مقاله پژوهشی

مقایسه کمی بیان ژن CK19 در نمونه خون زنان مبتلابه سرطان تخمدان با نمونه نرمال در جمعیت ایران با روش Real- Time PCR

سیده راضیه سادات شیرازی، اردشیر حسام پور*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: سرطان تخمدان پنجمین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان ایران و ایالات‌متحده است. تشخیص دیر بیماری می‌تواند منجر به مرگ بیمار گردد و درمان آن هزینه بسیاری را به اقتصاد کشور وارد می‌نماید. لذا تشخیص به‌موقع بیماری، درد و هزینه‌های تحمیلی را برای بیماران کاهش خواهد داد. بررسی تغییرات بیان ژن CK19 قابلیت تشخیص زودهنگام سرطان تخمدان را دارد. در این مطالعه پتانسیل بیان ژن CK19 به‌عنوان بیومارکری مولکولی در تشخیص سرطان تخمدان در سیستم گردش خون با استفاده از تکنیک Real Time PCR موردبررسی قرار گرفت تا بتوان با انجام تحقیق و بررسی بیشتر در مورد مکانیسم و نحوه اثر این ژن، از آن به‌عنوان یک هدف مناسب برای درمان سرطان تخمدان استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد شاهدی بر روی ۵۰ نمونه خون زنان مبتلابه سرطان تخمدان و ۵۰ نمونه خون کنترل نرمال افرادی که به بخش انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی مراجعه کرده بودند، انجام شد. بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها و استخراج RNA تام نمونه خون اپیتلیال تخمدان فریز شده، cDNA سنتز شد. درنهایت بیان مارکر زیستی CK19 در ۵۰ نمونه خون بیمار و ۵۰ نمونه خون نرمال با استفاده از روش RT-PCR موردبررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که بیان ژن CK19 در مبتلایان به سرطان تخمدان به‌طور معناداری در مقایسه با نمونه شاهد، به میزان ۴/۹۹ برابر افزایش‌یافته است. همچنین نتایج گویای این مطلب بود که افزایش بیان، وابسته به‌شدت بیماری بوده و با پیشروی مرحله بیماری، بیان ژن CK19 افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: این آزمایش گویای افزایش معنادار بیان ژن CK19 در افراد مبتلابه سرطان تخمدان بود به‌نحوی‌که پیشنهاد می‌شود که این امر احتمالاً سبب مهار فعالیت ژن‌های سرکوب‌کننده تومور می‌گردد. بررسی و تائید نقش کلیدی این ژن می‌تواند گامی مهم در جهت غربالگری، بیومارکری مناسب جهت تشخیص غیرتهاجمی و زودهنگام سرطان تخمدان و بررسی روند درمان باشد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، مارکر CK19، Real Time PCR

مقدمه

سرطان تخمدان از میان کلیه سرطان‌های وابسته به زنان یکی از بیشترین مباحث بالینی را متوجه خود ساخته است. این سرطان در مراحل اولیه خود علائم قابل‌توجهی را نشان نمی‌دهد و تشخیص آن در مراحل پیشرفته‌تر تومور امکان‌پذیر است؛ امری که سبب افزایش میزان مرگ‌ومیر این طیف بیماران می‌گردد (۱). سرطان تخمدان بااینکه تنها ۴ درصد از کل سرطان‌های مربوط به جامعه زنان را تشکیل می‌دهد ولی همچنان یکی از علل شایع مرگ‌ومیر ناشی از بدخیمی در این افراد است. در آمریکا، تقریباً ۲۲۲۸۰ مورد و ۱۵۵۰ مرگ ناشی از سرطان تخمدان در هرسال گزارش‌شده است (۲). یکی از علل کشنده بودن سرطان تخمدان این است که در بیش از ۷۰ درصد موارد بیماری در مرحله پیشرفته تشخیص داده می‌شود. گزارش‌ها گویای ارتباط نزدیک بین زمان تشخیص بیماری و میزان طول عمر افراد بیمار است؛ بنابراین تشخیص زودهنگام سرطان، بهترین روش برای کاهش مرگ‌ومیر و همچنین کنترل بیماری

*نویسنده مسئول: **اردشیر حسام پور**، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
Email: a.hesampour@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-7324-5469

در درازمدت است (۳). آمارها گویای این حقیقت است که سرطان تخمدان در زنان بالای ۵۵ سال بیشتر مشاهده می‌شود و همچنین در زنانی باسابقه فامیلی سرطان‌های سینه یا رحم، احتمال ابتلا به این بیماری ۳ برابر بیشتر است (۴). به‌طورکلی، احتمال اینکه هر فرد یک‌بار در طول عمر خود به سرطان تخمدان مبتلا شود ۱/۵-۱ درصد و مرگ ناشی از آن تقریباً ۰/۵ درصد است. همچنین گزارش‌ها حکایت از این موضوع دارند که بلوغ زودرس و یائسگی دیررس خطر ابتلا به سرطان تخمدان را افزایش می‌دهد. افرادی که از ترکیب استروژن و پروژسترون استفاده می‌کنند به دلیل اینکه پروژسترون از رحم محافظت می‌کند کمتر در معرض ابتلا به این بیماری هستند (۵). سرکوب تخمک‌گذاری ممکن است یک عامل مهم در جلوگیری از ابتلا به سرطان تخمدان باشد. ازآنجایی‌که اپیتلیوم سطحی تخمدان تخریب و ترمیم مکرر را تجربه می‌کند این امر می‌تواند منجر به افزایش جهش خود به خودی در سطح سلول‌های جنسی (ژرمینال) شده و منتهی به ساختار سرطانی گردد. عدم‌تشخیص صحیح مراحل اولیه بیماری و همچنین نبود آزمایش غربالگری مناسب عموماً منجر به تشخیص دیرهنگام این بیماری می‌شود. چنانچه این بیماری در مرحله اولیه شناسایی شود احتمال درمان آن بسیار بالا می‌رود. باوجوداینکه سرطان تخمدان بیشترین میزان مرگ‌ومیر را در بین بیماری‌های زنان به خود اختصاص داده تاکنون استراتژی غربالگری کارآمدی جهت شناسایی زودهنگام این بیماری یافت نشده است (۶).

آزمون غربالگری ایدئال برای سرطان تخمدان باید از حساسیت و دقت بالایی جهت تشخیص صحیح زنان مشکوک ابتلا به بیماری و حذف نتایج مثبت کاذب و غیرتهاجمی برخوردار باشد (۷). در حال حاضر روش‌های غربالگری رایج شامل معاینات بالینی، بررسی میزان تومور مارکر غیراختصاصی CA-125 و سونوگرافی واژینال است. از طریق روش‌های مذکور، تنها شناسایی زودهنگام بیماری در ۴۵-۳۰ درصد از زنان مبتلا امکان‌پذیر است. امروزه از مارکرهای مولکولی مختلفی برای شناسایی زودهنگام بیماری و بررسی روند بهبود و پایش درمان استفاده می‌شود (۸). کراتین‌ها به‌عنوان گروهی از فیلامنت‌های حد واسط سلول‌های اپیتلیال تعریف‌شده‌اند. کراتین‌ها با وزن مولکولی ۴۴ تا حدود ۶۶ کیلودالتون و با پایداری بالا و مقاومت شیمیایی مشخص می‌شوند که دارای ساختار فضایی پیچیده هستند. دومین هسته مرکزی آن‌ها بسیار محافظت‌شده و به‌طور میانگین از ۳۱۰ اسیدآمینه تشکیل‌شده است (محدوده ۳۰۰ تا ۳۳۰) که دارای ساختار α هلیکس هستند. کراتین‌ها با تشکیل دو مولکول کراتین، ساختارهای رشته‌ای را تشکیل می‌دهند. از دهه ۱۹۸۰ نقش کراتین در تشخیص و درمان سرطان نیز شناخته‌شده است. سلول‌های اپیتلیال بیان خاصی از کراتین‌ها را دارند که در طول رشد و تمایز قابل‌تغییر است. این الگو درصورتی‌که تحت تأثیر نئوپلاستی قرار بگیرد کمی متفاوت می‌شود که می‌تواند به شناسایی سلول‌های سرطانی و مرحله تمایز بافت کمک کند. به‌طوری‌که سنجش سیتوکراتین محلول، به‌عنوان مارکر اندازه‌گیری پاسخ درمان استفاده‌شده و ابزار مفیدی جهت ارزیابی بدخیمی اپیتلیال محسوب می‌شود. به‌طوری‌که مشخصاً منعکس‌کننده فعالیت یک سلول در حال رشد است. به نظر می‌رسد که موتیف‌های مربوط به کراتین‌های خاص احتمالاً به‌عنوان سوبسترای کاسپاز باشند و آزاد شدن آن‌ها متعاقباً در آپوپتوزیس رخ دهد. توانایی سنجش سیتوکراتین برای پیش‌بینی وضعیت بیماری قبل از روش‌های معمول ابزار قابل‌اعتماد برای درمان مؤثرتر و تصمیم‌گیری‌های قبلی است. بااین‌حال، مطالعات بالینی اضافی لازم است تا کلیه ابزارهای بالینی مارکر سیتوکراتین را به‌تنهایی و در کنار نشانگرهایی که با تومور همراه است به اثبات برسانند (۹). سنجش سیتوکراتین «اختصاصی بافت» نیستند که عملکرد تشخیصی آن‌ها را محدود می‌کند. بااین‌وجود استفاده از آن‌ها در نظارت بر علائم بیماران در طول درمان (رادیوتراپی، درمان غدد درون‌ریز و شیمی‌درمانی) و پس از درمان مفید بوده است (۱۰). مطالعات متعددی نیز در بررسی بیومارکرهای دخیل در سرطان ریه انجام شد. به‌طوری‌که در سال ۲۰۱۶ Ernst و همکاران و Malhotra و همکاران به ترتیب پژوهش‌هایی در ارتباط با تغییرات بیانی CK19 و ایجاد سرطان زبان و سارکومای oral squamous cell در مناطق غدد لنفاوی صورت در نمونه‌های سرم و بزاق زنان مبتلا انجام دادند (۱۰).

با توجه به شیوع روزافزون سرطان تخمدان، طراحی روشی غیرتهاجمی باقدرت تشخیص زودهنگام جهت بررسی و شناسایی بیومارکرهای مرتبط با سرطان تخمدان می‌تواند نقش بسزایی در پیش‌آگهی و واکنش به درمان با داروهای هدفمند و پایش درمان سرطان داشته باشد. هدف از این تحقیق بررسی میزان تغییرات بیان CK19 در نمونه‌های خون سرطان تخمدان و ارتباط آن با مراحل پیشرفت بیماری در مقایسه با افراد شاهد سالم و بررسی

نقش این ژن به‌عنوان بیومارکر احتمالی جهت غربالگری است (۱۱).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این پژوهش یک جامعه ۱۰۰ نفری متشکل از ۵۰ عدد نمونه خون مبتلابه سرطان تخمدان با طیف سنی ۷۳-۳۲ سال و ۵۰ عدد نمونه خون CBC نرمال شاهد که جواب تست‌های آزمایشگاهی و سونوگرافی آن‌ها در سه دوره متوالی معاینه ۱ ساله منفی اعلام گردیده است به همراه پرسشنامه و رضایت‌نامه و با رعایت قوانین اخلاق در مطالعات تجربی پزشکی Helsinki و تبعیت از دستورالعمل‌های مربوطه از کلینیک و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری به شماره کمیته اخلاق ICGEB-LAB-0337 جمع‌آوری‌شده است. پس از آماده‌سازی، نمونه‌های خون با رعایت اصول انتقال و نگهداری به تانک ازت و فریز ۸۰°C- منتقل شدند. تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی برای نگهداری و استفاده از نمونه‌های انسانی رعایت گردید.

استخراج Total RNA و cDNA

به‌منظور استخراج RNA تام از نمونه خون محلول RNA™- Plus (شرکت Merck، آلمان) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. درنهایت پس از سانتریفیوژ و خشک نمودن رسوب RNA، ۲۰ میکرولیتر DEPC-water به ویال‌ها افزوده شد. غلظت و نسبت جذب طول‌موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت Eppendrof آلمان) موردسنجش قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم MMULV انجام شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵°C نگهداری شدند.

طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن *GAPDH* و همچنین تومورمارکر CK19

توالی ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی و بیومارکر CK19 انسانی از پایگاه ژنی NCBI به دست آمد و توسط برنامه Oligo7 پرایمرهای اختصاصی آن‌ها طراحی گردید. به‌منظور بررسی اختصاصی بودن و دقت پرایمرهای طراحی‌شده، توالی این پرایمرها در NCBI و Gene Runner بلاست گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده‌شده است (۱۲).

جدول ۱ - توالی آغازگرهای ژن CK19 و ژن GAPDH

آغازگر	توالی
CK19F	5- GAA ATC AGT ACG CTG AGG GG -3
CK19R	5- CCG GCT GGT GAA CCA GGC TT -3
GAPDH F	5- GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA-3
GAPDH R	5- TTG AGG TCA ATG AAG GGG TC -3

Real Time PCR برای ژن GAPDH و بیومارکر CK19

برای این منظور واکنش‌ها به‌صورت هم‌زمان در دستگاه Real ABI-step1 time PCR گذاشته شد. در هر واکنش از 10 µM (10µM of each R and F Primers) و SYBR Green TM(2X)®Premix و cDNA الگو به غلظت ۲ میکروگرم استفاده شد.

واکنش دمایی شامل ۳۵ چرخه کامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه است. به‌منظور تائید قطعه تکثیرشده و اطمینان از عدم وجود محصول غیراختصاصی، پرایمر دایمر و آلودگی، منحنی تفکیک موردبررسی قرار گرفت. جهت تائید صحت انجام واکنش PCR، محصول واکنش Real Time PCR پس از بررسی توسط نانودراپ روی ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی و صحت اندازه قطعات حاصل از تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

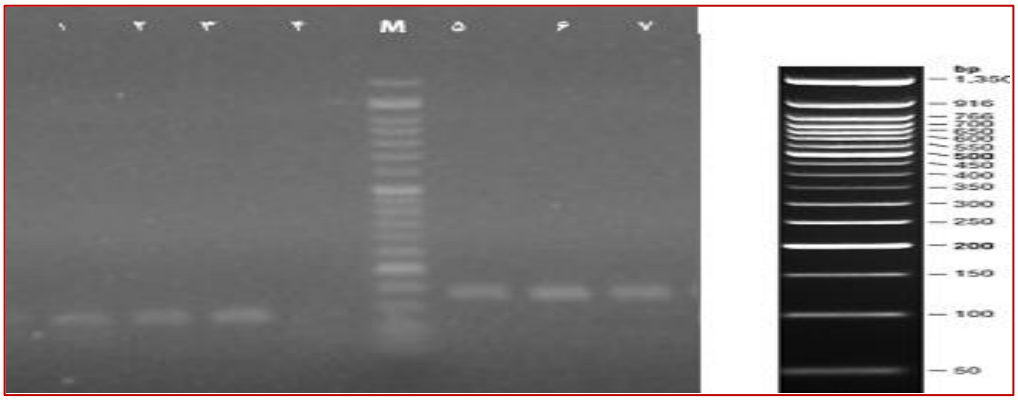
آنالیز داده‌ها

داده‌های خام حاصل از Real Time PCR با استفاده از نرم‌افزار تجزیه‌وتحلیل شد و محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گردید. پس از تکثیر، Ct (cycle threshold) نمونه‌ها شناسایی و همچنین PCR efficiency mean تعیین شد. بر اساس روش Relative Quantification (RQ)، $2^{-\Delta\Delta C_T}$ که مضربی از میزان بیان ژن CK19 است در مقایسه با کنترل داخلی GAPDH موردبررسی و تفسیر قرار گرفت (۱۳).

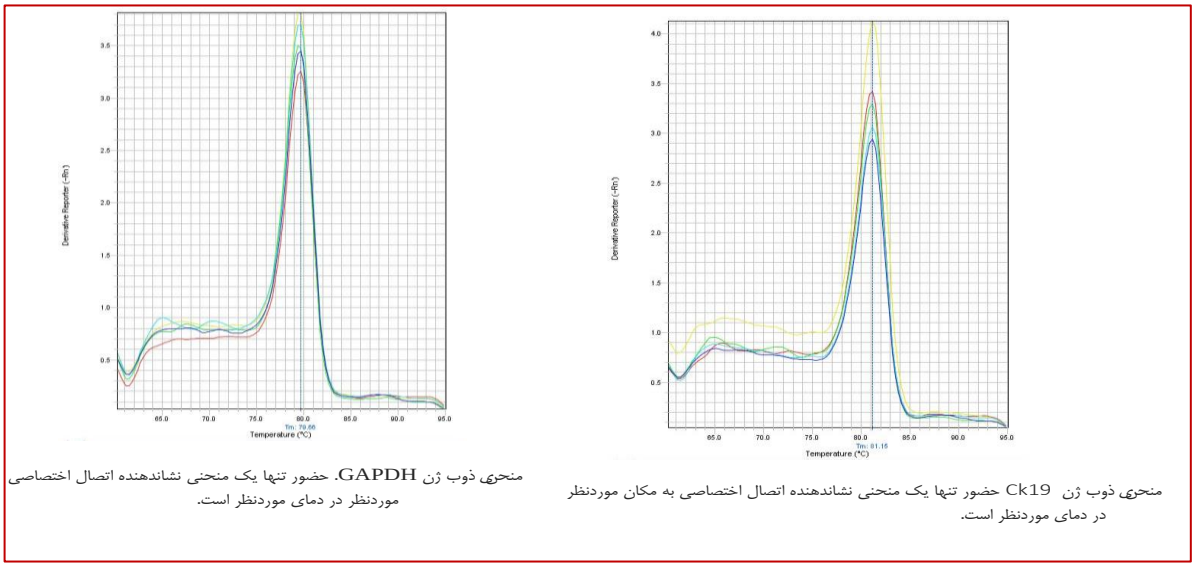
آزمون‌های آماری کولموگروف اسمیرنوف و T_TEST جهت تعیین ارتباط تغییرات بیان ژن و سن افراد مورداستفاده قرار گرفت و $P<0.05$ معنی‌دار محسوب گردید. در این پژوهش جمعیت موردمطالعه شامل دو گروه افراد بیمار و سالم بودند که با برآورد حجم نمونه آماری، در هر گروه ۳۰ نفر قرار گرفت. میانگین سنی بیماران در این مطالعه ۴/۹ ± ۵۰/۷ و افراد سالم ۱۱/۲ ± ۵۵/۷۶ سال بود و ازنظر توزیع داده پارامتر سن از توزیع نرمال برخوردار باشد و از این نظر، هر دو گروه بیمار و سالم یکسان انتخاب شدند (p=0.2).

نتایج

نتایج بررسی نسبت جذب نوری RNAهای استخراج‌شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری، جهت استفاده در مرحله سنتز cDNA، جذب نوری بین ۲-۱/۸ را نشان داد. همچنین نتایج PCR بر روی ژل الکتروفورز آگار بررسی و مشاهده شد که



شکل ۱- چاهک ۱ تا ۳. باند ۱۰۰ جفت باز حضور محصول GAPDH. چاهک ۴. کنترل منفی چاهک M. نشانگر DNA ۵۰ جفت باز، چاهک ۵ تا ۷. باند ۱۱۰ جفت باز حضور محصول CK19



منحنی ذوب ژن Ck19 حضور تنها یک منحنی نشاندهنده اتصال اختصاصی به مکان موردنظر در دمای موردنظر است.

منحنی ذوب ژن GAPDH. حضور تنها یک منحنی نشاندهنده اتصال اختصاصی موردنظر در دمای موردنظر است.

شکل ۲- منحنی ذوب: محور افقی دما برحسب °C و محور عمودی میزان فلورسنت است. تک قله بودن در نمودارها نشانه عدم وجود دایمر پرایمر و باند غیراختصاصی است.

هرکدام از واکنش‌های انجام‌شده توسط پرایمرهای اختصاصی تنها یک باند اختصاصی دارد که این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه‌ها را تائید کرد (شکل ۱).

به‌منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها، کیفیت رنگ فلورسانت (SYBR Green)، اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیراختصاصی در محصول PCR نمودار منحنی ذوب برای ژن GAPDH و مارکر CK19 به‌صورت جداگانه توسط دستگاه ABI-step1 Real-time PCR موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌صورت تک قله‌ای به دست آمد که این خود بیانگر تنها یک محصول PCR است (شکل ۲).

بررسی میزان بیان ژن CK19 در افراد بیمار و سالم

میانگین Ct ژن CK19 در افراد سالم ۰/۵۷ ± ۳۱/۲ و در افراد بیمار ۰/۷۹±۲۸/۹ گزارش شد. همچنین میانگین Ct ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی در افراد سالم و بیمار به ترتیب ۰/۶۹±۱۹/۰۵ و ۰/۸۱±۱۹/۰۷ به دست آمد. Ct ژن CK19 از Ct ژن کنترل داخلی GAPDH کاسته شد و ΔCt تک‌تک افراد موردمطالعه، تعیین و میانگین دو گروه با استفاده از آزمون T-TEST بررسی شد. نتایج ΔCt برای افراد گروه کنترل سالم ۰/۸±۱۲/۱۵ و افراد بیمار ۱/۰۸±۹/۸۳ به دست آمد؛ بنابراین با توجه به نتایج ΔΔCt حاصله و میزان $2^{-\Delta\Delta C_T}$، بیان ژن CK19 (Fold Change) به‌طور معنی‌داری در گروه بیمار ۴/۹۹ برابر افزایش داشته است (p=0.001) (نمودار ۱).

بررسی وضعیت مرحله بیماری

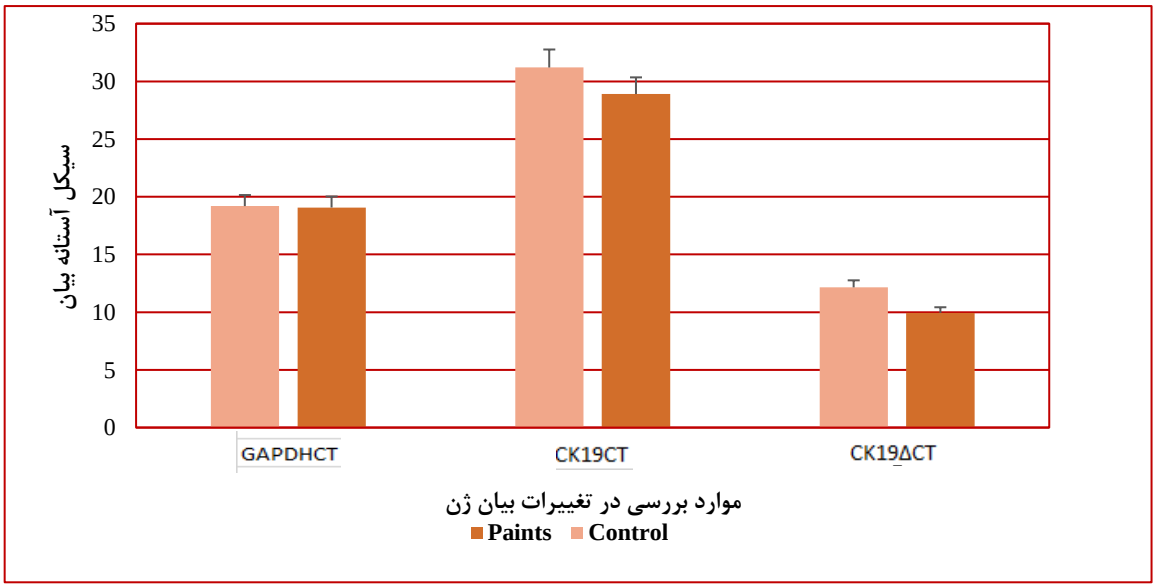
در این مطالعه از ۳۰ بیمار، ۱۵ نمونه (۳۰ درصد) در مرحله چهارم سرطان، ۹ نمونه سرطانی (۱۸ درصد) در مرحله سوم، ۶ مورد (۱۲ درصد) در مرحله دوم و ۲۰ نفر (۴۰ درصد) در مرحله یک بودند. بررسی تغییر بیانی (Fold) ژن CK19 در نمونه‌های بیماران، نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین تغییر بیان ژن CK19 و مرحله سرطان تخمدان وجود دارد، به‌طوری‌که بین افزایش بیان ژن CK19 و Stage سرطان تخمدان ارتباط مستقیم و معنی‌داری مشاهده شد (P-Value= 0.001).

بررسی ارتباط بین سن و میزان بیان ژن CK19 در افراد بیمار و سالم

به‌منظور به دست آوردن ارتباط بین دو پارامتر کمی از آزمون Pearson استفاده شد و میانگین و انحراف معیار داده‌ها باهم مقایسه شد. نتایج این بررسی نشان داد که بین سن افراد بیمار و تغییرات بیانی ژن CK19 ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (p=0.69).

بررسی ارتباط بین stage و grade بیماری و میزان بیان ژن CK19

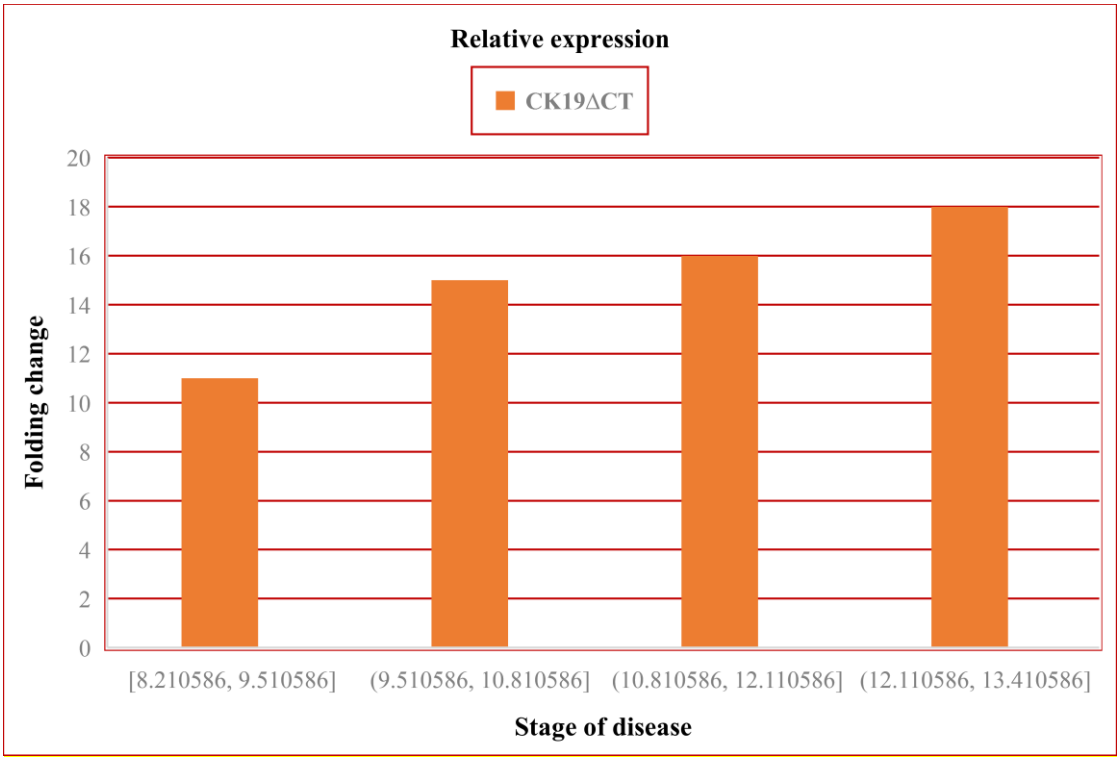
به این منظور ابتدا داده‌ها به دو گروه کنترل و بیمار تفکیک (split) شد و در ادامه آزمون Pearson جهت بررسی همبستگی بین مرحله بیماری و تغییرات بیان ژن مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد بین مرحله بیماری (stage) و تغییرات افزایش



نمودار ۱- سیکل آستانه (Ct) نمونه‌های سالم و بیمار برای ژن‌های CK19 و GAPDH نشان داده‌شده است.

بیان ژن CK19 ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p=0.001). همچنین نتایج این آزمون نشان داد که grade بیماری با افزایش میزان بیان CK19 دارای ارتباط معنی‌دار است (p=0.003). همان‌طور که در نمودار مشاهده شد میزان بیان ژن با افزایش stage بیماری افزایش‌یافته است به‌طوری‌که در استیج IV، این افزایش به ۱۵/۴۵ برابر نسبت به افراد سالم نرمال رسیده است (نمودار ۲).

نمی‌شود و همچنین در بسیاری از بیماری‌های خوش‌خیم زنان و غیر زنان نیز تغییرات بیانی دارد. این امر به‌نوبه خود گویای این امر است که علیرغم مزایای بالقوه CA125 تومورمارکری غیراختصاصی است و بهره‌گیری از آن ممکن است با محدودیت-های زیادی همراه باشد. به‌علاوه حساسیت و اختصاصیت CA125 جهت غربالگری جمعیتی مرتبط با سرطان تخمدان در مراحل اولیه به‌اندازه کافی مناسب نیست؛ بنابراین تلاش‌های



نمودار ۲ – ارتباط بین میانگین نسبی بیان ژن CK19 و مرحله بیماری را در سرطان تخمدان نشان می‌دهد. محور افقی مرحله سرطان در افراد مبتلابه سرطان تخمدان و محور عمودی شدت افزایش بیان بیومارکر CK19 را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون اصلی‌ترین علت سرطان تخمدان به‌طور دقیق مشخص نشده است ولی بسیاری از محققین هورمون‌های تولیدمثلی را ازجمله عوامل ایجاد این بیماری می‌دانند. مطالعه Fathalla و همکاران به تئوری تخمک‌گذاری پی‌درپی در ارتباط بین تعداد تخمک‌گذاری و شکل‌گیری تومورهای بدخیم بر سطح تخمدان اشاره دارد (۱۴). در بررسی‌های کلینیکی رایج برای تشخیص سرطان بیشتر از روش سونوگرافی لگن استفاده می‌شود. در مواردی نیز تومور مارکر CA125 سنجش می‌شود درحالی‌که در ۲۰ درصد از موارد سرطان تخمدان، تومورمارکر CA125 بیان

بسیاری برای شناسایی و یا بهبود عملکرد تشخیصی بیومارکرها در راستای تکمیل اثر CA125، افزایش حساسیت و اختصاصیت در مرحله اولیه بیماری تاکنون صورت گرفته است (۱۵). تومورمارکرها فاکتورهایی هستند که در خون، ادرار یا بافت‌های بدن به وجود آمده و افزایش و کاهش آن‌ها می‌تواند برای اهداف مختلفی درزمینه‌های غربالگری، تشخیص، پیش‌آگاهی یا درمان بیماری به کار رود (۱۶). تومو مارکر را می‌توان به‌عنوان مولکولی در نظر گرفت که احتمال وجود سرطان را تعیین و در مواردی پیش‌آگهی می‌دهد. همچنین اطلاعاتی درباره احتمال و رفتار سرطان مثل متاستازی شدن و گسترش آن و احتمال عود و برگشت سرطان در اختیار پزشکان قرار می‌دهد. ژن‌های رمز

کننده سیتوکراتین‌ها توسط تمام سلول‌های اپیتلیال بیان می‌شوند و بررسی تغییرات بیانی این ژن‌ها در طول تمایز اپیتلیال برای مدولاسیون و کنترل تنظیم چرخه سلولی، تحرک سلولی تومور و آپوپتوز حائز اهمیت است (۱۷). ژن CK19 در اکثر سلول‌های اپیتلیال ساده و سلول‌های بدخیم بیان می‌شود و در حال حاضر داده‌های پروفایل مولکولی از سرطان تخمدان نگرشی نوین در ارتباط ژن CK19 و سرطان تخمدان ارائه کرده است. تحریک سیگنال‌های رشد، غیر حساس شدن به سیگنال‌های مهارکننده رشد، اجتناب از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، پتانسیل نامحدود تکثیر، حفظ رگ زایی، تهاجم بافتی و متاستاز ازجمله خصوصیات مهم و کلیدی سلول سرطانی است که می‌تواند منجر به بدخیم شدن این بیماری شود. در این راستا استفاده از CK19 به‌عنوان مارکر تشخیصی در بسیاری از سرطان‌ها از اوایل دهه ۹۰ میلادی گزارش‌شده است (۱۸). نتایج پژوهش حاضر، تغییرات معنادار افزایش بیان ژن CK19 (۴/۹۹ برابر) را در نمونه‌های مبتلابه سرطان تخمدان، نسبت به نمونه‌های نرمال نشان داد. همچنین نتایج نشان‌دهنده ارتباط معنی‌داری بین افزایش بیان ژن CK19 و مرحله پیشرفت سرطان تخمدان و همچنین شدت بیماری بود. لذا طراحی روشی غیرتهاجمی باقدرت تشخیص زودهنگام جهت بررسی و شناسایی بیومارکرهای مرتبط با سرطان تخمدان می‌تواند نقش بسزایی در پیش‌آگهی، تشخیص، واکنش به درمان با داروهای هدفمند و پایش درمان سرطان داشته باشد (۱۹). نتایج حاضر با پژوهش‌های انجام‌شده در مورد ارتباط تغییرات بیانی بیومارکرها در سرطان‌های متعدد و بخصوص تغییرات بیانی افزایشی CK19 مطابقت دارد. در بسیاری از موارد نتایج مطالعات پیشین، افزایش معنی‌دار بیومارکر احتمالی دخیل در سرطان تخمدان را نشان داده است به‌طوری‌که یکی از مهم‌ترین موارد گزارش‌شده درباره سرطان پستان است. ناکاتا و همکاران در سال ۲۰۰۰ در گزارشی اعلام کردند که افراد مبتلابه سرطان پستان بیان بیشتری از CK19 را در مقایسه با افراد سالم نشان می‌دهند (۲۰). Kaliszewski و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ ارتباط مستقیمی بین افزایش بیان CK19 و روند ایجاد کارسینومای تیروئید مشاهده کردند (۲۱). همچنین نتایج حاصل از بررسی کمی بیان CK19 که در سال ۲۰۱۲ توسط Giovanella و همکاران گزارش شد، نشان داد که در بیش از ۴۰ درصد افراد مبتلابه سرطان تیروئید میزان بیان CK19 افزایش‌یافته است (۲۲). در مقاله‌ای که در سال ۲۰۰۳ در نشریه Brtitish Journal of Cancer به چاپ رسید ارتباط بین قطعه کوچکی به نام CYFRA 21-1 از CK19 و سرطان کبد گزارش شد. در این مقاله عنوان گردید که در سرم افراد مبتلابه این سرطان میزان بیشتری از این تومورماکر در مقایسه با افراد نرمال دیده می‌شود (۲۳). همچنین در سال ۲۰۱۷، Qiao و همکاران ارتباط معنی‌دار افزایش بیانCK19 و سرطان معده مشاهده کردند (۲۴). در مقاله دیگری که در سال ۲۰۰۴ در نشریه Brtitish Journal of Cancer به چاپ رسید گزارش شد که قطعه CYFRA 21-1 از CK19 با سرطان ریه در ارتباط است. در این گزارش که به‌صورت متا آنالیز بررسی‌شده بود مشخص گردید که سطح سرمی این CK19 در افراد مبتلابه این سرطان در مقایسه با افراد سالم متفاوت است (۲۵). Jeong و همکاران در همان سال گزارش کردند که افزایش CK19 با سرطان مثانه نیز در ارتباط است.

نتایج حاصل از این پژوهش حکایت از افزایش معنی‌دار بیان CK19 در کلیه نمونه‌های خون بیماران سرطان تخمدان موردمطالعه بود به‌طوری‌که بین تغییرات افزایشی بیان ژن CK19با اندازه تومور و مرحله سرطان تخمدان ارتباط مستقیم دیده شد. لذا احتمال می‌رود افزایش بیان ژن CK19 سبب مهار فعالیت ژن‌های سرکوب‌کننده تومور گردد. ازاین‌رو به نظر می‌رسد که استفاده از تکنیک‌های دقیق و کمی مولکولی جهت بررسی CK19 به‌عنوان بیومارکری جهت پیش‌آگهی از نحوه رفتار تومور ایجادشده در افراد مبتلابه سرطان تخمدان در کنار سایر آزمایش‌ها، می‌تواند امری مفید باشد؛ بنابراین مطالعه کمی این بیومارکر می‌تواند به‌عنوان شناساگر احتمالی جهت تشخیص افراد مستعد، غربالگری و پایش درمان سرطان تخمدان بکار رود (۲۶). در ادامه تحقیقات، مطالعات تکمیلی جهت بررسی ارتباط میزان بیان این ژن‌ها با خصوصیات هیستوپاتولوژی و بالینی بیماران انجام خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد. کد اخلاق این مقاله در کلینیک و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری ICGEB-LAB-۰۳۳۷ است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC, Fasih N. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. Radiographics. 2011.4;31(3):625-46.
2. Siegel R, Ward E,Brawley O, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. Cancer statistics. CA: a cancer J Clinic. 2012; 62(1): 10-29.
3. Rauh-Hain JA, TC, del Carmen MG, Olawaiye AB. Ovarian cancer screening and early detection in the general population. Rev Obstet Gynecol.2011; 4(1): 15-21.
4. Clarke-Pearson D.L.. Screening for ovarian cancer. New England Journal of Medicine, 2009;361(2):170-177.
5. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cotè TR, Wu XC, Correa CN, et al. pathology and classification of ovarian tumors. Cancer 2003; 97(S10):263-42.
6. Christine M, Coticchia Jiang Y, Marsha A. Ovarian Cancer Biomarkers: Current Options and Future Promise. J Natl Compr Canc Netw. 2012 6(8): 795–802.
7. György S, Michael D, Suher M, Othman A. , et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2016.26(1): 43–51.
8. Bast Jr RC, Klug TL, John ES, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. N Engel J Med 1983; 309(15): 883-87.
9. Lindman H, Jansson T, Arnberg H, Bergh J, Einarsson R. Serum markers TPS, TPA and CA 15-3 as monitors of chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. J Tumor Marker Oncol. 2000; 15:177 – 86.
10. Ernst J, Ikenberg K, Apel B, Schumann DM, Huber G, Studer G, et al. Expression of CK19 is an independent predictor of negative outcome for patients with squamous cell carcinoma of the tongue. Oncotarget. 2016.15;7(46):76151-76158.
11. Oezkan F, Khan AM, Hager T, Freitag L, Christoph D, et al. OSNA: A Fast Molecular Test Based on CK19 mRNA Concentration for Assessment of EBUS-TBNA Samples in Lung Cancer Patients. Clin Lung Cancer. 2016.17(3):198-204.
12. Giovanella L, Treglia G, Verburg F.A, Salvatori M, and Geriani L. Serum cytokeratin 19 fragments: a dedifferentiation marker in advanced thyroid cancer. Eur J Endocrinol. 2012; 167: 793–797.
13. Uenishi T, Kubo S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Yamamoto T, and et al. Cytokeratin 19 fragments in serum (CYFRA 21-1) as a marker in primary liver cancer. Br J Cancer. 2003; 88: 1894–1899.
14. Pujol J.L, Molinier O, Ebert W, Daures J.P, Barlesi F, Buccheri G, and et al. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of meta-analysis in 2063 patients. Br J Cancer. 2004; 91: 2097–2105.
15. Kaliszewski K, Diakowska D, Strutynska-Karpinska M, Rzeszutko M, Grzegrzolka J, Dziegiel P, et al. Expression of cytokeratin-19 (CK19) in the classical subtype of papillary thyroid carcinoma: the experience of one center in the Silesian region.Folia Histochem Cytobiol. 2016;54(4):193-201.
16. Yongjung P, Jong-Han L, Duck Jin H, Eun Yong L, Hyon-Suk K. Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologyic and non-gynecologic diseases. 2011. 884-88.
17. Paraio.M, Jorcano, L.Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signaling BioEssays.2002. 836-844.
18. Lo RC, Leung CO, Chok K, Ng IO. Variation of stemness markers expression in tumor nodules from synchronous multi-focal hepatocellular carcinoma - an immunohistochemical study. Diagn Pathol. 2017.1;12(1):56.
19. György S, Michael D, Suher M, Othman A , et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2016.26(1): 43–51.
20. Lo RC, Leung CO, Chok K, Ng IO. Variation of stemness markers expression in tumor nodules from synchronous multi-focal hepatocellular carcinoma - an immunohistochemical study. Diagn Pathol. 2017.1;12(1):56.
21. Qiao YF, Chen CG, Yue J, Ma MQ, Zhao Ma, and Zhen-Tao Yu. Prognostic significance of preoperative and postoperative CK19 and CEA mRNA levels in peripheral blood of patients with gastric cardia cancer. World J Gastroenterol. 2017.28;23(8):1424-1433.
22. Giovanella L, Treglia G, Verburg F.A, Salvatori M, Geriani L. Serum cytokeratin 19 fragments: a dedifferentiation marker in advanced thyroid cancer. Eur J Endocrinol. 2012; 167: 793–797.
23. Uenishi T, Kubo S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Yamamoto T, and et al. Cytokeratin 19 fragments in serum (CYFRA 21-1) as a marker in primary liver cancer. Br J Cancer. 2003; 88: 1894–1899.
24. Qiao YF, Chen CG, Yue J, Ma MQ, Ma Z, et al. Prognostic significance of preoperative and postoperative CK19 and CEA mRNA levels in peripheral blood of patients with gastric cardia cancer. World J Gastroenterol. 2017.28;23(8):1424-1433.
25. Paraio J. MJorcano J.L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signaling. BioEssays. 2002;836-844.
26. Frederick R, Ueland A. Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come. Diagnostics (Basel). 2017;7(1): 14.

Original Article

Quantitative Comparison of CK19 Gene Expression Between Normal Iranian Women and Ovarian Cancer Blood Sample by Real Time PCR

Shirazi SR, Hesampour A*

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 04 Dec 2018 Accepted: 03 Jun 2019

Abstract

Background & Objectives: Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer deaths in Iran and the United States women population. Late detection of illness could lead to death of the patient and has a lot of cost expenses to economy, so early diagnosis of pain and costs imposed on patients will be reduced.CK19 has the potential for early diagnosis of ovarian cancer. In this study, the potential for gene expression of CK19 as a molecular biomarker for the diagnosis of ovarian cancer in the circulatory system was investigated using Real Time PCR technique, so that it could be used as a suitable target for the treatment of ovarian cancer through further investigation about the mechanism and effect of this gene.

Materials & Methods: In this case-control study, 50 blood samples from women with ovarian cancer and 50 normal control blood samples from patients referred to Imam Khomeini Hospital were reviewed. After collecting samples, extracting Total RNA from frozen ovarian epithelial blood samples, cDNA was performed from the cDNA. Finally, the expression of the CK19 gene in 50 patient blood samples and 50 normal blood samples was investigated using qRT-PCR technique.

Results: We determined that CK19 was significantly up-regulated in ovarian cancer, compared to normal blood sample. Further investigations revealed that this overexpression is elevated by increasing the malignancy stage.

Conclusion: This test showed a significant increase CK19 in patients, expression of CK19 was quantitatively measured and expression of CK19 was reported in the serum of positive patients. Evaluation and confirmation of the key role of this gene can be an important step in screening, appropriate biomarker for non-invasive and early detection of ovarian cancer and evaluation of treatment process.

Keywords: Ovarian cancer, CK19 Marker, Real Time PCR

***Corresponding Author: Hesampour Ardeshir,** Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: a.hesampour@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-7324-5469

Journal of Fasa University of Medical Sciences 9 (2019): 1665-1674