

## مقاله تحقیقی

### بررسی کمی بیان مارکر CK19 در نمونه های خون مبتلایان به سرطان خون با روش Real Time PCR

سارا تاجر، آزاده محمدقلی\*، اردشیر حسام پور

گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* مسئول مکاتبات: تلفن: ۰۹۱۲۲۸۰۷۹۲۴، پست الکترونیک: a.mohammadgholi@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی و آزمایشگاه آتا

تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱

#### چکیده

سرطان خون حدود هشت درصد کل سرطان ها را تشکیل می دهد. شناخت اپیدمیولوژی و روند سرطان خون جهت برنامه ریزی ضروری می باشد. لوسمی (سرطان خون) میلوئیدی مزمن یک بیماری کلونال بدخیم سلول های پایه خون ساز است که نتیجه آن افزایش سلول های میلوئیدی، اریتروئیدی و پلاکت ها در خون محیطی و هیپرپلازی در مغز استخوان است. سیتوکراتین ۱۹ بخشی از اسکلت سلولی در سلول های اپی تلیالی و کوچکترین عضو از خانواده سیتوکراتین ها می باشد. CK19 به عنوان مارکر سلول های اپی تلیالی شناخته شده است. سیتوکراتین ۱۹ (CK19) کوچکترین عضو از خانواده سیتوکراتین ها می باشد. در مطالعه حاضر بیان نسبی ژن CK19 در بیماران مبتلا به CML تازه تشخیص داده شده و ارتباط آن با ویژگی های بالینی آنها را بررسی گردید. ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان خون نوع CML با ۵۰ فرد سالم مقایسه شدند. پس از گرفتن خون و استخراج cDNA، RNA Total، ساخته شد و سپس با روش Real-time-PCR بررسی و نتایج حاصل بررسی گردید. بیان ژن CK19 در سلول های لوسمی در مقایسه با نمونه های کنترل به وسیله Real time RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد بیان ژن CK19 افزایش بیان معنی داری در گروه بیمار ندارد. بررسی حضور بیومارکر سیتوکراتین ۱۹ در مراحل اولیه بیماری می تواند به عنوان شاخص پیش آگهی مناسبی در خون بیماران مطرح گردد. بررسی تعداد بیشتری از بیماران با مارکرها بیشتر با ارزش تشخیصی و یا با ارزش پیش آگهی بیماری در بررسی های آینده باید مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سرطان خون، لوسمی میلوئیدی مزمن، Real time PCR، CK19، بیومارکر

#### مقدمه

این سلول ها با سلول های خون نرمال و عادی متفاوت هستند و درست عمل نمی کنند. در نتیجه، تولید سلول های سفید خون طبیعی را متوقف کرده و توانایی فرد را در مقابله با بیماری ها از بین می برند. لوسمی بر اساس نوع گویچه سفید خون که دچار تراریختگی (ترانس ژن) و سرطان شده به دو دسته تقسیم می شود:

سرطان خون یا لوسمی یا لوکمیا بیماری پیشرونده و بدخیم اعضای خون ساز بدن است (۱). این بیماری در اثر تکثیر و تکامل ناقص گویچه های سفیدخون و پیش سازهای آن در خون و مغز استخوان ایجاد می شود (۲). لوسمی یکی از چهار سرطان شایع در میان کودکان است. در بیماری لوکمیا یا همان سرطان خون، مغز استخوان به صورت غیرعادی، مقدار بسیار زیادی سلول خونی تولید می کند.

سرطان در دنیاست. از سوی دیگر معمولاً تشخیص بیماری در مراحل اولیه آن از اهمیت قابل ملاحظه ای برخوردار است و تاخیر در تشخیص زود هنگام این دسته از بیماری‌ها به میزان قابل توجهی اثر اقدامات درمانی را کاهش می‌دهد. یکی از روش‌های رایجی که برای تشخیص سرطان به کار گرفته می‌شود، روش‌های آزمایشگاهی است که معمولاً با استفاده از بیومارکرها صورت می‌گیرد. پیدا کردن عامل مولکولی که بتواند سبب تشخیص این بیماری در سلول‌های خونی در مراحل اولیه گردد می‌تواند کمک فراوانی برای اقدامات پیشگیرانه در این زمینه داشته باشد.

هدف این مطالعه نیز بررسی ارتباط میزان کمی بیان بيو مارکر CK-19 با سرطان خون در مراحل اولیه و کشف راهکار مناسب برای تشخیص زود هنگام سرطان خون در مراحل اولیه با نمونه گیری از خون و حداقل ته‌اجم به بیمار با کمترین هزینه می‌باشد. در این مطالعه پتانسیل بیان ژن CK-19 به عنوان بیومارکری مولکولی در تشخیص سرطان خون با روشی غیرته‌اجمی در سیستم گردش خون با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان با انجام تحقیق و بررسی بیشتر در مورد مکانیسم و نحوه اثر این ژن از آن به عنوان یک هدف مناسب برای درمان سرطان خون استفاده کرد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه گیری

بیماران مطالعه شده در این پژوهش، شامل بیماران مبتلا به لوسمی میلو بلاستیک مزمن مراجعه کننده به بیمارستان و در مجموع ۵۰ بیمار بودند. معیارهای ورود به مطالعه افراد گروه بیماران شامل افرادی شد که فاقد سابقه عفونت‌های حاد ویروسی، بیماری‌های خودایمنی، اختلالات غدد درون ریز، ناهنجاری‌های کروموزومی بودند. این بیماران قبل از شروع شیمی درمانی مورد نمونه برداری قرار گرفتند. سپس نمونه گیری از خون وریدی انجام گرفت. در ضمن خون ۵۰ فرد شاهد به عنوان گروه کنترل، مانند نمونه بیمار گرفته شد.

لنفوئیدی یا لنفوبلاستی: این نوع لوسمی سلول‌های لنفوی یا لنفوسیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد که بافت‌های لنفوی را می‌سازند. این بافت جزء اصلی سیستم ایمنی بدن است و در قسمت‌های مختلف بدن از جمله غدد لنفوی، طحال یا لوزه‌ها یافت می‌شود.

میلوئیدی یا مغز استخوانی: این نوع لوسمی سلول‌های مغز استخوانی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. سلول‌های مغز استخوان شامل سلول‌هایی است که بعداً به گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و سلول‌های پلاکت ساز تبدیل می‌شوند. همچنین هر دو دسته لوسمی به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند لذا چهار نوع کلی لوسمی داریم: لوسمی حاد میلوئیدی (AML)، لوسمی مزمن لنفوئیدی (CLL)، لوسمی حاد لنفوئیدی (ALL)، لوسمی مزمن میلوئیدی (CML) (۳).

لوسمی مزمن میلوئیدی که به اختصار CML گفته می‌شود، سلول‌های مغز استخوان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که بافت‌های مغز استخوان را می‌سازند و روندی مزمن دارد. این بیماری اغلب افراد بزرگسال را درگیر می‌کند، اگرچه می‌تواند در هر سنی رخ دهد (۴). وقوع این بیماری سالانه ۱ تا ۳ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است و احتمالاً بیشترین مطالعات روی بدخیمی‌های انسان روی این بیماری صورت گرفته است (۵). CML توسط کروموزوم فیلادلفیا شناخته می‌شود که در واقع یک ناهنجاری اکتسابی کلونال بوده و از جابجایی کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ و تشکیل انکوژن اتصالی BCR-ABL ایجاد می‌شود. در دهه‌های اخیر تشخیص CML راحت تر شده که علت درک عمیق تر پاتوژنز مولکولی و تعیین هدفدار داروها به منظور عملکرد مناسب در محل مورد نظر می‌باشد (۶). شواهدی مبنی بر اینکه عوامل شیمیایی برای ایجاد لوسمی به عنوان عوامل ایجاد CML شناخته شده باشند، وجود ندارد و نیز گزارش شده است که ارثی بودن CML در مقایسه با CLL بسیار ضعیف است (۶) لوسمی میلوئیدی مزمن به دلیل تکثیر بیش از حد سلول‌های رده میلوئیدی در مغز استخوان ایجاد می‌شود و در نتیجه همیشه در کسانی که دچار این بیماری هستند، سلول‌های بازوفیل، فیلوسیت، متافیلوسیت و نوتروفیل در خون بالاتر از حد نرمال وجود دارد. سرطان خون یکی از مهمترین انواع

در انتهای 5' استفاده شده است. با NCBI BLAST اختصاصیت پرایمرها برای چسبیدن به ژنوم انسانی مورد بررسی قرار گرفت تا از منحصر به فرد بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم انسان، نشان داد که کلیه پرایمرها محل اتصال منحصر به فردی را دارا هستند.

جهت یافتن غلظت بهینه پرایمر ابتدا برای هر یک از آنها واکنش Real-Time PCR با استفاده از 7/5 میکرولیتر SYBRGreenMaster Mix (2X) از شرکت Primer Design و با غلظت پرایمر 0/2، 0/3، 0/4، 0/5 میکرومولار در حجم کلی 15 میکرولیتر انجام شد. غلظتی که در آن کمترین سیکل آستانه (Ct) و بیشترین میزان فلورسانت ( $\Delta Rn$ ) مشاهده شد به عنوان بهترین غلظت پرایمر مورد استفاده قرار گرفت. این روش فقط برای تخمین کیفیت پرایمرها مورد استفاده قرار گرفت و نتایج با روش Taq/man مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج RNA از نمونه جمع آوری شده با به کارگیری کیت استخراج miRNA شرکت MN آلمان انجام شد. استخراج RNA با استفاده از محتویات درون کیت انجام شد. RNA نمونه ی در 20°C- یا در 80°C- ذخیره- سازی شد. سپس جهت سنجش کمیت RNA استخراج شده رقت 1/50 از RNA تهیه و با دستگاه اسپکتروفوتومتر غلظت و نسبت 260/280 اندازه گیری شد.

به منظور سنتز cDNA از RNA استخراج شده از کیت QuantiTect Reverse Transcription محصول شرکت کبازن استفاده گردید لازم به ذکر است که کلیه مراحل روی یخ انجام شد.

#### طراحی پرایمر و پروب و بررسی کیفیت آنها

پرایمرها و پروب های اختصاصی برای ژن های مورد نظر به منظور بررسی بیان در سطح RNA در نرم افزار Gene runner (Version 3.05) طراحی شد. در طراحی پروب های Taqman از خاموش کننده FAM (Quencher)TAMRA در انتهای 3' و از گزارشگر

جدول 1 - ردیف الیگو نوکلئوتیدهای سفارش شده از شرکت Bioneer

شماره دسترسی)	توالی آغازگر	اندازه محصول (86 bp) PCR	Tm آغازگر
CK19-F	CACCAGCCGGACTGAAGAAT	150	59.23
CK19-R	GCAGGTCAGTAACCTCGGAC		59.97
CK19-P	GCCACACGGAGCAGCTCCAG		60.32
GAPDH-F	GAAAGCCTGCCGGTGACTAA		60.60
GAPDH-R	CTGCGCTCCTGCCTCGATGG		60.31

از آنالیز داده‌ها منحنی‌های ذوب (Melting curve) بدست آمده از هر واکنش PCR بررسی شد تا صحت پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا  $\Delta Ct$  ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن گلیسرآلدئید 3 فسفات GAPDH در ژن های سوماتیک به عنوان رفرنس محاسبه شد.

واکنش Q-RT-PCR با استفاده از Master Mix 2x از شرکت Primer Design<sup>®</sup> در واکنش‌های 15 میکرولیتری و با تکرارهای سه تایی انجام شد. چرخه های دمایی به صورت 10 دقیقه 95°C و 40 چرخه 95°C به مدت 15 ثانیه و 60°C به مدت 30 ثانیه بود. اندازه گیری میزان فلورسانت توسط دستگاه Eco Biosystems و آنالیز اولیه داده‌ها توسط نرم افزار software system ver.5.0 انجام شد. پروب ها با استفاده از گزارشگر FAM<sup>FAM</sup> در انتهای 5' و خاموش کننده TAMRA در انتهای 3' نشاندار شده اند. در پایان قبل

## نتایج

پس از بررسی داده های ابتدایی شامل نتایج تکثیر نمونه ها در software system ver.2.0 سیکل آستانه

نمونه ها استخراج شد و نتایج با استفاده از روش زیر آنالیز شد.

جدول ۲ - برنامه زمانی Real-time PCR

مرحله	دما	درجه
Enzyme activation-Hotstart (1 Cycle)	95°C	10 دقیقه
Denaturation	95°C	15 ثانیه
Data Collection	60°C	45 ثانیه

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct \text{ target (control-sample)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct \text{ ref (control-sample)}}}$$

به منظور تائید کیفی RNA استخراجی، الکتروفورز نمونه ها بر روی ژل ۰.۸٪ آگارز انجام شد که در شکل ۱ وجود باندهای 28s و 18s ریبوزومی نشان داده شده است. برای تهیه غلظت بهینه پرایمر و پروب ها با ۴ غلظت متفاوت Real-Time PCR گذاشته شد.

سیکل های مربوط به دو ژن CK19 و GAPDH در جدول ۴ نشان داده شده است.

بعد از بدست آوردن غلظت بهینه پرایمر ها پروب ها نیز با ۴ غلظت متفاوت و با روشی مشابه پرایمرها انجام شده و در نهایت غلظت های بهینه پروب ها نیز بدست آمد که در جدول ۴ برای هر ژن ذکر شده است.

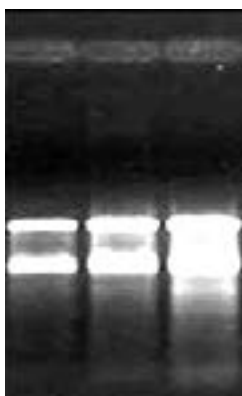
منحنی های شکل ۲- به ترتیب از سمت راست به چپ مربوط به ۰/۵، ۰/۴، ۰/۳ و ۰/۲ میکرومولار پرایمر است. مطالعه بیان ژن CK19 در سلول های لوسمی در مقایسه با نمونه های کنترل به وسیله Real time RT-PCR در نمونه لوسمی بیان ژن CK19 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد ژن CK19 افزایش بیان معنی داری در گروه بیمار پیدا نمی کند (شکل ۳).

در این فرمول منظور از Ct سیکل آستانه، E بازده پرایمرها، target ژن مورد بررسی، ref ژن خانه دار، sample نمونه لوسمی و control نمونه غیرلوسمی است. بر طبق این فرمول عدد به دست آمده میزان بیان ژن مورد نظر در نمونه لوسمی نسبت به نمونه غیر لوسمی پس از در نظر گرفتن تغییرات ژن خانه دار است. در این مطالعه ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده ها به صورت توصیفی و تحلیلی با استفاده از نرم افزار SPSS Ver20 صورت گرفت. در این مطالعه ۴۱٪ مرد در گروه بیماران و ۵۸٪ زن در گروه بیماران قرار گرفته اند. متوسط سنی در گروه بیمار ۴۵/۶ (SD=2.35) و متوسط سنی در گروه سالم ۴۹/۷۴ (SD=2.46) سال بود. تفاوتی در میانگین سنی گروه بیماران و گروه سالم از نظر آماری موجود نبود (p=0.06, 95% CI: -0.09 to 0.55).

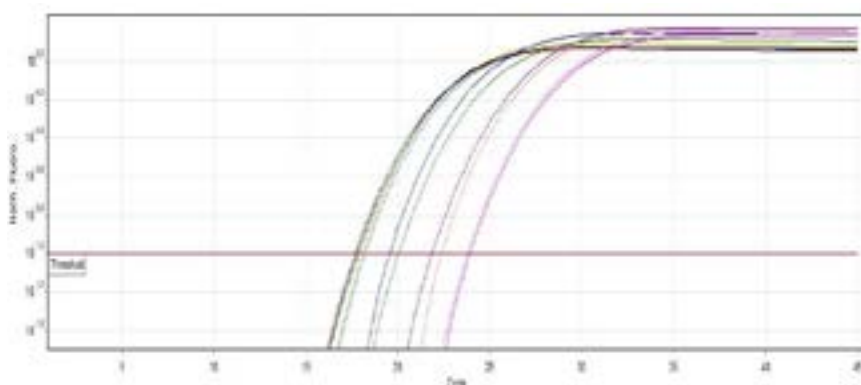
آنالیز کمی RNA از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر و با اندازه گیری جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد.

جدول ۳ - توزیع فراوانی و مقایسه بیماران و گروه کنترل برحسب متغیر جنسی.

متغیر	بیمار فراوانی (درصد)	شاهد فراوانی (درصد)	مقدار خی ۲	سطح معنی داری
جنسیت مونث	۵۱ (۵۸/۶)	۳۶ (۴۱/۴)	۵/۲۹	۰/۰۶۱
	۳۴ (۴۱/۰)	۴۹ (۵۹)		
مذکر				



شکل ۱ - ظهور باندهای ۱۸ S و ۲۸ SRNA ریبوزومی حاصل از الکتروفورز نمونه های RNA.



شکل ۲ - نتایج اولیه بهینه سازی پرایمرها

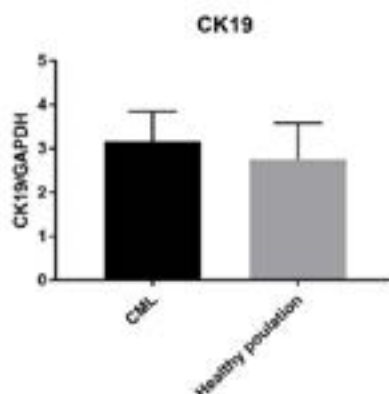
جدول ۴ - چرخه های آستانه برای ژن ها با غلظت های مختلف پرایمر.

چرخه آستانه	نام ژن	غلظت پرایمر (میکرومولار)
۲۱/۱۲	CK19	۰/۲
۱۸/۳۶	CK19	۰/۳
۲۲/۳۲	CK19	۰/۴
۲۱/۱۶	CK19	۰/۵
۲۳/۸	GAPDH	۰/۲
۲۳/۱۹	GAPDH	۰/۳
۲۱/۱۳	GAPDH	۰/۴
۲۴/۲	GAPDH	۰/۵

جدول ۵ - غلظت های بهینه پرایمر و پروب ها.

غلظت	ژن	
	CK19	GAPDH
Primers	۰/۲	۰/۲
Probe	۰/۳۰	۰/۳

برای این منظور پس از انجام تنظیمات اولیه استخراج RNA صورت گرفته و پس از سنتز cDNA با به کارگیری پرایمرها و پروب اختصاصی الگوی بیان مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳ - تغییر بیان CK19 در نمونه های لوسمی در مقایسه با نمونه حاضر در گروه کنترل

جدول ۶ - جدول تفکیکی بیان کننده الگوی معنی داری ژن CK19 با بکارگیری تست T غیرجفتی.

مقایسه		مقادیر محاسبه شده
افراد غیرلوسمی	بیماران لوسمی	
Fold Change Leukemia/Healthy population		۱/۳۷
p-value		۰/۱۵۹۶
T		۱/۴۴۵
Df		۲
آیا با فرض فاصله اطمینان ۹۵ درصد، تفاوت معنی دار است؟		خیر

#### بحث

تومور مارکر را می توان به عنوان مولکولی در نظر گرفت که احتمال وجود سرطان را تعیین می کند و یا اطلاعاتی در باره احتمال و رفتار سرطان مثل متاستازی شدن و گسترش آن و احتمال عود و برگشت سرطان در اختیار ما قرار می دهد (۷). اولین تومور مارکر مدرن که برای بررسی سرطان مورد استفاده قرار گرفت (human chronic HCG (gonadotropin بود که برای تست حاملگی استفاده می شد. میزان بالای این مارکر در خون افراد ممکن است علامتی از سرطان های مربوط به جفت gestational (GTD) trophoblastic disease باشد. بعضی از انواع سرطان های رحم و بیضه که در آن سلول های تولیدمثلی دچار سرطان می شوند، باعث تولید این مارکر می گردند (۸). هدف از جستجو و تحقیق در زمینه تومور مارکرها رسیدن به نقطه ای است که روزی بتوان توسط یک تست خون به وجود سرطان پی برد و سرطان را شناسایی کرد. این تست ساده خون علاوه بر ردیابی سرطان در فازهای اولیه می تواند از بروز میلیون ها مرگ در سال جلوگیری کند.

اگرچه امروزه این مارکرها به طور عمده در تشخیص سرطان های مختلف استفاده می شوند، اما مارکر اختصاصی سرطان های بدخیم تاکنون شناسایی نشده است. بیومارکرهای بسیاری برای تشخیص سرطان خون به کار می روند، ولی هنوز بیومارکر محافظه کارانه ای که در مراحل اولیه کاربرد داشته باشد، یافت نشده است (۹). در مطالعه

حاضر تلاش بر این بوده است که سایتوکراتین ها با استفاده از CK19 به این جایگاه مهم دست یابند. در بین انواع مختلف مارکرهای توموری، به نظر می رسد که بیومارکرهای mRNA مناسبتر از بقیه باشند، زیرا مقادیر بسیار کم از این مارکر را می توان با روش Real time PCR که روشی است با حساسیت و ویژگی بالا جستجو و ارزیابی کرد. به همین دلیل بیومارکری از همین گروه به نام ck19mRNA انتخاب شد.

سایتوکراتین ۱۹ (CK19) از خانواده ی سایتوکراتین ها، فیلامنت های پروتئینی مسئول در حفظ ساختار سلول های اپی تلیومی می باشند که در موارد بسیاری به عنوان نمایانگر تشخیصی برای تعیین ماهیت حضوری سلولی با منشأ اپی تلیومی استفاده می شود (۱۰). همچنین، CK19 به عنوان یک بیومارکر در سرطان سلول های اپی تلیالی مطرح شده است (۱۱).

در مورد سرطان خون تاکنون آزمایشی با این بیومارکر صورت نگرفته است و برای اولین بار است که این تحقیق یعنی بررسی بیان بیومارکر CK19 بر روی سرطان نوع CML صورت می گیرد. در مورد سایر سرطان ها مانند سرطان دهان، سرطان سلول سنگفرشی لیندربرگ و رینوالد (۱۲) نیز بر این اعتقاد هستند که بیان CK19 در لایه بازال و سوپرابازال به عنوان یک مارکر تشخیصی در تغییرات دیسپلاستیک و پیش بدخیمی می باشد.

Boisnic و همکاران نیز بر این باور هستند که بروز این نشانگر در لایه های سوپرابازال از نشانه های تغییرات

مقادیر بالایی از مارکر زیستی سیتوکراتین ۱۹ در سرم افراد مبتلا به کارسینومای یاخته ای غیرکوچک بخصوص از نوع سنگفرشی گزارش شد (۲۱). همچنین، Schneider و همکاران با مطالعه روی ۱۴۴ بیمار مبتلا به سرطان ریه بیشترین و کمترین میزان این مارکر را به ترتیب در سرطان ریه از نوع یاخته های سنگفرشی و یاخته های کوچک گزارش نمودند (۲۲). در مطالعات متعددی از جمله Oyama و همکاران و مقادیر بالای آنتی ژن کارسینومای جنینی را در سطح سرمی بیماران مبتلا به سرطان یاخته های غیرکوچک نسبت به نوع کوچک گزارش نمودند و مقادیر بالای آن به خصوص در سرطان نوع NSCLC بیشتر از انواع دیگر دیده شده است (۲۳). در مطالعات Bates و همکاران روی ۱۸۴ بیمار مبتلا به سرطان ریه همبستگی بین دو مارکر CK19 و CEA مثبت معنی دار ارزیابی شد (۲۴). در مطالعه اخیر نیز همبستگی معنی داری بین این دو مارکر یافت شد. در حالی که در مطالعات Paone و همکاران روی ۹۶ بیمار سرطان ریه این همبستگی معنی دار نبود (۲۵). مارکر CK19 حدوداً ۷۰-۵۰٪ در بیماران مبتلا به سرطان سلول های سنگفرشی ریه، ۵۰-۳۰٪ در بیماری ادنوکارسینوما و ۳۱٪ در SCLC مثبت است (۲۶). افزایش درصد مثبت بودن با شدت بیماری مطابقت دارد (۲۷).

مطالعه حاضر و نیز گزارش های گذشته نشان می دهند که پیشگویی صحیح پیامد در بیماران مبتلا به سرطان به عنوان مشکلی بالینی و پیچیده مطرح است. با وجود مطالعه های گسترده ای که در زمینه سرطان در سراسر جهان انجام گرفته، صحت عوامل تعیین شده همچنان جای تردید دارد. به علاوه، پیشرفت بیماری با افزایش خطر مرگ ناشی از این بیماری همراه هستند. انجام مطالعه های آتی برای تعیین نقش عوامل مختلف بالینی و آسیب شناختی برای شناخت پیش آگهی سرطان خون ضروری به نظر می رسد.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه آتا و همچنین پرسنل دانشگاه تهران مرکزی به خاطر حمایت از مطالعه، تشکر و قدردانی می کنند.

بدخیمی در اپیتلیوم می باشد (۱۳). بطور کلی، بسیاری از پژوهشگران معتقدند که بیان CK19 در لایه های بازال و سوپرابازال فارغ از تغییرات کراتوتیک، نشاندهنده ی تغییرات بدخیمی و پیش بدخیمی می باشد (۱۴).

Vara و همکاران دریافتند که میزان بیان CK19 در سرطان سلول های سنگفرشی زبان، ۲۹ درصد می باشد (۱۵). این در حالی است که Hamakawa و همکاران بیان داشتند که این میزان تظاهر در OSCC برابر با ۶۶/۷ درصد بوده است (۱۶). Nie و همکاران به نتایج صد در صدی در بیان CK19 در OSCC ها دست یافتند (۱۷). در مورد سرطان سینه در سال ۲۰۰۳، تحقیقات Smith و همکاران نشان داد تشخیص به موقع سرطان پستان باعث جلوگیری از مرگ و میر زودهنگام بیماران خواهد شد (۱۸).

Bieche و همکارانش در سال ۲۰۰۴ طی تحقیقاتی به این نتیجه رسیدند که سیتوکراتین از فیلامنت های سلول های اپی تلیال حاصل شده و در سلول های اپی تلیال بیشتر بافت ها بیان می شود (۱۹). سلول های سرطانی خیلی زودتر از زمان آغاز بیماری در خون وریدی منتشر می شوند و نشان داده شده است که سرطان پستان یک بیماری سیستمیک می باشد. در انواع کارسینوما ممکن است تغییرات منحصر به فردی در بیان ژن سیتوکراتین صورت گیرد که این تغییرات در طول گسترش تومور اتفاق می افتد. افراد باید قبل از دریافت دارو و هر گونه درمانی اعم از شیمی درمانی و یا رادیوتراپی و یا هورمون درمانی بررسی شوند، زیرا موارد فوق می تواند منجر به تغییر نتایج گردد. در این بررسی نیز در تمام افراد بیمار سیتوکراتین ۱۹ بیان شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده این هستند که این روش می تواند جهت تشخیص و یافتن سلول های سرطانی در خون مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش سابقه فامیلی نیز در افراد بیمار و سالم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان سیتوکراتین ۱۹ در افراد بیمار بدون ارتباط معنی دار با سابقه فامیلی است، این در حالی است که در افراد سالم یکی از دلایل بیان سیتوکراتین می تواند سابقه فامیلی باشد.

در سال ۲۰۰۸ Iakovlev و همکارانش بیان تومور مارکر سیتوکراتین-۱۹ را با روش real time PCR در رده سلولی T47D اثبات کردند (۲۰). در مطالعات Mizuguchi و مولینا بر روی بیماران مبتلا به سرطان ریه



منابع مورد استفاده

- 1- Mohammadi Kian, M., Mohammadi, S., Tavallaei, M., Chahardouli, B., Rostami, S., Zahedpanah, M., Ghavamzadeh, A., Nikbakht, M., 2018. Inhibitory Effects of Arsenic Trioxide and Thalidomide on Angiogenesis and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Leukemia Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19 (4), 1127-1134
- 2- Haghi, A., Mohammadi, S., Heshmati, M., Ghavamzadeh, A., Nikbakht, M., 2017. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Effects of Sorafenib and Arsenic Trioxide in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18 (6), 1655-1661.
- 3- Mahmoud Abadi, A. 2008. "Leukemia (Blood cancer)." Mashhad: Kerdegari Publisher.
- 4- Xiong, Q., Yang, Y., Wang, H., Li, J., Wang, S., Li, Y., Yaran, Y., Cai, K., Ruan, X., Yan, J., Hu, S., Fang, X., 2014. Characterization of miRNomes in acute and chronic myeloid leukemia cell lines. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12(2): 79-91
- 5- Hehlmann, R., Hochhaus, A., Baccarani, M., 2007. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370(9584): 342-50.
- 6- Litchman, M., 1995. Classification and clinical manifestations of the hemopoietic stem cell disorders. *Hematology*, 5<sup>th</sup> ed (McGraw-Hill Inc, New York).
- 7- Anne-Sofie, S., Holten-Andersen, M., Fred, S., Manfred, S., Nadia, H., John, F., Brünner, N. 2003. Tumor markers from laboratory to clinical utility. *Mol Amp Cell Proteom* 2:378-87.
- 8- Bonito, M., Cantile, M., DE-Cecio, R., Liguori, G., Botti, G., 2013. Prognostic value of molecular markers and cytogenetic alterations that characterize breast cancer precursor lesions Review. *Oncol Lett* 6:1181-3.
- 9- Babiker, A.Y., Rahmani, A.H., Abdalaziz, M.S., Albutti, A., Aly, S.M., Ahmed, H.G., 2014. Expressional analysis of p16 and cytokeratin19 protein in the genesis of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Clin Exp Med*; 7(6): 1524-30.
- 10- Moll, R., Divo, M., Langbein, L., 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129(6): 705-33.
- 11- Dhanuthai, K., Chaiyarit, P., Chowsrikul, W., Wongsana, P., Rojanawatsirivej, S., 2007. Cytokeratin 18 and 19 expression in normal mucosa, lichen planus and squamous cell carcinoma. *Acta Stomatol Croat* 41(1): 23-30.
- 12- Lindberg, K., Rheinwald, J.G., 1989. Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. *Am J Pathol*; 134(1): 89-98.
- 13- Boisnic, S., Ouhayoun, J.P., Branchet, M.C., Frances, C., Beranger, J.Y., Charpentier, Y. Le., Szpirglas, H., 1995. Alteration of cytokeratin expression in the oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79: 207-15.
- 14- Wu, Y.J., Rheinwald, J.G., 1981. A new small (40kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell* 25(3): 627-35.
- 15- Vora, H.H., Shah, N.G., Patel, D.D., Trivedi, T.I., Chikhlikar, P.R., 2003. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol* 82(1): 34-50.
- 16- Hamakawa, H., Bao, Y., Takarada, M., Fukuzumi, M., Tanioka, H. 1998. Cytokeratin expression in squamous cell carcinoma of the lung and oral cavity: an immunohistochemical study with possible clinical relevance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85(4): 438-43.
- 17- Nie, M.H., Zhong, L., Zeng, G.M., Li, B.Q., 2002. The changes of cytokeratin 19 during oral carcinogenesis. *Chinese Journal of Stomatology* 37(3):187-190.
- 18- Smith, R.A., Cokkinides, V., Eyre, H.J., 2003. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, American Cancer Society. *CA Cancer J Clin* 53: 27-43.
- 19- Bièche, I., Tozlu, S., Girault, I., Lidereau, R., 2004. Identification of a three-gene expression signature of poor-prognosis breast carcinoma. *Mol Cancer* 3: 37.
- 20- Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, R. Arneson, N.C., J. Done, S., 2008. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat.* 107:145-54.
- 21- Mizuguchi, S., Nishiyama, N., Iwata, T., Nishida, T., Izumi, N., Tsukioka, T., 2007. Clinical value of serum cytokeratin 19 fragment and sialyl-Lewis x in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 83(1):216-21.
- 22- Schneider, J., Velcovsky, H.G., Morr, H., Katz, N., Neu, K., Eigenbrodt, E., 2000. Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer. *Anticancer Res* 20(6D): 5053-8.

- 23- Oyama, T., Kawamoto, T., Matsuno, K., Osaki, T., Matsumoto, A., Isse, T., Nakata, S., Ozaki, S., Sugaya, M., Yasuda, M., Yamashita, T., Takenoyama, M., Sugio, K., Yasumoto, K., 2003. A case-case study comparing the usefulness of serum trace elements (Cu, Zn and Se) and tumor markers (CEA, SCC and SLX) in non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Research* 23(1): 605-12.
- 24- Bates, J., Rutherford, R., Divilly, M., Finn, J., Grimes, H., O'Muircheartaigh, I., Gilmartin, J.J., 1997. Clinical value of CYFRA 21.1, carcinoembryonic antigen, neurone-specific enolase, tissue polypeptide specific antigen and tissue polypeptide antigen in the diagnosis of lung cancer. *European Respiratory Journal* 10(11): 2535-8.
- 25- Paone, G., De Angelis, G., Munno, R., Pallotta, G., Bigioni, D., Saltini, C., Bisetti, A., Ameglio, F., 1995. Discriminant analysis on small cell lung cancer and non-small cell lung cancer by means of NSE and CYFRA-21.1. *European Respiratory Journal* 8(7): 36-40.
- 26- Benedíková, A., Srovnal, J., Szkorupa, M., Skalisky, P., Chudakek, J., Bohanes, T., 2012. Biomarkers in the detection of minimal systemic dissemination in lungcancer patients. *Rozhl Chir* 91(4): 209-15.
- 27- Yu, H., Huang, X., Zhu, Z., Hu, Y., Ou, W., Zhang, L., Zhou, N., 2014. Significance of combined detection of LunX mRNA and tumor markers in diagnosis of lung carcinoma. *Chinese Journal of Cancer Research* 26(1): 89-94.