کاریوتیپهای خاص مشول 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)<sup>۴</sup> هستند که در سلولهای سالم و بدخیم، فراوانی بالایی از آنها مشاهده می‌شود.

## Archive of SID

سرعت و دقت FISH دلیلی بر ایده‌آل بودن این روش جهت استفاده در غربالگری وسیع است. نرخ آشکارسازی با این روش برای آنپلویدیها، 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 لنفوبلاستویدی سالم و اتاکسی تلاترکیازی، قبل و بعد از تابش اشعه در مراحل G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> چرخه سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. اتاکسی تلاترکیازی (A-T) سندروم ژنتیکی مغلوب اتوزومی انسان است که از مشخصه‌های آن تلاترکیازی Occulocataaneous و اتاکسی پشرونده 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). انسپدانس هموزیگوس A-T در آمریکا تقریباً 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 می‌رسد (۸) و با افزایش فراوانی تنوپلاسم‌های 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 کلاستوزینیک پرتوهای یونساز و دیگر عوامل آسیب‌رسان به DNA مانند بلتوماسین، حساسیت بیشتری نسبت به افراد سالم نشان می‌دهند؛ همچنین اختلالاتی در شرایط *in vitro* و *in vivo* 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 (فتیوهاگلوتینین)<sup>۵</sup> (۱۵) و یا با تابش دودمانهای سلولی لنفوبلاستویدی و سنجش قابلیت تشکیل کلونی آنها نشان داده شد. مبانی مولکولی افزایش حساسیت سلولهای A-T به عوامل ژنوتوکسیک درک نشده است. هنوز اتفاق نظر کلی برای وجود نقص در سیستم ترمیم مولکول DNA در A-T وجود ندارد، چرا که با روشهای مختلف بیوشیمیایی و اندازه‌گیری تعداد پارگیهای تک‌ رشته‌ای یا هر دو رشته DNA، موفق به نشان دادن اختلال در سیستم ترمیم DNA نشده‌اند (۱۶، ۱۷)؛ اما ناهنجاریهای ساختاری کروماتین، اختلال در ترمیم که بر کیفیت ترمیم تأثیر می‌گذارد و اختلالات تمایزی، به عنوان

1. Fluorescent in situ hybridization
2. Gall and Pardue
3. Biotin
4. Cryptic translocations
5. Phytohemagglutinin

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

### \* تهیه کروموزومهای متافازی و انجام روش FISH

از سلولهای کشت شده شاهد و تابش دیده در مراحل G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> به ترتیب در زمانهای ۴ ساعت و یک هفته بعد از تابش اشعه نمونه گیری به عمل آمد. یک ساعت و نیم قبل از نمونه برداری ۱۰% M<sub>1</sub> با غلظت نهایی ۰/۰۴μg/ml دموکلین به محیط اضافه شد. سلولها در دمای ۲۰°C سانتریفوژ و در محلول هیپوتونیک ۰/۰۷۵m/L و KCL به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد. پس از سانتریفوژ مجدد، سلولها با ۱۰ ml محلول فیکساتیو کارنوی<sup>۳</sup> 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 زاویه دار، گستره متافازی تهیه شد. لامها پس از تهیه در فریزر ۲۰°C نگهداری شدند. قبل از انجام روش FISH، لامها به مدت ۲۴ ساعت بر روی سطح داغ دستگاه PCR با دمای ۵۴°C قرار داده شدند تا برای hybridization آماده شوند.

### \* انجام روش FISH

به طور کلی این روش در دو مرحله انجام شد:

**الف: دوزگیری:** 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 ۲xSSC به مدت دو دقیقه در دمای ۶۵°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 تلائنکتیازی، ۱۵μl از پروب کروموزوم کامل<sup>۴</sup> (Cambio/UK) هر یک از کروموزومهای مورد نظر به لوله های eppendorf منتقل و به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵°C در بن ماری قرار داده شدند، سپس انکوباسیون پروبها در بن ماری ۳۷°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

توجهی برای فونتیپ A-T گزارش شده است (۱۸، ۱۹). اخیراً نقص در سیستم ترمیم نوترکیبی<sup>۱</sup> dsb ایجاد شده در DNA در سلولهای A-T نشان داده شده است (۲۰).

در سلولهای کشت شده مبتلایان به A-T افزایش ناهنجاری کروموزومی به صورت خودبخودی و یا پس از مواجهه با عوامل ژنوتوکسیک و کلاستروژنیک مشاهده شده است. اولین موارد رخداد ناهنجاری خودبخودی سیترنیتیکی در سلولهای A-T در سال ۱۹۶۶ گزارش شد (۲۱) و یک سال بعد A-T نیز مانند برخی دیگر از سندرومها مثل مثل آنمی فانکونی و سندروم بلوم که رخداد شکستهای خودبخود کروموزومی در آنها بیش از افراد سالم است، به عنوان سندروم ناهنجاری کروموزومی طبقه بندی شد (۲۲). ناهنجاریهای کروموزومی به شکلهای مختلف و برای بیشتر کروموزومها از جمله شکستهای کروماتیدی، شکاف و تبادل کروماتیدی، قطعه های بدون سانتروم و دی سانتریک گزارش شد، همچنین Cohen و همکارانش (۲۳) نشان دادند که سطح شکستهای کروموزومی خودبخودی در فیروبلستهای A-T سه برابر بیشتر از سلولهای سالم است. اگرچه در بعضی از بیماران A-T آسیبهای ناپایدار کمی دیده می شود اما همه آنها سطوح بالایی از جابه جایی های کروموزومی پایدار را نشان می دهند (۲۴). بررسی ها نشان می دهد که بیشتر جابه جایی ها مستلزم شکست کروموزوم ۱۴ و دیگر کروموزومها است و رخداد این جابه جایی ها بیشتر بین کروموزومهای ۷ و ۱۴ مشاهده شده است. O'Connor و همکارانش (۲۵) نشان دادند که جابه جایی های بیشتری بین کروموزومهای ۱۴ و ۷ در لنفوسیت های T و B روی می دهند ولی در سلولهای لنفوبلاستی و یا فیروبلستی پوست بیماران A-T چنین چیزی مشاهده نشد.

### مواد و روشها

#### \* کشت سلول

سلولهای لنفوبلاستی نرمال (NG) و اتاکسی تلائنکتیازی (A-T) در محیط کشت (Sigma) RPMI-1640 حاوی ۱۵% سرم جنینی گاو (FCS)، پنی سیلین 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 فلاسک های ۲۵cm<sup>۲</sup> به تعداد ۱×۱۰<sup>۶</sup> سلول در ۱۰ ml محیط، کشت داده شد و به مدت دو روز در دمای ۳۷°C در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار نگهداری شد. سلولها در فاز G<sub>2</sub> چهار ساعت قبل از میتوز تحت تابش ۳۸۵ Gy/۰ اشعه گاما و در مرحله G<sub>1</sub> تحت تابش ۱ Gy اشعه گاما قرار گرفتند. از سلولهای G<sub>1</sub> یک هفته بعد از تابش گیری محصول برداری شد. یک ساعت و نیم قبل از برداشت سلولها ۱۰% M<sub>1</sub> محلول Democolcine برای توقف سلولها در مرحله متافاز به محیط کشت اضافه شد.

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



گری اشعه گاما، در مرحله G<sub>2</sub> نیز اختلالاتی خاصی را در این کروموزومها نشان نداد؛ اما در سلولهای تابش دیده در مرحله G<sub>1</sub> با دوز یک گری اشعه گاما و نمونه گیری بعد از یک هفته دو پدیده غالب 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 مناسانتریک را در اثر یک جابه جایی روبرسونی 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<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> انجام شد. با هیبریدیزاسیون و رنگ آمیزی مناسب، کروموزومهای موردنظر به وضوح قابل مشاهده و هرگونه اختلالی به آسانی قابل تشخیص بود. پانل A شکل ۳ نمونه ای از کروموزومهای شماره ۱ و ۴ رنگ آمیزی شده در سلولهای A-T را نشان می دهد.

در بررسی سلولهای شاهد A-T آنگونه که انتظار می رفت فراوانی بالایی از رخداد جابه جایی 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 قطعه کروموزومی را نشان می دهد) 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 در مرحله G<sub>1</sub> مسلماً باید فراوانی رخداد شکستهای کروماتیدی نسبت به سلولهای نرمال بیشتر باشد. با بررسی متافازها با رنگ فلئورسانس Dapi، تعداد زیادی از این آسیبها در کروموزومهای مختلف مشاهده شد اما تنها یک مورد از شکستهای کروماتیدی مربوط به کروموزوم شماره ۱ می شد که تصاویر آن در شکل ۳ پانلهای D و E نشان داده شد. تصویر E رنگ آمیزی Dapi را نشان می دهد و با دقت در این تصویر می توان چند مورد شکست کروماتیدی را در کروموزومهای مختلف مشاهده کرد که پیکان شکست کروماتیدی کروموزوم شماره ۱ را نشان می دهد.

در بررسی متافازهای تابش دیده در مرحله G<sub>2</sub> با دوز یک گری اشعه گاما و نمونه گیری پس از یک هفته عمده تاً 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 می دهد (تصویر F<sub>1</sub> کروموزومهای سالم شماره ۱ و A-T ۴ را نشان می دهد). 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 می شود که بخش کوچکی از بازوهای q و تقریباً تمامی بازوی P کروموزوم ۷ حذف شده است. در پانل H تریزومی کروموزوم شماره ۱۴ مشاهده می شود که البته رخداد تریزومی

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

ب: آشکار سازی<sup>۱</sup>: پس از انجام دورنگ گیری 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. ۱۰% محلول شیر بدون چربی روی هر لام منتقل شد و به مدت نیم ساعت در هوای مرطوب قرار داده شدند. سپس ۱۰% 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 ۲xSSC، ۱۰% Tween و آب مقطر، هر بار به مدت ده دقیقه شستشو داده شدند. انکوباسیون لامها با ۱۰% بیوتین به مدت نیم ساعت در هوای مرطوب ادامه یافت که متعاقب آن شستشو در محلول شستشو انجام و سپس رنگ آمیزی 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 فلئورسانس Dapi<sup>۲</sup> رنگ آمیزی شدند و پس از شستشو در محلول ۲xSSC در دمای اتاق خشک شدند. ۱۵% از نگهدارنده رنگ فلئورسانس (Vectashield) به روی هر لام منتقل شده و روی لامها با لامل پوشانده شد. برای آنالیز کروموزومها از میکروسکوپ فلئورسانس Zeiss متصل به دوربین ویدئویی Microimager استفاده شد. این سیستم مجهز به سه صافی FITC، Dapi و Rhodamine است. تصویر میکروسکوپی به یک برنامه کامپیوتری Smart capture VP (Mysis, 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 فلئورسانس مشاهده می شوند. در این بررسی کروموزومهای شماره ۱ و ۷ به رنگ قرمز و کروموزومهای ۴ و ۱۴ به رنگ سبز نشاندار شده بودند.

## یافته ها

در این بررسی چهار کروموزوم شماره ۱، ۴، ۷ و ۱۴ رنگ آمیزی 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 می شود (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 می شود. 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 ۳۸۵/۰

1. Detection

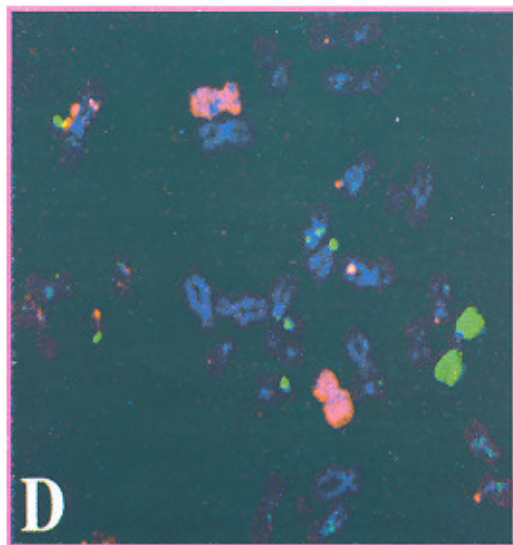
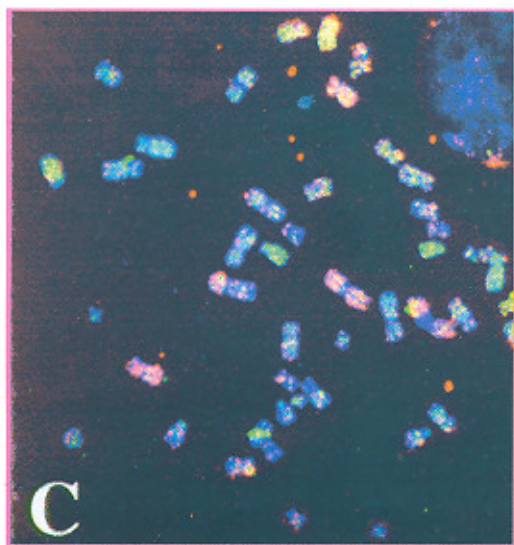
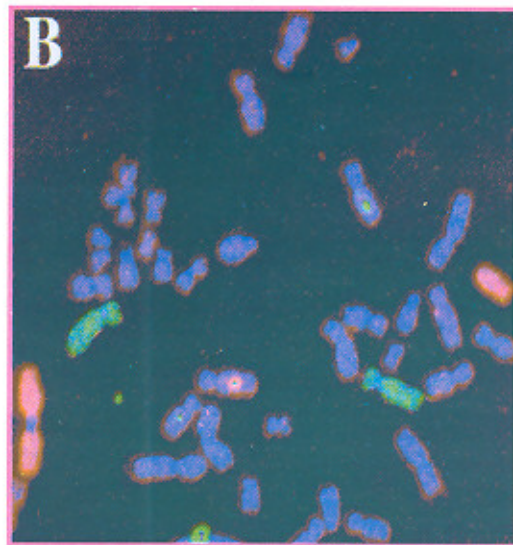
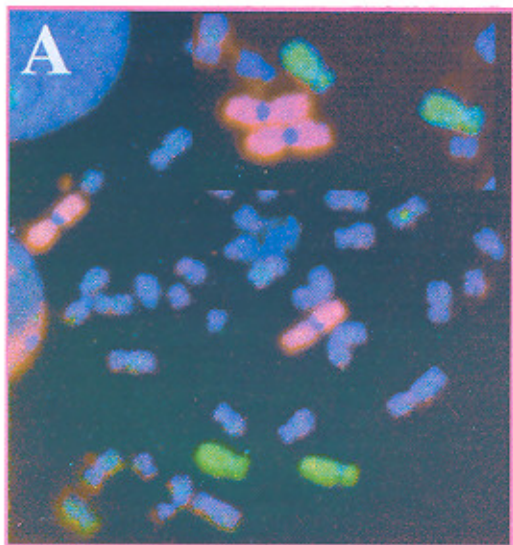
2. 4,6-diamidino-2-phenylindole





شماره ۱۴ است. همانگونه که در تصویر ل نشان داده شد، دو کروموزوم شماره ۱۴ با اتصال در محل سانترومر طی یک جابه‌جایی روبرتسونی، کروموزومی متاساتریک 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.

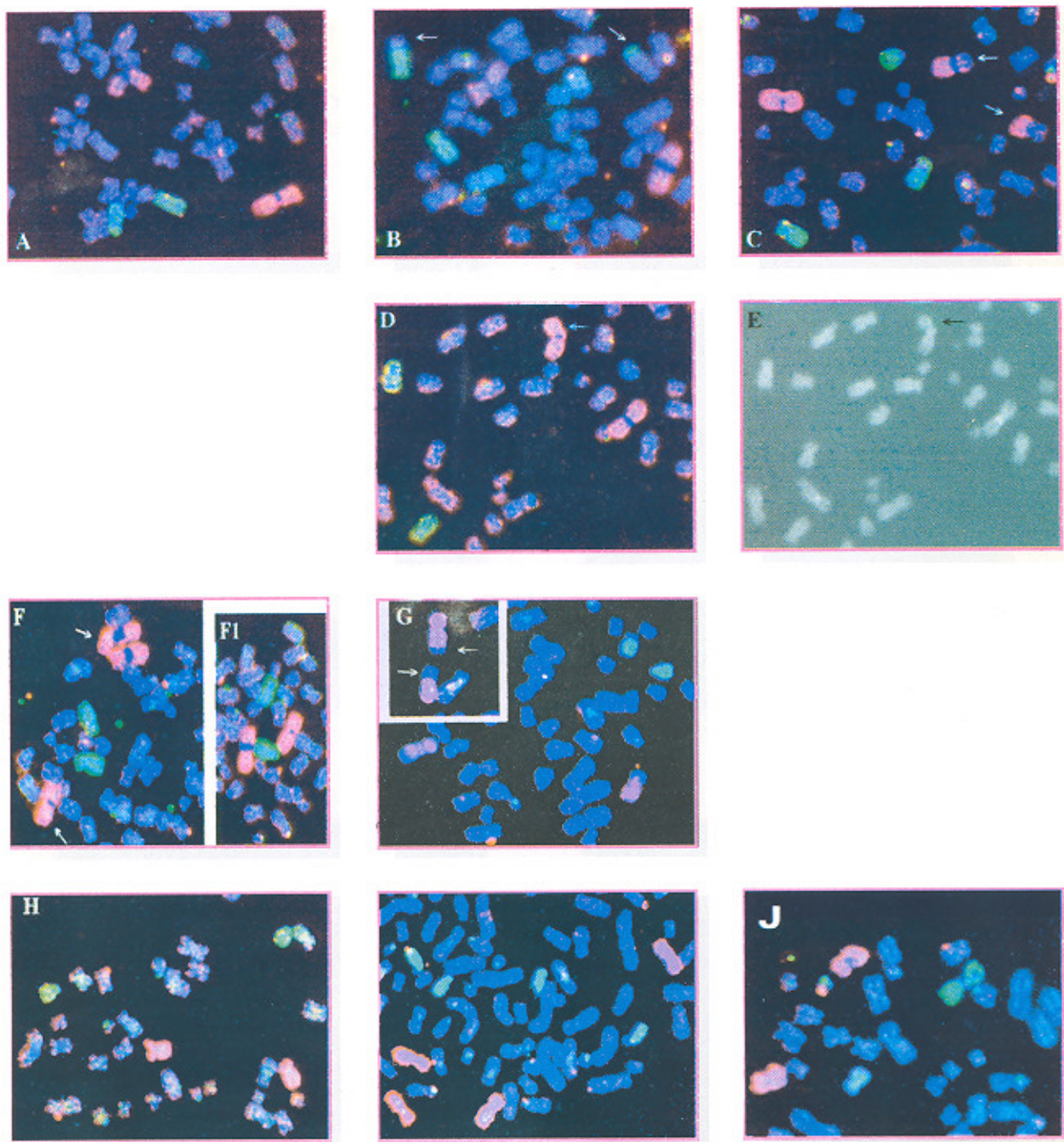
نمی‌تواند صرفاً به دلیل تابش‌گیری از اشعه باشد زیرا این پدیده در نتیجه تغییر در عملکرد دوک سلولی در هنگام تقسیم روی می‌دهد. پانل ۱ شکل ۳ رخداد endoreplication را نشان می‌دهد که از هر نسخه کروموزومهای ۷ و ۱۴، چهار کروموزوم دیده می‌شود که در واقع یک سلول تتراپلوئید است. ناهنجاری دیگر مشاهده شده تریزومی کروموزوم



۱۴۳

شکل ۲. تصاویری از نقاشی کروموزومهای ۷، ۱۴ و ۱۴.۱. A: کروموزومهای ۷ و ۱۴ سالم؛ B: حذف بازوی کروموزوم ۷؛ C: نقاشی هر چهار کروموزوم در یک متافاز؛ D: جابه‌جایی روبرتسونی بین کروموزومهای ۷ و ۱۴.





شکل ۳: 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 تریزومی؛ H: تتراپلویدی و I: جابه‌جایی روبروتسونی همراه با تریزومی ۱۴

۱۴۴

گیسا و یا نواریندی گیسا مورد بررسی قرار می‌گیرد. اخیراً با استفاده از روش دورنگ‌گیری فلورسانس در جا (FISH) که در آن از مخزنهای ژنی خاص هر کروموزوم استفاده می‌شود، آسیبهای کروموزومی 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

### بحث

پرتوهای یونساز، اشعه فرابنفش، عوامل آلکیل‌کننده و دیگر کارسینوژنهای موتاژنیک توانایی القاء آسیبهای کروموزومی در شرایط *in vivo* و *in vitro* را دارند. انواع آسیبهای ایجاد شده (کروموزومی و کروماتیدی) بستگی به ماهیت آسیبهای DNA و مرحله چرخه سلول دارد. آسیبهای ایجاد شده معمولاً با استفاده از رنگ آمیزی



تثعش 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 مرحله G<sub>1</sub>، رخداد تریزومی مانند تریزومی کروموزوم شماره ۱ (پانل F، شکل ۳) و تراپلویدی (پانل A، شکل ۳) مشاهده شد، نمی‌تواند ناشی از تشعشع باشد چراکه 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 آپلویدی می‌شود. مشاهده جابه‌جایی روبرتسونی در سلولهای A-T (شکل ۳، پانل L) و سلولهای نرمال (شکل ۲، پانل D) بین کروموزومهای ۱۴ پدیده نادری است. Pandita و همکاران (۳۱) رخداد این نوع جابه‌جایی که مستلزم اتصال end-to-end کروموزومها است را در سلولهای لئوفلاستویدی 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 شده که اندازه تلومر آن نسبت به سلولهای نرمال کوتاهتر و فعالیت تلومرازی آن کمتر است (۳۱).

مشاهدات انجام شده در این بررسی حاکی از سهولت تشخیص انواع ناهنجاریهای کروموزومی در ژنوم انسان یا استفاده از روش FISH است که ممکن است خودبخود یا تحت تأثیر عواملی چون پرتوها ایجاد شوند. روش FISH با بهره‌گیری از پروبهای خاص کروموزومی به درک منشأ 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 همه وقایعی است که در یک سلول رخ می‌دهد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر P.E. Bryant استاد دانشگاه سنت آندروس انگلستان که امکان انجام این تحقیق را در آزمایشگاه خود فراهم 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

- 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.
- 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

روش نواریندی-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 آشکار سازی 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 (نصاویر 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 شده که سلولهای نرمال قادر به ترمیم آسیبهای کروماتیدی ایجاد شده در مرحله G<sub>2</sub> چرخه سلول هستند (۲۹)، لذا انتظار می‌رود که تعداد آسیبهای سلولهای نرمال پس از تابش دوز کم اشعه در حد ۰/۳۸۵ Gy کاهش یافته و در کروموزومهای مورد بررسی در این مطالعه دیده نشوند. مسلماً سلولهایی که در مرحله G<sub>1</sub> تحت تابش یک‌گری اشعه قرار گرفته‌اند، طی مدت یک هفته فرصت کافی برای ترمیم آسیبهای را دارا بوده و سلولهایی که احتمالاً دچار آسیبهای کروموزومی جدی شده‌اند با رخداد مرگ میتوزی از جامعه 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 آسیبهای از نوع پایدار هستند.

اگر چه جابه‌جایی بین کروموزومها در سلولهای تابش ندیده 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)، اما بررسی‌های انجام شده با لئوفلاستویدی 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 لئوفلاستویدی و یا فیروپلاستی پوست بیماران A-T گزارش کرده‌اند و مشاهدات در این تحقیق که با سلولهای لئوفلاستویدی انجام شده مؤید آن است. پانلهای D و E شکل ۳ شکستهای کروماتیدی در کروموزوم شماره ۱ را پس از تابش G<sub>2</sub> در سلولهای A-T نشان می‌دهند. حساسیت سلولهای A-T در مرحله G<sub>2</sub> حداقل دو برابر سلولهای نرمال است، اما در عین حال نشان داده شده که سلولهای A-T نیز همچون سلولهای نرمال قادر به ترمیم شکستهای کروماتیدی هستند (۱۴). از آنجایی که اثر

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, occulocutaneous 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 perspectives. 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 (Washington 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<sub>2</sub> 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 phytohemagglutinin. 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, Koier 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 dosimeter 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<sub>1</sub> 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<sub>2</sub> 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.

