

## The Effect of Mercaptopurine on the DNMT I Gene in Children with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia

Kolan Rahmani<sup>1</sup>, Fatemeh Pourrajab<sup>2</sup>, Seyedhossein Hekmatimoghaddam<sup>3,4\*</sup>,  
Ali Dehghani Firoozabadi<sup>5</sup>, Tahereh Ahmadi Afzadi<sup>1</sup>

- 1- M.Sc., Department of Clinical Biochemistry, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
- 3- Associate Professor, Cardiovascular Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
- 5- Ph.D. Candidate, Cardiovascular Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran

*\*Corresponding Address: Postal Code: 8916188635, Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Emam Reza Complex, Daneshjoo Blvd, Yazd, Iran  
Email: shhekmati2002@yahoo.com*

**Received: 09/Mar/2017, Accepted: 30/May/2017**

### Abstract

**Objective:** Considering the high incidence of acute lymphoblastic leukemia (ALL), it is necessary to research this illness and determine genetic markers associated with it. The role of DNMT I gene expression during treatment with mercaptopurine drugs in children with B-cell ALL (B-ALL) is important because its changes reflect the effectiveness or ineffectiveness of the drugs. We have investigated the effect of mercaptopurine drugs on DNMT I expression in children with B-ALL.

**Methods:** This analytical study assessed 8 B-ALL children who referred to Tehran Children's Medical Center and 10 healthy children referred to the Yazd Central Laboratory by convenience selection in 2016. Blood samples were obtained before and after treatment, and extraction of total RNA from each sample was performed for real-time qPCR of the target gene (DNMT I). Simultaneously, we evaluated GAPDH, a housekeeping gene. Data from gene expressions were compared by the paired t-test, using SPSS-16 software.

**Results:** DNMT I gene expression was significantly decreased after mercaptopurine administration in children with B-ALL ( $P < 0.02$ ).

**Conclusion:** Our findings suggest that the mercaptopurine drug may affect DNMT I gene regulation. This epigenetic effect may explain the mechanism of drug action, possibly serve as a diagnostic factor, and a means of better monitoring for patients with ALL.

**Keywords:** B-cell acute lymphoblastic leukemia, Mercaptopurine, DNMTI, Gene regulation

# بررسی اثر داروی مرکاپتوپورین بر بیان ژن DNMT I در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B

کولان رحمانی<sup>۱</sup>، فاطمه پور رجب<sup>۲</sup>، سید حسین حکمتی مقدم<sup>۳\*</sup>، علی دهقانی فیروزآبادی<sup>۴</sup>، طاهره احمدی افزادی<sup>۵</sup>

- ۱- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۲- استادیار، گروه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۴- دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، یزد، کدپستی: ۸۹۱۶۱۸۸۶۳۵، بلوار دانشجو، مجتمع امام رضا، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی  
Email: Shhekmati2002@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۱۸

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۳/۰۹

## چکیده

**هدف:** با توجه به بروز بالای لوسمی لنفوبلاستیک حاد، امروزه اهمیت پژوهش در زمینه این بیماری و یافتن شاخصه‌های ژنتیکی مرتبط با آن بسیار مورد توجه است. نقش بیان ژن *DNMT I* طی دریافت داروها در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B از اهمیت به‌سزایی برخوردار است چرا که کاهش بیان این ژن در این بیماران می‌تواند بیان‌گر اثربخشی داروهای درمانی باشد. بنابراین در این مطالعه سعی شده است اثر داروی مرکاپتوپورین بر بیان ژن *DNMT I* در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B بررسی شود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تحلیلی در سال ۱۳۹۵ طی نمونه‌گیری در دسترس (Convenience) روی ۸ کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B در مرکز طبی کودکان تهران در دو مرحله قبل و پس از دریافت دارو، و ۱۰ کودک سالم مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی یزد انجام شد. پس از استخراج RNA کلی از هر ۸ نمونه، با استفاده از روش RT-qPCR، تکثیر ژن هدف انجام گرفت. به‌صورت همزمان یک ژن *housekeeping* نیز به‌عنوان کنترل داخلی بررسی شد (*GAPDH*). سپس داده‌های بیان ژن توسط آزمون Paired t-test در نرم‌افزار SPSS مقایسه شد.

**نتایج:** بیان ژن *DNMT I* در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B تحت تأثیر داروی مرکاپتوپورین به‌طور معنی‌داری نسبت به قبل از دریافت دارو در سطح ضریب اطمینان ۹۵ درصد پایین‌تر بود ( $P=0/02$ ).  
**نتیجه‌گیری:** یافته‌های بررسی حاضر پیشنهاد می‌کند که احتمالاً داروی مرکاپتوپورین اثر مهمی را بر تنظیم این ژن ایجاد می‌کند.

**کلید واژگان:** لوسمی لنفوبلاستیک حاد، مرکاپتوپورین، *DNMT I*، تنظیم ژن

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، صفحات: ۱۷-۲۸

لوسمی (Leukemia) گروهی از انواع سرطان است که از مغز استخوان شروع می‌شود و باعث شکل‌گیری تعداد زیادی گلبول سفید غیرطبیعی می‌شود. بیماری باعث توقف تولید سلول‌های سفید خون طبیعی می‌شود و توانایی فرد را در مقابله با بیماری‌ها از بین می‌برد. سلول‌های لوسمی همچنین بر تولید سایر انواع سلول‌های خونی که توسط مغز استخوان ساخته می‌شود از جمله گویچه‌های قرمز خون که اکسیژن را به بافت‌های بدن می‌رسانند و پلاکت‌های خونی که از لخته شدن خون جلوگیری می‌کنند، اثر منفی می‌گذارند. بنابراین در انواع لوسمی ضعف ایمنی، کم‌خونی و اختلال انعقاد خون مشاهده می‌شود. این دسته از سرطان‌ها بر اساس سرعت پیشرفت به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند [۱، ۲].

لوسمی حاد (Acute leukemia) شایع‌ترین سرطان اطفال است و تقریباً ۳۰ درصد از بدخیمی‌های آن‌ها را شامل می‌شود. از این میان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)؛ (Acute lymphoblastic leukemia) حدود ۷۵ درصد موارد را به خود اختصاص می‌دهد که با توجه به بروز بالای این لوسمی هنوز علت بروز بیماری ALL ناشناخته است. با بررسی‌ها روی افراد مبتلا و اطلاعات موجود در پیشرفت بیماری، حساسیت‌های ژنتیکی و محرک‌های محیطی جزو دو دسته از مهم‌ترین عوامل هستند [۳، ۴].

در میان عوامل ژنتیکی انتظار می‌رود که فعالیت سه عضو خانواده DNA متیل ترانسفرازها (DNA methyltransferase: DNMTs) (DNMT 3A, DNMT 3B و DNMT 1) در تنظیم بیان ژن‌های محرک تکثیر سلولی و ژن‌های سرکوب‌گر تکثیر سلولی نقش داشته باشند. افزایش یا کاهش بیان این ژن‌ها احتمالاً بتواند در ایجاد لوسمی یا پیشرفت بیماری نقش داشته باشد زیرا که سبب روشن یا خاموش ماندن CDKها (Cyclin-dependent kinases) یا سرکوب‌گر تومور Rb (Tumor suppressor) یا مولکول‌های مسیر پیام‌رسانی

## بیان ژن DNMT I در لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B

سلولی می‌شود که در پیشروی سرطان مؤثرند [۵، ۶]. فعالیت DNMT I بیشتر در پشت چنگال همانندسازی شناخته شده است و در حفظ متیلاسیون DNA تازه ساخته شده نقش دارد؛ درحالی‌که DNMT3a/b بیشتر در ایجاد الگوهای متیلاسیون DNA نقش دارند [۷]. علاوه بر فعالیت متیل ترانسفرازی، DNMTs در ایجاد و بازآرایی (Remodeling) کروماتین نقش دارند و سبب فراخوانی پروتئین‌هایی که در تغییر بیان ژن‌ها و خاموش شدن آن‌ها دخیل است، می‌شوند. به‌طور مثال DNMTs سبب فراخوانی هیستون داستیلازها (Histone deacetylase: HDAs) به نواحی پروموتوری‌شده و مستقیماً با آن‌ها برهمکنش می‌کنند. پروتئین‌های HDAs در خاموش شدن ژن نقش دارند [۵].

در لوسمی‌ها، عوامل رونویسی نامتعارف ناشی از جا به جایی ژن‌ها سبب فراخوانی DNMTs و پروتئین‌های مرتبط با آن‌ها به نواحی پروموتوری ژن‌های ویژه و خاموش شدن آن‌ها می‌شود. از آنجا که متیلاسیون DNA در بالادست استیلاسیون هیستون‌ها قرار داده شده است تصور می‌شود که در خاموش کردن ژن‌ها نسبت به استیلاسون هیستون‌ها دارای قدرت عملکرد بیشتری باشد. پس داروهایی که متیلاسیون را مهار کنند استیلاسیون را هم کاهش می‌دهد اما بالعکس آن نمی‌تواند درست باشد [۸].

تیوپورین‌ها (Thiopurines) که شامل ۶-تیوگوانین (6-thioguanine)، ۶-مرکاپتوپورین (6-mercaptopurine) و آزاتیوپرین (Azathioprine) می‌شوند به‌عنوان داروهای مؤثر در درمان ALL شناخته شده‌اند؛ در صورتی که مکانیسم دقیق تأثیر این داروها به خوبی شناسایی نشده است. طبق برخی از مطالعات این داروها تأثیر اپی‌ژنتیکی دارند، به‌طور مثال ۶-تیوگوانین سبب روشن شدن بیان ژن‌های خاموش‌شده اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطانی می‌شود [۹].

باتوجه به بروز بالای لوسمی رتبه هشتم در بین سرطان‌های ایران (WHO) و به جا گذاشتن بار اجتماعی - اقتصادی فراوان به جامعه و خانواده آن‌ها و همچنین نبود

شستشو (Elution buffer)، RNA استخراج شده و از ستون جداسازی شد.

### غلظت نمونه‌های RNA

نمونه‌های RNA به وسیله دستگاه نانودراپ آنالیز شد. سنجش خلوص RNA استخراج شده با محاسبه نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ صورت گرفت که باید در دامنه ۱/۷ تا ۱/۸ قرار گیرد و مقدار غلظت نهایی مقدار RNA بر حسب نانوگرم/میکرولیتر به دست آمد.

برای بررسی کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده، این نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۵ رقیق شد. سپس ۳ میکرولیتر از هر نمونه RNA با بافر بارگذاری (۶X) مخلوط و داخل چاهک‌های ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد. پس از انجام الکتروفورز کیفیت RNA استخراج شده به وسیله بررسی باندهای ۲۸S و ۱۸S تعیین شد (شکل ۱).

### ساخت cDNA

پس از استخراج RNA، لازم است بلافاصله از روی آن cDNA ساخته شود، زیرا RNA ناپایدار است و پس از مدتی تجزیه می‌شود. از طرفی برای تکثیر قطعه مورد نظر توسط PCR، تنها می‌توان از cDNA استفاده کرد. با استفاده از DNA پلیمر از وابسته به RNA (سیناژن، ایران) که به آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase) نیز معروف است، اولین رشته DNA به صورت تک رشته‌ای از روی RNA تخلیص شده نسخه‌برداری شد. مراحل انجام آزمایش بدین ترتیب بود: یک میکرولیتر آغازگر راندوم هگزامر (Random Hexamer Primer)، یک میکروگرم از RNA استخراج شده و آب DEPC (بسته به حجم RNA) به یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری اضافه و حجم نهایی مرحله اول ۱۳ میکرولیتر تعیین شد. سپس میکروتیوب در میکروسانتریفوژ به مدت ۵-۳ ثانیه اسپین شد و به مدت ۵

درمان کاملاً قطعی این بیماری، امروزه اهمیت پژوهش در زمینه این بیماری و یافتن شاخصه‌های ژنتیکی مرتبط با آن بسیار مورد توجه است. در این بین تغییر در بیان ژن DNMT I با توجه به اینکه اصلی‌ترین متیل ترانسفراز است که گسترش الگوی موجود متیلاسیون DNA را تضمین می‌کند؛ طی دریافت داروهای ALL نوع B (B-cell ALL) از اهمیت به سزایی برخوردار است؛ چرا که کاهش بیان ژن DNMT 1 می‌تواند بیان‌گر پیش‌آگهی اثربخشی داروهای درمانی مربوط باشد. بنابراین در این مطالعه سعی شده است بیان ژن DNMT I طی وقوع ALL نوع B تحت تأثیر داروی مرکاپتوپورین بررسی شود.

### روش بررسی

مطالعه در سال ۱۳۹۵ طی نمونه‌گیری در دسترس روی ۸ کودک (۱۲-۰ سال) مبتلا به بیماری ALL نوع B در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران در دو مرحله (قبل و پس از دریافت دارو داروی مرکاپتوپورین) انجام شد. در ضمن انجام پژوهش و روش نمونه‌گیری براساس موازین کمیته اخلاق پزشکی و نیز موافقت رسمی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی طبق نامه با کد IR.SSU.MEDICIN.REC.1396.100 و بعد از دادن اطلاعات به والدین و نیز خود کودکان و گرفتن موافقت کتبی آن‌ها صورت گرفت.

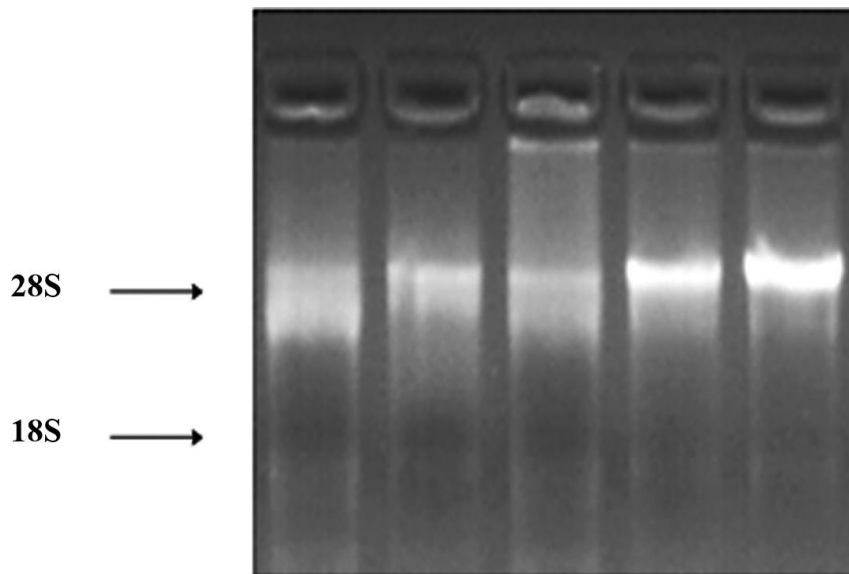
### استخراج RNA تام

استخراج RNA تام از خون بیماران تیمار شده و نیز گروه کنترل به وسیله کیت استخراج RNA شرکت Qiagen (آلمان) و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. به طور خلاصه، با استفاده از بافرهای لیزکننده، سلول‌های خونی را لیز نموده و سپس از ستونی که تمایل اتصال به RNA را دارد، گذر داده شد. در نهایت پس از شستشوی ستون با استفاده از بافر

#### بیان ژن DNMT1 در لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B

سانتی گراد قرار داده شد. بعد نمونه به مدت ۳ تا ۵ ثانیه سانتریفوژ و در کنار یخ قرار داده شد و ۱ میکرولیتر نسخه بردار معکوس به میکروتیوب اضافه شد. بالاخره میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. به دنبال آن میکروتیوب به مدت ۳ تا ۵ ثانیه سانتریفوژ و کنار یخ قرار داده شد. سپس ۴ میکرولیتر بافر RT، و ۲ میکرولیتر dNTP به میکروتیوب اضافه و آنگاه میکروتیوب به مدت ۳ تا ۵ ثانیه سانتریفوژ شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه



شکل ۱ نتایج الکتروفورز نمونه های RNA استخراج شده روی ژل آگارز

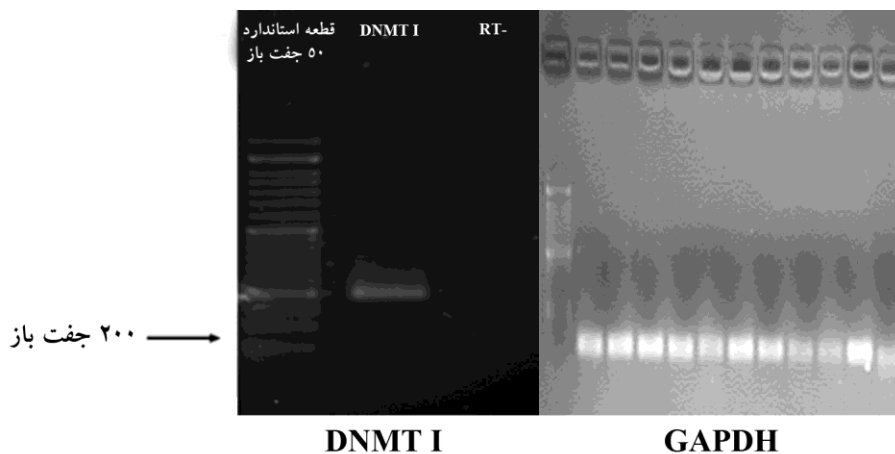
#### تأیید آغازگرها و محصولات

همان طور که در بالا ذکر شد پس از استخراج RNA، ژن هدف و ژن مرجع GAPDH (به عنوان ژن کنترل داخلی) که با روش رونویسی معکوس cDNA آن ها ساخته شده بود تکثیر شدند و الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز انجام شد. مقایسه نتایج الکتروفورز میزان بیان ژن هدف و GAPDH در نمونه های RNA سلول های تیمار شده و قبل از تیمار، نشان می دهد تکثیر ژن هدف و GAPDH با استفاده از RT-PCR به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون آلودگی صورت گرفته است. وجود باند منفرد از ژن GAPDH پس از الکتروفورز محصول تأییدکننده حفظ تمامیت و یکپارچگی

#### طراحی آغازگر

توالی FASTA (Families fast alignment) ژن های مربوط از NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج شد. سپس با استفاده از الگوریتم Nblast قسمت های مشترک از وریانت های متفاوت از یک ژن به دست آورده شد. توالی به دست آمده در نرم افزار آنالین Oligo 7 وارد شد و تنظیمات میزان تکثیر و دما (Tm) و درصد گوانین-سیتوزین (GC) برای هر ژن لحاظ شد. در نهایت آغازگرهای معرفی شده از نظر اختصاصیت و خواص ترمودینامیک به ترتیب در الگوریتم Primer-BLAST و Beacon Designer™ designs چک شدند.

در RNA و در نتیجه ساخته شدن cDNA و در نهایت انجام مناسب واکنش PCR است (شکل ۲).



شکل ۲ تأیید آغازگرهای ساخته شده و محصولات PCR

## بیان ژن DNMT I

برای بررسی بیان ژن هدف DNMT I و ژن کنترل داخلی GAPDH از آغازگر اختصاصی برای هر ژن استفاده شد و طراحی آغازگر صورت گرفت (جدول ۱) و برای اطمینان از یکتا بودن محل اتصال آغازگرها در مورد تمامی آغازگرها با استفاده از نرم افزار BLAST در ژنوم انسان

جستجو انجام شد. از روش (qPCR): real time [با استفاده از سیستم ABI (آمریکا)، رنگ فلورسنت SYBR Green و به کارگیری کنترل منفی]. در نهایت داده های گروه های پیش و پس از تیمار توسط آزمون *t*-test در نرم افزار SPSS 16 مقایسه شد.

جدول ۱ آغازگرها

| نام ژن | شناسه NCBI     | توالی آغازگر 5'→3'                                    | طول محصول PCR (جفت باز) | تعداد چرخه های PCR |
|--------|----------------|-------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| DNMT I | NM_001318731.1 | F: CACCAGGCAAACCACCATCAC<br>R: AGCGGTCTAGCAACTCGTTCTC | ۱۶۸                     | ۳۵                 |
| GAPDH  | NM_001289746.1 | F: GAGCCACATCGCTCAGACAC<br>R: CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG | ۱۵۰                     | ۳۵                 |

## نتایج

در نهایت ۸ کودک از ۱۰ کودک مبتلا به ALL نوع A (میانگین ۴ سال و ۶ ماه) بررسی شدند (از ده کودک اولیه یک

کودک به دلیل فوت و کودک دیگر به دلیل عدم مراجعه مجدد به تهران از مطالعه خارج شدند). ۵۰ درصد از کودکان مذکر و ۵۰ درصد مونث بودند. گروه کنترل شامل ده کودک سالم

## نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن هدف در نمونه‌های مورد مطالعه

به منظور مقایسه میزان بیان ژن هدف در نمونه‌های مورد آزمایش، از روش Relative Quantitative RT-PCR استفاده شد. در این بررسی ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. با قرار دادن بازده PCR [حاصل از قرار دادن شیب در فرمول کارایی (Efficiency)] مربوط به هر آغازگر، امکان مقایسه بیان ژن‌های هدف در نمونه‌های تیمار شده و کنترل فراهم شد. در این مطالعه گروه کنترل (پیش از درمان) به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد و بیان سایر نمونه‌ها نسبت به آن سنجیده شد (نمونه‌های شاهد) (شکل ۳).

## نتایج حاصل از رسم منحنی‌های تکثیر و ذوب

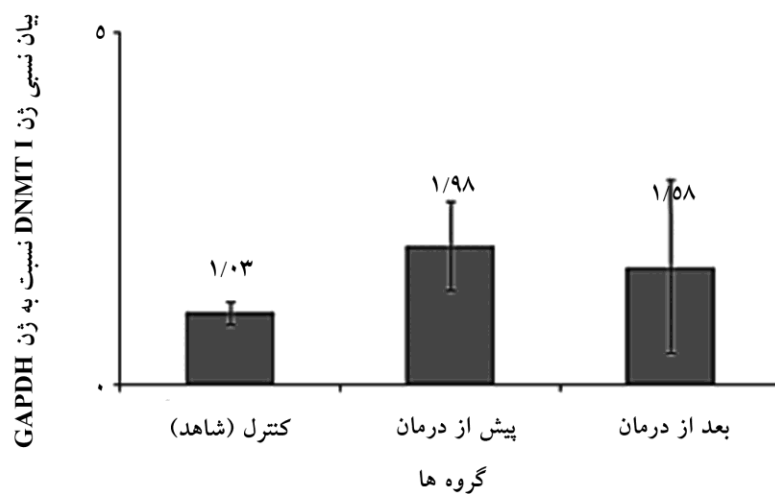
به منظور اطمینان از عدم حضور آغازگر دایمر یا باندهای غیر اختصاصی، منحنی‌های ذوب توسط دستگاه Q-PCR رسم شد (شکل ۴). بر اساس یافته‌های حاصل از این منحنی‌ها، حضور آغازگر دایمر و باندهای غیر اختصاصی رد شد. این نمودار نشان داده است که دمای ذوب  $84/73$  است. همچنین منحنی تکثیر ژن هدف و ژن GAPDH برای استخراج چرخه‌های آستانه بررسی و تحلیل شد (شکل ۵).

به کمک روش تک متغیره (Univariate)، و محاسبه شاخص Shapiro-Wilks (W) مشخص شد که داده‌های Real-time PCR حاصل از این پژوهش دارای توزیع نرمال بودند. بنابراین از روش t-test به منظور مقایسه مقادیر  $\Delta CT$  قبل و بعد از درمان که به ترتیب برابر با  $1/98 \pm 0/08$  و  $1/58 \pm 1/02$  بود استفاده شد و به کمک این آزمون تفاوت معنی‌داری ( $P=0/02$ ) بین میانگین  $\Delta CT$  گروه‌ها مشاهده شد.

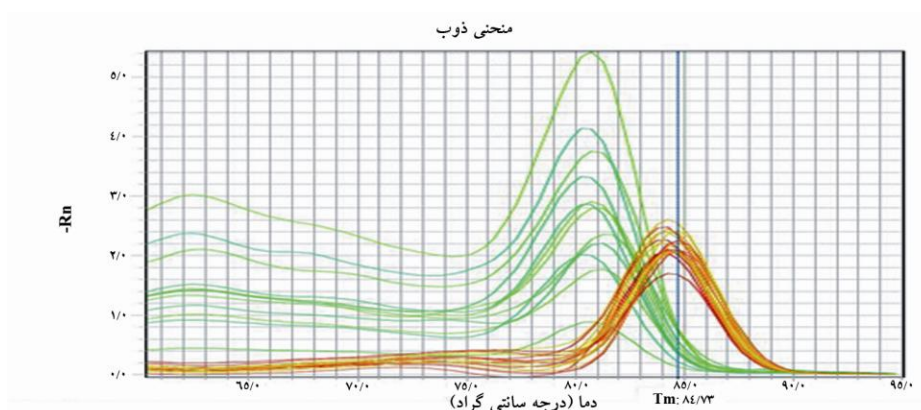
مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی استان یزد بود که از لحاظ هر نوع بدخیمی یا بیماری احتمالی تأثیر گذار بر بیان ژن توسط متخصص سرطان، سالم تشخیص داده شد. ۴۰ درصد مذکر و ۶۰ درصد مونث بودند. از لحاظ سنی میانگین سنی کودکان مبتلا و سالم به ترتیب برابر با  $5/1 \pm 3/41$  و  $8/3 \pm 1/7$  بود که اختلاف میانگین سنی بین دو گروه از لحاظ آمار معنی‌دار نبود ( $P=0/083$ ). همه کودکان در مرحله قبل از دریافت داروی مرکاپتوپورین سه داروی اصلی متوترهکسات (Methotrexate)، وینکریستین (Vincristine) و پردنیزولون (Prednisolone) دریافت می‌کردند که مدت زمان مصرف داروها برای آن‌ها یکسان بود و میزان دریافت داروی مرکاپتوپورین برای هر هشت کودک برابر بود. به منظور تعیین کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده، آن‌ها به نسبت ۱ به ۵ توسط آب عاری از نوکلئاز رقیق و روی ژل الکتروفورز ۲ درصد بارگذاری و الکتروفورز شد. در نمونه‌های انتخابی از هر گروه، باندهای ۲۸S و ۱۸S حضور داشت که نشان‌دهنده عدم تجزیه نسبی RNA تام بود.

## تأیید آغازگرهای سنتز شده و محصولات PCR

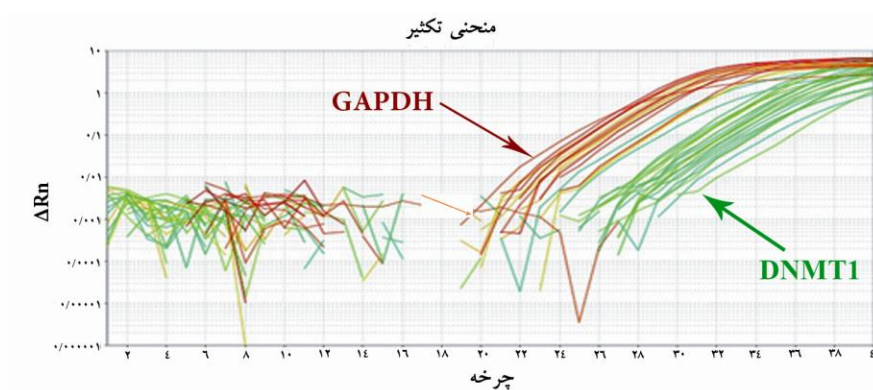
در نمونه‌های تحت بررسی، مقایسه میزان بیان ژن هدف در نمونه‌های تحت تیمار و کنترل صورت پذیرفت. به منظور اطمینان از عدم حضور آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، از کنترل منفی RT استفاده شد. با به کارگیری این روش عدم آلودگی نمونه‌های RNA با DNA ژنومی تأیید شد. وجود باند منفرد از ژن کنترل داخلی (GAPDH) تأیید کننده حفظ تمامیت (Integrity) در RNA و در نتیجه ساخته شدن cDNA و در نهایت انجام واکنش PCR و مشاهده باند پس از الکتروفورز محصول PCR است (شکل ۲).



شکل ۳ نتایج بیان ژن DNMT I در بین کودکان مبتلا و سالم



شکل ۴ منحنی های ذوب بعد از مشتق گیری (dF) ژن های DNMT I و GAPDH



شکل ۵ منحنی تکثیر ژن های DNMT 1 و GAPDH

روشن یا خاموش ماندن CDKها یا سرکوبگر تومور Rb یا مولکولهای مسیر پیامرسانی سلولی می شود که در پیشروی سرطان مؤثرند. در سلولهای سرطانی، ماده ژنتیکی بیشتر با کاهش متیلاسیون و به صورت هایپومتیله است، البته در نقاط خاصی مانند پروموتور ژنهای سرکوبگر تومور اغلب به صورت افزایش متیلاسیون است که همراه با افزایش فعالیت DNMT نیز هست.

در لوسمی ها، عوامل رونویسی نامتعارف ناشی از جا به جایی ژن ها سبب فراخوانی DNMTs و پروتئین های مرتبط با آن ها به نواحی پروموتوری ژن های ویژه و خاموش شدن آن ها می شود [۲]. از آنجا که متیلاسیون DNA در بالادست استیلاسیون هیستون ها قرار داده شده است تصور می شود که در خاموش کردن ژن ها نسبت به استیلاسیون هیستون ها دارای قدرت عملکرد بیشتری باشد.

میزونو (Mizuno) و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که DNMT 1 و DNMT 3B، DNMT 3A هر سه در تکوین و ایجاد AML (Acute myeloid leukemia) و CML (Chronic myeloid leukemia) نقش دارند. آن ها این دخالت را در سلول های منوسیت، لنفوسیت T، نوتروفیل و سلول های طبیعی مغز استخوان این بیماران نشان دادند. به صورت بسیار جالبی ژن DNMT 3B در سلول های مغز استخوان CD34+ بیان افزایش یافته دارد ولی در سلول های تمایز یافته کاهش بیان داشت. آن ها نشان دادند که در افراد AML بیشترین بیان، متعلق به DNMT 3B است تا دیگر متیل ترانسفرازها. در مورد CML نیز این چنین بیان کردند که در فاز مزمن، تغییر معنی داری در بیان این سه متیل ترانسفراز وجود ندارد ولی در فاز حاد افزایش بیان دارند. میزونو و همکاران این چنین نتیجه گیری کردند که انواع DNMTs در لوسمی ها، بسته به نوع بیماری و مرحله آن افزایش بیان دارد. بنابراین افزایش بیان این آنزیم ها می تواند در بیماری زایی لوسمی با افزایش متیلاسیون نقاط خاص ژنوم مرتبط باشد [۱۶].

سرطان به عنوان یک بیماری تهدیدکننده حیات بشر همواره توجه محققین را برای یافتن راه هایی برای تشخیص زود هنگام یا یافتن راه های جدید درمانی به خود جلب کرده است. مطالعه تغییرات ایجاد شده روی ماده ژنتیکی سلول ها از طریق جهش یا تغییرات اپی ژنتیکی و عوامل تأثیرگذار روی آن ها یک جنبه مهم و پویا در مطالعات مولکولی سرطان است. لوسمی حاد شایع ترین سرطان اطفال بوده و تقریباً ۳۰ درصد از بدخیمی های آن ها را شامل می شود. از این میان ALL حدود ۷۵ درصد موارد را به خود اختصاص می دهد. از این رو، در این مطالعه با روش تجربی مداخله ای از نوع قبل و بعد، در کودکان مبتلا به سرطان ALL از نوع B، تغییرات بیان ژن آنزیم DNMT1 در کودکان مبتلا به ALL نوع B قبل از درمان و بعد از درمان با مرکاپتوپورین بررسی و ارزیابی شد.

از دیرباز تغییرات سلولی در سرطان ها را به تغییرات ژنتیکی در ژن های مشخص نسبت می دادند هر چند اکنون تغییرات اپی ژنتیکی نیز مد نظر قرار گرفته است. تغییرات ژنتیکی شامل جهش های نقطه ای، جا به جایی ها و حذف ژنی است در حالی که تغییرات اپی ژنتیکی می توانند کنترل های زمانی و مکانی بر بیان ژن داشته باشد. از جمله تغییرات اپی ژنتیکی می توان به متیلاسیون در نوکلئوتیدهای CpG اشاره کرد که متیلاسیون آن ها بیشترین فرم تغییرات اپی ژنتیک مطالعه شده در پستانداران است [۱۴]. الگوهای طبیعی متیلاسیون اختصاصی بافت در دوران تکوین جنین رخ می دهد که ناشی از دمتیلاسیون و متیلاسیون de novo است. الگوهای متیلاسیون ایجاد شده در چرخه های سلولی بعدی به وسیله آنزیم های DNMT حفظ می شود [۱۵]. انتظار می رود که فعالیت DNMT ها در تنظیم بیان ژن های محرک تکثیر سلولی و ژن های سرکوبگر تکثیر سلولی نقش داشته باشد. افزایش یا کاهش بیان این آنزیم ها احتمالاً بتواند در ایجاد لوسمی یا پیشرفت بیماری مؤثر باشد؛ زیرا که سبب

در یک مطالعه دیگر لیو (Liu) و همکاران نشان دادند که گیرنده پروژسترون (Progesterone) در سلول‌های لوسمی، متیله بوده و بیان چندانی از آن صورت نمی‌گیرد. همچنین نشان دادند که بین میزان متیلاسیون این ژن و بیان DNMT I ارتباط و همراهی معنی‌دار وجود دارد که در نمونه بیماران نیز تأیید شد. مطالعه آن‌ها پیشنهاد می‌کند که هایپرمتیلاسیون جزایر CpG موجود در پروموتور ژن گیرنده پروژسترون می‌تواند یک نشان‌گر زیستی مولکولی باشد [۱۷].

تیوپورین‌ها که شامل ۶-تیوگوانین، ۶-مرکاپتوپورین و آزاتیوپورین می‌شوند به‌عنوان داروهای مؤثر در درمان ALL شناخته شده‌اند. به هر حال مکانیسم دقیق تأثیر این داروها به خوبی شناسایی نشده است. طبق برخی از مطالعات این داروها تأثیر اپی‌ژنتیکی دارد؛ به‌طور مثال ۶-تیوگوانین سبب روشن شدن بیان ژن‌های خاموش‌شده اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطانی می‌شود [۶]. همچنین گزارش می‌شود هنگامی که سلول با داروهای تخریب‌کننده DNA مواجه می‌شود در اولین فرصت بیان DNMT1 را افزایش می‌دهد [۹].

از طرفی مسیر پیام‌رسانی Jak/Stat3 دخیل در تکثیر سلول‌های مغز استخوان، با فعالیت این آنزیم‌ها به‌ویژه DNMT I می‌تواند ارتباط داشته باشد [۱۰]. به هر حال مکانیسم عمل آن‌ها شناسایی نشده است. انتظار می‌رود که سلول‌ها با استفاده از تغییر در بیان DNMT‌ها طی رشد و نمو بتوانند وارد مرحله تمایز شوند. متنها نوع و میزان این تغییرات در هر یک از این آنزیم‌ها در ابتدای تمایز با مرحله آخر تمایز هنوز مشخص نشده است و انتظار می‌رود که در سرطان‌های مختلف و نیز طی درمان‌های متفاوت کاملاً با هم فرق داشته باشند [۱۰، ۱۱].

در یک مطالعه هم گروهی بزرگ مربوط به بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده (Inflammatory Bowel Disease) که تیوپورین برای درمان بیماری خود دریافت کرده بودند، مشخص شد که خطر افزایش یافته‌ای برای ابتلا به AML و نشانگان‌های میلودیسپلاستیک (Myelodysplastic syndrome)

دارند، البته در این بین مواجه قبلی نیز بسیار سرنوشت‌ساز است [۱۸].

لازم به ذکر است که ALL فرآیند درمانی طولانی مدت دارد که شامل مرحله القا (یک ماه)، پس از القا (حدود ۶ ماه) و در انتها حفظ و نگهداری درمان (در حدود ۱۸-۳۰ ماه) است. در مرحله سوم از داروهایی مانند ۶-مرکاپتوپورین و متوترکسات داده می‌شود که غلظت تجویزی ۶-مرکاپتوپورین در این مرحله بسیار مهم است. ۶-مرکاپتوپورین سوبسترای S-متیلاسیون است که توسط تیو پورین متیل ترانسفراز (Thiopurine S-methyltransferase: TPMT) انجام می‌شود و یکی از عوامل کنترل‌کننده فعالیت این آنزیم، چندشکلی‌های ژنتیکی آن است. بیمارانی که یک SNP (Single nucleotide polymorphism) خاص را در این ژن به ارث برده باشند، حساسیت افزایش یافته‌ای را به سیتوتوکسیسیته و اثر مهارتی دارو بر سلول‌های مغز استخوان نشان خواهند داد [۱۹]. واریانت ارثی NUDT15 یک عامل ژنتیکی تعیین‌کننده تحمل مرکاپتوپورین در بیماران ALL است [۲۰].

منحنی تکثیر ژن‌های DNMT I و GAPDH با استفاده از Real-time PCR نشان می‌دهد که تکثیر به خوبی صورت گرفته است. یافته‌ها نشان داد که سطح بیان ژن DNMT I در بیماران مبتلا به ALL تحت تأثیر داروی مرکاپتوپورین به‌طور معنی‌داری در سطح ضریب اطمینان ۹۵ درصد در مقایسه با افرادی که دارو دریافت نکردند پایین‌تر است ( $p < 0.05$ ). از آنجا که این مطالعه روی هشت کودک مبتلا به ALL و ده کودک سالم انجام شد، تعداد نمونه‌های آن یکی از نقاط ضعف مهم مطالعه است؛ بنابراین در کاربرد نتایج آن باید دقت لازم را انجام داد. اما انجام چنین مطالعه‌ای باتوجه به اینکه تابه‌حال انجام نشده است می‌تواند برای شروع کار مناسب باشد.

## تشکر و قدردانی

محققان حاضر از پرسنل بخش خون شناسی بیمارستان طبیبی کودکان تهران و والدین کودکان، همچنین والدین

## منابع

- [1] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45(3): 321-34.
- [2] Leukemia. (2014, June 13). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. National Institutes of Health, National Cancer Institute (NCI). Retrieved from <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>.
- [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57(1): 43-66.
- [4] Hashemi A, Naini M, Eslami Z, Lotfi MH, Khirandish M, Rafeeyan M. Immunophenotype Children with Acute lymphoblastic leukemia, referred to Yazd hospital. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2010; 5: 56-60. (Persian)
- [5] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363(25): 2424-33.
- [6] Gudas LJ. Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes. *Semin Cell Dev Biol* 2013; 24(10-12): 701-5.
- [7] Foulks JM, Parnell KM, Nix RN, Chau S, Swierczek K, Saunders M, Wright K, Hendrickson TF, Ho KK, McCullar MV, Kanner SB. Epigenetic drug discovery targeting DNA methyltransferases. *J Biomol Screen* 2012; 17(1): 2-17.
- [8] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349(21): 2042-54.
- [9] Yuan B, Zhang J, Wang H, Xiong L, Cai Q, Wang T, Jacobsen S, Pradhan S, Wang Y. 6-Thioguanine reactivates epigenetically silenced genes in acute lymphoblastic leukemia cells by facilitating proteasome-mediated degradation of DNMT1. *Cancer Res* 2011; 71(5): 1904-11.
- [10] Tang Y, Luo Y, Jiang Z, Ma Y, Lin CJ, Kim C, Carter MG, Amano T, Park J, Kish S, Tian XC. Jak/Stat3 signaling promotes somatic cell reprogramming by epigenetic regulation. *Stem Cells* 2012; 30(12): 2645-56.
- [11] Wolfrum LA, Fernandez TM, Mamura M, Fuller WL, Kumar R, Cole DE, Byfield S, Felici A, Flanders KC, Walz TM, Roberts AB, Aplan PD, Balis FM, Letterio JJ. Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351(6): 552-9.
- [12] McFarlin DE, McFarland HF. Multiple

- sclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1982; 307(19): 1183-8.
- [13] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683-747.
- [14] Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7): 687-92.
- [15] Holliday R. DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1990; 326(1235): 329-38.
- [16] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001; 97(5): 1172-9.
- [17] Liu ZJ, Zhang XB, Zhang Y, Yang X. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. *FEBS Lett* 2004; 567(2-3): 327-32.
- [18] Lopez A, Mounier M, Bouvier AM, Carrat F, Maynadie M, Beaugier L, Peyrin-Biroulet L; CESAME Study Group. Increased risk of acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes in patients who received thiopurine treatment for inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12(8): 1324-9.
- [19] Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Komiyama T, Manabe A. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2015; 171(1): 109-15.
- [20] Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, Pei D, Chen Y, Crews KR, Kornegay N, Wong FL, Evans WE, Pui CH, Bhatia S, Relling MV. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2015; 33(11): 1235-42.