

ارزیابی بیان یک بیومارکر سرطانی در گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز در مقایسه با افراد سالم

نیلوفر شعاعی نائینی^۱، فرزانه حسینی^۱، عبدالرضا محمدنیا^{۲*}، نغمه بهرامی^{۳،۴}

- (۱) گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- (۲) مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- (۳) گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- (۴) مرکز تحقیقات جراحی فک و صورت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده:

سارکوئیدوز یک بیماری با علت ناشناخته است که در آن التهاب در گره‌های لنفاوی، ریه‌ها، کبد، چشم‌ها (شایعترین آن یووئیت قدامی)، پوست و دیگر بافت‌ها رخ می‌دهد. این مطالعه به بررسی بیان ژن بیومارکر سرطانی CK19 در گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و مقایسه آن با افراد سالم به منظور یافتن ارتباط آن با سرطان ریه می‌پردازد. ابتدا ۴۰ نمونه بافت از گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل تهیه شدند. استخراج RNA از گره‌های لنفاوی انجام شد و سپس Real-time PCR برای مارکر سرطانی انجام شد. بيو مارکر CK19 در نمونه‌های لنف نود بیماران سارکوئیدوزی در ۲۲ نفر از ۴۰ نفر مثبت گردید. در گروه بافت سالم این میزان ۷ نفر از ۴۰ نفر بود. سارکوئیدوز یک بیماری نادر با علت ناشناخته است. امروزه با افزایش افراد دارای ضعف سیستم ایمنی و مشکل بودن افتراق آن از سایر بیماری‌ها، پیشنهاد می‌شود برای بیماران آزمایشات مناسب برای تشخیص و درمان بهتر انجام شود. **واژگان کلیدی:** سارکوئیدوز، گره‌های لنفاوی، بافت، میکروبی، PCR

* نویسنندگان مسئول:

عبدالرضا محمدنیا، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی mohamadnia.ar@gmail.com

مقدمه:

سارکوئیدوزیس^۱ یک بیماری مزمن سیستمیک با منشا ناشناخته و پیش‌آگهی نامشخص است که بیشتر جوانان را تحت تاثیر قرار میدهد و اغلب با لنفادنوپاتی دو طرفه ناف، ارتشاح‌های ریوی و ضایعات چشمی و پوستی تظاهر می‌کند [۱].

در بیماری سارکوئیدوز توده‌ای از بافت غیرطبیعی گرانولوما^۲ در اندام‌های بدن شکل می‌گیرد. این گرانولوماها در واقع خوشه‌هایی متشکل از سلول‌های ایمنی هستند و در برخی مبتلایان از بین نمی‌روند و در نتیجه موجب التهاب آن می‌شوند. گرانولومای سارکوئیدوز با توده‌های ساختاری متشکل از یک مجموعه متمرکز از ماکروفاژها و مشتقات آن‌ها و سلول‌های اپیتلیالی و سلول‌های غول‌پیکر^۳ توسط سلول‌های T احاطه شده سازماندهی می‌شوند [۲، ۳].

با اینکه در اغلب اوقات تشخیص بیماری با توجه به علائم آن آسان است، اما به دلیل وجود سایر بیماری‌ها با علائم شبیه سارکوئیدوز، گاهی تشخیص این بیماری مشکل است. در این گونه موارد، انجام آزمایش‌های اختصاصی از جمله بررسی سطح آنزیم تبدیل آنژیوتانسین^۴ (ACE) و آدنوزین د آمیناز^۵ (ADA) و IgE تام و همچنین سطح لنفوسیت‌ها در مایعات شستشوی برونکوالوئولار^۶ (BAL) اهمیت دارد و تا امروز برای ارزیابی و تشخیص سارکوئیدوز استفاده شده است [۴].

شناخت مارکرهای زیستی، درمان‌های مولکولی هدفمند را امکان‌پذیر کرده‌اند و الگوی جدیدی از درمان شخصی‌سازی شده را ایجاد کرده و همچنین منجر به توسعه سریع داروهای جدید برای درمان سرطان ریه شده است [۴].

بیومارکرها مواد موجود در خون، ادرار و یا در برخی از بافت‌های بدن هستند که می‌توانند در موارد ابتلا به انواع بیماری‌ها مثل سرطان افزایش یابند [۵].

سیتوکراتین^۷ ۱۹، پروتئین ۶۵ کیلودالتونی است که به میزان بسیار کم در سلول‌های اپیتلیال شاخه برونش و به فراوانی در سلول‌های کارسینوما تولید می‌گردد [۶]. در انواع کارسینوما، تغییرات در بیان سیتوکراتین‌ها مانند افزایش رونویسی از این ژن ممکن است در زمان پیشرفت تومور اتفاق بیافتد و شناسایی این مارکر ممکن است بتواند به تشخیص به موقع بیماری کمک نماید [۷، ۸]. در تحقیق حاضر بررسی بیان CK19 mRNA در گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز در مقایسه با افراد سالم انجام شده است.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع مورد - شاهد می‌باشد که در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در بیمارستان دکتر مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق انجام گرفت. طی این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه بافت از گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل (از گره‌های لنفاوی بیماران غیر از سارکوئیدوز و غیر عفونی) با نظر پزشک متخصص ریه جمع‌آوری گردید و سپس استخراج RNA صورت پذیرفت. بیماران با داشتن علائم مشابه از مطالعه حذف گردیدند. نمونه‌های بیماران و افراد سالم در این بررسی در گروه‌های سنی یکسانی در نظر گرفته شدند. همچنین رضایتنامه کتبی از بیماران اخذ شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام آزمایش

Real-time PCR

مرحله استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج (Cinna pure, Cat no. PR891620) انجام شد و ارزیابی غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجش گردید.

به منظور سنتز cDNA از Viva 2-steps RT-PCR Kit (Cat no. RTPL12) استفاده شد.

پرایمرهای اختصاصی مارکر به کمک نرم‌افزار AlleleID6 طراحی و جهت ساخت سفارش داده شد. با توجه به پارامترهای فیزیکی - شیمیایی (مانند طول پرایمر و PCR-product و melting temperature آنها و نیز مولفه شیمیایی ساختار پرایمر) طراحی پرایمر

¹ Sarcoidosis

² Granuloma

³ Giant cells

⁴ Angiotensin-converting enzyme

⁵ Adenosine deaminase

⁶ Bronchoalveolar lavage

⁷ Cytokeratin 19

جدول ۱ - مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-time RT-PCR

پارامترها	CK19	18s rRNA
آغازگر F	TCCGAACCAAGTTTGAGAC	GTAACCCGTTGAACCCCAT
طول پرایمر	۱۹	۲۰
آغازگر R	AATCCACCTCCACACTGA	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
طول پرایمر	۱۸	۲۰

انجام گرفت. پرایمرهای ژن رفرانس نیز از توالی‌هایی که قبلاً مورد استفاده قرار گرفته بودند انتخاب گردید. انجام واکنش Real-time RT-PCR با استفاده از HotTaq EvaGreen qPCR Mix انجام گردید. شرایط دمایی و زمانی به ترتیب دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۶ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۲۵ ثانیه (برای ۳۵ سیکل) و تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

یافته‌ها:

در این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه بافت از گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. گروه‌ها با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی مقایسه شدند که تفاوت معناداری را نشان نداد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور سن در گروه‌های مورد مطالعه اشکالی ایجاد نمی‌کند. مارکر Ck19mRNA در نمونه‌های لنف نود بیماران سارکوئیدوزی در ۲۲ نفر از ۴۰ نفر مثبت گردید. در گروه بافت سالم کناره‌ها، این میزان ۷ نفر از ۴۰ نفر بود. مقایسه آماری میزان مثبت شدن این مارکر بیانگر تفاوت آماری معنادار بین دو گروه بود ($P\text{-value} < 0.001$). جهت محاسبه تفاوت بیان بیومارکر مورد نظر، ابتدا Ct هر نمونه تعیین گردید. میزان تفاوت بیان بیومارکر بین نمونه آزمایش در مقابل کنترل اندازه‌گیری شد، این کار با روش $\Delta\Delta Ct$ بین دو گروه بیمار و سالم صورت گرفت. پس از انجام محاسبات نشان داده شد که میزان بیان این مارکر در افراد بیمار ۱/۵۸ برابر افراد سالم است.

بحث:

سارکوئیدوز یک بیماری التهابی چند سیستمی است که با تجمع گرانولوم‌های غیر پنییری در هر ارگانی مشخص

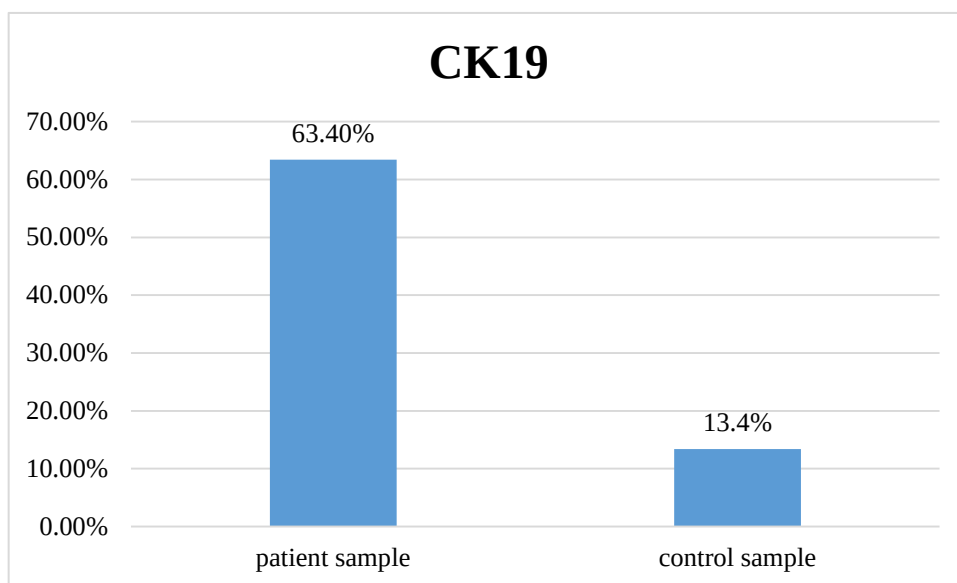
می‌شود. سن بروز سارکوئیدوز در کشور ایران زیر ۷۱ سال با پیک سنی بین ۳۸ تا ۴۱ سال و در زنان شایع‌تر است. در بعضی منابع افزایش بروز بیماری در دسته دوم سنی در حدود ۱۱ سالگی نیز گزارش شده است. موارد زیادی از بیماری ممکن است هیچ‌گاه بیماری بالینی را نشان ندهند و خودبخود کنترل شوند. در مطالعه ما تعداد ۴۰ نمونه بافت از گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و ۴۰ نمونه کنترل مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

با وجود پژوهش‌های گسترده بر روی بیومارکرها، هنوز مارکر واحدی قابلیت استفاده بالینی جهت تشخیص زودرس، بررسی متاستاز، تعیین پیش‌آگهی و یا پاسخ به درمان که حساسیت و اختصاصیت بالایی داشته باشد یافت نشده است [۸].

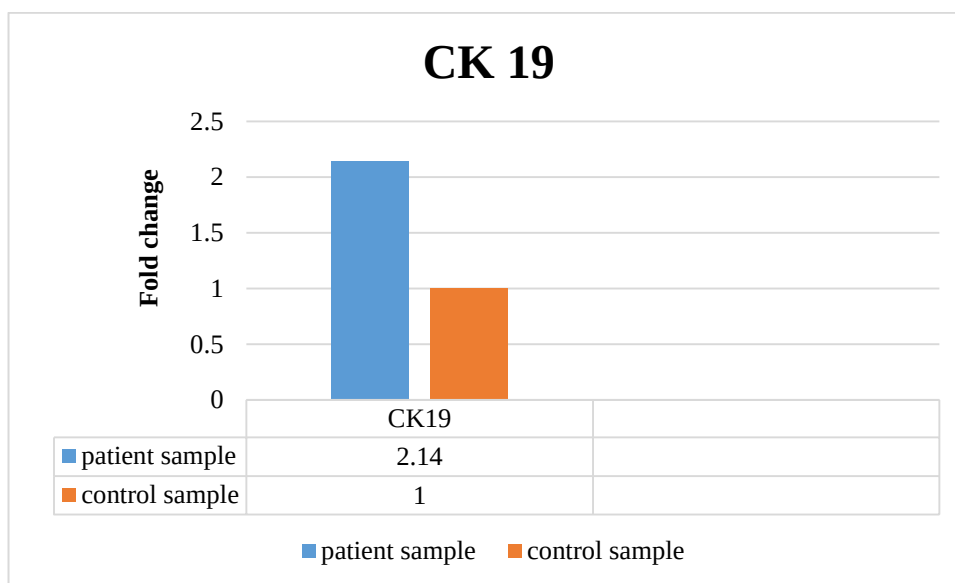
در مطالعه Pastré و همکاران در سال ۲۰۲۱ در اتریش، گرانولوماتوز سیستمیک سارکوئیدوز در رابطه با سرطان ریه وجود داشته است. ۳۸ بیمار با سارکوئیدوز اثبات شده با بیوپسی پس از تشخیص، بدخیمی هم داشته‌اند. همه بیماران درگیری قفسه سینه را نشان دادند. مکان‌های خارج قفسه سینه هم در آنها مشاهده شد. ۳۲ درصد از افراد سارکوئیدوز بدون علامت بودند [۹].

در یک مطالعه مروری توسط Spiekermann در سال ۲۰۱۷ گفته شد که سارکوئیدوز یک بیماری مزمن و التهابی است که اندام‌های مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهد و با گرانولوم‌های اپیتلوئیدی مشخص می‌شود. این فرایند التهابی سیستمیک با افزایش خطر ابتلا به سرطان مرتبط است [۱۰]. در مطالعه انجام شده نیز مارکر سرطانی نشان داده شده است.

چندین مورد سارکوئیدوز نیز گزارش شده که پیشرفت تومور متاستاتیک هم داشته‌اند و در یافته‌های



نمودار ۱ - میزان مثبت شدن مارکر CK19mRNA در نمونه‌های بیماران و گروه کنترل



تصویر ۴-۴ - تفاوت بیان CK19mRNA در نمونه‌های بیماران و گروه کنترل

به طور کلی سارکوئیدوز پتانسیل ایجاد متاستاز را دارد زیرا شامل زیرمجموعه‌های سلولی تقویت کننده و تنظیم کننده سیستم ایمنی است [۱۱]. در مطالعه حاضر نیز بیان ژن CK19 مورد بررسی قرار گرفت. این مارکر در مطالعات متعددی در سرطان ریه

رادیولوژیکی تاکنون گزارش شده‌اند. با این حال، مواردی نیز وجود دارد که همزیستی سارکوئیدوز و متاستاز را ارائه کرده‌اند که باعث ایجاد معضل تشخیصی و درمانی شده است [۱۰] که با مطالعه حاضر هم‌راستا می باشد.

- 9) Pastré J, Bouvry D, Juvin K, et al. Sarcoidosis-like cancer-associated granulomatosis: characteristics and a case-control comparison with sarcoidosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(9):1988.
- 10) Spiekermann C, Kuhlencord M, Huss S, Rudack C, Weiss D. Coexistence of sarcoidosis and metastatic lesions: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Oncology Letters*. 2017;14(6):7643-7652.
- 11) Makis W, Palayew M, Rush C, Probst S. Disseminated multi-system sarcoidosis mimicking metastases on 18 F-FDG PET/CT. *Molecular Imaging and Radionuclide Therapy*. 2018;27(2):91.
- 12) Shao M-M, Chan SK, Alex M, et al. Keratin expression in breast cancers. *Virchows Archiv*. 2012;461(3):313-322.

افزایش بیان نسبت به افراد سالم را نشان داده است [۱۲].

در مطالعه اخیر نیز افزایش بیان CK19mRNA در گره‌های لنفاوی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز نسبت به افراد سالم نشان داده شد. بنابراین می‌توان چنین گفت که شاید بیماران مبتلا به سارکوئیدوز از نظر ژنتیکی مستعد بیان ژن‌های سرطانی باشند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که در گروه‌های بزرگتری، تعداد مارکرهای سرطانی بیشتری بررسی گردند تا نتایج مفیدتری برای پیشگیری و درمان زودتر این گونه بیماران به دست آید.

منابع:

- 1) Hunninghake G, Costabel U, Ando M, et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American thoracic society/European respiratory society/world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders. *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases: official journal of WASOG*. 1999;16(2):149-173.
- 2) Cozier YC. Assessing the worldwide epidemiology of sarcoidosis: challenges and future directions. *European Respiratory Journal*. 2016;48(6):1545-1548.
- 3) Iannuzzi MC, Fontana JR. Sarcoidosis: clinical presentation, immunopathogenesis, and therapeutics. *JAMA*. 2011;305(4):391-399.
- 4) Planck A, Eklund A, Grunewald J. Markers of activity in clinically recovered human leukocyte antigen-DR17-positive sarcoidosis patients. *European Respiratory Journal*. 2003;21(1):52-57.
- 5) Osman N, O'Leary N, Mulcahy E, et al. Correlation of serum CA125 with stage, grade and survival of patients with epithelial ovarian cancer at a single centre. *Irish Medical Journal*. 2008;101(8):245-247.
- 6) Buccheri G, Ferrigno D. Cytokeratin-derived markers of lung cancer. Expert review of molecular diagnostics. 2001;1(3):315-322.
- 7) Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, et al. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochimica Polonica*. 2004;51(3):747-755.
- 8) Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. *Annals of Oncology*. 2001;12(1):39-46.

The Expression Study of a Cancer Biomarker in the Lymph Nodes of Patients with Sarcoidosis, Compared to Healthy Individuals

Nilofar Shoaie Naeini¹, Farzaneh Hosseini¹, Abdolreza Mohamadnia^{2*}, Naghmeh Bahrami^{3,4}

- 1) Department of Microbiology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 2) Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3) Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4) Craniomaxillofacial Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract:

Sarcoidosis is a disease of unknown cause in which inflammation occurs in the lymph nodes, lungs, liver, eyes (most commonly anterior uveitis), skin, and other tissues. In this study, the gene expression of CK19 cancer biomarker gene in lymph nodes of patients with sarcoidosis was studied and compared with healthy individuals to find any association between sarcoidosis and lung cancer.

Forty lymph nodes tissue samples of patients with sarcoidosis and also 40 lymph node of healthy persons (control samples) were obtained. Following of the lymph nodes RNA pool extraction and their cDNA synthesis, the real-time PCR was performed to investigate cancer marker.

The CK19 mRNA marker was positive in lymph node samples of 22 of 40 sarcoidosis patients. In the healthy tissue group, this rate was 7 out of 40 people.

Sarcoidosis is a rare disease of unknown cause. Nowadays, with the increase of people with weak immune system and the difficulty in its differentiation from other diseases, it is recommended that patients undergo appropriate tests for better diagnosis and treatment.

Keywords: Lymph nodes, Tissues, Sarcoidosis, Microorganisms, PCR

* Corresponding Authors:

Abdolreza Mohamadnia, Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: mohamadnia.ar@gmail.com