لیلا دریانورد،کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی
دکتر طاهره ناجی،عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

مروری بر ژنومیک سرطان سینه و روش های نوین تشخیص و درمان

در مقایسه با ژنتیک که بیشتردر راستای بررسی ژن های منفرد است، ژنومیکس تمام ژن های ژنوم و درهم‌کنش‌های میان آنها و محیط‌شان را مورد مطالعه قرار می‌دهد. در این میان دانش ژنومیکس سرطان تغییرات اساسی را در شیوه تفکر دانشمندان، درباره سرطان به وجود آورده است. درمان بسیاری از انواع سرطان ها هنوز شامل عمل جراحی برای درآوردن تومور، به‌علاوه پرتودهی اضافی یا شیمی‌درمانی برای کشتن هرگونه سلول باقیمانده است که هر کدام از این روش ها می‌تواند دارای عوارض جانبی جدی باشد. برای نمونه بسیاری از داروهای معمول شیمی‌درمانی موجب ریزش مو، حالت تهوع و افت خطرناک سلول های خونی سفید و قرمز می‌شوند. اما خوشبختانه تحقیقات جدید ژنتیکی روش های بهتری را در تشخیص، هدفگذاری و درمان موثر سرطان، همچنین مدیریت بهینه اثرات جانبی به ارمغان آورده است. با تمرکز بر روی ژن های مسئول رشد و انتشار سرطان های گوناگون، محققان می‌توانند هدف‌های بیشتری را برای داروها شناسایی کنند و روش های جدید درمانی را برای از بین بردن سلول های سرطانی، بدون آسیب به بافت های سالم طراحی کنند.

محققان سرطان، اطلاعات ژنومیکس را برای پیشگویی دقیق اینکه کدام انواع سرطان احتمال انتشار تهاجمی دارند و کدام انواع، احتمالاً به درمان‌های معمول پاسخ می‌دهند و یا نیاز به روش های متفاوتی دارند.

هدف نهایی ژنومیکس دارویی (دانش مطالعه چگونگی اثرگذاری ژن ها به روشی که افراد به داروها پاسخ دهند) تولید داروهای سفارشی برای آرایش‌های ژنتیکی منحصر به فرد افراد است. هم اکنون چندین دارو از این روش تولید شده و در حال توسعه است. برای نمونه در سال ۱۹۸۸ محققان دانشگاه کالیفرنیا ارتباط بین یک ژن مشخص و یک شکل تهاجمی از سرطان سینه را یافتند که منجر به ایجاد یک آنتی‌بادی به نام هرسپتین شد. دو سال بعد، دانشمندان در دانشگاه پنسیلوانیا موفق به کاربرد هرسپتین به عنوان داروی شیمی‌درمانی برای زنان مبتلا به مراحل ابتدایی سرطان تهاجمی سینه شدند. هرسپتین خطر بازگشت بیماری را برای این بیماران تا نصف کاهش داد (٤).

سرطان سینه

سرطان سینه شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده در زنان و دومین دلیل مرگ و میر در اثر سرطان در ایالات متحده امریکا گزارش شده است. هم‌اکنون آمار سالیانه سرطان سینه در جهان، به یک میلیون مورد تشخیص داده شده، ٤٠ هزار مورد مرگ و میر، یک‌پنجم مرگ و میر در زنان ٥٠-٤٠ ساله و ١٠٠-٦٠ میلیارد دلار هزینه‌های مستقیم و غیر مستقیم مربوط به آن رسیده است.

پیش از سرطانی شدن سلول ها، تعدادی اشتباه در کدهای ژنتیکی رخ می‌دهد که پزشکان این اشتباهات را نقص یا جهش ژنتیکی می‌نامند. بیشتر این جهش‌های ژنی به دلیل مواجه با مواد سرطان زا یا اشتباهات سلول ها حین کپی کردن اطلاعات ژنتیکی، پیش از تقسیم سلولی، در طول زندگی ما رخ می‌دهند. بسیاری از این سلول ها توسط سیستم ایمنی بدن از بین می‌روند، بنابراین معمولا سالیان زیادی طول می‌کشد تا تعداد جهش ها و اشتباهات ژنتیکی آن قدر زیاد شود تا منجر به وقوع سرطان شود. از این رو این نوع از سرطان ها در سنین بالا پدید می‌آید و عموما خطر ابتلا در سنین جوانی بسیار کمتر از سنین میانسالی و پیری است.

امکان تولد یک شخص با نقص ژنتیکی که خطر سرطان سینه را افزایش دهد به این معنا نیست که ضرورتا شخص مبتلا به سرطان شود، بلکه نسبت به اشخاص معتدل دارای احتمال بیشتری برای ابتلاست.

ژن های سرطان سینه

نخستین نقص ژنتیکی مربوط به سرطان سینه در ژن های BRCA1 و BRCA2 آشکار شد. زنان دارای این ژن ها ٥٠ تا ٨٠ درصد احتمال ابتلا به سرطان سینه را در طول عمر خود دارند. آزمایش های ژنتیکی برای زنانی که به احتمال زیاد دارای ژن های BRCA1 و BRCA2 و همچنین دو ژن دیگر یافت شده به نام‌های TP53 و PTEN قابل دسترسی هستند (١).

طبقه‌بندی تومورهای سرطان سینه

تومورهای سینه بر اساس تفاوت در بیان ژن، فنوتیپ (شکل ظاهری)، پیش‌آگهی و حساسیت به درمان های ویژه در ٤ زیرنوع luminal A، luminal B، بیان اضافی HER2 و پایه ای گروه‌بندی می‌شود. طبقه‌بندی دیگر قدیمی بر پایه وضعیت گیرنده استروژن

(ER)، گیرنده پروژسترون (PR) و شبه گیرنده فاکتور رشد پوستی انسانی (HER2/neu)2 است (۵).

فناوری ریزآرایه‌ها (Microarrays)

با انجام پروژه ژنوم انسانی، شاید به شناسایی بیش از ۵۰ هزار ژن انسانی بانجامد. سوال مهمی که در مبحث سرطان مطرح می‌شود چگونگی استفاده از این اطلاعات برای بهبود بیماران سرطانی است. یکی از تکنیک‌های مهمی که در این جهت توسعه داده شده آنالیز ریزآرایه‌ای (microarray analysis) است (۲).

ریزآرایه‌های DNA، بیشتربرای کنترل تغییرات در سطوح بیان ژن ها به کار می‌روند. در این نوع از کاربرد، یک سنجش ساده ریزآرایی همزمان می‌تواند بیان هزاران ژن را از راه تبیین رونوشت‌های مربوطه (سطوح mRNA) آنالیز کند. بیان ژن با مقایسه میزان نسبی mRNA در دو جمعیت سلولی مشخص تخمین زده می‌شود. mRNA هدف حاصل از نمونه‌های شاهد (کنترل) و آزمایشی توسط رنگ فلورسنتی نشاندار می‌شود و پس از هیبریداسیون، مقدار mRNA باند شده با تراشه به واسطه تراکم نور ساطع شده‌ی مربوط تخمین زده می‌شود. سپس سطوح mRNA در نمونه‌های شاهد و آزمایشی مقایسه شده و اطلاعات بیان افتراقی به منزله نسبت یا تغییر انجام یافته گزارش می‌شود (۳).

یک ریزآرایه آرایشی منظم از نمونه‌های DNA شناخته شده یا نشده‌ی متصل به یک محافظ جامد است. هر لکه‌ی DNA بر روی ریزآرایه که پروب خوانده می‌شود، معمولا کمتر از ۲۰۰ میکرومتر قطر دارد و یک آرایه کامل نوعاً شامل هزاران لکه (پروب) است. پروب‌های چسبیده به محافظ جامد می‌توانند الیگونوکلئوتید، cDNA و یا توالی‌های ژنتیکی باشند. آرایه می‌تواند به وسیله سنتز چاپ عکس تهیه شده از الیگونوکلئوتیدهای طبیعی باشد یا اینکه نمونه‌های DNA مستقیماً توسط پین‌ها، قلم یا فناوری چاپگرهای جوهرافشان به سطح آرایه اتصال یابند. چندین ماده شیمیایی مشخص برای اتصال پروب‌ها به سطح به کار گرفته می‌شوند و هیبریداسیون به شکل الکترونیکی کنترل می‌شود. توالی هدف هیبریدشده با پروب روی سطح آرایه به صورت رادیواکتیو یا فلورسنت مشخص و نمایان می‌شود. در اینجا به برخی از انواع آرایه‌ها اشاره می‌شود:

آرایه‌های فیلتری

این نوع آرایه‌ها با به کارگیری نمونه‌های پرتراکم DNA و به طور معمول cDNAها به غشاهای هیبریداسیون نایلونی مشابه با نمونه‌های آنالیز ساترن تهیه می‌شوند. آرایه‌های فیلتری، که از نظر تجاری قابل دسترس‌اند و ابزار خاصی نمی‌طلبند، تنها برای نمونه‌های RNAهای کوچک در حدود ۵۰ نانوگرم- که در واکنش های رونویسی معکوس برای سنتز پراب نشاندار به کار می‌روند- مفید واقع می‌شوند.

ریزآرایه‌های DNA شیشه‌ای

این نوع ریزآرایه DNA را با کارایی ربوتیک به سطح شیشه‌ای می چسباند. در این روش cDNAها و کلون‌های ژنومی مورد استفاده قرار می گیرند، هرچند که الیگونوکلئوتیدها نیز مورد استفاده در این روش دارند. این شیوه مناسب پروب‌هایی است که به خوبی از راه کووالانسی به سطح شیشه اتصال می‌یابند.

آرایه‌های الیگونوکلئوتیدهای پرتراکم

در این مدل آرایه‌های الیگونوکلئوتیدی در شرایط طبیعی روی یک محافظ مسطح جامد سنتز می‌شوند. این مدل توسط شرکت «آفیمتریکس» با پیونددهنده‌های حاوی گروه نشانگر جداشونده‌ی فتوشیمیایی به یک سطح شیشه‌ای ابداع شد.

فناوری ریزآرایه روشی را برای کنترل سطوح بیان همزمان RNA در هزاران ژن موجود در تومورهای ابتدایی و سل‌لاین‌ها (دودمان‌های سلولی) فراهم می‌کند. اصولاً اطلاعات به دست آمده از چنین تحقیقاتی می‌تواند تحولی را در شناسایی سرطان به وجود آورد. بر این اساس که رفتار کلی یک سرطان می‌بایست از راه بیان ژن های دخیل آن تعیین شود. بنابراین شناسایی سری‌های ژن هایی که بیان یا عدم بیان آنها یک خصوصیت منفرد تومور را تعریف می‌کند، همراه با شناسایی دقیق و رفتار درمانی آن ممکن می‌شود.

از کاربردهای دیگر ریزآرایه‌ها می‌توان به تشخیص و شناسایی جهش‌ها اشاره کرد. برای نمونه، امروزه در زمینه سرطان سینه نیاز داریم به تعیین جهش‌های ژنی گسترده در سطح جمعیت، درون ژن‌های نظیر BRCA1 ، BRCA2، P53 و CHK2 که زمینه‌ساز رشد پیشرفت بیماری هستند. چنین تحقیقاتی، اطلاعاتی را درباره شیوع رده‌های جهش فراهم کرده و از راه مجموعه اطلاعات اپیدمیولوژیکی نقش احتمالی عوامل سبب‌شناسی پیشرفت سرطان را روشن‌تر می‌کند. تحقیقات غربالگری در مقیاس وسیع روی ژنهای سرطان سینه که در آنها جهش سوماتیکی رخ داده است می‌تواند منجر به شناسایی نشانگرهای تشخیصی مولکولی شود و از راه آنالیز طیف جهشی مدارکی دال بر نقش احتمالی مواد شیمیایی در پیشرفت سرطان سینه فراهم کند.

رشد و پیشرفت تومور

چندین روش برای سنجش رشد و پیشرفت تومور به کار رفته است. هیلسنبک و دیگران یک سیستم مدل پیوند خارجی برای بررسی تغییرات در بیان ژن، حین ایجاد مقاومت حاصل شده نسبت به تاموکسیفن در دودمان سلولی سرطانی انسانی (MCF-7) به کار گرفتند. با تزریق سلول هایMCF-7 به پدهای آغشته به چربی پستان موش های فاقد غده تیموس، همراه با یک تکه غذای حاوی استروژن، اجازه رشد به سلول های توموری داده

شد. هنگامی که تکه غذا جدا شد و موش ها مورد تیمار تاموکسیفن قرار داده شدند، تومورها کوچک شده و به مدت چندین ماه پیش از ایجاد مقاومت به تاموکسیفن و ازسرگیری رشد به همان حال باقی ماندند. الگوهای بیان برای تومورهای اصلی (اولیه) تحریک شده با استروژن (OS)، پیش از تیمار تاموکسیفن، برای تومورهای حساس به تاموکسیفن (TS) در طول تیمار، البته پیش از ایجاد مقاومت و برای تومورهای مقاوم به تاموکسیفن (TR) در پی ازسرگیری رشد تعیین شد. دو ژن ERK2 وHSF1 که نمودشان در فرایند انتقال از OS به TR تغییر یافته بود، با آزمایش وسترن بلات گزینش شدند. نتیجه وسترن بلات اطلاعات آرایه را تایید کرد: کنترل مثبت (افزایشی) در پروتئین HSF1 که پاسخ سلولی به استرس دخیل است، در سلول های TS مشاهده شد و برعکس این پاسخ در سلول های OS به کنترل منفی (کاهش) پروتئین یاد شده، انجامید. همچنین بیان ژن ERK2 کیناز در سلول های TS نسبت به سلول های توموری OS افزایش یافت.

امضاهای مولکولی؛ ابزار تشخیص و پیش‌بینی سرطان‌ها

فعالیت سلولها در شرایط آسیب‌دیدگی به طور فعال از راه تغییرات خاصی در بیان ژن تنظیم می‌شود. بنابراین اطلاعات ایجاد شده‌ی بیان از راه ریزآرایه‌ها می‌تواند برای مطالعه وابستگی فنوتیپ سلولی ویژه مورد استفاده قرار گیرد. برخی اشکال معلوم و مشخص بیان ژن که موسوم به امضا (نشانه)های مولکولی هستند برای تشخیص حالات کلینیکی مشخص و یا رده و مرحله بیماری مفید واقع شوند (۲).

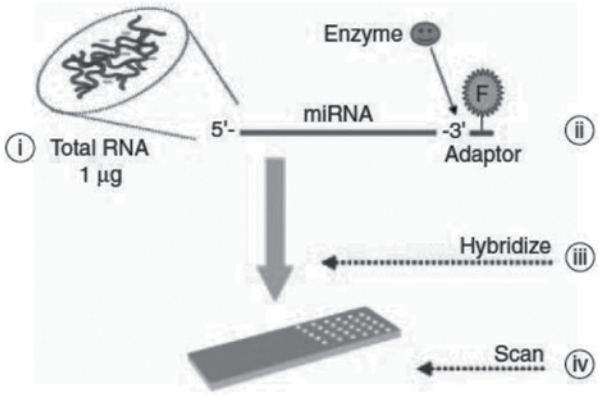
فناوری ریزRNAها

پیچیدگی یوکاریوتی در پیوند با بیان و تنظیم ژنها از راه درهم‌کنش‌های: RNA-DNA، RNA-RNA، DNA-پروتئین و RNA-پروتئین است. چندی است که نقش مولکول های RNA در تنظیم ژن های ارگانیسم‌های عالی آشکارتر شده است. به ویژه کشف این نکته که حدود ۹۷٪ خروجی رونویسی شده در ارگانیسم‌های عالی به شکل RNAهای غیر رمزگذار شامل: rRNA، snoRNA، tRNA، عناصر جهنده، نواحی رونویسی نشده‌ی ۵' و ۳'، اینترونها، نواحی بین ژنی و ریزRNAها نشان داده شده‌اند. عملکرد ریز RNAها از راه تنظیم منفی بیان ژن با تجزیه یا بازداری هدف‌های mRNA آنها و در نتیجه شرکت در فرآیندهای سلولی بسیار متنوع فیزیولوژی و آسیب‌شناسی شامل: رشد، تکثیر سلول، تمایز و مسیرهای آپوپتوزیس انجام می‌شود. بیان اشکال ریزRNAها در بسیاری از انواع سرطان ها شناسایی شده است. گزارش‌های اخیر نشان داده که اشکال بیان تغییرات ریزRNAها در سرطان های گوناگون انسانی تغییر می‌کند و عملکرد مهارکننده‌های انکوژن‌ها یا تومورها را آشکار ساخته است. بیان غیر طبیعی ریزRNA به طور فزاینده‌ای به ویژگی رایج سرطانهای انسانی مبدل شده است.

تخمین زده شده که ریزRNAها حدود یک‌سوم ژن ها را در ژنوم انسانی تنظیم می‌کنند. پژوهش های واپسین نشان داده‌است که ریزRNAها در دسته‌هایی سازمان‌بندی می‌شوند و با یکدیگر در تنظیم رونویسی شراکت می‌کنند، هرچند هر یک پروموتر خویش را داراست. تقریبا ۵۰٪ ریزRNAها از ژنهای فاقد رمز پروتئین رونویسی می‌شود و بقیه در اینترون‌های ژن های رمزگذار هستند.

نقش ریزRNAها در سرطان

رابطه میان ریزRNAها و سرطان هنگام کشف ژن های miR-16 و miR-15 واقع در ناحیه‌ای از کروموزوم ۱۳ –که در بیش از ۶۵٪ بیماران مبتلا به کم‌خونی (لوسمی) لنفوسیتی مزمن و در بیش از نیمی از سلول های B لوسمی لنفوسیتی مزمن حذف شده– نشان داده شد. سپس معلوم شد که تعداد مشخصی از ژنهای ریزRNAها روی جایگاه‌های شکننده (نواحی ناپایداری که موجب افزایش ناپایداری DNA در سلول های سرطانی می‌شوند) یا نواحی ژنومی مرتبط با سرطان قرار دارند. ریزRNAها می‌توانند بیان ژنهای وابسته با سرطان را مهار کنند، و خاصیت تومورزایی را در بافت های مختلف با عملکرد خود به منزله انکوژن یا مهارکننده تومور افزایش داده یا بازدارند. این ویژگی ریزRNAها و هدف های مربوطه آنها را به عنوان نشانگرهای زیستی (بیومارکرها)ی ایده‌آل برای تشخیص و پیش‌بینی تومورها و استراتژی‌های جدید درمانی برای سرطان معرفی کرده است. فزونسازی، خودمختارشدن یک عامل رونویسی یا دمتیله شدن جزایر CpG در نواحی پروموتر ژنهای سرطانی انسانی می‌توانند در نتیجه بیان اضافی ریزRNAها رخ دهند. ریزRNAهای مهارگر تومور می‌توانند با حذف، خاموشی خارج ژنی یا از دست دادن فاکتورهای رونویسی موجب تنظیم کاهشی تومور شوند (۵).



شکل ۱) فرآیند کاری یک ریزآرایه ساده mercury LNA
(i)آماده‌سازی کل RNA، (ii) نشاندار کردن RNA با استفاده از کیت ویژه (iii) هیبریداسیون شبانه (iv) اسکن و آنالیز

Cancer Type	miRNA	Up/Down Regulation	References
Breast	miR-21 ,miR-155, miR-23, and miR-191 miR-205,miR-145,miR-10b,and miR-125b	Up Down	(57,58)
Ovary	miR-200a,miR-200c, and miR-141 miR-199a,miR-140,miR-145,and miR125b1	Up Down	(61)
Colon	miR-135,miR-21,miR-15b,miR-181b,miR-191,miR-200c miR143,miR145,miR-133b,and miR-126	Up Down	(72,79) (75, 76, 77)
AML	Has-miR-191,199a,miR155	Up	(83,86)
CML	miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR- 20a, and miR-92a-1	Up	(91)
CLL	miR-21,miR-155 miR-15a,miR16,miR-29, miR143,miR-45,miR-30d,miR-let7a,miR-181a	Up Down	(96) (32, 40, 94, 96)
Endometrioid adenocarcinoma	miR-205,miR-449, miR-429 miR-193a,miR-204, miR-99b	Up Down	(100)

جدول ۱- ریزRNAهای مرتبط با سرطان

یکی از روشهای تخصصی استفاده از ریزRNAها به عنوان بیومارکر تشخیص سرطان‌ها ریزآرایه‌ی mercury LNA است. ریزآرایه‌های LNA-enhanced mercury دارای حساسیت بالاتر، اختصاصی بودن عالی و قابلیت بالای بازتولید میان‌آرایه‌ای هستند. روش ساده و سریع نشاندار کردن RNA نیاز به ازدیاد یا غنی‌سازی ریزRNA را برطرف می‌کند و جابه‌جایی RNA را که می‌تواند بالقوه ایجاد انحراف و اشتباه در آزمون تجربی کند، به حداقل می‌رساند. شکل ۱، طرح کلی فرآیند استفاده از ریزآرایهmercury LNA را نمایش می‌دهد (۷).

ریزRNAها در سرطان سینه

تومورهای سینه بر اساس تفاوت در بیان ژن، فنوتیپ (شکل ظاهری)، پیش‌آگهی و حساسیت به درمانهای ویژه در ٤زیرنوع luminal A، luminal B، بیان اضافی HER2 و پایه ای گروه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی دیگر قدیمی بر پایه وضعیت گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR) و شبه گیرنده فاکتور رشد پوستی انسانی (HER۲/neu) ۲ است.

نشان داده شده که ریزRNAهای چندگانه با امضای مشخص سرطانی در پیوندند. در سرطان سینه تنظیم افزایشی miR-۲۱ در نمونه‌های توموری گزارش شده است، درحالی‌که ریزRNAهای دیگر الگوی نامنظمی از بیان را نشان داده‌اند. اختصاصی بودن بیان ریزRNA در مراحل مختلف تومور سینه به گونه‌ایست که سطح بیان ریزRNA می‌تواند برای تشخیص دودمان های سلولی سینه بر اساس وضعیت وخامت آنها به کار گرفته شود. به عنوان مثال بالارفتن بیان چندین ریزRNA در دودمانهای سلولی تومورزا در مقایسه یا دودمانهای غیرتومورزا مشاهده شده است. در تحقیق مشابهی نشان داده شده که در بافت سرطانی سینه miR-۲۱ خیلی اوقات سطوح بالاتری را در سلولهای سرطانی در برابر بافت سالم دارا بوده است.

بیان افتراقی ریزRNAها و همبستگی آنها با ویژگی‌های آسیب‌شناسی زیستی سرطان سینه، همانند مرحله تومور، تهاجم عروقی و بیان گیرندهای استروژن و پروژسترون، می تواند در آینده به عنوان بیومارکرهای مراحل مشخصی از سرطان سینه به کار رود(۵). همچنانکه وجوه مختلف نقش عملکردی ریزRNAها در بیولوژی سرطان ناشناخته مانده، انتشار ریزRNAها بیومارکرهای کوچک نوینی را برای سرطان سینه و انواع دیگر فراهم خواهد کرد و روش‌های اصلاح شده‌ی طبقه‌بندی انواع سرطان سینه منجر به رژیم‌های درمانی سفارشی و منحصر به فرد و دور کردن بسیاری از تاثیرات سمی داروهای بی‌فایده از بیماران خواهد شد (٦).

منابع:

1-Cooper, Colin S. Applications of microarray technology in breast cancer research: http://breast-cancer-research.com/content/3/3/158

2-Okamoto, Oswaldo Keith. DNA microarrays in cancer diagnosis and prognosis

3-Cancer Genomics Promises to Revolutionize Patient Care. AAMC

4-Moslemi Naeini, Mozhgan & Ardekani, Ali M. Noncoding RNAs and Cancer

5-Heneghan, H. M., et al. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. Journal of Oncology ;Volume 2010, Article ID 950201, 7 pages

6-http://www.nature.com/naturemethods