مقاله تحقیقی

بررسی کمّی بیان ژن *CK-18* در بیماران مبتلا به لوکمیای میلوئیدی مزمن

فرشید قیدر [۱]، نسترن اصغری‌مقدّم [۱،*]، فریبا شریف‌نیا [۲]

۱. گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* **مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: nas.asgharimoghaddam@iauctb.ac.ir، تلفن و فاکس: ۰۲۱۴۴۶۰۰۱۸۴

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

تاریخ دریافت:۹۸/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش:۹۹/۰۱/۲۳

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد۱۳- شماره ۴-زمستان ۱۳۹۷

چکیده

بیماری لوکمیای میلوئیدی مزمن (CML) یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است. میزان ابتلا به آن در سال‌های اخیر افزایش یافته و در صورت تشخیص دیرهنگام منجر به مرگ و میر بالا می‌شود. در حال حاضر اکثر روش‌های آزمایشگاهی و تشخیصی سرطان سخت، پر هزینه و وقت‌گیر می‌باشند و این موضوع مانع عمده‌ای برای تشخیص زودهنگام سرطان است. سیتوکراتین ۱۸ (CK18) یکی از پروتئین‌های اسکلت سلولی می‌باشد و تغییر الگوی بیان آن در سرطان‌های مختلف مشاهده شده‌است. مطالعه حاضر به بررسی تغییر بیان این ژن در سطح mRNA در افرادی که بیماری CML در آنها به تازگی شناخته شده‌است، می‌پردازد. بدین‌منظور نمونه خون ۵۰ فرد مبتلا به CML و ۵۰ فرد سالم جمع‌آوری شد. در ادامه، استخراج RNA انجام شده و با روش Real-time PCR بیان نسبی ژن *CK-18* مورد سنجش قرار گرفت و داده‌های حاصل با فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$۲آنالیز شد.قدرت بیومارکری *CK-18* با رسم منحنی ROC اندازه‌گیری شد. یافته‌ها نشان‌دهنده افزایش بیان ۱/۹۲ برابری و معنادار ژن *CK-18* در نمونه‌های لوسمی نسبت به نمونه های نرمال مشاهده شد ($p<0.05$) و نیز ارتباط معناداری بین جنسیت و تغییر میزان بیان این ژن در گروه بیماران یافت نشد. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که بررسی مقدار mRNA ژن *CK-18* می‌تواند برای تشخیص CML در کنار سایر عوامل مفید باشد.

واژگان کلیدی: لوکمیای میلوئیدی مزمن (CML)، سرطان، *CK-18*، سیتوکراتین

مقدمه

واژه لوکمیا به ایجاد نامحدود سلول‌های سفید نامتعادل در خون اشاره دارد. این گروه از سرطان‌ها حدود ۳٪ از انواع سرطان را تشکیل می‌دهند و نیز بیشترین میزان مرگ و میر را نسبت به دیگر سرطان‌ها دارد (۱،۲). این بیماری یک اختلال کلونی نئوپلاستی است که به علت تغییرات ژنتیکی در سلول پیش‌ساز خونی پدید می‌آید (۳،۴). لوکمیا چند نوع مختلف دارد و به طور سنتی بر اساس سرعت پیشرفت بیماری و سلول‌های درگیر در آن طبقه بندی می‌شود. تشخیص لوکمیای حاد از طریق مشاهده بلاست‌ها در خون محیطی و مغز استخوان و تشخیص لوکمیای مزمن براساس کندی بلوغ سلول‌های ایمنی صورت می‌گیرد. هم‌چنین، لوکمیا بر اساس مکانی که سلول‌ها از آن منشا می‌گیرند به دو نوع لنفوئیدی و میلوئیدی تقسیم می‌شوند. بر این اساس در حالت کلی ۴ نوع لوکمیا با عناوین لوکمیای لنفوئیدی حاد (ALL)، لوکمیای لنفوئیدی مزمن (CLL)، لوکمیای میلوئیدی حاد (AML) و لوکمیای میلوئیدی مزمن (CML) وجود دارد

(۵). حدود ۲۰-۱۵ درصد لوکمیای مشاهده شده در افراد بالغ را CML تشکیل می‌دهد (۶). در CML تعداد بسیار زیادی گلبول سفید در مغز استخوان ساخته می‌شود. در این حالت سرعت پیشرفت بیماری آهسته می باشد. هرچند سلول‌ها ظاهراً بالغ هستند، اما عملکرد مناسبی ندارند و مانند گلبول‌های سفید طبیعی قدرت مقابله با عفونت ها را ندارند. افزایش تعداد سلول‌ها، مشکل اصلی لوکمیای مزمن نیست، بلکه مسئله این است که سلول‌های لوکمیای مزمن نسبت به گلبول‌های سفید طبیعی عمر طولانی تری دارند. بنابراین، در گستره خونی آنها تعداد بسیار زیادی گرانولوسیت یا لنفوسیت بالغ مشاهده می‌شود. این بیماری با آهستگی پیشرفت کرده و معمولا در افراد میانسال یا پیرتر دیده می شود (۷). در اکثر بیماران مبتلا به CML، محصول ژن الحاقی حاصل از جابجایی بین کروموزم ۹ و ۲۲ نقش اصلی را در ایجاد CML ایفا می‌کند. این بیماری در اثر عدم درمان، از مرحله مزمن به مرحله حاد خواهد رسید (۴).

بیومارکرها مشخصه هایی هستند که به صورت عینی اندازه گیری می‌شوند و به عنوان شاخص‌های فرآیندهای زیستی، طبیعی، فرآیندهای بیماری‌زا یا پاسخ‌های دارویی برای مداخله درمانی ارزیابی می‌گردند. آنها در مایعات بدن مثل خون، ادرار، سرم و نیز در بافت‌های بدن وجود دارند. اکثر آنها پروتئین‌هایی هستند که در شرایط طبیعی در حد کمی در سلول وجود دارند و در اثر ایجاد سرطان دچار افزایش بیان شده و میزان آنها در خون و مایعات بدن و یا در بافت ها بالا می‌روند. بیومارکرهای به دست‌آمده از طریق Real-time PCR یا فلوسایتومتری برای تشخیص و تعیین زیر تیپ تومورهای خونریزی‌دهنده استفاده می‌شوند. آنها هم‌چنین برای پیش‌بینی اثر بخشی درمان‌های هدفمند مولکولی و تشخیص حداقل سلول‌های لوکمیایی باقیمانده استفاده می‌شوند (۸). در حال حاضر بررسی بیومارکرهای سرطانی تأییدشده به لحاظ بالینی مؤثرترین روش برای شناسایی بیماری و مرحله آن در افراد است. متاسفانه تاکنون بیومارکرهای مجزا با حساسیت و اختصاصیت کافی برای سرطان‌های شایع شناسایی نشده‌اند و برخی از بیومارکرها برای تشخیص سرطان‌ها در مراحل اولیه مؤثر نیستند. بنابراین بیومارکرهای جدید دارای عملکرد بهتر تشخیصی و پیش‌آگهی لازم خواهند بود (۹).

ژن سیتوکراتین ۱۸ (*CK-18*) روی کروموزوم q۱۳ ۱۲ واقع شده و ۳۷۹۱ جفت باز طول دارد. محصول پروتئینی آن پروتئین رشته‌ای حدواسط نوع یک است. این ژن به طورمداوم در انواع مختلف اندام‌های اپیتلیال بزرگسالان مانند کبد، ریه، کلیه، پانکراس، دستگاه گوارش و غدد پستان بیان می شوند و همچنین در سرطان‌های توسعه‌یافته از این بافت‌ها بیان می‌شوند (۱۰). محصول این ژن بیش از ۳۰ سال است که به‌عنوان یک پروتئین نشانگر ساختاری اختصاصی سلول‌های اپیتلیالی شناخته شده‌است و در نتیجه در هر دو جنبه حرکت سلولی و پیشرفت سرطان دخیل است (۱۱). بیان *CK18* با پیش آگهی بیمار در انواع سرطان‌های اپیتلیالی مرتبط است (۱۲،۱۳).

هدف تحقیق حاضر این است که بررسی کنیم آیا می‌توان از تغییر در بیان *CK-18* که خود به عنوان بیومارکری در تشخیص سرطان‌های سلول‌های اپیتلیالی است، برای CML استفاده کنیم و اینکه آیا اندازه گیری بیان ژن *CK-18* به عنوان یک مارکر زیستی مولکولی در تشخیص زوهنگام با روش غیرتهاجمی سرطان خون در سیستم گردش خون با روش Real-time PCR ممکن است یا خیر و در نهایت پی بردن به مکانیسم و نحوه اثر این ژن تا در آینده بتوان از آن به عنوان یک هدف مناسب برای درمان CML استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد-شاهدی است که شامل ۵۰ فرد بیمار و ۵۰ فرد سالم بود. قبل از انجام نمونه‌گیری بیماران به لحاظ عدم داشتن سابقه عفونت حاد ویروسی، بیماری‌های خودایمن، اختلالات غدد درون‌ریز مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴). هم‌چنین بیماران مورد مطالعه توسط پزشک متخصص پیش از نمونه‌گیری معاینه شدند. پس از کسب رضایت‌نامه، ۵ میلی‌لیتر از خون محیطی افراد بیمار (قبل از شیمی درمانی) و افراد شاهد گرفته شد و در لوله محتوی EDTA به آزمایشگاه منتقل گردید. تا زمان استخراج RNA نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج mRNA تولید شرکت MN آلمان براساس پروتکل آن انجام گرفت. به منظور تایید کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به

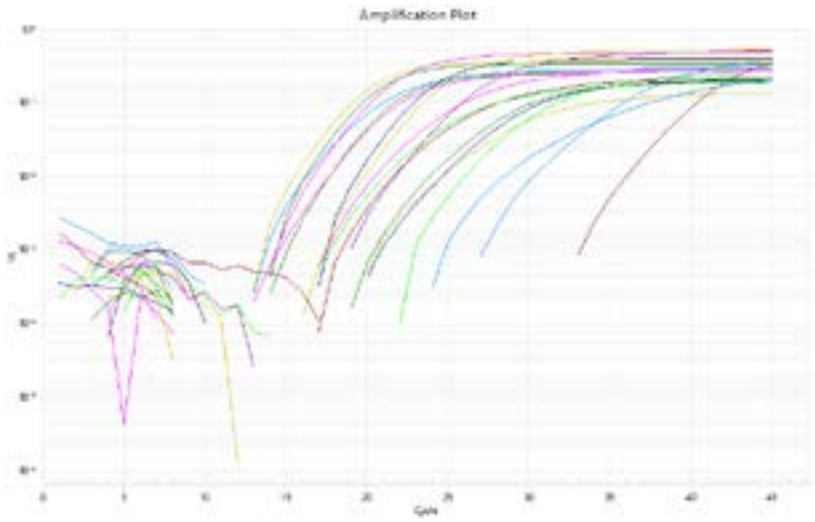
ترتیب از الکتروفورز ژل و نانودراپ استفاده شد. از کیت QuantiTect Reverse Transcription محصول شرکت کیاژن برای سنتز cDNA استفاده شد.

بررسی بیان ژن

پرایمرها و پروب‌های لازم به منظور سنجش کمی میزان بیان ژن *CK-18* و نیز ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی با کمک نرم افزار Gene Runner v.3.05 طراحی شد (جدول ۱). برای اجتناب از اتصال پرایمر و پروب های طراحی شده به سایر توالی‌های مشابه با توالی ژن‌های مورد نظر از BLAST که بر روی اینترنت (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) در دسترس است، استفاده شد. در این مطالعه از خاموش‌کننده TAMRA (Quencher) در انتهای '۳ و از گزارشگر FAM در انتهای '۵ استفاده شده است. به منظور تعیین غلظت بهینه پرایمرها در واکنش از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ میکرومولار آنها در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر برای انجاه واکنش Real-time PCR استفاده گردید. نتایج با روش Taq/man مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت یافتن غلظت بهینه پروب واکنش Real-Time PCR با بهترین غلظت پرایمر و سه غلظت ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میکرومولار پروب در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. انتخاب غلظت مناسب بر اساس چرخه آستانه کمتر و میزان فلورسانت بیشتر تعیین می شود (شکل ۱).

جدول ۱ - توالی پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر.

نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول PCR (bp)	Tm آغازگر
CK18 –F	CGCCACCGTCGTCCG		۵۹/۲۳
CK18 –R	CGAGTGGTGAAGCTCATGCT	۸۶	۵۹/۹۷
CK18-P	TCCTGTCCTTTCTCTCTCCCCGGA		۶۰/۳۲
GAPDH-F	GAAAGCCTGCCGGTGACTAA		۶۰/۶۰
GAPDH-R	CTGCGCTCCTGCCTCGATGG	۱۵۰	۶۰/۳۱
GAPDH-P	AGGAAAAGCATCACCCGGAG		۵۹/۳۰



شکل ۱ - نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت پرایمرها.

واکنش Q-PCR در ۴۰ سیکل انجام گرفت. دناتوراسیون آغازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. در ادامه ۳۵ سیکل اشاره شده با برنامه زمانی زیر انجام گرفت: دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد

برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. اندازه‌گیری فلورسانت تابش شده با دستگاه Eco Biosystems و آنالیز ابتدایی داده‌ها با استفاده از نرم افزار software system ver.5.0 انجام شد.

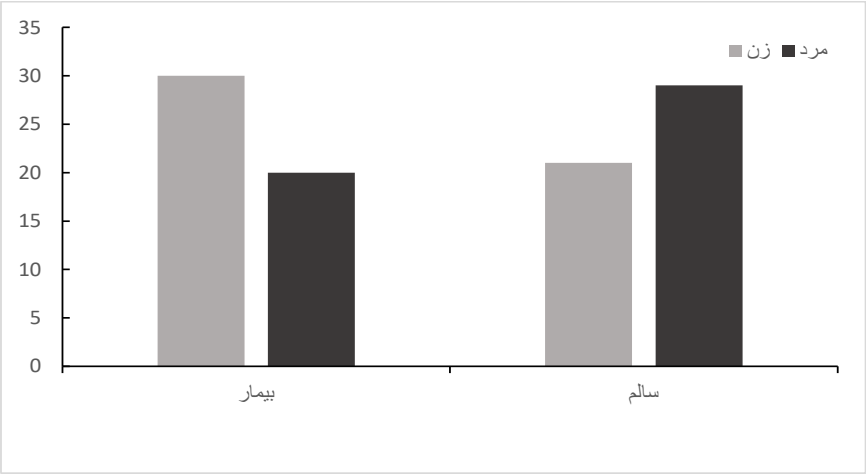
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها به صورت توصیفی و تحلیلی با استفاده از نرم افزار SPSS Ver24 صورت گرفت. برای مطالعه ارتباط بین بیان *CK-18* و بیماری از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. به منظور آنالیز آماری بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه از آزمون t-test و هم‌بستگی پیرسون استفاده شد. لازم به ذکر است که تمامی آزمایش ها با ۳ بار تکرار صورت گرفته است و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. $P\leq0.05$ به عنوان حد معنی‌داری در نظر گرفته شد. به منظور بررسی قدرت بیومارکری mRNA ژن *CK-18* از منحنی ROC استفاده شد که سطح زیر نمودار (AUC) موید قابلیت عامل مورد بررسی به عنوان یک مارکر تشخیصی است.

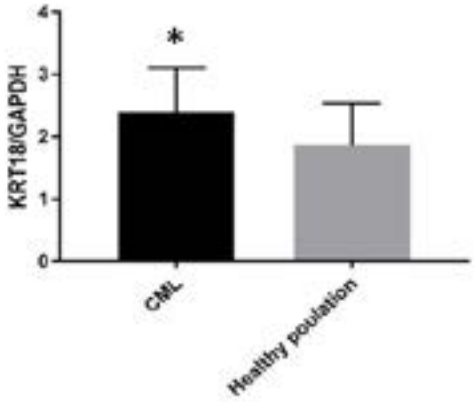
نتایج

بررسی آماری روی جمعیت شرکت‌کنندگان در این مطالعه، میانگین سنی گروه بیمار ۲/۳۵±۴۵/۶ سال و میانگین سنی گروه سالم ۲/۴۶ ± ۴۹/۷۴ را نشان داد ($p>0.05$). هم‌چنین زنان در گروه بیمار و شاهد به ترتیب ۵۸/۶ درصد و ۴۱/۴ درصد بودند که اختلاف معناداری میان درصد زنان و مردان شرکت کننده در مطالعه وجود ندارد ($p>0.05$) (شکل ۲).

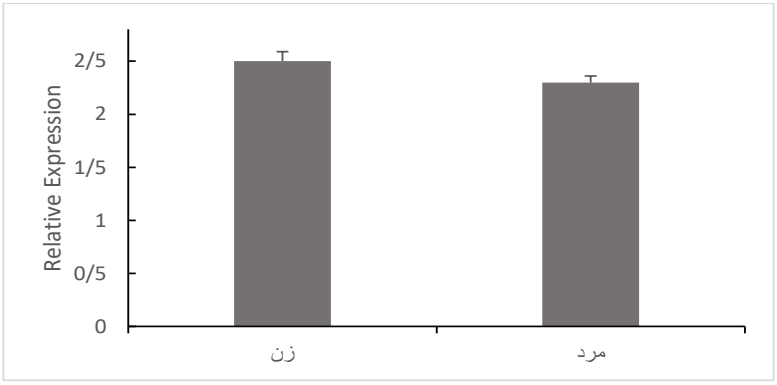
نتایج به دست آمده از Real-time PCR تغییر نسبی بیان ژن CK-18 را در نمونه بیماران نسبت به افراد سالم به لحاظ آماری معنادار است ($p=0.037$) (شکل ۳). مقدار افزایش بیان CK-18 در گروه بیماران ۱/۹۲ بوده است (شکل ۳). هم‌چنین محاسبه هم‌بستگی بیان ژن *CK-18* بین زنان و مردان در گروه بیمار وجود نداشت ($p>0.05$)(شکل ۴). پس از معنادار شدن اختلاف بیان این ژن در افراد مبتلا به CML نسبت به افراد سالم، به منظور ارزیابی قدرت بیومارکری mRNA ژن *CK-18* آنالیز منحنی ROC انجام شد(شکل ۵). نتایج نشان داد که AUC برای mRNA *CK-18* برابر با ۰/۵۹۵ است (95% CI, $p<0.05$) میزان حساسیت و اختصاصیت به دست آمده به ترتیب ۵۶٪ و ۵۳٪ می‌باشد و مقدار Cut off محاسبه شده ۹/۸ است به طور کلی می‌توان نتیجه گرفته اگرچه افزایش بیان این ژن در سرطان CML مشاهده می‌شود؛ ولی نمی‌توان از سنجش آن به عنوان بیومارکر استفاده کرد.



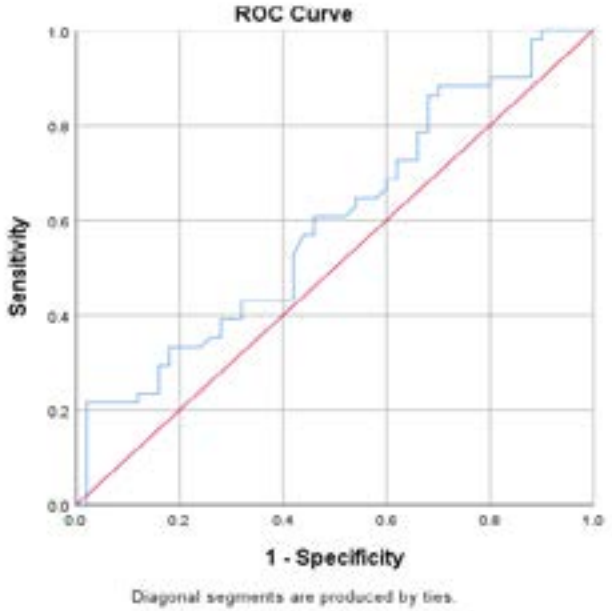
شکل ۲ - توزیع جنسیتی افراد بیمار و سالم.



شکل ۳ - بیان نسبی ژن CK-18 (KRT18) در نمونه های سالم و بیماران مبتلا به CML.



شکل ۴ - بیان نسبی ژن CK-18 در هر دو جنس در گروه بیمار. تفاوت معناداری مشاهده نشده است.



شکل ۵ - منحنی ROC برای بیان ژن *CK-18*؛ سطح زیرنمودار توان بیومارکری این ژن را در بیماران CML نشان می‌دهد.

بحث

در CML سلول‌های مغز استخوان تحت تأثیر قرار دارند و بیماری روندی مزمنی دارد. این بیماری اغلب افراد بزرگسال را درگیر می‌کند. وقوع این بیماری سالانه ۱ تا ۳ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است و احتمالاً بیشترین مطالعه درباره بدخیمی‌های انسان روی این بیماری صورت گرفته است (۱۴). از سال ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۰، میزان شیوع کلی لوکمیا سیر صعودی داشته‌است (۰/۵ ٪ در هر سال) و درسال ۲۰۱۴ به ۵۲۳۸۰ مورد افزایش یافته است (۱۵).

هدف از جستجو و تحقیق در زمینه تومور مارکرها رسیدن به نقطه‌ای است که بتوان با یک آزمایش خون به وجود سرطان پی‌برد و سرطان را شناسایی کرد. این آزمایش ساده خون علاوه بر ردیابی سرطان در فازهای اولیه می‌تواند از بروز میلیون‌ها مرگ در سال جلوگیری کند. اگرچه امروزه مارکرهای پروتئینی به طور عمده در تشخیص سرطان‌های مختلف استفاده می‌شوند، اما مارکر اختصاصی برای سرطان‌های بدخیم تاکنون شناسایی نشده است. بیومارکرهای بسیاری برای تشخیص سرطان خون به کار می‌روند، ولی هنوز بیومارکر مناسبی که در مراحل اولیه کاربرد داشته باشد، یافت نشده است. در مطالعه حاضر تلاش بر این بوده است که اهمیت *CK-18* به عنوان یک بیومارکر از میان سیتوکراتین‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. در بین انواع مختلف مارکرهای توموری، به نظر می‌رسد که *mRNA* مناسب‌تر از بقیه باشد، زیرا مقادیر بسیار کم از این مارکر را می‌توان با روش Real-Time PCR که روشی است با حساسیت و ویژگی بالا جستجو و ارزیابی کرد (۱۶). این امر دلیل انتخاب *CK-18 mRNA* بود تا بتوان با بررسی میزان بیان این ژن به جست و جوی تغییرات میزان بیان آن در بیماران مبتلا به CML پرداخت. برای این منظور در مطالعه حاضر ۵۰ فرد سالم و ۵۰ فرد مبتلا به لوسمی میلوبلاستیک مزمن مراجعه کننده به بیمارستان مورد بررسی قرار گرفتند که میزان تغییر نسبی بیان ژن *CK-18* در افراد مبتلا در مقایسه با افراد سالم توسط روش Real-Time PCR سنجیده شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش بیان معنی دار ۱/۹۲ برابری ژن *CK-18* در نمونه های لوسمیک نسبت به نمونه های نرمال بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنادار بود ($p=0.037$). بنابراین بیان *CK-18* ممکن است به عنوان یک تشخیص افتراقی در سرطان های مختلف باشد. در انواع مختلفی از سرطان‌ها میزان بیان *CK-18* نسبت به نمونه‌های نرمال تغییر کرده است. محققان مختلف داده‌های دلگرم‌کننده در مورد استفاده احتمالی *CK-18* به عنوان نشانگر بیولوژیکی سرم را برای ارزیابی اثر بخشی شیمی درمانی برای سرطان های مختلف از جمله کارسینومای دستگاه گوارش، سرطان پستان و سرطان ریه گزارش کرده اند (۲۰–۱۷). اما نتایج ما نقش بیومارکری را برای بیان این ژن در بیماری CML پیشنهاد نمی‌کند. این امر می‌تواند به دلیل نقش مهم سیتوکراتین ۱۸ در سلول‌های اپی‌تلیالی و اهمیت کمتر آن در تغییرات سرطانی مرتبط با سلول‌های میلوئیدی باشد. در مطالعه حاضر افزایش معنادار میزان بیان *CK18* در افراد مبتلا به لوکمیا نسبت به افراد سالم فاقد ارزش بیومارکری بوده است. این برای بار نخست است که این تغییر بیان ژن برای سرطان‌های سلول‌های خونی گزارش گردید. لازم به ذکر است که می‌توان با تحقیقات بعدی درباره تفاوت بیان این ژن در درجه‌های مختلف سرطان و همین‌طور تدارک دیدن جامعه آماری بزرگتر شواهد لازم برای در نظر گرفتن بررسی mRNA تولید شده از ژن *CK-18* به عنوان یک بیومارکر مناسب برای بیماری CML را فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان تمایل دارند تا از پرسنل آزمایشگاه آتا، همین‌طور از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به پاس حمایت و همراهی سپاس‌گزاری نمایند.

منابع مورد استفاده

. Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int J Cancer 83(1): 18-29.

. Wu, J., Chen, Y., Hageman, L., Francisco, L., Ness, E. C., Parman, M. *et al*., 2019. Late mortality after bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in the context of prior tyrosine kinase inhibitor exposure: A Blood or Marrow Transplant Survivor Study (BMTSS) report. Cancer 125(22): 4033-42.

3. Wan, T. S. K., Hui, E. K. C., Ng, M. H. L., 2018. Significance of cytogenetics in leukemia diagnostics. Curr Genet Med Rep 6(4):165-75.

. Mrózek, K., Heerema, N. A., Bloomfield, C. D., 2004. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Reviews 18(2):115–36.

. Kasteng, F., Sobocki, P., Svedman, C., Lundkvist, J., 2007. Economic evaluations of leukemia: A review of the literature. Int J Technol Assess Health Care 23(1):43–53.

. Etienne, G., Dulucq, S., Huguet, F., Schmitt, A., Lascaux, A., Hayette, S. *et al.*, 2019. Incidence and outcome of BCR-ABL mutated chronic myeloid leukemia patients who failed to tyrosine kinase inhibitors. Cancer Med 8(11):5173–82.

. Quintás-Cardama, A., Cortes, J. 2009. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. Blood 113(8):1619–30.

. Tohda, S., 2015. Biomarker for hematopoietic tumors-aiming for personalized diagnosis of leukemia stem cells. Rinsho Byori 63(9):1110–3.

. Kirwan, A., Utratna, M., O'Dwyer, M. E., Joshi, L., Kilcoyne, M., 2015. Glycosylation-based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics. Biomed Res Int 2015: 490531.

0. Oshima, R. G., Baribault, H., Caulín, C., 1996. Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. Cancer Metastasis Rev 15(4): 445-71.

1. Makino, T., Yamasaki, M., Takeno, A., Shirakawa, M., Miyata, H., Takiguchi, S., *et al.*, 2009. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. Br J Cancer 101(8): 1298-306.

2. Fillies, T., Werkmeister, R., Packeisen, J., Brandt, B., Morin, P., Weingart, D., *et al.*, 2006. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. BMC Cancer 2006; 6: 10.

3. Woelfle, U., Sauter, G., Santjer, S., Brakenhoff, R., Pantel, K., 2004. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. Clin Cancer Res 10(8):2670-4.

14. Xiong, Q., Yang, Y., Wang, H., Li, J., Wang, S., Li, Y., *et al*., 2014. Characterization of miRNomes in acute and chronic myeloid leukemia cell lines. Genomics Proteomics Bioinformatics 12(2): 79-91.

15. Kalia, M., 2015. Biomarkers for personalized oncology: Recent advances and future challenges. Metab Clin Exp 64(3 Suppl 1): S16-21.

16. 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.

17. Cummings, J., Hodgkinson, C., Odedra, R., Sini, P., Heaton, S. P., Mundt, K. E., *et al*., 2008. Preclinical evaluation of M30 and M65 ELISAs as biomarkers of drug induced tumor cell death and antitumor activity. Mol Cancer Ther 7(3): 455-63.

18. Mulligan, A. M., Pinnaduwage, D., Bane, A. L., Bull, S. B., O'Malley, F. P., Andrulis, I. L., 2011. CK8/18 expression, the basal phenotype, and family history in identifying BRCA1-associated breast cancer in the Ontario site of the breast cancer family registry. Cancer 117(7): 1350-9.

19. Balm, A. J., Hageman, P. C., van Doornewaard, M. H., Groeneveld, E. M., Ivanyi, D., 1996. Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur Arch Otorhinolaryngol 253(4-5): 227-33.

20. Cheng, Y., Qin, K., Huang, N., Zhou, Z., Xiong, H., Zhao, J., *et al.*, 2019 Cytokeratin 18 regulates the transcription and alternative splicing of apoptotic-related genes and pathways in HeLa cells. Oncol Rep 42(1): 301-12.