خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۳ پاییز ۹۱ (۳۳۰-۳۲۳)

مقاله پژوهشی

تشخیص میکرومتاستاز کارسینومای سلول کلیوی توسط مارکر CA9 با استفاده از روش Real-Time RT PCR

بابک باجلان[۱]، مهرداد هاشمی[۲]، محمود پروین[۳]، مجید ذکی دیزجی[۴]، کامران علی مقدم[۵]، اردشیر قوام‌زاده[۵]، سید حمیداله غفاری[۶]

چکیده

سابقه و هدف

حدود ۴۰ درصد از مبتلایان به سرطان کلیه حتی پس از خارج نمودن کامل کلیه(رادیکال نفرکتومی) دچار متاستاز می‌شوند. بنابراین یافتن راهی برای تشخیص شروع متاستاز بسیار ارزشمند می‌باشد. در تحقیق حاضر، امکان تشخیص میکرومتاستاز سرطان کلیه با استفاده از نشانگر(CA9) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، از ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کلیه که به بیمارستان دکتر لبافی‌نژاد مراجعه نموده بودند، به صورت غیر تصادفی در دسترس خونگیری به عمل آمد. اطلاعات مربوط به درجه و مرحله تومور هر یک از بیماران از پاتولوژی دریافت گردید. از رده سلولی سرطان کلیه به نام ACHN به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت بررسی ارتباط بین میزان بیان ژن، درجه و مرحله تومور، از روش‌های آماری من‌ویتنی U و کروسکال والیس استفاده گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ۱۳ تحلیل شدند.

یافته‌ها

از ۳۰ بیمار مورد مطالعه، در ۶ بیمار شاهد افزایش تعداد نسخه‌های ژن CA9 بودیم. از این ۶ بیمار، ۳ بیمار در Stage I ، ۲ تا در Stage II و ۱ مورد در Stage III قرار داشتند. هم‌چنین پس از گذشت یک سال از نمونه‌گیری، پیگیری بیماران نشان داد که ۴ بیمار دچار متاستاز شده‌اند اما ارتباط معناداری بین تعداد نسخه‌های ژن با متاستاز یافت نگردید.

نتیجه گیری

این نتایج نشان می‌دهد ژن CA9 می‌تواند مارکر مناسبی جهت تشخیص میکرومتاستاز در خون بیماران مبتلا به سرطان سلول کلیه(RCC) باشد. هم چنین امید است با پیگیری طولانی مدت بیماران مبتلا به سرطان در آینده امکان پیش‌بینی وقوع متاستاز توسط سنجش مارکر CA9 فراهم گردد.

کلمات کلیدی: سرطان سلول کلیوی، میکرومتاستاز، کربنیک انهیدراز

تاریخ دریافت: ۹۰/ ۶/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۷

۱ـ کارشناس ارشد ژنتیک ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران ـ تهران ـ ایران
۲ـ PhD ژنتیک مولکولی ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۳- متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و بیمارستان شهید دکتر لبافی‌نژاد ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۵ـ فوق تخصص خون و انکولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۶ـ مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران ـ کارگر شمالی ـ کدپستی: ۱۴۱۱۱

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سرطان سلول کلیه(Renal Cell Carcinoma = RCC) یا همان تومورهای بدخیم سلول‌های پوششی کلیه، ۸۵ درصد کل نئوپلاسم‌های کلیه را تشکیل می‌دهند(۱).

این تومورها در هر دو کلیه، شیوع یکسانی دارند و به طور اتفاقی در قطب‌های فوقانی و تحتانی توزیع می‌شوند. تشخیص میکرومتاستاز در تومور سلول‌های کلیه از چند جنبه حایز اهمیت می‌باشد:

اولین نکته به ماهیت کلیه و عملکرد آن باز می‌گردد که همان تصفیه خون می‌باشد. بنابراین در صورت وجود تومور در این دستگاه، امکان شسته شدن سلول‌های توموری به وسیله جریان خون مداومی که از آن عبور می‌کند و به تمام بدن پخش می‌گردد بسیار زیاد است و همان‌طور که می‌دانیم سلول‌های توموری جدا شده از تومور کلیه، می‌توانند در هر قسمت از بدن منشا تومور ثانویه باشند که در نهایت به متاستاز منجر می‌شود(۲).

دومین نکته؛ روش درمانی موجود برای این سرطان است که همان خارج نمودن کامل کلیه از بدن می‌باشد. متاسفانه حتی پس از برداشت کامل کلیه مبتلا به تومور، باز هم در برخی بیماران متاستاز رخ می‌دهد و یا در کلیه سالم همان بیمار پس از مدتی تومور ظاهر می‌شود که علت این امر، به وجود سلول‌های توموری شسته شده در جریان خون باز می‌گردد. از طرفی سرطان سلول‌های کلیوی، شایع‌ترین نوع کانسر کلیه بوده و تقریباً ۳ درصد از کل بدخیمی‌های بزرگسالان در ارتباط با این بیماری است. پیش‌آگهی آن هم‌چنان ضعیف باقی مانده است. بقای ۵ ساله در این افراد بین ۳۰ تا ۶۰ درصد بسته به مرحله تومور متغیراست(۲، ۱).

بر اساس مطالعه‌های بالینی و ژنتیک، عوامل خطرزای متعددی برای پیدایش سرطان کلیه وجود دارد. اکثر مطالعه‌ها با تعداد بیمار کافی نشان می‌دهد که یک ارتباط مثبت بین سرطان کلیه و مصرف سیگار به میزان ۳۵ درصد افزایش خطر وجود دارد. چاقی نیز ارتباط مثبتی با سرطان کلیه نشان می‌دهد(۴، ۳).

تظاهرات بالینی سرطان کلیه بسیار متغیر است. تومورها کوچک و اغلب بدون علامت بوده و تعداد زیادی از ضایعات تا زمانی که به مرحله پیشرفته نرسند، کشف نمی‌شوند. اگر چه سه علامت(درد پهلو، هماچوری و توده پهلو) به همراه سرطان کلیه گزارش شده است، ولی هر سه علامت به ندرت با یکدیگر دیده می‌شوند(۶، ۵). روش‌های تشخیصی شامل رادیوگرافی، آنژیوگرافی، سونوگرافی، CT اسکن و MRI می‌باشند که هر یک با محدودیت‌های ویژه خود همراه هستند(۸، ۷). با وجود تمامی مشکلات در تشخیص این بیماری پس از قطعی شدن وجود تومور، نمونه بیوپسی کلیه بیمار گرفته می‌شود تا توسط روش‌های پاتولوژی، نوع و مرحله تومور تشخیص داده شود. هدف مرحله‌بندی، انتخاب درمان مناسب و تهیه اطلاعاتی برای تعیین پیش‌آگهی است(۹).

به طور کلی مرحله‌بندی تومور کلیه از نظر پاتولوژی به صورت زیر انجام می‌پذیرد:

مرحله I : تومور محدود به پارانشیم کلیه است.

مرحله II : تومور چربی دور کلیه را درگیر کرده است.

مرحله III : تومور ورید اصلی کلیه را درگیر می‌کند.

مرحله IV : وجود متاستاز دوردست.

بررسی‌های تکمیلی برای ارزیابی مرحله‌بندی کامل بالینی عبارتند از: شرح حال و معاینه فیزیکی، شمارش کامل خونی، بررسی مواد شیمیایی سرم(عملکرد کلیه و کبد)، آنالیز ادرار، رادیوگرافی قفسه سینه(CT اسکن قفسه سینه در موارد مبهم)، CT اسکن شکم و لگن، و اسکن رادیونوکلوئید از استخوان(با تصاویر اشعه X از نواحی غیر طبیعی)(۱۱، ۱۰). پس از مشخص شدن نوع و مرحله تومور، نوبت به درمان بیماری می‌رسد. تاکنون خارج کردن ضایعه در مرحله زودرس با جراحی، به عنوان تنها درمان بهبود دهنده بالقوه در دسترس برای بیماران مبتلا به RCC مطرح بوده است. متاسفانه تقریباً در ۳۰٪ بیماران مبتلا به RCC ، بیماری متاستاتیک بروز می‌کند. RCC متاستاتیک، جزو بیماری‌هایی است که سیر طبیعی آن به طور بارز تهاجمی و سریعاً پیش‌رونده می‌باشد(۱۳، ۱۲).

مهم‌ترین علت ذکر شده برای وقوع متاستاز حتی بعد از رادیکال نفرکتومی، وجود سلول‌های سرطانی می‌باشد که از تومور اولیه جدا شده و به وسیله جریان خون و یا لنف در نقاط دیگر بدن پخش می‌گردند. این مرحله میکرومتاستاز

Archive of SID
www.SID.ir

نام دارد. این سلول‌ها می‌توانند حتی پس از عمل جراحی و خارج کردن تومور اصلی، باعث عود مجدد و یا متاستاز شوند. بنابراین تشخیص زود هنگام این مرحله بسیار با اهمیت می‌باشد زیرا که هر چه تعداد سلول‌های توموری در خون محیطی بیشتر باشد، احتمال وقوع متاستاز در آینده نزدیک بیشتر خواهد بود(۱۴). برای تشخیص میکرومتاستاز می‌بایست وجود سلول‌های توموری را در خون محیطی بیمار مشخص نمود. یکی از وجوه تمایز این سلول‌ها، تفاوت الگوی بیان برخی ژن‌ها در مقایسه با سلول‌های سالم می‌باشد که به آن‌ها تومور مارکر می‌گویند.

یکی از بهترین تومور مارکرها در تشخیص سلول‌های توموری کلیه، ایزو آنزیم شماره ۹ خانواده کربنیک انهیدرازها (CA9) است که وظیفه تنظیم pH سلول را بر عهده دارد(۱۶، ۱۵). به همین علت امکان تشخیص میکرومتاستاز سرطان کلیه پس از رادیکال نفرکتومی توسط نشانگر تومور CA9 در خون محیطی بیماران، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. از ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کلیه که به بیمارستان دکتر لبافی‌نژاد مراجعه نموده بودند، به صورت غیر تصادفی در دسترس خونگیری به عمل آمد(جدول ۱).

داده‌های مربوط به درجه و مرحله تومور هر یک از بیماران از بخش پاتولوژی بیمارستان دریافت شد. از ۱۶ فرد سالم با میانگین سنی ۵۵ سال به عنوان کنترل منفی و ۳۰ نمونه با رده سلولی سرطان کلیه(ACHN) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

استخراج RNA کل از لنفوسیت‌ها و ساخت cDNA:

به لوله فالکون حاوی رسوب سلول‌های لنفوسیتی، یک میلی‌لیتر RNX (تهیه شده از شرکت سیناژن) اضافه کرده و مطابق با دستورالعمل کیت، استخراج انجام گردید. پس از جدا نمودن ۴ میکرولیتر از محلول RNA (برای سنجش غلظت RNA)، نمونه استوک در ۲۰ºC- نگهداری شد.

جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافیک بیماران مورد مطالعه

فاکتور		شماره
جنسیت	مرد	۱۸
	زن	۱۲
سن، سال	متوسط	۶۰
	حداقل ـ حداکثر	۲۹-۸۸
رده تومور	۱	۱۲
	۲	۱۳
	۳	۵
درجه تومور	۱	۰
	۲	۲۲
	۳	۷
	۴	۱
متاستاز	بله	۴
	نه	۲۶

تعیین غلظت RNA استخراج شده :

غلظت RNA توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به نسبتی با آب بدون RNase مخلوط گردید که هر نمونه حاوی ۱۰۰۰ نانوگرم RNA کل باشد و بعد نمونه‌ها در ۲۰ºC- نگهداری شد.

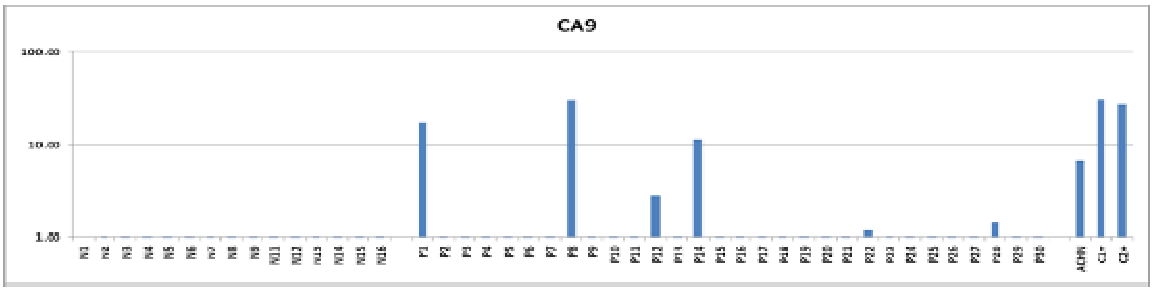
ساخت cDNA از RNA های استخراج شده:

برای ساخت cDNA با غلظت‌های برابر، یک میکروگرم از هر نمونه RNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT محصول شرکت تاکارا به cDNA رونویسی شد.

جدول ۲: توالی آغازگرها

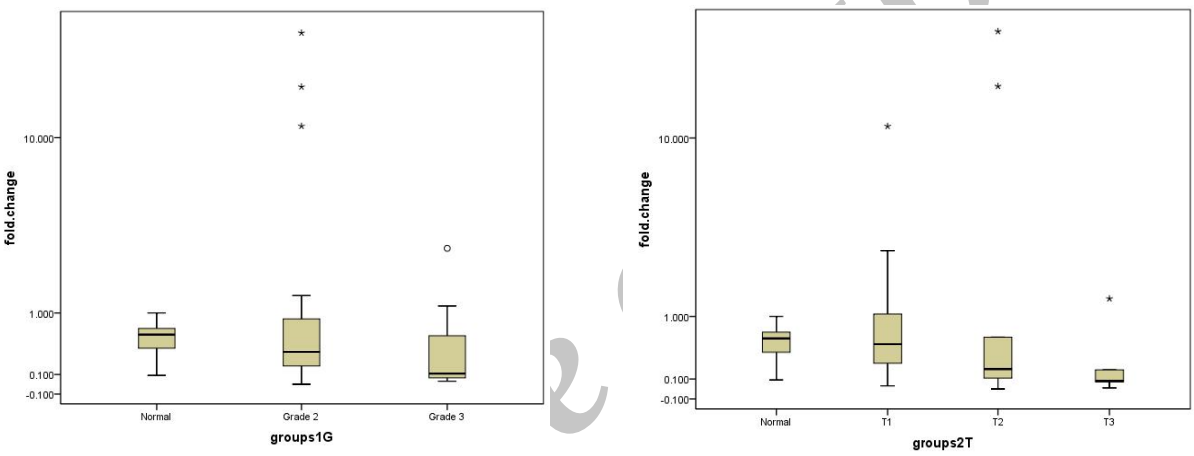
Gene symbol	آغازگر	(5' to 3') Sequence
CA9	جلوبرنده	GGACAAAGAAGGGGATGA
CA9	معکوس	AGTTCTGGGAGCGGCGGGAG
Gene symbol	آغازگر	(5' TO 3') Sequence
HPRT	جلوبرنده	TGGACAGGACTGAACGTCTTG
HPRT	معکوس	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱: تعداد نسخه‌های ژن CA9 درگروه سالم(N)، بیمار(P) و کنترل (C2 ، C1 و ACHN)

(تعداد نسخه‌های ژن، در محور عمودی و نمونه‌های بیماران، افراد سالم و گروه کنترل مثبت به تفکیک در محور افقی نشان داده شده است.)



CA9 mRNA expression (relative level)				
Normal	۱۵	۰/۶۲	۰/۰۹–۱/۰۰	
Stage				
pT1	۱۲	۰/۵۴	۰/۰۳–۱۱/۳۱	۰/۲۰[a]
pT2	۱۰	۰/۲۱	۰/۰۰–۲۹/۴۵	
pT3	۵	۰/۰۸	۰/۰۱–۱/۳۷	
Grade				
G2	۱۹	۰/۳۷	۰/۰۰–۲۹–۴۵	۰/۲۹[a]
G3	۷	۰/۱۱	۰/۰۳–۲/۷۵	

a) Kruskal-Walls Test

نمودار ۲: مقایسه میزان بیان ژن CA9 در بیماران به تفکیک مراحل (III, II, I) تومور با گروه افراد سالم

طراحی آغازگرها:

جهت طراحی آغازگرها ابتدا توالی cDNA ژن‌هـا از ژن بانک گرفته شـد و سـپس بـا نـرم‌افـزار ABI(بیوسیسـتم)، بهترین ناحیه برای این آغازگرها طبق جدول ۲ تعیین شد.

Real-Time PCR :

در این تحقیـق از کیـــت SYBR® Premix Ex Taq ™ محصول شرکت تاکارا برای انجام Real-Time PCR استفاده گردید. هم چنین از روش جدید Shuttle PCR با توجه بـه دستورالعمل شرکت تاکارا استفاده شـد. در ایـن روش دو فرآیند آنیلینگ و اکستنشن با هم ممـزوج شـده و PCR در دو مرحله انجام می‌شود. مزیت این روش، افزایش سـرعت PCR می‌باشد.

از یک ژن Housekeeping به نام HPRT به عنوان کنترل

www.SID.ir

داخلی استفاده شد. مقادیر Ct حاصل از دستگاه Real time به صورت صفحه‌ای تحت برنامه Microsoft Excel ارایه شد. سپس این مقادیر در فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ قرار داده شد و میزان تفاوت در تعداد نسخه‌های ژن هدف نسبت به ژن کنترل که همان HPRT می‌باشد محاسبه گردید.

یافته‌ها

پس از تجزیه وتحلیل مقادیر Ct حاصل از دستگاه Light- cycler ، نتایج به شکل منحنی به دست آمد(نمودار ۱). همان طور که مشاهده می‌شود، ژن CA9 در افراد سالم نیز به میزان بسیار کم بیان می‌شود. هم چنین از ۳۰ بیمار مورد مطالعه، در ۶ بیمار افزایش تعداد نسخه‌های ژن CA9 در مقایسه با افراد سالم بسیار چشمگیر است. حتی در بیمار شماره ۸ ، این میزان از گروه کنترل مثبت(Cell-line ACHN) نیز بیشتر است(نمودار۱). با مقایسه میزان بیان ژن CA9 در بیماران به تفکیک مرحله‌ای از تومور(Stage) که به آن دچار بودند، نتایج ارایه شده در نمودار ۲ به دست آمد.

بحث

تظاهرات بالینی سرطان کلیه بسیار متفاوت است. تومورهای کوچک اغلب بدون علامت بوده و تعداد زیادی از ضایعات تا زمانی که به مرحله پیشرفته نرسند، کشف نمی‌شوند. روش های تشخیصی شامل رادیوگرافی، آنژیوگرافی، سونوگرافی، CT اسکن و MRI می‌باشند. در روش رادیوگرافی، فقط ۱۰ درصد ازسرطان‌های کلیه حاوی کلسیفیکاسیون هستند و در فیلم قابل تشخیص می‌باشند. آنژیوگرافی نیز به علت تهاجمی بودن جای خود را به روش‌هایی مثل MRI داده است. سونوگرافی در تشخیص ضایعات کمتر از ۲ سانتی‌متر حساسیت کمی دارد (۱۲، ۱۱، ۵).

میکرومتاستازها می‌توانند نقش کلیدی در بازگشت مجدد بیماری داشته باشند. قبل از این که متاستاز به طور آشکار مشهود گردد، سلول‌های توموری از توده سرطانی اولیه جدا شده و از طریق لنف یا خون به نقاط دیگر بدن منتقل می‌شوند. از نظر تئوری، اگر چه تمامی سلول‌های توموری آزاد قابلیت رشد و ایجاد متاستاز را ندارند ولی برخی از این سلول‌ها، در جریان لنف یا خون زنده می‌مانند و منشا متاستاز می‌گردند. با توجه به نظریه فوق می‌توان از وجود این سلول‌ها در لنف و خون به عنوان یک شاخص کلینیکی در تشخیص متاستاز بهره برد. در حال حاضر با استفاده از نمونه بافت پس از انجام عمل جراحی و بررسی پاتولوژیک بر روی نمونه، می‌توان به وجود متاستاز پی برد که این روش خود دارای معایبی جهت تشخیص در مراحل اولیه می‌باشد(۱۷).

بررسی بر روی سلول‌های توموری آزاد در نمونه خون می‌تواند به عنوان یک روش غیر تهاجمی و با سهولت بیشتر در امر نمونه‌گیری، جایگزین روش‌های موجود گردد. امروزه از روش‌های حساسی جهت بررسی سلول‌های سرطانی در خون، از قبیل ایمونوهیستوشیمی، فلوسیتومتری و Real-Time PCR استفاده می‌شود(۱۹، ۱۸).

بر اساس تحقیقات بسیاری که در زمینه تشخیص اولیه سرطان کلیه توسط مارکرهای مولکولی انجام شده، مشخص گردیده ژن CA9 می‌تواند یکی از بهترین نشانگرها جهت تشخیص زود هنگام میکرومتاستاز در سرطان کلیه باشد(۳۱-۲۰).

یک پروژه تحقیقاتی در سال ۲۰۰۷ ، نمونه تازه تومور از بیماران مبتلا به RCC گرفته شد و میزان بیان ژن CA9 دراین نمونه‌ها به روش Real-Time PCR سنجیده شد. پس از پی‌گیری ۵ ساله نشان داده شد بین میزان بیان ژن CA9 در تومور و مراحل اولیه متاستاز ارتباط معناداری وجود دارد(۲۱).

در سال ۲۰۰۹ در آمریکا، پیتر و همکاران رابطه میزان ژن CA9 را با RCC در خون محیطی بیماران توسط آنتی‌بادی مونوکلونال به روش آنزیمی بیان کردند. در این تحقیق نیز میزان بیان بسیار بالایی در نوع RCC مشاهده گردید(۲۲).

با نگاه کلی بر تحقیقات انجام شده بر روی نشانگر CA9 و ارتباط آن با سرطان کلیه می‌توان دریافت که این مارکر در تشخیص شروع متاستاز سرطان کلیه می‌تواند ارزش تشخیصی بالایی داشته باشد.

بلومکه و همکارانش با تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ انجام دادند، ارتباط معناداری بین میزان وجود سلول‌های توموری

Archive of SID
www.SID.ir

در جریان خون محیطی بیماران و متاستاز در آن‌ها یافتند و بیان داشتند، تشخیص وجود سلول‌های توموری در خون محیطی، فاکتور مستقل و بسیار با ارزشی در پیش‌بینی رفتار تومور و مراحل پیشرفت آن به حساب می‌آید(۱۴).

در سال ۲۰۰۶، ویستون و گیلبرت در مطالعه‌ای ارتباط بین میزان بیان ژن CA9 را در سلول‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان کلیه توسط روش RT-PCR بررسی نمودند. در این تحقیق که بر روی ۴۱ بیمار انجام گرفت، نشان داده شد که ژن CA9 در RCC بیان بالایی دارد اما پس از ۴ سال پیگیری بیماران، ارتباط معناداری بین بیان ژن CA9 و متاستاز یافت نگردید(۱۹).

با توجه به این که تحقیق اخیر تنها تحقیقی است که از نظر روش تشخیص نیز مشابه پژوهش حاضر است، نتایج به دست آمده در این دو مطالعه به هم شبیه بوده و در هر دو تحقیق ارتباط معناداری بین افزایش بیان CA9 و RCC دیده شد که نشان می‌دهد نشانگر CA9 جهت تشخیص وجود سلول توموری کلیه در خون محیطی، فاکتور ارزشمندی است. اما این ارتباط در مراحل مختلف تومور و متاستاز به دست نیامد.

همان طور که مشاهده می‌شود، هدف اصلی در این گونه پژوهش‌ها و پژوهش انجام شده این است که با استفاده از نمونه خون(به عنوان یک روش غیرتهاجمی)، می‌توان به بررسی مارکرهای مختلف پرداخت و تشکیل تومور و متاستاز آن را در مراحل اولیه بیماری داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به روش گزینش سلول‌های سرطانی در خون محیطی به کار رفته در این پژوهش، پیشنهاد می‌گردد با استفاده از روش‌های مناسب‌تر جهت به دست آوردن سلول‌های سرطانی در میان سلول‌های دیگر خون، از قبیل جداسازی سلول‌های سرطانی توسط ذرات آهن‌ربا با استفاده از مارکرهای سطحی سلول‌های سرطانی، در آینده‌ای نزدیک بتوان به نتایج مفیدتری دست یافت.

تشکر و قدردانی

با سپاس از تمامی مسؤولین مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی تهران که تحقیق حاضر با حمایت مالی و تجهیزات آنان انجام گردید و هم چنین همکاران آزمایشگاه و بخش اورولوژی وپاتولوژی بیمارستان دکتر لبافی‌نژاد که در تهیه نمونه‌ها همکاری بی‌دریغ نمودند.

References :

1- Cohen HT, McGovern FJ. Renal-Cell Carcinoma. review article. N Engl J Med 2005; 353(23): 2477-90.
2- Klatte T, Pantuck JA, Klaid MD, Belldegrun AS. Understanding the natural biology of kidney cancer: implications for targeted cancer therapy. Rev Urol 2007; 9(2): 47-56.
3- Leveridge MJ, Jowett MA. Recent developments in kidney cancer. Can Urol Assoc J 2011; 5(3): 195-203.
4- Mejean A, Oudard S, Thiounn N. Prognostic factors of renal cell carcinoma. J Urol 2003; 169(3): 821-7.
5- Furniss D, Harnden P, Ali N, Royston P, Elisen T, Oliver RT, *et al.* Prognostic factors for renal cell carcinoma. Cancer Treat Rev 2008; 34(5): 407-26.
6- Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey JF, Pantuck AJ, Zisman A, *et al*. Use of university of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma:an international multicenter study. J Clin Oncol 2004; 22(16): 3316-22.
7- Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, *et al*. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. J Urol 2005; 173(1): 48-50.
8- Frank I, Blute M, Chevile JC, Lohse CM, Weaver AL, Leibovich BC, *et al*. A multifactorial postoperative surveillance model for patients with surgically treated clear cell renal cell carcinoma. J Urol 2003; 170(6 Pt 1): 2225-32.
9- Yang XJ, Sugimura J, Schafernak KT, Tretiakova MS, Han M, Vogelzang NJ, *et al.* Classification of renal neoplasms based on molecular signatures. J Urol 2006; 175(6): 2302-6.
10- Gudbjartsson T, Hardarson S, Potursdottir V, Thoroddson A, Magnusson J, Einarssan GV. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. Eur Urol 2005; 48(4): 593-600.
11- Mulders P, Figlin R, deKernion JB, Wiltrout R, Linehan M, Parkinson D, *et al.* Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. Cancer Res 1997; 57(22): 5189-95.
12- Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SIGN score. J Urol 2002; 168(6): 2395-400.

Archive of SID
www.SID.ir

13- Clark A, Breau RH, Morash C, Ferguson D, Doucete S, Cagianos I. Preservation of renal function following partial or radical nephrectomy using 24-hour creatinine clearance. Euro Urol 2008; 54(1): 143-49.
14- Blümke K, Bilkenroth U, Meye A, Fuessel S, Lautenschlieger C, Goebel S, *et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal carcinoma correlates with prognosis. Cancer Epidemial Biomarkers Prev 2009; 18(8); 2190-4.
15- Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, Scaloni A, Matulis D, Innocenti A, *et al.* Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. J Biol chem 2008; 283(41): 27799-809.
16- Li G, Cuilleron M, Cottier M, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, *et al*. The Use of MN/CA9 gene expression in identifying malignant solid renal tumors. Eur Urol 2006; 49(2): 401-5.
17- Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miaqkova A, Tarasova N, Weirich G, *et al*. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrase in human cancer. Am J Pathol 2001; 158(3): 905-919.
18- Papworth K, Sandlund J, Grankvist K, Liungberg B, Rasmuson T. Soluble carbonic anhydrase IX is not an independent prognostic factor in human renal cell carcinoma. Anticancer Res 2010; 30(7): 2953-7.
19- Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, Battyan R, Benson MC, Olsson CA, *et al*. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. Urology 2006; 67(5): 942-5.
20- Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, *et al*. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. Clin Cancer Res 2003; 9(2): 802-11.
21- Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. CA9 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. Clin Exp Metastasis 2007; 24(3): 149-55.
22- Hulick P, Zimmer M, Margulis V, Skates S, Hamel M, Douglas M, *et al.* Blood Level of Carbonic Anhydrase IX Correlate with Clear cell Renal cell carcinoma activity. Clinical Proteomics 2009; 5(1): 37-45.
23- Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: A critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. Eur Urol 2009; 55(4); 851-63.
24- Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y, *et al.* Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. J Urol 2004; 171(6 Pt 1): 2461-6.
25- Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbrige E, Youmans A, *et al*. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. Clin Cancer Res 2005; 11(10): 3714-21.
26- Genega EM, Ghebremichael M, Najarian R, Fu Y, Wang Y, Argani P, *et al* . Carbonic anhydrase IX expression in renal neoplasms: correlation with tumor type and grade. Am J Clin Pathol 2010; 134(6): 873-9.
27- Mulders P, Figlin R, deKernion JB, Wiltrout R, Linehan M, Parkinson D, *et al*. Renal cell carcinoma: recent progress and future directions. Cancer Res 1997; 57(22): 5189-95.
28- Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. Cancer Res 2004; 64(17): 6160-5.
29- Závada J, Závadová Z, Zat'ovicová M, Hyrsl L, Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. Br J Cancer 2003; 89(6); 1067-71.
30- Higgins JP, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Teris M, Cohen RJ, *et al.* Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. Am J Pathol 2003; 162(3): 925-32.
31- Brannon AR, Reddy A, Seiler M, Arreola A, Moore DT, Pruthi RS, *et al.* Molecular stratification of clear cell renal cell carcinoma by consensus clustering reveals distinct subtypes and survival patterns. Gene Cancer 2010; 1(2): 152-63.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 9(3): 323-330

Original Article

Detection of micro-metastasis of renal cell carcinoma by CA9 marker using Real-time PCR

Bajelan B.[1], Hashemi M.[2], Parvin M.[3], Zaki Dizaji M.[4], Alimoghaddam K.[4], Ghavamzadeh A.[4], Ghaffari H.[4]

[1]Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3]Laboratory of Labbafi Nejad Hospital ,Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The global prognosis of renal cell carcinoma (RCC) remains poor; about 40% of patients will develop metastasis after nephrectomy. There is a strong need to identify the early metastasis. The present study aimed to test if analysis of the CA9 gene in peripheral blood can provide useful information to predict micro metastasis.

Materials and Methods

In this experimental study, patients (n=30) with RCC were evaluated for peripheral blood CA9 expression non-randomly. Data of tumor grade were received from the pathologist. Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed. CA9 expression levels of patients were compared with the normal group (n=16) by real-time PCR. The Mann-Whitney U test and Kruskal-wallis test were used to compare CA9 expression levels with tumor grades. SPSS13 was used for data analysis.

Results

Six of patients show high CA9 expression (3 in grade I, 2 in grade II, and 1 in grade III) but no significant difference was found between CA9 expression level and tumor grade. After one year follow up, 4 patients were found to have a metastasis but no significant difference was found between CA9 expression level and metastatic patients.

Conclusions

On the basis of the results of this study, CA9 is a tumor-specific marker for RCC with a high degree of expression in the conventional RCC. At the same time, the detection of CA9 gene expression in the peripheral blood of patients with RCC may predict increasing risk of micro metastasis.

Key words: Renal Cell Carcinoma, Micrometastasis, Carbonic Anhydrases

Received: 3 Sep 2011
Accepted: 6 Feb 2012

Correspondence: Ghaffari SH., PhD. Associate professor. Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Street.
Postal code: 14111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902665; Fax : (+9821) 88004140
E-mail: *shghaffari@tums.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir