

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن بیومارکر سلولی (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 پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۳/۱۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: CD34 از عوامل مطرح در تعیین پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان خون است. از آنجایی که 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 مورد بررسی 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 انجام شده 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 افزایش یافته بود ($F=21.588$, $P\text{-Val}=0.002$).

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 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 پیش‌سازهای 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 اختلال 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

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 ایجاد شده‌اند، اشاره دارد (۱). سرطان خون گروهی از انواع سرطان است که معمولاً از مغز استخوان شروع شده 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

^{*}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>

«آنتی ژن 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، منژیوما، 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 در واقع 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 (HSC) 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، از جمله سلول‌های ماهواره‌ای عضلانی و پیش سازهای اپیدرمی استفاده شده است. علاوه بر این، اطلاعات اخیر نشان می‌دهد این پروتئین‌ها بیشتر نقش در کموتاکسی و در تقسیم سلولی نامتقارن دارند (۱۴). از آنجایی‌که 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

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

از آنجایی‌که 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 به‌طور کلی 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 گویچه‌های 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 mesylate) است (۱۰). مجموعه تمایزی ۳۴ که با نام‌های دیگری همچون «آنتی‌ژن سلولی پیش ساز سلول‌های خون‌ساز CD34» و

استخراج شده جهت اندازه گیری غلظت نمونه ها در دستگاه قرار داده شد. از سوی دیگر برای بررسی کیفی RNA استخراج شده لازم است که پس از استخراج RNA مورد نظر در این تحقیق و برای اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده از نمونه ها که در شرایط RNase free تهیه شده شده اند و برای تعیین غلظت RNA استخراج شده کیفیت نمونه های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز بررسی شوند. قبل از سنتز باید DNA احتمالی در نمونه ی RNA استخراج شده را حذف نمود که به منظور حذف حضور DNA احتمالی در نمونه ی RNA استخراج شده 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) مورد نیاز ۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و سپس افزودن آب عاری از نوکلئاز تا رسیدن به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. بعد از آن با استفاده از کیت تاکارا به cDNA تبدیل شد و سپس نمونه ها با روش Real Time RT-PCR به منظور بررسی بیان ژن بررسی شد و نتایج حاصل به ژل الکتروفورز منتقل گردید و باند تشکیل شده مشاهده شد.

طراحی پرایمر

پرایمرهای CD34 و GAPDH در این آزمایش توسط نرم افزار الیگو طراحی گردید. پرایمر GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای CD34 و GAPDH در جدول ۱ آورده شده است.

Real Time RT PCR

روش Real Time PCR روش جمع آوری اطلاعات است که میزان محصول را همزمان با تکثیر در هر مرحله انجام می دهد. این عمل به کمک مواد شیمیایی فلورسنت انجام می شود که میزان محصول PCR را با شدت فلورسنت مرتبط می سازند. واکنش ها توسط سیکلی از PCR که تکثیر هدف اولین بار تشخیص داده شده، مشخص می شوند. این مقدار به عنوان سیکل

و مشخص شدن نوع بیماری توسط پزشک متخصص و همچنین ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد با رضایت افراد جمع آوری 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 ضد اجتماعی، دارا بودن پرونده پزشکی، دریافت تشخیص لوسمی میلوئید حاد به وسیله آزمایش و معیارهای خروج از تحقیق هر زمانی که بیمار از ادامه درمان منصرف گردید می تواند از طرح خارج شود. بیماران قبل از نمونه گیری رضایت نامه و پرسش نامه را تکمیل کردند که شامل مشخصات فرد مثل سن، تاریخ ابتلا و نوع بیماری در پرسش نامه ها ثبت گردید. سپس از هر فرد ۴ سی سی خون گرفته و در لوله های مخصوص CBC ریخته شد تا از لخته شدن آن ها جلوگیری شود. سپس هر نمونه جهت جداسازی لنفوسیت ها به آزمایشگاه رسانده شد. نمونه گیری از افراد سالم که سلامتی آن ها توسط پزشک تأیید شد انجام گرفت. به منظور بررسی بیان ژن مورد نظر در ابتدا لازم بود لنفوسیت ها را جداسازی کرده و سپس با استفاده از تریزول RNA تام سلولی استخراج شد که مواد مورد استفاده شامل محلول TRIzol یک میلی لیتر، کلروفرم ۰/۲ میلی لیتر، ایزوپروپانول یک میلی لیتر، اتانول ۷۵ درصد یک میلی لیتر و آب تیمار شده با DEPC (آب عاری از نوکلئاز) ۲۵ میکرو لیتر بود. سپس RNA استخراج شده بررسی کیفی و کمی شد که برای بررسی کمی RNA استخراج شده و تعیین مقدار RNA مورد نظر از دستگاه نانودراپ (Thermo و مدل ۲۰۰۰) استفاده شد و میزان غلظت RNA و نیز نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و اگر نسبت خوانده شده (OD ۲۸۰ / OD ۲۶۰) در محدوده ی ۱/۸-۲ باشد حاکی از آن است که RNA استخراج شده از کیفیت مطلوبی جهت سنتز cDNA برخوردار است اما نسبت بالاتر از ۲ و پایین تر از ۱/۸ به ترتیب نشانه آلودگی با DNA و پروتئین است. برای بررسی کیفی مقدار ۱/۵ میکرولیتر از RNA

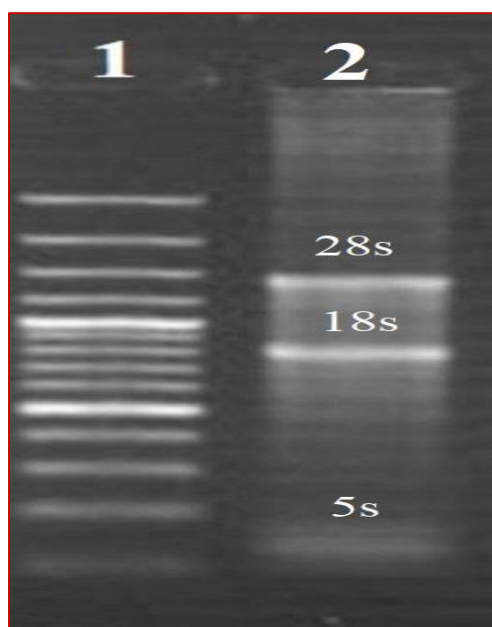
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد نظر در این تحقیق

ژن مورد نظر	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'

۳۰ عدد از هر کدام از بیمارستان کاشانی شهرکرد تهیه شد و پس از مراحل استخراج لنفوسیت و RNA مطابق با پروتکل ذکر شده که به آن پرداخته شد، RNA تام سلولی را استخراج و در محلول RNA later حل و نگهداری گردید.

بررسی کیفی و کمی RNA استخراج شده

برای تعیین غلظت RNA استخراج شده 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 به وضوح قابل مشاهده هستند که نشان‌دهنده عدم تجزیه RNA است (شکل ۱).



شکل ۱- حضور سه باند 28s، 18s و 5.8s ریبوزومی در RNA تام استخراج شده و چاهک اول مارکر 100 bp است

بررسی کیفی cDNA سنتز شده

طبق مراحل که در فصل قبل آورده شد cDNA توسط تکنیک RT-PCR تکثیر شد. به منظور تأیید طول قطعه محصول را بر روی ژل آگارز برده شد. از ژن GAPDH house keeping به عنوان 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

آستانه (Ct) (Cycle threshold) 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 به تمامی 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 به این ترتیب بود که Syber ۱۰ میکرو لیتر (2x)، پرایمرهای پیرو و پیشرو ۰/۳ میکرو لیتر (۵ میکرومول)، نمونه cDNA ۱ میکرو لیتر (۲۵ نانوگرم بر میکرو لیتر) و با آب دپس به حجم ۲۰ میکرو لیتر 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.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، به منظور 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 وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده گردید. تمام داده‌ها به صورت means + S.E.M در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شدند.

نتایج

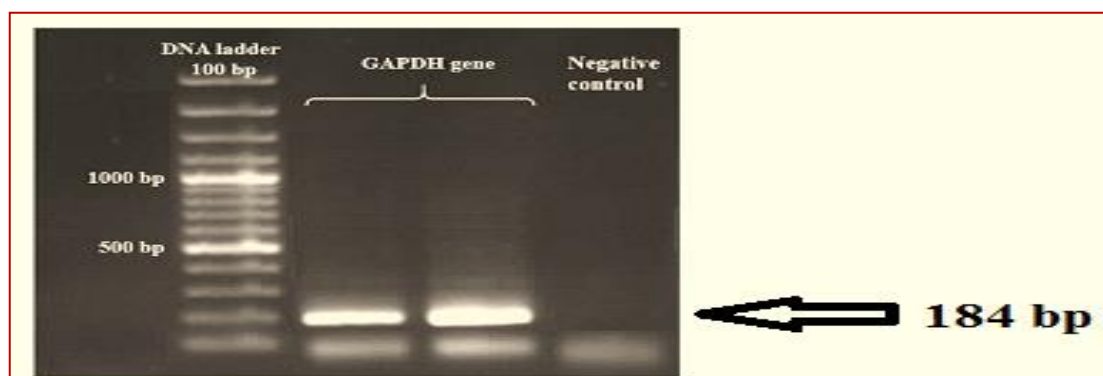
جمع‌آوری خون و استخراج لنفوسیت

نمونه خون افراد سالم و افراد مبتلا به سرطان خون به تعداد

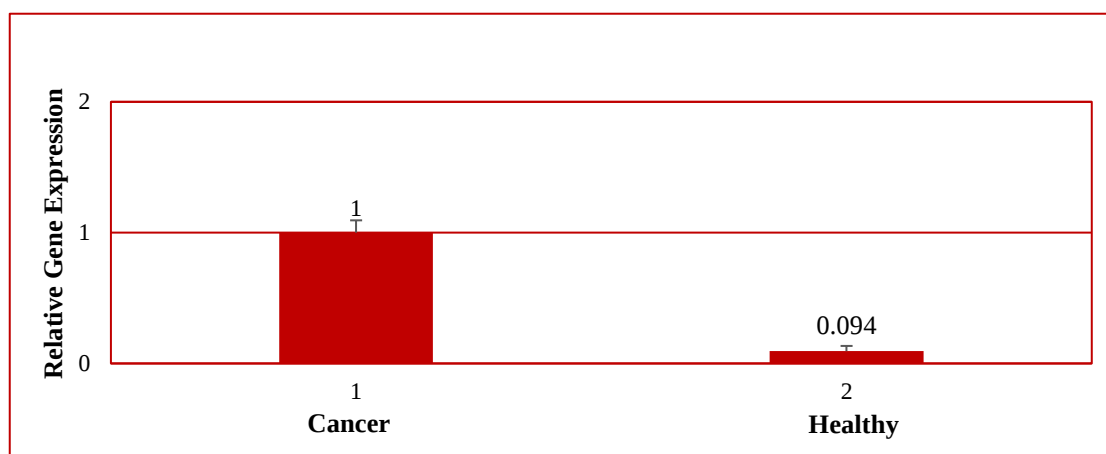
دو گروه سنی زیر ۴۸ سال و بالای ۴۸ سال نشان داد که میزان بیان ژن *CD34* در دو گروه از لحاظ آماری تفاوت چندانی ندارد و در هر دو گروه بیان تقریباً یکسانی را نشان می‌دهد؛ بنابراین با درجه‌ی اطمینان ۹۵ درصد می‌توان گفت میزان بیان ژن *CD34* با سن افراد ارتباط معناداری ندارد ($P\text{-value}=0.73$) که در نمودار ۲ نمایش داده شده است.

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

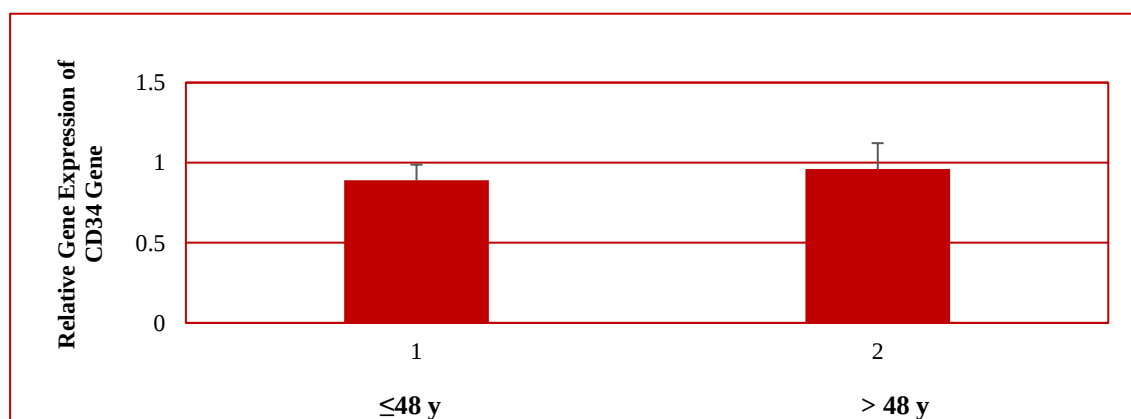
بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (*CD34*) بین دو گروه سنی زیر ۴۸ سال و بالای ۴۸ سال
نتایج بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (*CD34*) در



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.

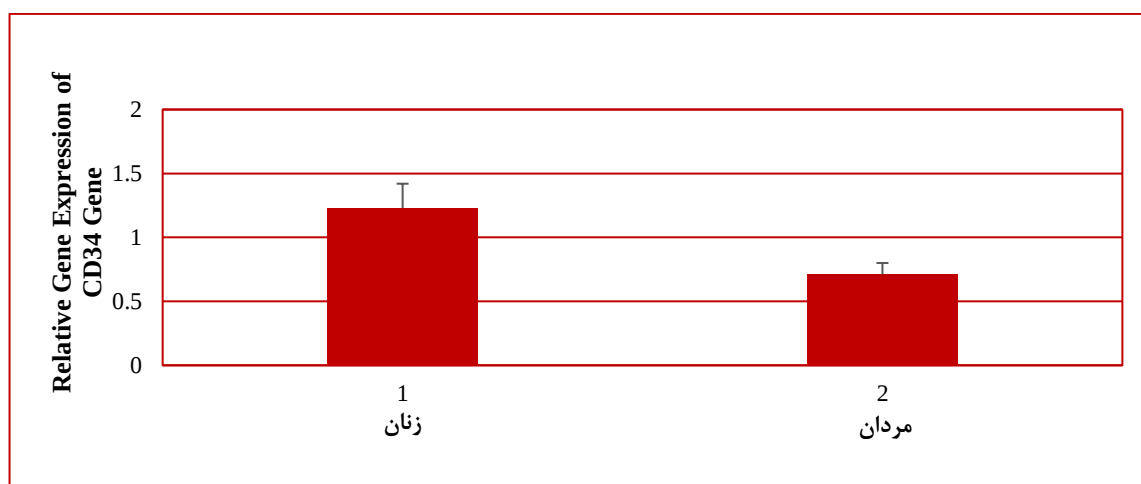


نمودار ۲- بررسی بیان ژن آنتی‌ژن سلول‌های خون‌ساز (*CD34*) در افراد زیر ۴۸ و افراد زیر ۴۸ سال که نمودار عمودی بر اساس دلتا Ct است.

به صورت معناداری افزایش می یابد ($P\text{-Val}=0.002$)؛ بنابراین می توان با سطح اطمینان ۹۵ درصد بیان کرد که میزان بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز با بروز سرطان خون در افراد ارتباط دارد.

نمودار بررسی بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز (CD34) در مردان و زنان

نتایج حاکی از بررسی آماری بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز (CD34) در مردان و زنان مثبت نشان داد که بیان ژن CD34 به صورت معناداری در نمونه های مردان نسبت به نمونه های زنان



نمودار ۳- بررسی بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز (CD34) در مردان و زنان

جدول ۲- بررسی آماره های 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

بحث

با بررسی بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز (CD34) در افراد مبتلا به سرطان خون ALL و افراد سالم دریافتیم که این ژن در سرطان افزایش معناداری را از خود نشان می دهد. در بیماری لوسمی حاد، مغز استخوان مقدار بسیار زیادی سلول های سفید خونی نارس تولید می کند. سلول های سرطانی شده بر سایر انواع سلول های خونی که توسط مغز استخوان ساخته می شوند از جمله گلبول های قرمز خون و پلاکت های خونی نیز اثر می گذارند.

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

کاهش یافته است ($P\text{-value}=0.03$) که در نمودار ۳ نشان داده شده است.

آنالیز آماری میزان بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز در دو گروه سالم و بیمار با بررسی ΔCT برای دو گروه صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده از بررسی ΔCT در دو گروه در جدول ۲ نشان داده شده است.

در این راستا پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، از آزمون آنالیز واریانس جهت بررسی معنی داری اختلاف بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز در دو گروه استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد که میزان بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز در گروه بیمار

سوی دیگر Pui و همکاران به اهمیت بالینی بیان CD34 در لوسمی لنفوبلاستیک حاد در کودکان پرداختند و اظهار داشتند که تجزیه و تحلیل چند متغیره نشان داد که اثر پیش آگهی آنتی ژن مستقل از سن، تعداد لکوسیت ها و سایر عوامل شناخته شده است. از طرفی بیان CD34 با لوسمی اولیه CNS و منفی CD10 همبستگی مثبت داشت اما تجزیه و تحلیل نشان داد که درمان بابیان آنتی ژن CD34 و به عنوان یک مارکر آگهی دهنده و یک جواب قطعی نیاز به مطالعه بیشتر دارد و اظهار داشتند که بیان CD34 ممکن است تفاوت های اساسی بیولوژیکی بین این گونه سرطان خون را منعکس کنند (۱۹). در سال ۲۰۰۹ Yamazaki و همکاران به بررسی CD90 و CD110 در سلول های لوسمی لنفوبلاستیک T حاد انسانی پرداختند. آن ها اظهار داشتند که CD34 تنها نشانگر انتخاب برای CSC در بیماری T-ALL است و بنابراین تجزیه و تحلیل گسترده ای از نشانگرهای CD را در رده های سلولی T-ALL انجام دادند. نتایج آن ها نشان می دهد که CD90 + / CD110 + در برخی موارد T-ALL نشانگرهای انتخاب مثبت برای جداسازی CSC ها هستند بنابراین مطالعات بیشتر در این مورد نیاز است (۲۰). در سال ۲۰۱۷ Lang و همکاران به بررسی بیان CD34 و CD38 پلاستیک در لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش رونده سلول B بزرگ سالی پرداختند. آن ها اظهار داشتند این تجزیه و تحلیل ها برای یافتن نشانگرهای مناسب برای شناسایی LIC در ALL که یک پیش نیاز برای توسعه روش های درمانی جدید بارهنمایی LIC است، ضروری است. این استراتژی های جدید به منظور بهبود نتیجه طولانی مدت و بقا در کلیه بیماران مورد نیاز فوری است. همچنین آن ها اظهار داشتند که بیان این ژن ها در سرطان تغییر می کند ولی نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۲۱). از این سو در این مطالعه ما به بررسی بیان ژن آنتی ژن سلول های خون ساز (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 می دهد.

نتیجه گیری

مطالعات انجام شده در این پژوهش نشان داد که بیان ژن CD34 در افراد مبتلا به سرطان خون به طور معناداری افزایش می یابد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد به شماره

سلامتی و نوع لوسمی بستگی دارد (۱۵). درمان های مختلفی برای بیماری لوسمی عنوان شده، برخلاف سایر انواع سرطان ها، لوسمی تومور جامد توپری نیست که پزشک بتواند با عمل جراحی آن را خارج نماید. درواقع مغز استخوان منبع این مشکل است. درمان هایی که امروزه برای مقابله با لوسمی ها انجام می گیرد شیمی درمانی، درمان زیستی، بازدارنده های کینازی، پیوند مغز استخوان و پیوند سلول بنیادی هستند. داروهای شیمی درمانی که باعث می شوند سلول های سرطانی به تخریب خودشان بپردازند، گاهی با مقاومت سلول های سرطانی مواجه می شوند. تحقیقات تازه وجود ماده ای را در این بیماران نشان می دهد که سلول های سرطانی را نسبت به این نوع درمان مقاوم خواهد کرد (۱۶).

مطالعات اخیر نشان دهنده نقش سلول های بنیادی سرطان در پیشروی، عود و متاستاز سرطان و همچنین نقش آن ها در مقاومت دارویی است. وجود تفاوت در خصوصیات سلول های بنیادی سرطان با سلول های بنیادی نرمال امکان شناسایی این سلول ها را فراهم می کند که از آن جمله بیان شاخص های سطح سلولی مانند CD133, ALDH1, CD44, CD34, CD45, Vcam1, Rthy1.2 و CD31 را می توان نام برد. در سه دهه گذشته، پژوهشگران داده های زیادی را درباره ژن ها و پروتئین ها و نقش آن ها در تولید سلول های طبیعی و سرطانی گزارش کرده اند. یکی از اکتشاف های مهم آن ها، نقش ژن های جهش یافته در تولید سلول های سرطانی بوده است. عوامل محیطی که باعث جهش های ژنتیکی می شوند، در حال شناسایی هستند. با کمک روش های گوناگون مولکولی میکروآری و طیف سنجی جرمی می توان قدرت بیان ژن ها و پروتئین های معیوب را تعیین نمود. حتی پیدا کردن بیومارکرهای نوین که شاخص یک نوع سرطان هستند، در تشخیص زودرس و بهبود به هنگام بیماری سرطان، کمک های شایان توجهی را می نماید. پس از تعیین شکل های فضایی پروتئین های معیوب، می توان داروهای ضد سرطان نوینی را ساخت که بتوانند سلول های در حال سرطانی شدن را هدف قرار بدهند و از تولید و رشد آن ها به سلول های سرطانی جلوگیری کنند (۱۷). مطالعاتی در رابطه با پژوهش ما انجام شده است به عنوان مثال Taussing و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی بیماران لوسمی AML در ژن CD34 پرداختند. آن ها اظهار داشتند که یکی از ژن های متداول در AML است که بابیان کم CD34 همراه است اما نیاز به بررسی های بیشتری دارد (۱۸). از

تعارض منافع

تمامی نویسندگان مقاله هیچگونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

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.

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-18BPα 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. In *Update 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. In *New 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.



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.



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 Ficoll 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 ($F = 21.588$, $P\text{-Val} = 0.002$).

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>