مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا | سال دهم | شماره ۳ | پاییز ۱۳۹۹

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن بیومارکرسلولی (CD34) در افراد مبتلا به سرطان خون ALL و افراد سالم

گلشن مرادی زاده، نوشا ضیاء جهرمی*، حسین سازگار

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۳/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: CD34 از عوامل مطرح در تعیین پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان خون است. ازآنجایی‌که امروزه ارتباط بیان مارکر سطح سلولی CD34 با بسیاری از سرطان‌ها به اثبات رسیده است، در مطالعه حاضر اندازه‌گیری بیان این مارکر با سرطان خون موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر یک مطالعه موردی- شاهدی است که بر روی ۳۰ نمونه از خون سالم و ۳۰ نمونه از خون افراد مبتلا به سرطان خون انجام‌شده است. لنفوسیت‌ها با استفاده از روش فایکول جداسازی شد. RNA آن‌ها استخراج شد و پس از سنتز cDNA، سطوح بیان ژن با استفاده از روش Real Time RT PCR- همراه با یک کنترل داخلی GAPDH تعیین گردید.

نتایج: پس از انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی در Real Time RT PCR و آنالیز نتایج حاصله مشخص شد، بیان ژن CD34 در خون مبتلایان به سرطان خون ALL در مقایسه با افراد سالم افزایش‌یافته بود (F=21.588, P-Val=0.002).

نتیجه‌گیری: پیدا کردن بیومارکرهای نوین که شاخص یک نوع سرطان هستند، در تشخیص زودرس و بهبود به هنگام بیماری سرطان، کمک‌های شایان توجهی را می‌نماید. با بررسی این بیومارکرها، می‌توان داروهای ضد سرطان نوینی را ساخت که بتوانند سلول‌های در حال سرطانی شدن را هدف قرار بدهند و از تولید رشد آن‌ها به سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند.

کلمات کلیدی: CD34، Real-time RT PCR، سرطان خون ALL، سلول‌های بنیادی سرطان

مقدمه

لوسمی به افزایش سطح گلبول‌های سفید خون به‌صورت پیش‌رونده یا طولانی اطلاق می‌شود. اصطلاح لوسمی (سرطان خون) به گروهی از بیماری‌ها با زمینه‌های مختلف بیولوژیکی، تظاهرات بالینی که توسط تحول بدخیم سلول‌های خون‌ساز ایجادشده‌اند، اشاره دارد (۱). سرطان خون گروهی از انواع سرطان است که معمولاً از مغز استخوان شروع‌شده و باعث شکل‌گیری تعداد زیادی گلبول سفید غیرطبیعی در جریان خون می‌گردد. این گلبول‌های سفید بالغ در جریان خون بلاست یا سلول‌های لوسمی یا سرطان خون گفته می‌شود (۲). درگیری می‌تواند در بین رده میلوئیدی یا لنفوئیدی صورت گیرد که این امر وجه تمایز لوسمی با لنفوم است.

سرطان خون یا لوسمی، بیماری پیش‌رونده و بدخیم اعضای خون‌ساز بدن به‌ویژه مغز استخوان است که با تکثیر و تکامل ناقص سلول‌های خون و پیش سازهای آن در خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود (۳).

سلول‌های سفید خونی معمولاً در صورت نیاز بدن، به طریقی منظم و کنترل‌شده رشد کرده و تقسیم می‌شوند؛ اما بیماری لوسمی در این روند اخلال ایجاد نموده و رشد سلول‌های خونی را از کنترل خارج می‌نماید. در بیماری لوسمی حاد، مغز استخوان مقدار بسیار زیادی سلول‌های سفید خونی نارس تولید می‌کند و تولید طبیعی سلول‌های سفید خونی نیز متوقف می‌شود که

*نویسنده مسئول: **نوشا ضیاء جهرمی**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
Email: nooshazia.59@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6114-7060

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

منجر به از بین رفتن توانایی بدن در مقابله با بیماری‌ها می‌شود (۴).

ازآنجایی‌که مغز استخوان محل تکثیر بی‌رویه گلبول سفید می‌شود فضای کافی برای تکثیر گلبول قرمز و پلاکت وجود ندارد بنابراین خون‌سازی اکسترا مدولاری (خارج هرمی) در کبد و طحال و مغز استخوان‌های پهن انجام می‌شود و نتیجه آن بزرگی و دردناک شدن کبد و طحال است (۵).

لوسمی به‌طورکلی به دودسته تقسیم می‌شود:

لوسمی بر اساس طیف، شدت و سرعت پیشرفت روند بیماری به دودسته حاد و مزمن تعریف می‌شود (۶).

در لوسمی حاد رشد سریع بیماری همراه با تعداد بالای گویچه های سفید نارس ایجاد می‌شود و مدت فاصله زمانی بین شروع بیماری و گسترش دامنه آن بسیار کوتاه است. گلبول‌های سفید اکثراً تمایز نیافته و به شکل بلاست هستند. بروز این بیماری در ۶۰ سالگی به اوج خود می‌رسد و این نوع شایع‌ترین لوسمی غیر لنفوسیتی است که به یکی از دو شکل اولیه و ثانویه بروز پیدا می‌کند (۷).

برخلاف نوع حاد، سیر بیماری و بروز علائم بالینی در سرطان خون مزمن بسیار کند پیش می‌رود و ممکن است فرد مبتلا به سرطان مدت‌های طولانی از وجود سلول‌های سرطانی در بدنش بی‌اطلاع باشد. علائم نیز بسیار خفیف و جزئی است (۸). ضعف، بی‌حالی و بزرگی طحال جزء نشانه‌های این بیماری است. گاهی بیماران به علت بزرگی طحال به پزشک مراجعه می‌کنند و بیماری سرطان خون تشخیص داده می‌شود. در بزرگ‌سالان برعکس کودکان، سرطان خون مزمن شایع‌تر است. سرطان خون مزمن دو نوع میلوپرولیفراتیو (Chronic myeloid Leukemia) (CML)و لنفوپرولیفراتیو (Chronic Lymphocytic Leukemia) (CLL) دارد (۹). در این حالت بلاست‌ها در کنار شکل بالغ از گلبول‌های سفید افزایش می‌یابند. در ۹۰ تا ۹۵ درصد بیماران بخشی از کروموزوم ۲۲ (فیلادلفیا) کم شده (ژن BCR) و بر روی کروموزوم ۹ کنار ژن ABL قرار می‌گیرد. قرارگیری این دو ژن در کنار هم منجر به تولید پروتئینی بنام تیروزین کیناز می‌شود که باعث افزایش تکثیر گلبول‌های سفید می‌شود؛ بنابراین یکی از درمان‌های اصلی در این بیماری مهار این پروتئین توسط دارویی بنام ایماتینیب مسیلات (Imatinib mesylat) است (۱۰). مجموعه تمایزی ۳۴ که با نام‌های دیگری همچون«آنتی‌ژن سلولی پیش ساز سلول‌های خون‌ساز CD34» و «آنتی‌ژن CD34» شناخته می‌شود و اصولاً به «CD34» مشهور است، یک پروتئین است که در انسان توسط ژن «CD34» کد می‌شود. پروتئین را نخستین بار سیوین و تیندل و همکاران به‌طور مستقل در سطح سلول و به‌عنوان یک فاکتور چسبندگی سلول توصیف کردند. احتمالاً این سلول در اتصال یاخته بنیادی به ماتریکس خارج سلولی مغز استخوان یا مستقیماً به سلول‌های استرومال آن نقش داشته باشد. علاوه بر سلول‌های سالم، این آنتی‌ژن بر سطح برخی سلول‌های سرطانی همچون سارکوم کاپوسی، لوسمی حاد مغز استخوان، منتژیوما، تومورهای استرومال دستگاه گوارش و شوانوما هم مشاهده می‌شود. CD34 بر روی باند: 1q32.2 قرار دارد. CD34 یکی از آنتی‌ژن‌های سطحی گویچه‌های سفید است که در یک تا دو درصد سلول‌های مغز استخوان و درواقع بر روی همه سلول‌های پیش ساز مغز استخوان بیان می‌گردد و برخلاف حضور محدود آن در سلول‌های نرمال به‌طور شایعی در سلول‌های لوسمیک حاد یافت می‌شود (۱۱). سطح سلول سیالوموسین شبیه مولکول‌های پیوندی سلول‌های CD34 است که شبیه یک علامت دسترسی برای سلول‌های بنیادی سرطانی استفاده می‌شود (۱۲). CD34 به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی سرطانی برای کمک به تشخیص و تفکیک سلول‌های خون‌ساز بنیادی و اجدادی (HSCها) در آماده‌سازی برای پیوند مغز استخوان استفاده می‌شود (۱۳). اخیراً از آن به‌عنوان یک مارکر برای کمک به شناسایی دیگر سلول‌های بنیادی و بافت خاص، ازجمله سلول‌های ماهواره‌ای عضلانی و پیش سازهای اپیدرمی استفاده‌شده است. علاوه بر این، اطلاعات اخیر نشان می‌دهد این پروتئین‌ها بیشتر نقش در کموتاکسی و در تقسیم سلولی نامتقارن دارند (۱۴). ازآنجایی‌که امروزه ارتباط بیان مارکر سطح سلولی CD34 با بسیاری از سرطان‌ها به اثبات رسیده است بنابراین هدف از مطالعه حاضر اندازه‌گیری بیان این مارکر با سرطان خون ALL بود.

مواد و روش‌ها

جمعیت و نوع مطالعه و استخراج RNA

در تحقیق حاضر که از نوع مورد- شاهدی بود، نمونه‌گیری (خون وریدی) از ۳۰ فرد مبتلا به سرطان خون ALL از بین مراجعه‌کنندگان به بیمارستان کاشانی استان چهارمحال و بختیاری و آزمایشگاه المهدی بعد از تأییدیه آزمایش‌های مرتبط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

و مشخص شدن نوع بیماری توسط پزشک متخصص و همچنین ۳۰ فرد سالم به‌عنوان گروه شاهد با رضایت افراد جمع‌آوری شد. معیارهای ورود به تحقیق گروه سنی بین ۱۸ تا ۴۸ سال، عدم وجود افسردگی شدید یا افکار خودکشی، عدم وجود تشنج کنترل نشده، عدم وجود شخصیت ضداجتماعی، دارا بودن پرونده پزشکی، دریافت تشخیص لوسمی میلوئید حاد به‌وسیله آزمایش و معیارهای خروج از تحقیق هرزمانی که بیمار از ادامه درمان منصرف گردید می‌تواند از طرح خارج شود. بیماران قبل از نمونه-گیری رضایت‌نامه و پرسش‌نامه را تکمیل کردند که شامل مشخصات فرد مثل سن، تاریخ ابتلا و نوع بیماری در پرسش‌نامه‌ها ثبت گردید. سپس از هر فرد ۴ سی‌سی خون‌گرفته و در لوله‌های مخصوص CBC ریخته شد تا از لخته شدن آن‌ها جلوگیری شود. سپس هر نمونه جهت جداسازی لنفوسیت‌ها به آزمایشگاه رسانده شد. نمونه‌گیری از افراد سالم که سلامتی آن‌ها توسط پزشک تائید شد انجام گرفت. به‌منظور بررسی بیان ژن موردنظر در ابتدا لازم بود لنفوسیت‌ها را جداسازی کرده و سپس با استفاده از ترایزول RNA تام سلولی استخراج شد که مواد مورداستفاده شامل محلول TRIzol یک میلی‌لیتر، کلروفرم ۰/۲ میلی‌لیتر، ایزوپروپانول یک میلی‌لیتر، اتانول ۷۵ درصد یک میلی‌لیتر و آب تیمار شده با DEPC (آب عاری از نوکلئاز) ۲۵ میکرو لیتر بود. سپس RNA استخراج‌شده بررسی کیفی و کمی شد که برای بررسی کمی RNA استخراج‌شده و تعیین مقدار RNA موردنظر از دستگاه نانودراپ (Thermo و مدل ۲۰۰۰) استفاده شد و میزان غلظت RNA و نیز نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر موردبررسی قرار گرفت و اگر نسبت خوانده‌شده (۲۶۰OD /۲۸۰OD) در محدوده‌ی ۲-۱/۸ باشد حاکی از آن است که RNA استخراج‌شده از کیفیت مطلوبی جهت سنتز cDNA برخوردار است اما نسبت بالاتر از ۲ و پایین‌تر از ۱/۸ به ترتیب نشانه آلودگی با DNA و پروتئین است. برای بررسی کیفی مقدار ۱/۵ میکرولیتر از RNA استخراج‌شده جهت اندازه‌گیری غلظت نمونه‌ها در دستگاه قرار داده شد. از سوی دیگر برای بررسی کیفی RNA استخراج‌شده لازم است که پس از استخراج RNA موردنظر در این تحقیق و برای اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج‌شده از نمونه‌ها که در شرایط *RNase* free تهیه‌شده شده‌اند و برای تعیین غلظت RNA استخراج‌شده کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز بررسی شوند. قبل از سنتز باید DNA احتمالی در نمونه‌ی RNA استخراج‌شده را حذف نمود که به‌منظور حذف حضور DNA احتمالی در نمونه‌ی RNA استخراج‌شده تیمار با آنزیم *DNaseI* انجام شد که مواد آن شامل *DNaseI* برای هر نمونه به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، بافر ۱ میکرولیتر و RNA (10x Buffer) موردنیاز ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و سپس افزودن آب عاری از نوکلئاز تا رسیدن به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. بعدازآن با استفاده از کیت تاکارا به cDNA تبدیل شد و سپس نمونه‌ها با روش Real Time RT-PCR به‌منظور بررسی بیان ژن بررسی شد و نتایج حاصل به ژل الکتروفورز منتقل گردید و باند تشکیل‌شده مشاهده شد.

طراحی پرایمر

پرایمرهای CD34 و GAPDH در این آزمایش توسط نرم‌افزار الیگو طراحی گردید. پرایمر GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی مورداستفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای CD34 و GAPDH در جدول ۱ آورده شده است.

Real Time RT PCR

روش Real Time PCR روش جمع‌آوری اطلاعات است که میزان محصول را هم‌زمان با تکثیر در هر مرحله انجام می‌دهد. این عمل به کمک مواد شیمیایی فلورسنت انجام می‌شود که میزان محصول PCR را با شدت فلورسنت مرتبط می‌سازند. واکنش‌ها توسط سیکلی از PCR که تکثیر هدف اولین بار تشخیص داده‌شده، مشخص می‌شوند. این مقدار به‌عنوان سیکل

جدول ۱- توالی پرایمرهای موردنظر در این تحقیق

ژن موردنظر	توالی
CD34 R	5'- TGG CTG ATA CCG AAT TGT GAC- 3'
CD34 F	5'- AAG GGT TGG GCG TAA GAG ATG- 3'
GAPDH F	5'- GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC - 3'
GAPDH R	5'- TCAGCCTTGACGGTGCCATG - 3'

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

آستانه (Cycle threshold) (Ct) در نظر گرفته می‌شود و زمانی است که شدت فلورسنت از فلورسنت پس‌زمینه بیشتر می‌شود. هرچه بیان ژن بیشتر باشد، میزان mRNA آن بیشتر خواهد بود و باعث ایجاد یک Ct پایین‌تر می‌گردد. یک‌راه برای اندازه‌گیری تکثیر، استفاده از رنگ‌هایی است که در اثر اتصال به DNA دو رشته‌ای باعث ایجاد فلورسنت می‌شود. افزایش محصول DNA طی PCR باعث افزایش شدت فلورسنت می‌شود و از این طریق غلظت DNA سنجیده می‌شود؛ اما رنگ‌های متصل شونده به DNA دو رشته مثل SYBR Green، می‌توانند به‌تمامی محصولات PCR شامل محصولات غیراختصاصی مثل پرایمردایمر نیز متصل شوند. این جریان می‌تواند در اندازه‌گیری دقیق اختلال ایجاد کند. این تکثیر غیراختصاصی می‌تواند با توجه به بررسی منحنی ذوب و یا آنالیز بر روی ژل مشخص گردد.

لازم به ذکر است که مقادیر واکنشگرها برای واکنش Real time به‌این‌ترتیب بود که Syber ۱۰ میکرو لیتر (۲x)، پرایمرهای پیرو و پیشرو ۰/۳ میکرولیتر (۵ میکرومول)، نمونه cDNA ۱ میکرو لیتر (۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر) و با آب دیپس به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. همچنین برنامه بهینه‌شده برای هر دو ژن به این صورت بود که فرآیند دناتوره به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله اتصال به مدت ۲۰ ثانیه و در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و همچنین مرحله طویل سازی به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. لازم به ذکر است که تعداد سیکل‌های کل این فرآیندها ۳۷ سیکل بود.

تجزیه‌وتحلیل آماری

پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، به‌منظور مطالعه آماری میزان تغییرات بیان نسبی ژن موردنظر در نمونه‌های مبتلا به سرطان خون در مقایسه با افراد سالم، از نرم‌افزارهای SPSS 16.0 مورد تحلیل آماری قرار خواهد گرفت؛ از آزمون one way ANOVA و آزمون متعاقب LSD و نیز آزمون Independent T-test، جهت بررسی و وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده گردید. تمام داده‌ها به‌صورت means + S.E.M در سطح معنی‌داری $p< 0.05$ در نظر گرفته شدند.

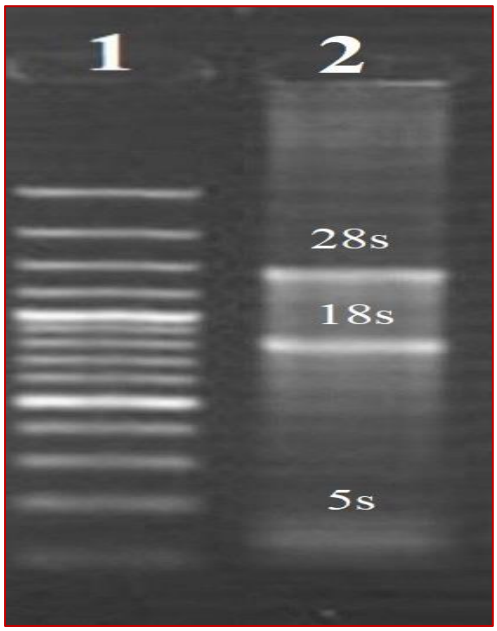
نتایج

جمع‌آوری خون و استخراج لنفوسیت

نمونه خون افراد سالم و افراد مبتلا به سرطان خون به تعداد ۳۰ عدد از هرکدام از بیمارستان کاشانی شهرکرد تهیه شد و پس از مراحل استخراج لنفوسیت و *RNA* مطابق با پروتکل ذکرشده که به آن پرداخته شد، *RNA* تام سلولی را استخراج و در محلول *RNA later* حل و نگهداری گردید.

بررسی کیفی و کمی *RNA* استخراج‌شده

برای تعیین غلظت *RNA* استخراج‌شده و برای کسب اطمینان از عدم تجزیه *RNA*، کیفیت نمونه‌ها به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها با اسپکتروفتومتری بررسی شد. در بررسی ژل دو باند *18s* و *28s*، *RNA* ریبوزومی به‌وضوح قابل‌مشاهده هستند که نشان‌دهنده عدم تجزیه *RNA* است (شکل ۱).



شکل ۱- حضور سه باند 28s، 18s و 5.8s ریبوزومی در RNA تام استخراج‌شده و چاهک اول مارکر ۱۰۰ bp است

بررسی کیفی *cDNA* سنتز شده

طبق مراحلی که در فصل قبل آورده شد *cDNA* توسط تکنیک *RT-PCR* تکثیر شد. به‌منظور تائید طول قطعه محصول را بر روی ژل آگارز برده شد. از ژن *GAPDH house keeping* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد؛ که قطعه‌ای به طول ۱۸۴ جفت باز تکثیر شد (شکل ۲).

بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز *(CD34)* در افراد مبتلا به سرطان خون و افراد سالم

در این مطالعه برای مقایسه میزان تغییرات نسبی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز در گروه‌های بیمار و کنترل از

www.SID.ir

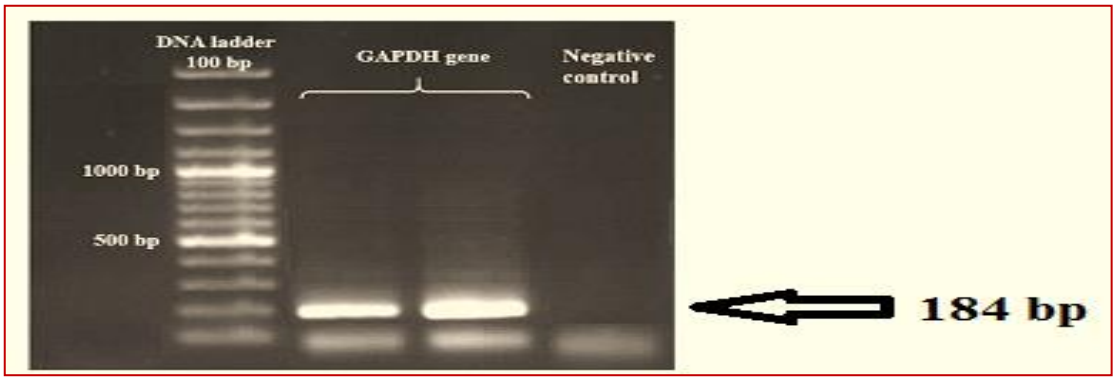
Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

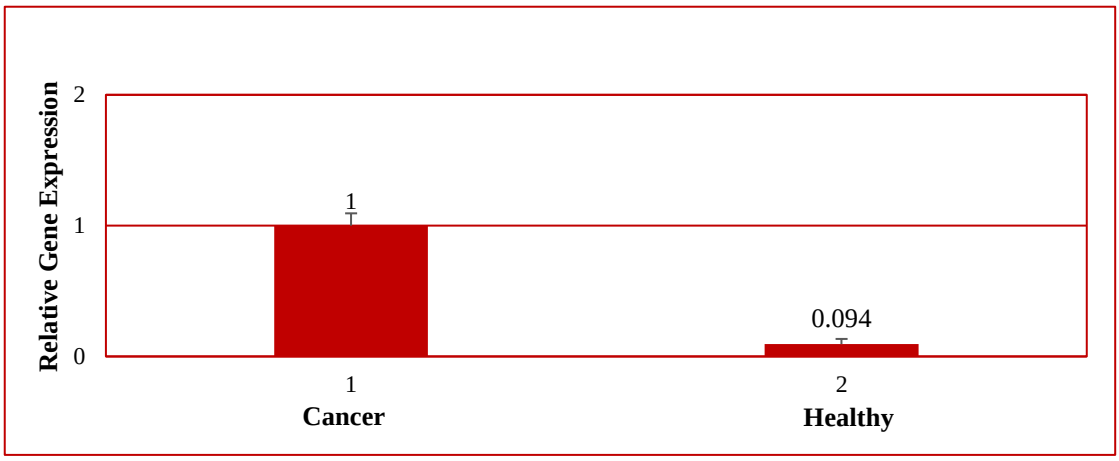
Relative Quantification($2^{-\Delta\Delta CT}$) استفاده شد. نتایج بررسی در نمودار ۱ آورده شده است.

بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز *(CD34)* بین دو گروه سنی زیر ۴۸ سال و بالای ۴۸ سال

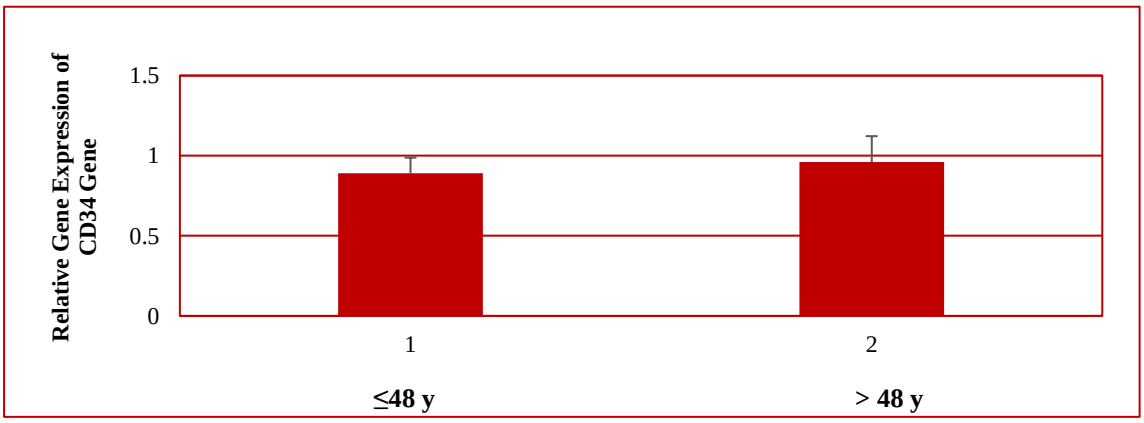
نتایج بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز *(CD34)* در دو گروه سنی زیر ۴۸ سال و بالای ۴۸ سال نشان داد که میزان بیان ژن *CD34* در دو گروه ازلحاظ آماری تفاوت چندانی ندارد و در هر دو گروه بیان تقریباً یکسانی را نشان می‌دهد؛ بنابراین با درجه‌ی اطمینان ۹۵ درصد می‌توان گفت میزان بیان ژن *CD34* با سن افراد ارتباط معناداری ندارد (*P-value=0.73*) که در نمودار ۲ نمایش داده‌شده است.



شکل ۲- بیان ژن GAPDH در نمونه‌های سالم و سرطانی



نمودار ۱- میزان بیان نسبی آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز در دو گروه سالم و بیمار که نمودار عمودی بر اساس دلتا ct است.



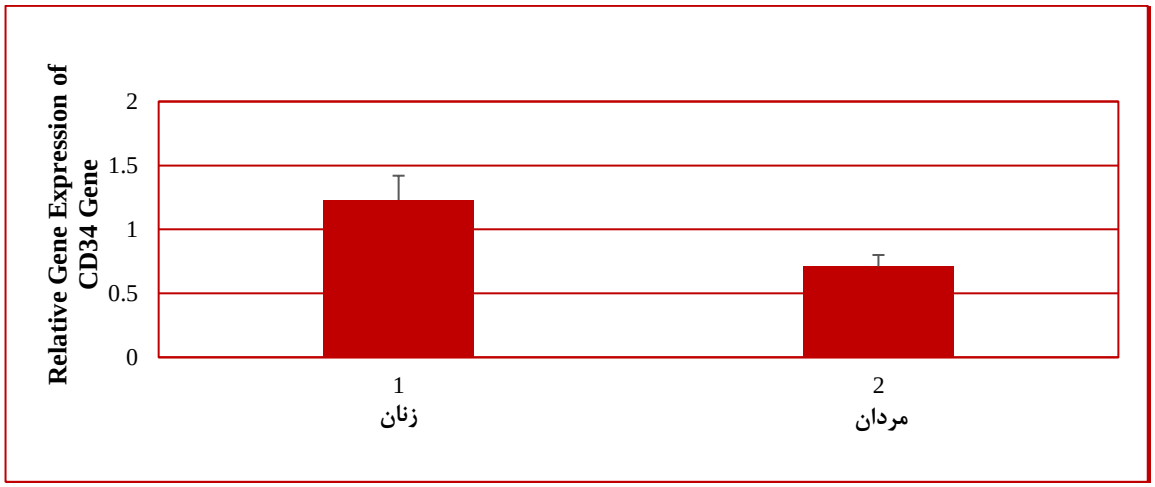
نمودار ۲- بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (CD34) در افراد زیر ۴۸ و افراد زیر ۴۸ سال که نمودار عمودی بر اساس دلتا ct است.

www.SID.ir
journal.fums.ac.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

نمودار بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز *(CD34)* در مردان و زنان

نتایج حاکی از بررسی آماری بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون-ساز *(CD34)* در مردان و زنان مثبت نشان داد که بیان ژن *CD34* به‌صورت معناداری در نمونه‌های مردان نسبت به نمونه‌های زنان به‌صورت معناداری افزایش می‌یابد (*P-Val=0.002*)؛ بنابراین می‌توان با سطح اطمینان ۹۵ درصد بیان کرد که میزان بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز با بروز سرطان خون در افراد ارتباط دارد.



نمودار ۳- بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (CD34) در مردان و زنان

جدول ۲- بررسی آماره‌های توصیفی برای بررسی سیکل آستانه ΔCT در دو گروه سالم و مبتلا به سرطان خون

گروه	تعداد	ΔCT میانگین	انحراف استاندارد	CI(%95)	کمینه	بیشینه
سالم	۳۰	۴/۴۵۸	۰/۵۰۹	(۳/۵-۶۵/۲۷)	۳/۹۲	۵/۰۵
سرطانی	۳۰	۸/۵۳۲	۱/۶۷۴	(۶/۱۰-۴۵/۶۱)	۶/۲۱	۱۰/۸۶

کاهش‌یافته است (*P-value=0.03*) که در نمودار ۳ نشان داده‌شده است.

آنالیز آماری میزان بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز در دو گروه سالم و بیمار با بررسی ΔCT برای دو گروه صورت پذیرفت. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی ΔCT در دو گروه در جدول ۲ نشان داده‌شده است.

در این راستا پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، از آزمون آنالیز واریانس جهت بررسی معنی‌داری اختلاف بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز در دو گروه استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد که میزان بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز در گروه بیمار

بحث

با بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (CD34) در افراد مبتلا به سرطان خون ALL و افراد سالم دریافتیم که این ژن در سرطان افزایش معناداری را از خود نشان می‌دهد. در بیماری لوسمی حاد، مغز استخوان مقدار بسیار زیادی سلول‌های سفید خونی نارس تولید می‌کند. سلول‌های سرطانی شده بر سایر انواع سلول‌های خونی که توسط مغز استخوان ساخته می‌شوند ازجمله گلبول‌های قرمز خون و پلاکت‌های خونی نیز اثر می-گذارند.

درمان لوسمی بسیار پیچیده است و به سن، جنس، وضعیت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

سلامتی و نوع لوسمی بستگی دارد (۱۵). درمان‌های مختلفی برای بیماری لوسمی عنوان‌شده، برخلاف سایر انواع سرطان‌ها، لوسمی تومور جامد توپری نیست که پزشک بتواند با عمل جراحی آن را خارج نماید. درواقع مغز استخوان منبع این مشکل است. درمان‌هایی که امروزه برای مقابله با لوسمی‌ها انجام می‌گیرد شیمی‌درمانی، درمان زیستی، بازدارنده‌های کینازی، پیوند مغز استخوان و پیوند سلول بنیادی هستند. داروهای شیمی‌درمانی که باعث می‌شوند سلول‌های سرطانی به تخریب خودشان بپردازند، گاهی با مقاومت سلول‌های سرطانی مواجه می‌شوند. تحقیقات تازه وجود ماده‌ای را در این بیماران نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی را نسبت به این نوع درمان مقاوم خواهد کرد (۱۶).

مطالعات اخیر نشان‌دهنده نقش سلول‌های بنیادی سرطان در پیشروی، عود و متاستاز سرطان و همچنین نقش آن‌ها در مقاومت دارویی است. وجود تفاوت در خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان با سلول‌های بنیادی نرمال امکان شناسایی این سلول‌ها را فراهم می‌کند که از آن جمله بیان شاخص‌های سطح سلولی مانند CD133، ALDH1، CD44، CD34، CD45، Rthy1.2، Vcam1 و CD31 را می‌توان نام برد. در سه دهه گذشته، پژوهشگران داده‌های زیادی را درباره ژن‌ها و پروتئین‌ها و نقش آن‌ها در تولید سلول‌های طبیعی و سرطانی گزارش کرده‌اند. یکی از اکتشاف‌های مهم آن‌ها، نقش ژن‌های جهش‌یافته در تولید سلول‌های سرطانی بوده است. عوامل محیطی که باعث جهش‌های ژنتیکی می‌شوند، در حال شناسایی هستند. با کمک روش‌های گوناگون مولکولی میکروآری و طیف‌سنجی جرمی می‌توان قدرت بیان ژن‌ها و پروتئین‌های معیوب را تعیین نمود. حتی پیدا کردن بیومارکرهای نوین که شاخص یک نوع سرطان هستند، در تشخیص زودرس و بهبود به هنگام بیماری سرطان، کمک‌های شایان توجهی را می‌نماید. پس از تعیین شکل‌های فضایی پروتئین‌های معیوب، می‌توان داروهای ضد سرطان نوینی را ساخت که بتوانند سلول‌های در حال سرطانی شدن را هدف قرار بدهند و از تولید و رشد آن‌ها به سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند (۱۷). مطالعاتی در رابطه با پژوهش ما انجام‌شده است به‌عنوان‌مثال Taussing و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی بیماران لوسمی AML در ژن CD34 پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند که یکی از ژن‌های متداول در AML است که بابیان کم CD34همراه است اما نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (۱۸). از سوی دیگر Pui و همکاران به اهمیت بالینی بیان CD34 در لوسمی لنفوبلاستیک حاد در کودکان پرداختند و اظهار داشتند که تجزیه‌وتحلیل چند متغیره نشان داد که اثر پیش‌آگهی آنتی‌ژن مستقل از سن، تعداد لکوسیت‌ها و سایر عوامل شناخته‌شده است. از طرفی بیان CD34 با لوسمی اولیه CNS و منفی CD10 همبستگی مثبت داشت اما تجزیه‌وتحلیل نشان داد که درمان بابیان آنتی‌ژن CD34 و به‌عنوان یک مارکر آگهی‌دهنده و یک جواب قطعی نیاز به مطالعه بیشتر دارد و اظهار داشتند که بیان CD34ممکن است تفاوت‌های اساسی بیولوژیکی بین این‌گونه سرطان خون را منعکس کنند (۱۹). در سال ۲۰۰۹ Yamazaki و همکاران به بررسی CD90 و CD110 در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک T حاد انسانی پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند که CD34 تنها نشانگر انتخاب برای CSC در بیماری T-ALL است و بنابراین تجزیه‌وتحلیل گسترده‌ای از نشانگرهای CD را در رده‌های سلولی T-ALL انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که CD90 + / CD110 + در برخی موارد T-ALL نشانگرهای انتخاب مثبت برای جداسازی CSCها هستند بنابراین مطالعات بیشتر در این موردنیاز است (۲۰). در سال ۲۰۱۷ Lang و همکاران به بررسی بیان CD34 و CD38 پلاستیک در لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌رونده سلول B بزرگ‌سالی پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند این تجزیه‌وتحلیل‌ها برای یافتن نشانگرهای مناسب برای شناسایی LIC در ALL که یک پیش‌نیاز برای توسعه روش‌های درمانی جدید باراهنمایی LIC است، ضروری است. این استراتژی‌های جدید به‌منظور بهبود نتیجه طولانی‌مدت و بقا در کلیه بیماران موردنیاز فوری است. همچنین آن‌ها اظهار داشتند که بیان این ژن‌ها در سرطان تغییر می‌کند ولی نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۲۱). از این‌سو در این مطالعه ما به بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (CD34) در افراد مبتلا به سرطان خون ALL و افراد سالم پرداختیم و دریافتیم که این ژن در سرطان افزایش معناداری را از خود نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

مطالعات انجام‌شده در این پژوهش نشان داد که بیان ژن CD34 در افراد مبتلا به سرطان خون به‌طور معناداری افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد به شماره

www.SID.ir

مصوب ۱۳۳۳۰۵۲۰۹۶۱۰۰۳ و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد است و از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

تعارض منافع

تمامی نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

References

1. Fattahi E, Hossein Somi M, Ebrahimzade E, Fakhrjo A, Naghashi S. Evaluation of Relationship between Serum Levels of Tumor Markers (CEA, CA19-9) with Diagnosis, Pathological Finding and Staging in Colorectal Carcinoma. Health Promot Perspect. 2012;33(6): 1-7.
2. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). J Natl Cancer I. 2005;97(16):1180-4.
3. Foster N, Andreadou K, Jamieson L, Preshaw PM, Taylor JJ. VIP inhibits P. gingivalis LPS-induced IL-18 and IL-18BPa in monocytes. J Dent Res. 2007;86(9):883-7.
4. Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34+ or CD34−: which is the more primitive? Leukemia. 2002;16(9):1603-8.
5. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. J cell science. 2008;121(22):3683-92.
6. Orta-Salazar E, Vargas-Rodríguez I, Castro-Chavira SA, Feria-Velasco AI, Díaz-Cintra S. Alzheimer's Disease: From Animal Models to the Human Syndrome. InUpdate on Dementia. 2016;28(3):45-55.
7. Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. Traffic. 2005;6(11):1047-57.
8. Lesuis N, Befrits R, Nyberg F, van Vollenhoven RF. Gender and the treatment of immune-mediated chronic inflammatory diseases: rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and psoriasis: an observational study. BMC medicine. 2012;10(1):82.
9. Sommer IE, de Witte LD, Begemann M, Kahn RS. 14: 45 non-steroidal anti-inflammatory drugs in schizophrenia: ready for practice or a good start? A meta-analysis. Schizophrenia Research. 2012; (136):S76.
10. Dinarello CA. Role of IL-18 in inflammatory diseases. New Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis: Springer; 2009. p. 103-27.
11. Dinarello CA. Role of IL-18 in inflammatory diseases. InNew Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis. 2009; (3):103-127.
12. Kwok YK, Tang MH, Law HK, Ngai CS, Lau YL, Lau ET. Maternal plasma or human serum albumin in wash buffer enhances enrichment and ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ cells. Br J Haematol. 2007;137(5):468-74.
13. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Corbeil D, Ordemann R. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-modeling the niche compartments in vitro. Haematologica. 2010;95(4):542-50.
14. Frei GM, Persi N, Lador C, Peled A, Cohen YC, Nagler A, et al. Nicotinamide, a form of vitamin B3, promotes expansion of natural killer cells that display increased in vivo survival and cytotoxic activity. Am Soc Hematology;2011; (45):4035-4035
15. Corces MR, Buenrostro JD, Wu B, Greenside PG, Chan SM, Koenig JL, et al. Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. Nature genetics. 2016;48(10):1193-203.
16. Quek L, Otto GW, Garnett C, Lhermitte L, Karamitros D, Stoilova B, et al. Genetically distinct leukemic stem cells in human CD34− acute myeloid leukemia are arrested at a hemopoietic precursor-like stage. J Experiment Med. 2016;213(8):1513-35.
17. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. New England J Med. 2015;373(12):1136-52.
18. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34− fraction. Blood. J American Society Hematol. 2010;115(10):1976-84.
19. Pui CH, Hancock ML, Head DR, Rivera GK, Look AT, Sandlund JT, et al. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood.1993; (9): 889-894.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Yamazaki H, Nishida H, Iwata S, Dang NH, Morimoto C. CD90 and CD110 correlate with cancer stem cell potentials in human T-acute lymphoblastic leukemia cells. Biochem biophysic research communications. 2009;383(2):172-7.

21. Lang F, Wojcik B, Bothur S, Knecht C, Falkenburg JF, Schroeder T, et al. Plastic CD34 and CD38 expression in adult B–cell precursor acute lymphoblastic leukemia explains ambiguity of leukemia-initiating stem cell populations. Leukemia. 2017;31(3):731-4.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

www.SID.ir
journal.fums.ac.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:50 +0430 on Saturday April 3rd 2021

Original Article

Evaluation of Cell Biomarker Gene Expression (CD34) in ALL Patients and Healthy Controls Expression (CD34) in People with Leukemia

Moradizadeh G, Zia Jahromi N*, Sazgar H

Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 06 Apr 2020 Accepted: 02 June 2020

Abstract

Background & Objective: CD34 is a prognostic factor in determining the prognosis of patients with acute myeloid leukemia. Since the relationship between expression of the marker of the CD34 cell line and many cancers has been proven today, in this study, the measurement of the expression of this marker with leukemia was investigated.

Materials & Methods: The present study is a case-control study performed on 30 healthy blood samples and 30 blood samples from blood donors. Lymphocytes were isolated using Ficole method. RNA was extracted. After synthesis of cDNA, expression regions were determined using Real Time RT-PCR with an internal control of GAPDH.

Results: After performing the PCR reaction with specific primers in Real Time RT PCR and analyzing the results, the expression of CD34 gene in the blood of cancer patients was increased compared to healthy subjects (F = 21.588, P-Val = 0.002).

Conclusion: Finding new biomarkers, which are a common indicator of cancer, can help with early diagnosis and recovery during cancerous illnesses. By reviewing these biomarkers, it is possible to develop new anti-cancer drugs that can target cancerous cells and prevent growth from growing into cancerous cells.

Keywords: CD34, Real-time RT PCR, leukemia, cancer stem cells

***Corresponding Author: Zia Jahromi Noosha,** Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: nooshazia.59@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6114-7060

Journal of Fasa University of Medical Sciences 10 (2020): 2578-2587

www.SID.ir