مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۲ شماره ۱ و ۲ بهار و تابستان ۱۳۸۷، ۸۳-۷۳

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

بررسی بیان ژن تلومراز انسانی(hTERT) در فازهای مختلف لوسمی میلوژن مزمن(CML)

علی امینی [۱]، دکتر سید حمیدالله غفاری [۲]، دکتر یوسف مرتضوی [۳]*، دکتر ناهید عین الهی [۴]، دکتر کامران علی مقدم [۵]، شهربانو رستمی [۶]، یونس جهانی [۷]، دکتر اردشیر قوام زاده [۸]

چکیده

زمینه و هدف : *لوسمی میلوژن مزمن (CML) یک بیماری کلونال سلول بنیادی خون ساز است که با جابجایی متقابل کروموزوم های ۹ و ۲۲ (کروموزوم فیلادلفیا) مشخص می شود. تلومراز آنزیمی است که با اضافه کردن توالی های تکراری تلومریک به انتهای کروموزوم ها باعث حفظ انسجام و یکپارچگی کروموزوم ها می گردد. نشان داده شده است که بیان زیر واحد کاتالیتیکی این آنزیم (hTERT) در اکثر سلولهای سرطانی و نئوپلازی ها افزایش بیان دارد. از این روی در این مطالعه به بررسی بیان ژن hTERT در فازهای مختلف بیماری CML پرداخته شد.*

روش بررسی : *مطالعه انجام شده از نوع بررسی مقطعی (Cross sectional) بود. ۵۲ نمونه به صورت تصادفی از ۲۶ بیمار CML در فاز مزمن قبل از درمان (۲۶ نمونه) و فواصل زمانی ۳ ماه پس از درمان (۲۶ نمونه)، ۹ بیمار در فاز شتاب گیرنده و ۱۲ بیمار در فاز بلاستیک که به بخش خون بیمارستان شریعتی تهران مراجعه کرده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. بیان ژن hTERT در ۷۳ نمونه بیماران فوق با روش RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. جهت تحلیل نتایج نرم افزار SPSS 15 استفاده شد.*

یافته ها : *از ۴۵ بیمار مطالعه شده ۳۳ نفر(۷۳٪) مرد و ۱۲ نفر(۲۷٪) زن بودند. بیماران مورد مطالعه در ۳ گروه سنی ۲۹-۱۷، ۴۰-۳۰ و ۷۵-۴۱ ساله تقسیم بندی شدند. بطور کلی از ۷۳ نمونه بررسی شده، ۴۳ نمونه(۵۸/۹٪) از نظر RT-PCR ژن hTERT مثبت و ۳۰ نمونه(۴۱/۱٪) منفی شدند. در فاز مزمن ۶۹/۲٪، پس از درمان ۳۸/۵٪، فاز شتاب گیرنده ۵۵/۶٪ و فاز بلاستیک ۸۳/۳٪ از نتایج مثبت بودند؛ که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($p<0.05$).*

نتیجه گیری : *تفاوت معنی دار بیان ژن hTERT بین فازهای مزمن، پس از درمان و بلاستیک می تواند نشانگر مولکولی مناسبی در پیگیری درمان و عامل پیش آگهی دهنده در سیر بیماری باشد.*

واژه های کلیدی : *لوسمی میلوژن مزمن، تلومراز، hTERT، RT-PCR*

* نویسنده مسئول :
دکتر یوسف مرتضوی ؛
دانشگاه علوم پزشکی زنجان
Email: ymort @ yahoo . com

- دریافت مقاله : اسفند ماه ۱۳۸۷ - پذیرش مقاله : اردیبهشت ماه ۱۳۸۷

[۱] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] دانشیار دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیماریهای متابولیک دانشگاه علوم پزشکی زنجان
[۴] استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۶] کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون
[۷] کارشناس ارشد آمار زیستی
[۸] استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

CML یک اختلال کلونال میلوپرولیفراتیو سلولهای بنیادی خونساز است(۱). که در٪۹۵ موارد همراه با یک ناهنجاری کروموزومی به نام کروموزوم فیلادلفیا(Ph) (جابجایی کروموزوم های ۹ و۲۲ و ایجاد ژن ادغامی BCR-ABL) است. محصول ادغام فوق دارای فعالیت تیروزین کینازی است که این امر سبب گسترش رده میلوئیدی می گردد(۱).

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

متوسط سن ابتلا ۶۰-۵۰ سالگی است اما در تمامی گروههای سنی از جمله کودکان نیز می تواند دیده شود. CML تقریباً ۱۵٪ از کل لوسمی ها و۲۰-۷٪ از لوسمی های بالغین را تشکیل می دهد(۲).

این بیماری به سه فاز مزمن(chronic) شتاب گیرنده(accelerated) و بلاستیک(blastic) تقسیم می شود که اکثر بیماران در فاز مزمن(۹۰-۸۵٪) به سر می برند و معمولاً ۷-۲ سال در همین فاز باقی مانده و سپس وارد فاز شتاب گیرنده می شوند که این فاز حدوداً کمتر از ۱/۵ سال به طول می انجامد و سپس وارد فاز بلاستیک می شوند(۱,۲). در این فاز معمولاً ۶- ۲ ماه عمر می کنند. اگرچه در فاز مزمن کروموزوم Ph تنها یافته سیتوژنتیک است ولی در فاز بلاستیک اختلالات دیگری چون +8، +Ph، +19 و iso-17q نیز دیده می شود(۳, ۴).

تلومر ساختار بسیار اختصاصی انتهای کروموزوم ها است که در انسان از توالی های تکراری 5'-TTAGGG-3' و تعدادی پروتئین های وابسته به تلومر تشکیل شده اند(۵). از وظایف مهم آنها می توان از حفظ یکپارچگی کروموزومی، جلوگیری از اتصال انتهای کروموزوم ها به یکدیگر و جلوگیری از تخریب و باز آرایی آنها نام برد(۷-۵). به علت عدم توانایی DNA پلیمراز سلول در همانند سازی قطعات تلومریک("end replication problem") در هر چرخه سلولی حدود ۱۰۰bp-۵۰ از طول توالی های تلومریک کاسته می شود(۶,۷). آنزیم تلومراز یک مجموعه ریبونوکلئوپروتئینی است که مسئول اضافه کردن واحدهای تکراری TTAGGG به انتهای کروموزوم ها است. این آنزیم از سه بخش: ۱) زیر واحد RNA (hTERC, hTR, hTER)، ۲) پروتئین وابسته به تلومراز(TEP1) و ۳) زیر واحد کاتالیتیکی(hTERT، تلومراز ترانس کریپتاز معکوس) تشکیل شده است(۷). این آنزیم به طور معمول در سلولهای سوماتیک وجود نداشته و یا به میزان بسیار کم و غیر قابل تشخیص وجود دارد؛ ولی در سلولهای germ-line، سلول های بنیادی و سلولهای سرطانی به میزان مختلفی در مراحل تمایزی سلول بیان می شود(۸). از آنجایی که تلومرها فاقد ژن هستند، میزان خاصی از این کوتاه شدگی در سلول های سوماتیک قابل تحمل است ولی هنگامی که این عمل سبب کوتاه شدن تلومرها در حد بحرانی شود، منجر به ناپایداری ژنتیکی، فرسودگی و پیری سلول (cell aging) می گردد(۹, ۱۰).

بیان ژن hTERT با فعالیت تلومراز (Telomerase Activity (TA)) در سلول های طبیعی، نامیرا یا سرطانی در ارتباط است؛ که این خود بیانگر نقش کلیدی hTERT در فعالیت تلومراز است(۵). اکثر تومورهای انسانی(بیشتر از ۸۵٪) توسط تلومراز از کوتاه شدگی تلومرها، ممانعت به عمل می آورند، از این روی اندازه گیری بیان hTERT در سلول های سرطانی، می تواند از نظر بالینی دارای اهمیت باشد(۱۱). مطالعات قبلی نشان داده اند که در نئوپلازی های هماتولوژیکی فعالیت مجدد تلومراز (reactivation of telomerase activity) دارای ارزش پیش آگهی دهنده است(۱۱, ۱۲). از آنجاییکه فعال شدن تلومراز عامل کلیدی در ایجاد سرطان بوده و با نامیرا شدن سلول در ارتباط است، لذا در این مطالعه به بررسی بیان ژن hTERT در فازهای مختلف بیماری CML پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی،۵۲ نمونه به صورت تصادفی از ۲۶ بیمار CML در فاز مزمن قبل از درمان (۲۶ نمونه) و فاصله زمانی ۳ ماه پس از درمان (۲۶ نمونه)، ۹ نمونه از ۹ بیمار در فاز شتاب گیرنده و ۱۲ نمونه از۱۲ بیمار در فاز بلاستیک مراجعه کننده به بخش

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی تهران که بر اساس علائم بالینی و آزمایشگاهی (کروموزوم فیلادلفیا)، تشخیص CML برای آنها قطعی شده بود، مورد مطالعه قرار گرفت. از هر بیمار 5mL خون وریدی بر روی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد. قبل از انجام نمونه گیری از تمامی بیماران رضایت کتبی گرفته شد.

با استفاده از فایکول (Ficol Hypaque, I.B.R.F.) و شیب غلظتی سانتریفیوژ، سلول های تک هسته ای از خون محیطی جدا گردیدند.

RNA تام از سلول های تک هسته ای بیماران توسط Trizol (آلمان,Sigma) مطابق دستورالعمل جدا گردید.

سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA سلولی، پرایمرهای راندوم (لیتوانی,Fermentas)، آنزیم M-MuLV (لیتوانی,Fermentas)، آنزیم RNase Inhibitor (لیتوانی, Fermentas) و dNTP Mix (ایران- سیناژن) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

سپس نمونه ها برای ژن hTERT، PCR شدند. برای این منظور در هر واکنش از 2.5 µl بافر 10X، 0.75 µl $MgCl_2$، 0.5 µl dNTPs، 0.5 µl از پرایمرهای Forward(F) و Reverse (R)، 0.2 µl Taq DNA Polymerase، 2 µl cDNA استفاده شد و حجم نهایی با آب مقطر استریل به 25 µl رسانده شد. توالی پرایمرهای به کار برده شده به صورت F=5´CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA3´ و R=5´GGATGAAGCGGAGTCTGGA3´ بود.

نمونه ها در شروع ۴ دقیقه در۹۵°C، و سپس۳۵ چرخه با شرایط ۴۰ ثانیه در ۹۵°C، ۴۰ ثانیه در ۵۵°C، ۴۰ ثانیه در ۷۲°C و نهایتاً ۷ دقیقه در ۷۲°C، PCR شدند. جهت اطمینان از روش کار در هر مرحله، از ژن ABL به عنوان یک house keeping gene استفاده شد. تمامی نمونه های cDNA علاوه بر ژن hTERT برای ژن ABL با توالی پرایمری F=5'CGGCTCTCGGAGGAGACGATGA3' و R=5'CCCAACCTTTTCGTTGCACTGT3' با شرایط یکسان PCR شدند. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۳٪ الکتروفورز شدند. در هر چرخه کاری یک میکروتیوب به عنوان کنترل منفی(Negative Control) و یک میکروتیوب به عنوان کنترل مثبت(Positive Control) استفاده شد؛ که در کنترل منفی به جای cDNA، آب و در کنترل مثبت از cDNA رده سلولی NB4 استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه بیان ژن hTERT توسط RT-PCR در فازهای ذیل مورد بررسی قرار گرفت.

۱- مرحله تشخیص بیماری و قبل از درمان (Diagnosis یا همان (Chronic Phase (CP)

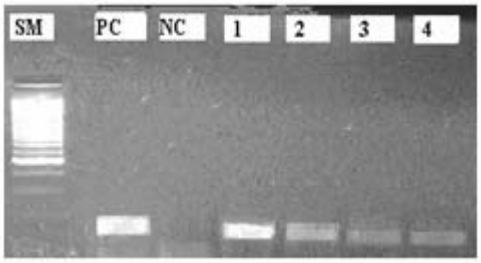
۲- مرحله ۳ ماه پس از درمان (After Therapy (AT))

۳- مرحله ورود به فاز شتاب گیرنده (Accelerated Phase (AP))

۴- مرحله ورود به فاز بلاستیک (Blastic Phase (BP))

از ۴۵ بیمار مطالعه شده ۳۳ نفر(۷۳٪) مرد و ۱۲ نفر(۲۷٪) زن بودند. بیماران مورد مطالعه در ۳ گروه سنی ۲۹-۱۷، ۴۰-۳۰ و ۷۵-۴۱ ساله تقسیم بندی شدند. متوسط سن بیماران ۳۸ سال بود. ۷۳ نمونه از ۴۵ بیمار فوق جهت بیان ژن hTERT توسط RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه هایی که از نظر ژن hTERT مثبت بودند باند ۱۴۴ bp ایجاد کردند (شکل شماره ۱).

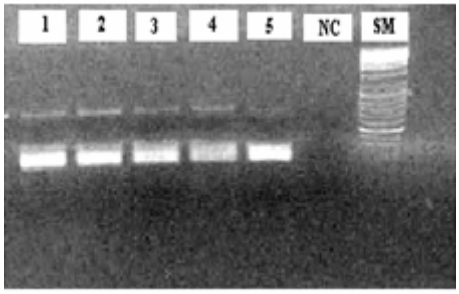
Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017



۱۴۴ bp→

شکل شماره ۱ : الکتروفورز محصولات AT-PCR ژن hTERT

در شکل شماره ۱ ستون های ۱ تا ۴ مربوط به نمونه بیماران، NC نمونه کنترل منفی، PC نمونه کنترل مثبت و SM شاخص اندازه مولکولی نردبانی (۱۰۰bp) هستند. نمونه های بیماران در این تصویر همگی PCR مثبت هستند که شدت باند مشاهده شده با توجه به بیان مختلف hTERT در هر بیمار، متفاوت است. همچنین تمامی نمونه ها که برای ژن ABL، PCR شدند، باند ۲۰۰ bp ایجاد کردند(شکل شماره۲).



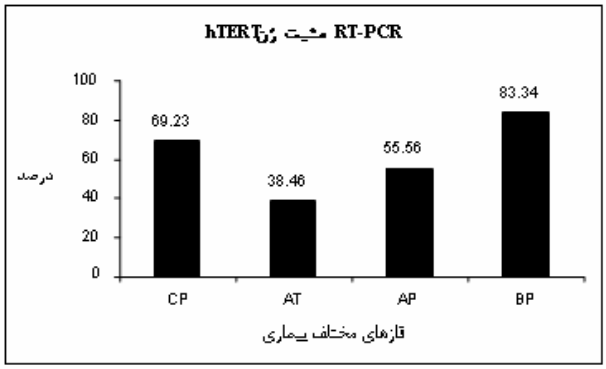
۲۲۰ bp→

شکل شماره ۲ : الکتروفورز محصولات RT – PCR ژن ABL

در شکل شماره ۲ ستون های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه بیماران، NC نمونه کنترل منفی و SM شاخص اندازه مولکولی نردبانی (۱۰۰ bp) هستند.

بطور کلی از ۷۳ نمونه بررسی شده، ۴۳ نمونه (۵۸/۹٪) از نظر RT-PCR ژن hTERT مثبت و ۳۰ نمونه (۴۱/۱٪) منفی شدند. در فاز مزمن از نظر RT-PCR ژن hTERT ۶۹/۲٪ مثبت و ۳۰/۸٪ منفی، پس از درمان ۳۸/۵٪ مثبت و ۶۱/۵٪ منفی، فاز شتاب گیرنده ۵۵/۶٪ مثبت و ۴۴/۴٪ منفی و فاز بلاستیک ۸۳/۳٪ مثبت و۱۶/۷٪ منفی شدند (نمودار شماره ۱).

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017



نمودار شماره ۱ : درصد نتایج مثبت RT-PCR ژن hTERT در فازهای مختلف بیماری

در نمودارشماره ۱ محور عمودی نمایانگر درصد و محور افقی نشان دهنده فازهای مختلف بیماری است. همچنین CP: فاز مزمن، AT: فاز پس از درمان، AP: فاز شتاب گیرنده و BP: فاز بلاستیک را نشان می دهند. همانطور که مشاهده می شود، بیشترین درصد بیان hTERT مربوط به فاز بلاستیک و کمترین درصد مربوط به فاز پس از درمان است. برای تجزیه و تحلیل آماری از Fisher's Exact Test استفاده شد، که بر اساس آن اختلاف بیان و عدم بیان ژن hTERT در بین تمام فازهای مختلف بیماری معنی دار بود ($p<0.05$). در مقایسه فاز مزمن با هر کدام از فازهای شتاب گیرنده(AP) و بلاستیک(BP) به صورت جداگانه، اختلاف معنی داری در بیان ژن hTERT دیده نشد($p>0.05$). همچنین بین مرحله پس از درمان و فاز شتاب گیرنده نیز اختلاف معنی دار نبود ولی اختلاف بیان hTERT پس از درمان و فاز بلاستیک معنی دار بود ($p<0.05$). در مقایسه بیان hTERT با گروه های سنی و جنس بیماران مورد مطالعه، ارتباط معنی داری دیده نشد ($p>0.05$).

در این مطالعه شاخص های آزمایشگاهی چون شمارش WBC، پلاکت، درصد بلاست و میزان هموگلوبین نیز بررسی شد. شمارش WBC در فاز مزمن بیشترین (۱۲۰۶۰۰ /mm^3) و در فاز پس از درمان کمترین (۲۴۶۵۰ /mm^3) میزان را داشت. شمارش پلاکت در فاز مزمن بالاترین (۳۶۷۰۰۰ /mm^3) و در فاز بلاستیک پایین ترین (۱۴۹۰۰۰ /mm^3) میزان را دارا بود. درصد بلاست در فاز بلاستیک بیشترین (۱۱٪) و در فاز پس از درمان کمترین (۱٪) میزان را داشت؛ و میزان هموگلوبین در فاز پس از درمان بیشترین (۱۲/۴ g/dl) و در فاز بلاستیک کمترین (۹/۲ g/dl) میزان را دارا بود (جدول شماره ۱).

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

جدول شماره ۱ : میانگین شمارش گلبول های سفید(WBC)، پلاکت(Plt)، درصد بلاست(Blast) و میزان هموگلوبین(Hb) نمونه های بیماران مورد مطالعه در فازهای مختلف بیماری CML

فازهای بیماری	WBC /mm3	Hb g/dL	Blast %	Plt 1000/mm3
CP	۱۲۰۶۰۰/۰۰	۱۰/۶۹	۱/۸۸	۳۶۶/۹۶
AT	۲۴۶۵۰/۳۸	۱۲/۴۲	۱/۱۱	۲۱۰/۰۰
AP	۲۷۶۰۰/۰۰	۹/۷۳	۴/۱۱	۲۸۳/۲۲
BP	۲۵۸۸۰/۸۳	۹/۲۷	۱۱/۴۱	۱۴۸/۷۵
مجموع	**۵۹۳۹۰/۱۳**	**۱۰/۹۵**	**۳/۴۵**	**۲۶۴/۸۶**

اختلاف این شاخص ها در فازهـای مختلـف بیمـاری بـا آزمـون آمـاری Kruaskal-Wallis بررسـی شـد و همگی معنی دار بودند ($p<0.0001$). در بررسـی ایـن شاخص ها با بیان ژن hTERT، بین شمارش WBC و درصد بلاست اختلاف معنی داری بین نتایج مثبـت و منفی PCR ژن hTERT دیده نشد ($p>0.05$)؛ ولی بین شمارش پلاکت و میزان هموگلـوبین بـا نتـایج PCR، این اختلاف معنی دار بـود($p<0.05$)؛ بـدین نحـو کـه میزان پلاکت در افـراد بیـان کننـده hTERT بـالاتر از افرادی بود که hTERT را بیان نمی کننـد. و در مـورد هموگلوبین افراد بیان کننده hTERT میزان کمتـری از هموگلوبین نسبت به افراد با عـدم بیـان hTERT دارا بودند.

بحث

تلومراز یک ترکیب ریبونوکلئوپروتئینی یا بـه عبـارتی یک آنزیم Reverse Transcriptase متشکل از دو زیر واحد hTERT و hTR است که توالی هـای تکـراری تلومریک را به انتهای تلومرها اضافه می نماید. سـلول هـای سـوماتیک تـوالی هـای تلومریـک خـود را بـه صورت پیوسته در هر چرخه تقسیم از دست می دهند در حالیکه تعداد زیادی از بافت هـای سـرطانی دارای فعالیـت تلـومرازی هـستند و بـدین ترتیـب طـول تلومرهای خود را ثابت نگاه داشته و متحمل تقسیمات پی در پی و نامحدود می شوند. مطالعات زیادی نشان می دهند که بر خلاف سلول های طبیعـی سـوماتیک، تلومراز در ٪ ۸۵ سلول های سرطانی انـسان، افـزایش فعالیـت از خـود نـشان مـی دهـد. نتـایج حاصـل از تحقیقـات Dawei و همکـاران(۱۳) بـر روی بیمـاران AML و نیز مطالعات انجام شده بر روی نمونـه هـای سرطان پستان توسط Bie`che و همکاران این یافته را تایید می کنند(۱۴).

تا کنـون عـلاوه بـر مطالعـه تلـومراز در لوسـمی هـا، مطالعات بسیار گسترده ای در این زمینه بر روی انواع تومورهـای تـوپر(Solid Tumor) انجـام شـده اسـت. تقریباً در تمامی این مطالعات، افزایش میـزان بیـان ژن hTERT در مراحل پیشرفته تر سرطان هـا و تومورهـا به وضوح به چشم می خورد. در مطالعه Kirkpatrick و همکاران گزارش شده اسـت کـه بیـان hTERT بـا فعالیت تلومراز در سرطان پستان ارتباط معنی داری با یکدیگر دارند(۱۵). تحقیقات انجـام شـده بـه وسـیله Ohyashiki و همکاران بیان داشـته اسـت کـه تلـومر کوتاه تر و فعالیـت تلـومراز بـالاتر تقریبـاً همیـشه بـا شدت بیماری در نئوپلازی های همـاتولوژیکی (مثـل

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

لوسمی های عود کننده و لنفوما های high-grade) مرتبط است و اندازه گیری آنها جهت پیگیری روند بیماری می تواند مفید باشد(۷). همچنین در مطالعات Ghaffari و همکاران که بر روی فعالیت تلومراز در بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL) در دو مرحله تشخیص و عود انجام گرفته شده، آمده است که اکثر بیماران با سطوح بالای فعالیت تلومراز متعلق به گروه عود بوده و به طور معنی داری طول تلومر کوتاه تر و طول عمر کمتری نسبت به بیماران با فعالیت تلومراز پایین که اکثراً مربوط به گروه تازه تشخیص داده شده هستند، داشتند(۱۶).

تعدادی از محققین سعی بر این داشتند که به جای اندازه گیری فعالیت تلومراز از بیان زیر واحد های آن استفاده کنند. بیان همه زیر واحد های تلومراز ارتباط مستقیمی با فعالیت تلومرازی ندارد. حدوداً ٪ ۹۵-۸۵ از بافت های توموری بیان hTERT را از خود نشان می دهند و این ارتباط سبب شده که این زیر واحد به عنوان یک فاکتور معتبر در تشخیص و تعیین مراحل سرطان پستان و تشخیص بدخیمی ها در مقایسه با سلول های طبیعی اطراف، معرفی شود(۱۷).

پیش از این، از تکنیک TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) جهت اندازه گیری فعالیت تلومراز، پس از استخراج پروتئین بافتی استفاده می شد. این روش نیاز به فعالیت آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (زیر واحد hTERT) و RNA (زیر واحد hTR) سالم و دست نخورده دارد و در مرحله ای نیز از آنزیم Taq Polymerase استفاده می شود؛ در نتیجه ممکن است به دلیل امکان حضور بازدارنده های تلومرازی، ممانعت کننده های آنزیم Taq، پروتئاز ها و RNase در عصاره استخراج شده از سلول، نتایج منفی کاذب به همراه داشته باشد(۱۸) در حالیکه در تکنیک RT-PCR تنها به قطعه کوچکی از hTERT mRNA نیاز است و نسبت به TRAP حساسیت کمتری به RNase دارد و همچنین بدون حساسیت به پروتئاز است؛ در نتیجه ما بر آن شدیم تا در این مطالعه برای بررسی وجود یا عدم وجود hTERT mRNA از تکنیک RT-PCR استفاده کنیم. تقریباً اکثر مطالعات انجام شده بر روی تلومراز در بیماران CML، سنجش فعالیت آنزیم است؛ اما همانطور که قبلاً ذکر شد از روش TRAP استفاده می گردید. ما در این مطالعه برای سنجش آنزیم فوق از بررسی وجود mRNA جزء کاتالیتیکی آنزیم یا همان hTERT استفاده کردیم. در برخی مطالعات نظیر تحقیقات Jin Huh و همکاران بر روی AML(۱۹)، Kirkpatrick و همکاران(۱۵) روی سرطان پستان و دیگر مطالعات(۲۰)، گزارش شده است که سطوح hTERT mRNA با فعالیت تلومراز (TA= Telomerase Activity) ارتباط تنگاتنگی دارد.

در این مطالعه مشاهده کردیم که در بین ۴ فاز بیماری اختلاف نتایج PCR مثبت بیماران معنی دار است($p<0.05$). یعنی اینکه درصد نتایج مثبت در فازهای مختلف با هم تفاوت داشتند. مطالعات مشابه بر روی فعالیت تلومراز نیز گویای این مطلب است. البته در مطالعه حاضر با وجود تفاوت درصد PCR مثبت در فاز بلاستیک(۸۳/۳٪) با فاز مزمن(۶۹/۲٪)، این اختلاف معنی دار نبود؛ که یک احتمال می تواند به علت تعداد کم نمونه در فاز بلاستیک باشد. این موضوع در تحقیقات Verstovsek و همکاران نیز بیان شده است که به دلیل حجم کم نمونه در فازهای بلاستیک و شتاب گیرنده، نتوانستند ارتباط معنی داری از فعالیت تلومراز در این فاز ها پیدا کنند(۲۱).

در مطالعه حاضر تفاوت آشکار و معنی داری ($p<0.05$) بین فازهای مزمن و پس از درمان مشاهده کردیم. این امر نشانگر این است که درمان باعث کاهش درصد مثبت شدن PCR ژن hTERT می شود. این یافته می تواند به چند دلیل باشد؛ دلیل

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

اول اینکه، درمان، تعداد سلول های بدخیم را از بین می برد و در نتیجه میزان حضور hTERT mRNA در نمونه به حدی پایین می آید که با RT-PCR قابل شناسایی ناست، که خود این امر نشانگر این است که hTERT mRNA در سلول های طبیعی وجود نداشته یا به صورت بسیار کم وجود دارد. دلیل دیگر می تواند اثر درمان(Imatinib) بر روی بیان ژن hTERT باشد. همان گونه که در مطالعات Osama Yamada نیز گزارش شده است که بیان hTERT در رده سلولی K562 در حضور Imatinib کاهش می یابد(۲۲).

وجود رابطه معنی دار بیان ژن hTERT بین فازهای پس از درمان و بلاستیک ($p<0.05$) در این مطالعه، مجدداً حاکی از آن است که hTERT mRNA در سلول های بدخیم وجود دارد. یعنی با افزایش سلول بدخیم و مقاومت به درمان، درصد PCR مثبت در فاز بلاستیک افزایش یافته است که حتی این افزایش از سطح درصد فاز مزمن بیشتر بود؛ پس می توان گفت مثبت باقی ماندن RT-PCR ژن hTERT در نمونه های پس از درمان، ممکن است نشانگری جهت پیش آگهی در پیشرفت بیماری محسوب شود.

مطالعات زیادی نشان داده اند که طول تلومر در نمونه های بیماران CML به طور معنی داری نسبت به نمونه های کنترل کوتاه تر است. Bagheri و همکاران بیان داشته اند که از دست رفتن طول تلومر هنگام تشخیص و کوتاه شدگی پیشرفت بیماری به فاز بلاستیک، می تواند نشان دهنده شدت بیماری بوده و در نتیجه اطلاعات پیش آگهی دهنده مهمی را در اختیار ما قرار دهد. مطالعات دیگر نیز گزارش کرده اند که بیماران با طول تلومر کمتر، سطوح بیشتر از فعالیت تلومراز را دارا هستند. بنابراین واضح است که بر طبق این مطالعات، فعالیت تلومراز و طول تلومر نقش مهمی را در پیشرفت بیماری CML ایفا می نماید و اندازه گیری آنها در بیماران تازه تشخیص داده شده ممکن است اطلاعات پیش آگهی دهنده مناسبی را ارائه کند(۲۳).

ظرفیت بالای تکثیر در سلول های CML فاز مزمن ممکن است باعث القا پیش رونده کوتاه شدن تلومرها شود، که یک علت آن می تواند تقسیم فعال سلولی در سلول های خون ساز، بدون افزایش واضح فعالیت تلومراز باشد. در فاز بلاستیک، وجود hTERT mRNA افزایش معنی داری دارد که یک احتمال این است که کوتاه شدن پیش رونده تلومر تا حد بحرانی پیش می رود و آن دسته از سلول هایی که تلومراز خود را تنظیم افزایشی کرده اند، می توانند زنده بمانند. این یافته با مطالعات Ohyashiki و همکاران در مورد فعالیت تلومراز مشابهت کامل دارد(۲۴). احتمال دیگر این است که سطوح بالای hTERT می تواند باعث مقاومت به درمان با Imatinib شود؛ همانگونه که در تحقیقات Yamada و همکاران نیز گزارش شده است که سلول های لوکمیک K562 که افزایش فعالیت تلومراز دارند، نسبت به Imatinib مقاومت دارند(۲۲). بنابراین این مطالعه و مطالعات دیگر(۱۲, ۲۱, ۲۵) پیشنهاد می کنند که بررسی وجود hTERT، سنجش فعالیت تلومراز و طول تلومر در طی پیشرفت بیماری CML می تواند در آینده به عنوان یک فاکتور پیش آگهی دهنده(prognosis) در نظر گرفته شده و از نظر بالینی برای پیگیری درمان بهتر بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

از دیگر موارد قابل ذکر در این مطالعه بررسی شمارش WBC، درصد سلول های بلاست، پلاکت و میزان هموگلوبین بیماران است. اختلاف میانگین شمارش WBC، درصد سلول های بلاست، پلاکت و میزان هموگلوبین در بین فازهای مختلف بیماری از نظر آماری معنی دار بود؛ ولی ارتباط هر کدام از آنها با PCR ژن hTERT در همان فاز از نظر آماری معنی

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

دار نبود. این یافته در مطالعات Verstovsek نیز گزارش شده است که ارتباط معنی داری مابین فعالیت تلومراز و فاز مزمن در سن، هموگلوبین، پلاکت، WBC و بلاست مشاهده نشد(۲۱). بررسی کلی نتایج PCR با میانگین شمارش WBC و درصد سلول های بلاست از نظر آماری معنی دار نبود ($p<0.05$)؛ یعنی تفاوت معنی داری در میانگین شمارش WBC و درصد سلول های بلاست بین کل نمونه های PCR مثبت و منفی مشاهده نشد. ولی در مورد هموگلوبین و پلاکت تفاوت، معنی دار بود؛ به عبارتی افراد PCR مثبت میانگین شمارش پلاکت بالاتر و میزان هموگلوبین پایین تری نسبت به PCR منفی ها داشتند. در مطالعه Jin Huh و همکاران آمده است که بیان hTERT mRNA با جنس، WBC و درصد بلاست ارتباطی نداشته ولی با سن بیماران AML در ارتباط است(۱۹).

در این مطالعه ارتباط معنی داری بین نتایج PCR و سن و جنس بیماران مشاهده نشد. البته قابل ذکر است که درصد PCR مثبت، در زنان(۷۵/۰٪) با وجود کمتر بودن در تعدادشان نسبت به مردان، بالاتر است؛ این امر شاید حاکی از اثر تنظیمی مثبت استروژن بر روی بیان hTERT باشد(۲۶).

نتیجه گیری

در این مطالعه تفاوت معنی داری در بیان ژن hTERT در فازهای قبل و بعد از درمان و نیز در فاز های شتاب گیرنده و بلاستیک، مشاهده شد. از این روی بررسی بیان ژن hTERT می تواند به عنوان یک نشانگر مولکولی مناسب، در پیگیری درمان و پیش آگهی سیر بیماری مورد استفاده قرار گیرد. هرچند در این رابطه نیاز به مطالعات بیشتر با حجم نمونه بالاتر ضروری می نماید.

علاوه بر نقش های گفته شده، می توان از hTERT به عنوان یک هدف درمانی استفاده کرد. چنانکه مطالعه بر روی مکانیسم های تنظیمی بیان ژن hTERT، می تواند در طراحی درمان و مهار رونویسی این ژن بسیار موثر واقع شود.

منابع

1.Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, editors. Williams Hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc; 2006.

2. Loffler H, Bergman J, Hochhaus A, Hehlmann R, Krämer A, The German CML Study Group. Reduced risk for chronic myelogenous leukemia in individuals with cytochrome P-450 gene polymorphism CYPIAI *2A. Blood. 2001 Dec; 98(13): 3874-3881.

3. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, et al. Gene expression Change associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21; 103(8): 2794–2799.

4. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. Nat Rev Cancer. 2008 May;8(5):341-50.

5. Cheung AL, Deng W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. Front Biosci. 2008 Jan 1;13:2075-90.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017

6. Ram R, Uziel O, Lahav M. The importance of the telomere and telomerase system in hematological malignancies. Leuk Lymphoma. 2005 Aug; 46(8):1121-35.

7. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. Oncogene. 2002 Jan 21;21(4):680-7.

8. Bock O, Serinsöz E, Schlué J, Kreipe H. Different expression levels of the telomerase catalytic subunit hTERT in myeloproliferative and myelodysplastic diseases. Leuk Res. 2004 May;28(5):457-60.

9. Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, Silver RT, Moore MAS. Telomerase Activity and Telomere Length in Acute and Chronic Leukemia, Pre- and Post-ex Vivo Culture. Cancer Res. 2000 Feb; 60(3):610-617.

10. Deng Y, Chang S, Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. Lab Invest. 2007 Nov;87(11):1071-6.

11. Padmanabhan P, Otero J, Ray P, Paulmurugan R, Hoffman AR, Gambhir SS, et al. Visualization of telomerase reverse transcriptase(hTERT) promoter activity using a trimodality fusion reporter construct. J Nucl Med. 2006 Feb; 47(2): 270-277.

12. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. Leukemia. 1997 Feb;11(2):190-4.

13. Xu D, Gruber A, Peterson C, Pisa P. Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukemia. Br J Haematol. 1998 Sep;102(5):1367-75.

14. Bièche I, Noguès C, Paradis V, Olivi M, Bedossa P, Lidereau R, et al. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. Clin Cancer Res. 2000 Feb;6(2):452-9.

15. Kirkpatrick KL, Clark G, Ghilchick M, Newbold RF, Mokbel K. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. Eur J Surg Oncol. 2003 May;29(4):321-6.
Ghaffari SH, Shayan-Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Ann Oncol. 2008 Nov;19(11): 1927–1934.

16. Yoo J, Park SY, Kang SJ, Kim BK, Shim SI, Kang CS. Expression of telomerase activity, human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in gastric adenocarcinomas. Mod Pathol. 2003 Jul;16(7):700-707.

17. Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2004 Dec 1;10(23):3514-7.

18. Huh HJ, Huh JW, Yoo ES, Seong CM, Lee M, Hong KS, et al. hTERT mRNA Levels by Real-Time RT-PCR in Acute Myelogenous Leukemi. Am J Hematol. 2005 Aug;79(4):267-73.

19. Zhu K, Qu D, Sakamoto T, Fukasawa I, Hayashi M, Inaba N. Telomerase expression and cell proliferation in ovarian cancer cells induced by histone deacetylase inhibitors. Arch Gynecol Obstet. 2008 Jan;277(1):15-9.

20. Verstovsek S, Kantarjian H, Manshouri T, Cortes J, Faderl S, Giles FJ, et al. Increased telomerase activity is associated with shorter survival in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. Cancer. 2003 Mar 1;97(5):1248-52.

21. Yamada O, Kawauchi K, Akiyama M, Ozaki K, Motoji T, Adachi T, et al. Leukemic cells with increased telomerase activity exhibit resistance to imatinib. Leuk Lymphoma. 2008 Jun;49(6):1168-77.

22. Bagheri N, Mortazavi Y, Ghafari SH, Alimoghadam K, Pourfatoullah AA, Shayan N, et al. Analysis of telomere length change in chronic and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. SJIBTO. 2008 Spring; 5(1):9-15.

23. Ohyashiki K, Iwama H, Tauchi T, Shimamoto T, Hayashi S, Ando K, et al. Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2000 Dec;40(1-2):49-56.

24. Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, et al. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. Blood. 2000 Mar 15;95(6):1883-90.

25. Kimura A, Ohmichi M, Kawagoe J, Kyo S, Mabuchi S, Takahashi T, et al. Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. Oncogene. 2004 Jun 3;23(26):4505-15.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 2:09 IRST on Tuesday October 17th 2017