بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه

برای دریافت درجه دکترای حرفه ای دامپزشکی

عنوان:

مطالعه موتاسیون های موجود در اگزون شماره یک از ژن p53 در تومورهای بافت پستان سگ به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز و تعیین توالی

استاد راهنما:

دکتر رضی اله جعفری جوزانی

اساتید مشاور:

دکتر جواد اشرفی هلان

دکتر محسن حنیفه

پژوهشگر:

ندا زاهلی پیله رود

شهریور ماه ۱۳۹۱

نام خانوادگی دانشجو: زابلی پیله رود **نام:** ندا

عنوان پایان‌نامه: مطالعه موتاسیون‌های موجود در اگزون شماره یک از ژن p53 در تومورهای بافت پستان سگ به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تعیین توالی

استاد راهنما: دکتر رضی‌اله جعفری جوزانی **اساتید مشاور:** دکتر جواد اشرفی هلان، دکتر محسن حنیفه

مقطع تحصیلی: دکترای حرفه‌ای **رشته** : دامپزشکی **دانشگاه** : تبریز

دانشکده: دامپزشکی **تاریخ فارغ‌التحصیلی** :۱۳۹۱ **ت‌عداد صفحات:** ۱۰۷

کلید واژه: تومور، ژن p53، سگ، جهش، PCR، تعیین توالی DNA

چکیده:

سرطان در سگ‌ها به طور معمول رخ می دهد و نیازمند توجه فوری و قاطع دامپزشک می باشد. بدلیل پیشرفت در بهبود مراقبت‌های دامپزشکی، سگ‌ها تا سنین بالا زندگی می‌کنند که باعث شیوع بالای انواع سرطان‌ها در این زمان می‌شود. سرطان امروزه علت بیماری‌های منجر به مرگ در سگ‌ها به شمار می-رود و به همین ترتیب اهمیت زیادی در جامعه بدست آورده است. فاکتورهای محیطی و ژنتیکی (آلودگی هوا، آلودگی آب، عوامل عفونی و پرتوهای یونیزه و غیریونیزه و بویژه هورمون‌ها و داروها، خطرات شغلی و فاکتورهای خطرساز مربوط به زندگی مثل رژیم غذایی) تاثیر زیادی روی وقوع زمان سرطان دارند. بنابراین امروزه تاکید بیشتری برروی توسعه یادگیری درباره فاکتورهای ژنتیکی و محیطی است که در سرطان‌های سگ‌سانان روی تغییرات سلولی و مولکولی تاثیر دارند. تومورهای پستان سگ‌سانان نصف تومورهای سگ‌های ماده را شامل می شود که تقریبا ۵۰-۴۰٪ از آنها به صورت بدخیم رخ می‌دهد، هدف از اجرای این طرح بررسی میزان موتاسیون‌های رخ داده در اگزون شماره یک از ژن p53 در تومورهای بافت پستان سگ به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) و تعیین توالی آنها بوده است. بمنظور اجرای این پروژه تعداد ۲۶ نمونه بلوک پارافینه شده بافت تومور پستانی مربوط به آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی تبریز، مورد استفاده قرار گرفت. لام‌های تهیه شده از بلوک‌های پارافینه، به وسیله دستگاه میکروسکوپ نوری OLYMPUS-CH30 (ساخت ژاپن)، مربوط به بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی تبریز، به منظور تایید وجود تومور و تشخیص نوع تومور، مورد مشاهده قرار گرفتند و تصاویر مربوط به لام‌ها، بوسیله دوربین OLYMPUS DP12,U-TVO.5XC-2(Japan). تهیه شد. پس از برش و استخراج DNA به ۲ روش جوشاندن و استفاده از کیت ژل سیلیکا و پس از ارزیابی غلظت DNA موجود، با روش PCR و تعیین توالی DNA مورد بررسی قرار گرفت. پس از تکثیر بخشی از ژن p53، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تعیین توالی شد. این محصول با وزن حدود ۵۰۰ جفت باز به روش ۲طرفه سنجر تعیین توالی شد. نتایج سکانس کردن با استفاده از نرم‌افزارهای blast مورد جستجوی همانندی نوکلئوتیدی قرار گرفت. نتایج حاکی از شباهت بسیار زیاد توالی‌های بدست آمده با بخشی از ژن p53 ثبت شده در بانک جهانی ژن می‌باشد. توالی‌های بدست آمده به شکل In Silico مورد ترجمه قرار گرفت و نتایج همانندی توالی اسیدهای آمینه، توسط نرم‌افزارهای موجود در سایت expasy مورد مقایسه قرار گرفت. در تمامی نمونه‌ها یک موتاسیون به شکل اضافه شدن یک توالی ممتد ۲۷ اسیدآمینه‌ای در فاصله بین اسید آمینه‌های ۳۰-۵۷، مشخص شد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و تاریخچه

۱ مقدمه و تاریخچه .....۱.....

فصل دوم: کلیات

۲-۱ تعریف تومور .....۱۱.....

۲-۲ طبقه بندی و نامگذاری تومورها .....۱۳.....

۲-۲-۱ انواع تومورها .....۱٤.....

۲-۲-۲ ساختمان، نمای ظاهری و رشد تومور .....۱۷.....

۲-۲-۳ سلول شناسی تومورها .....۲۰.....

۲-۲-٤ انتشار تومورها .....۲۲.....

۲-۲-۵ متاستاز .....۲۲.....

۲-۲-٦ تشخیص و پیش بینی تومورها .....۲۳.....

۲-۲-۷ خصوصیات میکروسکوپی تومورها .....۲٤.....

۲-۳ سبب شناسی تومورها .....۲۵.....

۲-۳-۱ دگرگونی یا تغیر (transformation) .....۲٦.....

۲-۳-۲ عوامل تومورزا .....۲٦.....

۲-۳-۳ سایر عوامل موثر در تومورزایی .....۲۸.....

۲-٤ میزان وقوع تومورهای سگ سانان .....۲۹.....

۲-٤-۱ تومورهای پستانی سگ و عوامل موثر در ایجاد تومور پستانی .....۲۹.....

۲-٤-۲ طبقه بندی تومورهای پستانی .....۳۰.....

۲-۵ مبنای ژنتیکی تومور پستانی .....۳٦.....

۲-۵-۱ ژنهای بازدارنده تومور (Tumor Suppressor gene) .....۳۹.....

فصل سوم: **مواد و روش کار**

۳-۱ انتخاب نمونه ۵۱

۳-۲ مطالعه هیستوپاتولوژی نمونههای تومور پستانی: ۵۲

۳-۳ مراحل استخراج DNA به روش جوشاندن: ۵۲

۳-۳-۱ آماده سازی نمونه ها ۵۲

۳-٤ استخراج DNA به روش جوشاندن: ۵۵

۳-۵ استخراج DNA با استفاده ازکیت Genomic DNA Purification Kit ۵۵

۳-٦ انجام واکنش PCR: ۵۷

۳-۷ مبانی الکتروفورز ۵۹

۳-۷-۱ ژل آگارز: ۵۹

۳-۷-۲ الکترفورز ژل آگارز ۵۹

۳-۷-۳ بافرهای الکتروفورز ٦۰

۳-۷-٤ بافرهای بارگذار الکتروفورز ٦۲

۳-۷-۵ رنگ آمیزی ژل ٦۳

۳-۸ تعیین توالی (Sequencing DNA) ٦۳

۳-۹ جستجوی همانندی توالی DNA (homology search) ٦٤

۳-۱۰ جستجوی همانندی توالی پروتئینی (homology search) ٦٤

فصل جهارم: نتایج

٤-۱ نتایج هیستوپاتولوژی نمونههای تومور پستانی ٦٦

٤-۲ نتایج درجه بندی بدخیمی نمونههای تومور پستانی ٦۷

٤-۳ تصاویر مربوط به مشاهدات هیستوپاتولوژیک ٦۸

٤-٤ نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۷۱

٤-۵ نتایج تعیین توالی DNA نمونههای ارسالی به کمپانی بایونیر کره جنوبی ۷۲

٤-٦ نتایج جستجوی همانندی (homology search) توالیهای DNA ۷۳

٤-٦-۱ مشخصات توالی شماره ۱: ۷۵

٤-٦-٢ مشخصات توالی شماره ٢: .....٧٨.....
٤-٦-٣ مشخصات توالی شماره ٣: .....٧٨.....
٤-٦-٤ مشخصات توالی شماره ٤: .....٧٩.....
٤-٦-٥ مشخصات توالی شماره ٥: .....٧٩.....
٤-٦-٦ مشخصات توالی شماره ٦: .....٧٩.....
٤-٦-٧ مشخصات توالی شماره ٧: .....٨٠.....
٤-٦-٨ مشخصات توالی شماره ٨: .....٨٠.....
٤-٧ ترجمه توالی-های DNA به توالی پروتئینی: .....٨٠.....
٤-٧-١ ترجمه توالی شماره ١: .....٨٠.....
٤-٧-٢ ترجمه توالی شماره٢: .....٨٥.....
٤-٧-٣ ترجمه توالی شماره ٣: .....٨٦.....
٤-٧-٤ ترجمه توالی شماره ٤: .....٨٧.....
٤-٧-٥ ترجمه توالی شماره ٥: .....٨٨.....
٤-٧-٦ ترجمه توالی شماره ٦: .....٨٩.....
٤-٧-٧ ترجمه توالی شماره ٧: .....٩٠.....
٤-٧-٨ ترجمه توالی شماره ٨: .....٩١.....
٤-٨ مقایسه نتایج ترجمه توالیها: .....٩٢.....

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

٥ بحث و نتیجه‌گیری .....٩٥.....

منابع .....١٠٠٢.....

فهرست شکل‌ها

عنوان .....

صفحه .....

شکل ٤-١: تومور پستانی از سگ ماده ٢ساله نژاد تریر:از نوع تومور بدخیم سلولهای دوکی شکل ، (رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی100×) .....٦٨.....

شکل ٤-٢: تومور پستانی از سگ ماده ٢ساله نژاد تریر:از نوع تومور بدخیم سلولهای دوکی شکل .تراکم بالای سلولهای دوکی بسیار شبیه به سلولهای میو اپیتلیال آسینی های پستان قابل مشاهده است.(رنگ آمیزی H&E درشت نمایی 200×) .....٦٨.....

شکل ٤-٣: تومور پستانی از سگ ماده ٩ ساله ژرمن شفرد.از نوع تومور کارسینوم پردی لوله ای(توبولوپاپیلر).همچنین کانونهایی از متاپلازی سلولهای ترشح کننده شیر به سلولهای خاردار و تبدیل آنها به کارسینوم سلولهای خاردار–در تصویر ٢مجرای شیری مبتلا به کارسینوم توبولوپاپیلر قابل مشاهداه است.(رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی 40×) .....٦٨.....

شکل ٤-٤: تومور پستانی از سگ ماده ٩ ساله ژرمن شفرد.از نوع تومور کارسینوم پردی لولهای(توبولوپاپیلر).همچنین کانونهایی از متاپلازی سلولهای ترشح کننده شیر به سلولهای خاردار و تبدیل آنها به کارسینوم سلولهای خاردار.(رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی 40×) .....٦٩.....

شکل ٤-٥: تومور پستانی از سگ ماده ٩ ساله ژرمن شفرد.از نوع تومور کارسینوم پردی لوله ای(توبولوپاپیلر).همچنین (رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی 40×) کانونهایی از متاپلازی سلولهای ترشح کننده شیر به سلولهای خاردار. (رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی 40×) .....٦٩.....

شکل ٤-٦: تومور پستانی از سگ ماده ١٢ساله از نژاد یورک شایر–تریر،تومور از نوع کارسینوم ساده باالگوی توبولار. (رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی 200×) .....٦٩.....

شکل ٤-٧: تومور پستانی سگ ماده ١١ ساله از نژاد اشپیتس،تومور از نوع کارسینوسارکوما،مختلط همراه با کانونهای غضروفی. (رنگ آمیزی H&E، درشت نمایی 200×) .....٧٠.....

شکل ٤-٨: تومور پستانی سگ ماده ٦ساله از نژاد ترير،تومور از نوع کارسينوم توبولوپاپيلری.(رنگ آميزی H&E، درشت نمايی 100×) ۷۰
شکل ٤-٩ : تومور پستانی از سگ ماده ۱۲ساله از نژاد يورک شاير–ترير،تومور از نوع کارسينوم ساده باالگوی توبولار(رنگ آميزی H&E، درشت نمايی 200×) ۷۰
شکل ٤-۱۰: نتايج الکتروفورز محصولات واکنش زنجيرهای پليمراز بر روی ژل آگارز ۷۱
شکل ٤-۱۱: استفاده از نرم افزارهای اينترنتی بانک ژن بمنظور انجام جستجوی همانندی ۷۳
شکل ٤-۱۲: استفاده از نرمافزار blast بمنظور جستجوی همانندی توالی DNA ۷۳
شکل ٤-۱۳: انتخاب گزينه nucleotide blast ۷۳
شکل ٤-۱٤: ورود به صفحه Standard Nucleotide BLAST ۷٤
شکل ٤-۱٥: وارد کردن توالی نوکلئوتيدی ۷٤
شکل ٤-۱٦: نتايج جستجوی همانندی توالی DNA به شکل گرافيک ۷٤
شکل ٤-۱۷: نتايج جستجوی همانندی توالی DNA به تفصيل ۷٥
شکل ٤-۱۸ ..... ۷٥
شکل ٤-۱۹ ..... ۷٥
شکل ٤-۲۰ ..... ۷٦
شکل ٤-۲۱ ..... ۷٦
شکل ٤-۲۲ ..... ۷٦
شکل ٤-۲۳ ..... ۷۷
شکل ٤-۲٤ ..... ۷۷
شکل ٤-۲٥ ..... ۷۷
شکل ٤-۲٦ ..... ۷۸
شکل ٤-۲۷: ۷۸
شکل ٤-۲۸ ..... ۷۸
شکل ٤-۲۹ ..... ۷۹
شکل ٤-۳۰ ..... ۷۹

شكل ٤-٣١ ..... ٧٩
شكل ٤-٣٢ ..... ٨٠
شكل ٤-٣٣ ..... ٨٠
شكل ٤-٣٤: ٨٠
شكل ٤-٣٥ ..... ٨١
٤ شكل ٤-٣٧ ..... ٨١
٤ شكل ٤-٣٨ ..... ٨١
شكل ٤-٣٩ ..... ٨٢
شكل ٤-٤٠ ..... ٨٢
شكل ٤-٤١ ..... ٨٢
شكل ٤-٤٢ ..... ٨٣
شكل ٤-٤٣ ..... ٨٣
شكل ٤-٤٤ ..... ٨٣
شكل ٤-٤٥ ..... ٨٤
٤شكل ٤-٤٦ ..... ٨٤
شكل ٤-٤٧ ..... ٨٤
شكل ٤-٤٨ ..... ٨٥
شكل ٤-٤٩ ..... ٨٥
شكل ٤-٥٠ ..... ٨٥
شكل ٤-٥١ ..... ٨٦
شكل ٤-٥٢ ..... ٨٦
شكل ٤-٥٣ ..... ٨٦
شكل ٤-٥٤ ..... ٨٧
شكل ٤-٥٥ ..... ٨٧
شكل ٤-٥٦ ..... ٨٧

شكل ٤-٥٧ ..... ٨٨
شكل ٤-٥٨ ..... ٨٨
شكل ٤-٥٩ ..... ٨٨
شكل ٤-٦٠ ..... ٨٩
شكل ٤-٦١ ..... ٨٩
شكل ٤-٦٢ ..... ٨٩
شكل ٤-٦٣ ..... ٩٠
شكل ٤-٦٤ ..... ٩٠
شكل ٤-٦٥ ..... ٩٠
شكل ٤-٦٦ ..... ٩١
شكل ٤-٦٧ ..... ٩١
شكل ٤-٦٨ ..... ٩١
شكل ٤-٦٩ ..... ٩٢
شكل ٤-٧٠ ..... ٩٢
شكل ٤-٧١ ..... ٩٢
شكل ٤-٧٢ ..... ٩٣
شكل ٤-٧٣ ..... ٩٣
شكل ٤-٧٤ ..... ٩٣
شكل ٤-٧٥ ..... ٩٤
شكل ٤-٧٦ ..... ٩٤

فهرست جداول

عنوان .....

صفحه.....

جدول ۲-۱:مشخصات تومورهای خوشخیم و بدخیم .....۱۸.....

جدول ۳-۱: اسامی نمونه‌های تومور پستانی .....۵۱.....

جدول ۳-۲: درجه بندی بدخیمی تومورهای پستانی بر اساس مشخصات بافتی .....۵۲.....

جدول ۳-۳: وزن نمونه‌ها (بر حسب گرم) .....۵۳.....

جدول ۳-٤: اسامی نمونه های مورد استفاده در روش استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج ژنوم .....۵۷.....

جدول ۳-۵: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده .....۵۷.....

جدول ٤-۱: نتایج هیستوپاتولوژی نمونه‌های تومور پستانی .....٦٦.....

جدول ٤-۲: نتایج درجه بندی بدخیمی نمونههای تومور پستانی .....٦۷.....

جدول ٤-۳: نتایج مربوط به تعیین توالی DNA .....۷۲.....

فصل اول

مقدمه و تاریخچه

سرطان در سگ‌ها به طور معمول رخ می‌دهد و نیازمند توجه فوری و قاطع دامپزشک می‌باشد. بدلیل پیشرفت در بهبود مراقبت‌های دامپزشکی، سگ‌ها تا سنین بالا زندگی می‌کنند که باعث شیوع بالای انواع سرطان‌ها در این زمان می‌شود. سرطان امروزه علت بیماری‌های منجر به مرگ در سگ‌ها به شمار می‌رود و به همین ترتیب اهمیت زیادی در جامعه بدست آورده است. فاکتورهای محیطی و ژنتیکی (آلودگی هوا، آلودگی آب، عوامل عفونی و پرتوهای یونیزه و غیر یونیزه و بویژه هورمون‌ها و داروها، خطرات شغلی و فاکتورهای خطرساز مربوط به زندگی مثل رژیم غذایی) تاثیر زیادی روی وقوع زمان سرطان دارند. بنابراین امروزه تاکید بیشتری برروی توسعه یادگیری درباره فاکتورهای ژنتیکی و محیطی است که در سرطان‌های سگ‌سانان روی تغییرات سلولی و مولکولی تاثیر دارند [۱و۲] تومورهای پستان سگ‌سانان نصف تومورهای سگ‌های ماده را شامل می‌شود که تقریبا ۵۰-۴۰٪ از آنها به صورت بدخیم رخ می‌دهد [۳]. ماهوپاترا و همکارانش (۲۰۰۵) در بخش جراحی کالج دامپزشکی اوریسا روی وقوع نئوپلاسم‌های سگ‌سانان بر اساس داده‌های موجود از سال ۱۹۸۵ تا ۲۰۰۰ مطالعه کردند و گزارش کردند که تومورهای ارگان‌های تناسلی و بدنبال آن تومورهای غده پستانی از رایجترین تومورها می‌باشند. بالاترین نرخ شیوع تومورها در گروه سنی ۷ تا ۹ سال (۲۸/۵۷٪)، بعد از آن در گروه سنی ٤ تا ٦ سال(۲۵/۷۱٪) و بعد از آن در گروه سنی ۱ تا ۳ سال (۲۱/۹٪) و در آخر در گروه سنی ۱۰ تا ۱۲ سال (۲۰/٦۳٪) گزارش شده است. در میان نژادهای مختلف نژاد تبتی بیشترین حساسیت را داشته و پس از آن نژادهای مخلوط، shepherd، Spitz، Non-descript، Labrador و Doberman دارای بیشترین حساسیت هستند[٤]. آداک(۲۰۰۵) گزارش کرد که ۳۳/۱٤٪ از وقوع تومورهای پستانی در میان ۳٤۷ تومور مربوط به سگها بوده و همچنین

از ژانویه تا دسامبر ۲۰۰٤ از مجموع ٤٥۳۰ اختلال ثبت شده مربوط به سگ‌سانان در بیمارستان BSPCA در مومبای مربوط به تومورهای پستانی سگها بود. از مجموع ۱۱۵ تومور پستانی سگ‌سانان، ٦٥٪ بین ۸ تا ۱۲ سال، ۲۵٪ بین ۱۳ تا ۱۸ سال و فقط ۱۰٪ در میان گروه سنی ۰ تا ۸ سال بود. به علاوه نژاد Pomeranian با ٤۰٪ ابتلا بیشترین حساسیت را به تومورهای پستانی نشان داد. بعد از آن Doberman با ۲۵٪، mongrels با۱۵٪، Alsatian با ۱۰٪ و Dachshund و Cocker spaniel هر کدام با ۵٪ ابتلا قرار داشتند. وی همچنین گزارش کرد که وقوع تومورهای پستانی(۸۰٪) در سگهای دست نخورده، درمقایسه با سگهای اخته به صورت معنی‌داری بیشتر بود [۵]. زاتلوکال و همکارانش (۲۰۰۵) در مطالعه خود روی ۱۷۰۵۳ سگ گزارش کردند که میانگین سنی سگهای با ضایعات پستانی خوش خیم و بدخیم به ترتیب ۸/۹ و ۱۰ سال بود. ضایعات خوش خیم نئوپلاستیک به طور معمول در سنین پایین‌تر نسبت به نوع بدخیم آن رخ می‌دهد. در میان نژادهای مختلف Poodle به طور معنی‌داری بالاترین خطر در توسعه تومورهای خوش‌خیم و بدخیم غده پستانی را داشت و بعد از آن English Cocker Spaniels و Dachshunds قرار داشتند [٦]. گدس (۲۰۰۱) در مطالعه خود روی تومورهای پستانی سگ‌سانان آنها را به دو دسته تومورهای خوش‌خیم و بدخیم طبقه‌بندی کرد. تومورهای خوش‌خیم مجدد به آدنومای ساده، تومور مخلوط خوش خیم، آدنومای مرکب، پاپیلومای سلول‌های خاردار، تومور خوش‌خیم مزانشیمال، میواپیتلیوما و فیبروآدنوما، بویژه زمانی که ترکیبات غده‌ای واستترومایی باهم در تشکیل آن دخیل باشند، تقسیم‌بندی شدند. تومورهای بدخیم نیز به آدنوکارسینومای ساده (توبولار، پاپیلاری و جامد)، آدنوکارسینومای مرکب (توبولار، پاپیلاری، جامد و آدنومیواپیتلیوما) و تومورهای بدخیم مخلوط تقسیم-

بندی شد [۷]. موتو و همکارانش (۲۰۰۰)، ۲۵ مورد از تومورهای بدخیم سگ‌سانان را آنالیز کردند تا تغییرات اگزون ۸-۵ را برای ژن سرکوب کننده تومور P53 بیان کنند. ۵ جهش نامطلوب(یک تومور دارای۲ جهش نامطلوب) و یک جهش بی‌معنی در ۲۰٪ از موارد یافت شد. از میان ٦ جهش مختلف، ۳ مورد روی اگزون ۵ قرار داشت که درگیر کدون‌های ١٦٣، ۱۷۵ و ۱۸۰ بود. این اطلاعات بیان کرد که تغییرات ژن P53 می‌تواند در ارتباط با بدخیمی باشد [۸]. اورگارد و همکارانش (۲۰۰۰) گزارش کردند که جهش‌های ژن P53 در ۲۳٪ از موارد تک گیر سرطان سینه در انسان دیده شده است. به طور کلی جهش‌های ژن P53 بیشتر در تومورهای با چهره ی مهاجم، گره مثبت، با سطح منفی گیرنده استروژنی و با درجه بالا از آناپلازی در مجرای کارسینوما دیده می‌شود [۹]. پاول و همکارانش (۲۰۰۰) جهش در ژن P53 را با آنالیزهای PCR-SSCP، ۱۷٪ (۱۸۷/۱۰۳۷) در اگزون‌های ٤ تا ۸ درمراحل ابتدای سرطان سینه در انسان نشان دادند. یافته‌های سکانس ژنی نشان داد که ۱۲ جهش در اگزون ٤، ٦۷ جهش در اگزون ۵، ۱۱ جهش در اگزون ٦، ٤۲ جهش در اگزون ۷ و ٤٦ جهش در اگزون شماره ۸ رخ داده است. ارتباط معنی‌دار بین جهش در ژن P53 و پیش‌آگهی ضعیف، اندازه بزرگ تومور و حجم کم گیرنده هورمونی مشخص شده است [۱۰]. ستوگوچ و همکارانش (۲۰۰۱) ناهنجاری‌های ژن سرکوب کننده تومور P53 را در پیشرفت نمونه‌های توموری ۱۵ سگ از تومورهای مختلف شامل لیمفومای بدخیم(۷ سگ)، لوسمی مونوسایتیک(۱ سگ)، آدنومای غده پستانی(۱ سگ)، تومور خوش‌خیم مخلوط غده پستانی(۱ سگ)، رابدومیوسارکوما(۱ سگ)، سرطان کولون(۱ سگ) و استئوسارکوما(۳ سگ) را مورد مطالعه قرار دادند. آنها جهش‌های نقطه‌ای و حذف را گزارش کردند که باعث تعویض تعدادی از اسیدهای آمینه در تیپ

وحشی P53 در ۷ نمونه از ۱۵ تومور سگها با لیمفومای بدخیم، لوسمی مونوسایتیک، رابدومیوسارکوما، سرطان کولون و استئوسارکوما می‌شود. بسیاری از ناهنجاری‌های ژن P53 در این تومورها شناسایی شد که در محل transactivation، DNA binding و oligomerization زنجیره قرار دارند. پیشرفت طبیعی تومورهای مختلف سگ اغلب در نتیجه غیرفعال شدن ژن سرکوب کننده تومور P53 می‌باشد که ممکن است یکی از چندین تغییرات تدریجی ژنتیکی در طی تومورزایی باشد. این مطالعه نشان می‌دهد که ژن p53 می‌تواند به عنوان هدف برای ژن درمانی تومورهای سگ قرار بگیرد [۱۱]. واکوئی و همکارانش (۲۰۰۱) روی تغییرات اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن P53 در ٦۹ کارسینومای پستان سگ‌سانان بوسیله PCR-SSCP با آنالیز مستقیم سکانس ژنی مطالعه کردند و ۱۷٪ جهش در کارسینوماها گزارش کردند. بعد از پیگیری ۳۰ ماهه آنالیز ها نشان داد که جهش در ژن P53 فقط یک فاکتور خطرساز مستقل برای افزایش عود مجدد و مرگ برای کارسینومای پستانی می‌باشد [۱۲]. لی و همکارانش (۲۰۰۲) روی ۲۰ مورد از تومورهای پستانی خودبخودی[1] سگ‌سانان برای شناسایی جهش روی ژن P53 مطالعه کردند و گزارش کردند که ٤ جهش نامطلوب و یک جهش بی‌معنی در ۱۰ مورد از ضایعات بدخیم (٤۰٪) و ۲ جهش نامطلوب و ۱ جهش خاموش در ۱۰ مورد از تومورهای پستانی خوش‌خیم (۳۰٪) پیدا شد. ۵ مورد از جهش‌های نامطلوب در زنجیره‌های محافظت شده II، III، IV و V قرار گرفته بودند [۱۳]. یازاوا و همکارانش (۲۰۰۳) روی اثرات وکتور آدنوویروسی که ژن P53 سگ‌سانان (AxCA-cp53) را در سلول

1. spontaneous

های رشد یافته لاین سلولی آدنوکارسینومای پستانی بیان می‌شود، مطالعه کردند و گزارش کردند که وکتور آدنوویروس که ژن P53 سگ‌سانان را بیان می‌کند باعث مهار رشد سلولی از طریق القا توقف سیکل سلولی و آپوپتوز در لاین سلولی آدنوکارسینومای پستانی سگ‌سانان می‌شود که عملکرد P53 را از دست داده‌اند. در پایان آنها نتیجه گرفتند که وکتور آدنوویروس که P53 سگ‌سانان (AxCA-cp53) را بیان می‌کند ممکن است به عنوان هدفی برای ژن P53 در درمان سگهای مبتلا به تومور مفید باشد [١٤و١٥].

مولتون (١٩٧٨) توزیع سنی تومورهای پستانی و سایر تومورهای سگ‌سانان را توصیف کرده است.او اظهار کرده است که تومورهای پستانی در سنین کمتر از ٢سال نادر است اما شروع بروز این تومور از حدود ٦ سالگی به شدت افزایش می‌یابد که او این سن را بعنوان سن شروع سرطان توصیف کرد [١٦]. استعداد نژاد در پیشرفت نئوپلاسم پستان گزارش شده است اما در مطالعات مختلف متفاوت است [١٧].

مک‌کارتی و همکاران (٢٠٠١) گزارش کردند که به نظر می‌رسد توسعه نئوپلاسم‌های غدد پستانی وابسته به هورمون باشد زیرا خطر ابتلا به تومور پستانی با افزایش تعداد چرخه‌های جنسی حیوان افزایش می-یابد.خطر ابتلا به تومور پستانی ٠,٠٥٪ می‌باشد در صورتی که سگ قبل از شروع اولین چرخه جنسی عقیم شده باشد. میزان شیوع این تومور تا ٨٪ افزایش می‌یابد در صورتی که عقیم سازی حیوان قبل از شروع دومین چرخه جنسی انجام گرفته باشد و زمانی تا ٢٦٪ افزایش را نشان می‌دهد که عقیم سازی پس از دومین چرخه جنسی صورت بگیرد. بافت طبیعی پستان و بسیاری از تومورهای خوش‌خیم هردو

گیرنده‌های استروژن و پروژسترون را بیان می‌کنند. کمتر از ۵۰٪ تومورهای بدخیم پستانی چنین گیرنده-هایی را بیان می‌کنند. این مشاهدات نشان می‌دهد که تومورهای بدخیم وابستگی کمتری به هورمون دارند [۱۸].

مطالعات اپیدمیولوژیک نئوپلاسم‌های مربوط به سگ‌سانان به وسیله آنالیز جهش‌های ژن p53 در تومورهای پستانی با روش PCR-SSCP انجام شد، هدف از این کار بررسی تاثیر سن، جنس و نژاد در ایجاد شرایط و زمینه توموری شدن و هم‌چنین مطالعه جهش‌های موجود در اگزون ٤ و ٨ از قطعه ژن p53 در تومورهای پستانی سگ‌سانان بود. این مطالعات اپیدمیولوژیک با تجزیه و تحلیل داده‌های در دسترس از ده سال گذشته (۱۹۹٦–۲۰۰۵) از ۱۷۵ نمونه نئوپلاسم مربوط به گونه‌های سگ‌سانان گروه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی آناند وآنالیز جهش‌های قطعه ژن p53 بر پایه PCR-SSCP بر روی ١٦ نمونه جمع‌آوری شده درطول جراحی در بخش جراحی دانشکده دامپزشکی آناند و کلینیک‌های مختلف انجام شد.

نتایج مطالعات حاکی از حضور جهش در منطقه بسیار محافظت شده از ژن سرکوبگر تومور p53 بود که این موضوع نشان دهنده اهمیت این منطقه در بروز آپوپتوز و دخالت جهش‌های موجود در ژن p53 در پیشرفت روند تومور پستانی سگ می‌باشد [۱۹].

ژنتیک سرطان زمینه فهم بالا از مکانیسم وقوع سرطان و حتی امکان تعیین اشخاص در معرض خطر را بر اساس حساسیت نژادی فراهم می‌کند. محدوده وسیع دانش پایه، هزاران فرصت برای تحقیقات آینده و

راه‌های جدیدی برای پیشگیری و کنترل سرطان فراهم می‌کند. مشخصه بارز سرطان رشد سلولی و تکثیر کنترل نشده[1]است. از دست دادن کنترل رشد در نتیجه تجمع موتاسیون‌ها (اشتباهات ایجاد شده در کد DNA) در ژن‌های کنترل کننده تقسیم و بقا سلولی می‌باشد. بیشترین مکانیسم رایج در ایجاد جهش در DNA سلول‌های سوماتیک (غیرجنسی)، اشتباهات ماندگاری است که در حین تقسیم نرمال سلولی اتفاق می‌افتد. بیشتر این جهش‌ها خاموش هستند یعنی وجود آنها برای توانایی عملکرد سلول مشکلی ایجاد نمی‌کند ولی بقیه می‌تواند ژن سرکوب کننده تومور را ناتوان کند و یا انکوژن‌ها را فعال کند که به ترتیب باعث مهار و بالا رفتن تقسیم سلولی و بقا آن می‌شوند. سلولی که مقدار کافی از جهش‌ها را که در مراحل مختلف برای جلوگیری از تکثیر و حفظ یکپارچگی ژنتیک اصلاح نشده‌اند، را در خود جمع کند ایجاد تومور می‌کند. بدلیل جهش‌ها، این سلول و دودمان آن ویژگی رشد انتخابی را در میان محیطشان کسب می‌کنند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیولوژی سرطان نشانه‌هایی را برای طبقه‌بندی تومورها مشخص کرده است [۲۰و۲۱]. مطالعات مختلف روی نقش قابل توجه ژن سرکوب کننده تومور P53 در سرطانزایی در انسان و سگ‌سانان متمرکز شده‌اند. ژن سرکوب کننده تومور، ژنی است که احتمال تبدیل سلول در مجموعه چندسلولی را به سلول توموری کاهش می‌دهد. جهش یا حذف در این گونه ژن‌ها احتمال تشکیل تومور را افزایش می‌دهد. مثال قابل توجه در این زمینه ژن کد کننده P53 می‌باشد [۱۹]

[1] . multiplication

ژن سرکوب کننده تومور P53 نقش مهمی را در سرطانزایی ارگان‌های مختلف از طریق تنظیم تکثیر سلولی، پایداری ژنومی و مرگ برنامه ریزی شده سلولی بر عهده دارد. سرکوب تومور بواسطه P53 به علت توانایی آن در فعال کردن برخی ژن‌های درگیر در چرخه سلولی و آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) می‌باشد. فرم جهش یافته آن می‌تواند مثل یک انکوژن عمل کند در حالی که تیپ وحشی P53 با خاصیت بازدارندگی تومور شناخته می‌شود. به نظر می‌رسد جهش در ژن P53 روی اگزون ۸-۳ بیشترین تغییر ژنتیکی در تومورهای پستانی سگ‌سانان بوده و مطالعات مختلف نشان دادند که جهش روی P53 با پیشرفت تومور در ارتباط است [۲۲و۲۳و۲٤]. بعضی از ناهنجاری‌های ژن P53 در تومورهای پستانی خود بخودی ثبت شده است [۸ و۱۱ و۲۲ و۲٤]

مطالعه روی بیولوژی تومورهای پستانی خودبخودی در سگها ممکن است سودمند باشد، به شرطی که به عنوان مدلی برای مدیریت کلینیکی سرطان سینه در انسان باشد. فهم بهتر این روند می‌تواند رسیدن به درمان عاقلانه و بهبود زندگی بیماران را به دنبال داشته باشد. با وجود اهمیت نئوپلاسم در بیماران سگ-سانان در دامپزشکی و شباهت کلینیکی آنها با انسان، اطلاعات در مورد اساس مولکولی تومورزایی در سگ اندک است و از این رو مطالعه حاضر اجرا شده است [۱۹].