بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

بررسی بیان ژن غیر کد کننده HOTAIR در گلبولهای سفید مبتلایان به لوسمی میلوئیدی مزمن

نگارش

مونا آقامحمدحسین تجریشی

استاد راهنما

دکتر امیر آتشی

استاد مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

بهمن ۱۳۹۳

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم مونا آقا محمدحسین تجریشی رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « بررسی بیان ژن غیر کدکننده HOTAIR در گلبولهای سفید مبتلایان به لوسمی میلوئیدی مزمن » در تاریخ ۱۳۹۳/۱۱/۱ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر امیر آتشی	
استاد مشاور	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد ناظر	دکتر سعید آبرون	
استاد ناظر	دکتر سعید شهرابی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید کاویانی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آن‌ها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم‌افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مونا آقا محمد حسین تجریشی** دانشجوی رشته خون شناسی و بانک خون ورودی سال تحصیلی **۱۳۹۱** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان‌نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۳/۱۱/۱۵

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:
ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **خون شناسی و بانک خون** است که در سال **۱۳۹۳** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر امیر آتشی** ، مشاوره **دکتر مسعود سلیمانی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **مونا آقا محمد حسین تجریشی** دانشجوی رشته **خون شناسی و بانک خون** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی مونا تجریشی
تاریخ و امضا ۹۳/۱۱/۱۵

تقدیم به

خانواده‌ی عزیزم

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس بی کران بر پروردگار مهربانم که تحت نام لطیفش لحظه به لحظه مرا حمایت میکند. اینک که با لطف او به مرحله دفاع از پایان نامه رسیدم از ***خانواده ی عزیز و مهربانم*** *که یاران و مشوقان دلسوز همیشگی ام بوده اند، کمال تشکر و قدردانی را بجا آورم.*

از استاد راهنمای خوب و عزیزم ***جناب آقای دکتر امیر آتشی*** *به پاس زحمات، محبت‌ها و حمایت‌های بی دریغشان تشکر کنم و برای ایشان از پروردگارم آرامش، سلامت و موفقیت هرچه بیشتر را خواستارم.*

از استاد مشاور عزیزم ***جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی*** *که همواره از مشاوره های دلسوزانه ایشان بهره برده ام، بسیار سپاس گزارم. همچنین از اساتید محترم* ***جناب آقای دکتر سعید آبرون*** *و* ***جناب آقای دکتر سعید کاویانی*** *که همواره وجودشان باعث دلگرمی‌ام بوده است مراتب سپاس و تشکر را دارم. همچنین از زحمات* ***جناب آقای دکتر بهزاد پوپک*** *و* ***جناب آقای دکتر پرویز فلاح*** *به پاس آموزش‌ها و کمک در تهیه نمونه‌ی بیماران کمال تشکر را دارم.*

در نهایت مراتب تشکر و قدردانی خود را از مدیران، پژوهشگران و کادر مجرب ***مرکز تحقیقات بن یاخته*** *جهت حمایت های مستمر ایشان و فراهم آوردن بستری مناسب برای انجام امور پروژه اعلام می دارم.*

چکیده

RNA های غیر کدکننده ی طویل (lncRNA)، گروهی از RNA غیر کد کننده هستند که امروزه در مقیاس ژنومی گسترده ایی مورد مطالعه قرار گرفته انـد. lncRNAهـا دارای نقش‌هـای بیولـوژیکی متنوعی در زمینه ی بیان ژن، تمایز سلولی و بیماریزایی هستند. مطالعات اخیر بیان lncRNA ها را در بسیاری از سرطان‌ها ازجمله بدخیمی‌های خونی نشان داده‌اند که می‌توانند ابزاری جهـت تشـخیص و پیش‌آگهی بسیاری از بیماری ها و به عنوان یک جایگزین درمانی محسوب شـوند. مطالعـات گذشـته بیان بالای نابهنجار ژن HOTAIR را در سرطان‌های مختلف، ازجمله سـرطانهای سـینه، هپاتوسـلولار، کارسینومای اسکواموس حنجره، کلورکتال، پانکراس و ریه نشان داده‌اند. این تحقیق به بررسـی بیـان RNA غیر کد کننده ی طویل HOTAIR در لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)، که یک اختلال بـدخیم در سلول بنیادی خون‌ساز است، می پردازد.

تهیه بافی کوت خون از ۳۰ فرد مبتلابه CML و ۲۰ فرد سالم انجام شد. بیمـاران انتخـاب شـده هیچگونه سابقه ی گرفتن درمان نداشتند و در همگی آزمون BCR-ABL مثبت بـود. مبنـای انتخـاب افراد سالم در مقایسه از لحاظ سن و جنس با بیماران بودند و همچنین سابقه ابتلا بـه بیمـاری هـای زمینه ای را نداشتند. RNA تام از افراد بیمار و سالم استخراج و سطح بیان ژن HOTAIR با اسـتفاده از تکنیک qRT-PCR سنجیده شد.

با بررسی و مقایسه کمی و کیفی بیان ژن در بین دو گروه بیمار و نرمال مشخص گردید بیان ژن HOTAIR در بیماران مبتلابه CML در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری داشت ($P<0.05$).

یافته‌های ما نشان داد که تغییر در بیان این ژن HOTAIR می‌تواند در بیولوژی لوسمی میلوئیدی مزمن دخالت داشته و همچنین دارای یک عملکرد بالقوه به‌عنوان یک بیومارکر جدید برای تشـخیص، پیش‌آگهی و درمان باشد.

کلیدواژه‌ها: لوسمی میلوئیدی مزمن، LncRNA، HOTAIR،qRT-PCR

فهرست مطالب

۱-مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲-لوسمی میلوئیدی مزمن ۳

۱-۲-۱خصوصیات بالینی ۴

۱-۲-۲خصوصیات آزمایشگاهی ۵

۱-۲-۳-ناهنجاری سیتوژنتیک ۶

۱-۲-۵-ردیابی به‌وسیله روش PCR ۸

۱-۲-۶-سیر بیماری و درمان ۹

۱-۳-RNA های غیر کدکننده ۱۰

۱-۴-RNA های طویل غیر کد کننده ۱۲

۱-۴-۱-انواع lncRNA ۱۴

۱-۴-۲-عملکردlncRNA ۱۴

۱-۴-۳-مکانسیم ها ۱۶

۱-۴-۴-نقش lncRNA ها در تمایز ۱۸

۱-۴-۵-تنظیم خون‌سازی توسط lncRNA ها ۱۸

۱-۴-۶-فنّاوری‌های شناسایی lncRNA ها ۲۲

۱-۴-۷-چالش استفاده از lncRNA ها در درمان بیماری‌ها ۲۳

۱-۵ خانواده‌ی HOX کلاستر ۲۴

۱-۵-۱-HOTAIR (Hox transcript antisense intergenic RNA) ۲۵

۱-۵-۲-HOTAIR و متاستاز ۲۷

۱-۶ اهداف ۲۹

۱-۷ فرضیه ۲۹

۲- مواد و روش‌ها ۳۰
۲-۱-تهیه گروه‌های مورد آزمایش ۳۱
۲-۲-مواد و تجهیزات استفاده‌شده ۳۴
۲-۲-۴-تهیه بافر TAE 50 X مورداستفاده در الکتروفورز ۳۶
۲-۳-کشت سلولی ۳۷
۲-۳-۱-رده‌ی سلولی K562 ..... ۳۷
۲-۳-۲-کشت سلول ۳۸
۲-۳-۳-انجماد و نگهداری سلول‌ها ۳۹
۲-۳-۴-شمارش سلولی ۳۹
۲-۴-تهیه نمونه ۴۰
۲-۴-۱-تهیه نمونه از بیماران مبتلابه لوسمی میلوئیدی مزمن ۴۰
۲-۴-۲-تهیه نمونه از افراد سالم ۴۱
۲-۴-۳-جداسازی لایه بافی کوت ۴۱
۲-۵-بررسی مولکولی بیان ژن HOTAIR ۴۱
۲-۵-۱-استخراج RNA از سلول ۴۱
۲-۵-۱-۱-نگهداری و تعیین کیفیت RNA ی استخراج‌شده ۴۳
۲-۵-۲-واکنش رونویسی معکوس ۴۴
۲-۵-۳-واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) ۴۶
۲-۵-۳-۱-مواد لازم برای انجام PCR ۴۷
۲-۵-۳-۲-انجام PCR جهت بهینه‌سازی شرایط : ۴۸
۲-۵-۴-الکتروفورز محصولPCR ۵۰
۲-۵-۵ واکنش زنجیرهای پلیمراز کمی (Real-time PCR) ۵۱
۲-۵-۶-نرم‌افزارهای مورداستفاده ۵۴

۳- نتایج و یافته‌ها ۵۵
۳-۲-نتایج کشت سلولی ۵۶
۳-۳-نتایج استخراج RNA ۵۷
۳-۳-۱غلظت RNAهای استخراج‌شده و درجه خلوص آن‌ها ۵۷
۳-۴-نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR ۵۸
۳-۵-نتایج quantitative Real Time PCR ژن‌ها ۵۸
۳-۵-۱نتایج حاصل از نمودارهای Melt و Quantitation در بیان ژن HOTAIR ۵۹
۳-۵-۲نتایج حاصل از نمودارهای Melt و Quantitation در بیان ژن β-actin ۶۰
۳-۵-۳جدول نتایج CT نمونه‌ها ۶۲
۳-۵-۴-محاسبه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در این پژوهش ۶۳
۴- بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۶۵
۴-۱-بحث ۶۶
۴-۲ نتیجه‌گیری: ۷۲
۴-۲-پیشنهادها ۷۳
۵-منابع ۷۴
۶-ضمائم ۸۱
۷-چکیده انگلیسی ۸۶

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: lncRNA های دخیل در بدخیمی‌های خونی..... ۲۱

جدول ۱-۲: مطالعات و مقالات انجام گرفته پیرامون ژن HOTAIR..... ۲۸

جدول۲-۱: مشخصات بیماران مبتلابه CML..... ۳۲

جدول۲-۲ :مواد و تجهیزات مورداستفاده در کشت سلولی..... ۳۴

جدول ۲-۳: مواد و تجهیزات مورداستفاده در بررسی‌های مولکولی..... ۳۵

جدول ۲-۴: کیت‌های مورداستفاده..... ۳۶

جدول ۲-۵ : مواد لازم جهت تهیه بافر TEA..... ۳۷

جدول ۲-۶: چرخه دمایی سنتز cDNA..... ۴۶

جدول۲-۷: توالی پرایمرهای رفت‌وبرگشت ژن HOTAIR و ژن بتا اکتین..... ۴۷

جدول۲-۸: مواد لازم جهت PCR..... ۴۹

جدول۲-۹: برنامه داده‌شده به دستگاه ترموسایکلر جهت PCR..... ۴۹

جدول۲-۱۰: مقادیر مواد استفاده شده جهت انجام REAL TIME PCR ۵۳

جدول۲-۱۱: برنامه تغییرات دمایی REAL TIME PCR..... ۵۳

جدول۳-۱: نتایج استخراج RNA در نمونه‌ی افراد مبتلا..... ۵۷

جدول۳-۲: جدول مربوط به بیان ژن HOTAIR در دستگاه rotor gene..... ۶۰

جدول ۳-۳: جدول مربوط به بیان ژن B- actin در دستگاه rotor gene..... ۶۱

جدول ۳-۴: برنامه qRT-PCR در دستگاه rotor gene..... ۶۲

جدول ۳-۵: میانگین CT افراد بیمار و نرمال و CT سل لاین K562..... ۶۲

فهرست نمودارها

نمودار ۲-۱ :. نمودار Quantitation در نرم‌افزارRotor-Gene Q..... ۵۱

نمودار۲-۲: بررسی Melt curve: ۵۲

نمودار۳-۱: Quantitation curveدر بیان ژن HOTAIR ۵۹

نمودار ۳-۲: Melt curve در بیان ژن HOTAIR..... ۵۹

نمودار ۳-۳: Quantitation curve در بیان ژن β-actin..... ۶۰

نمودار ۳-۴: Melt curve در بیان ژن β-actin..... ۶۱

نمودار ۳-۵: مقایسه میانگین بیان ژن HOTAIR در بیماران مبتلا به CML..... ۶۳

نمودار ۳-۶ :مقایسه میانگین بیان ژن HOTAIR در رده سلولی K562 ..... ۶۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: جابجایی کروموزومی (۲۲;۹)t و محصولات آن ۸

شکل۱- ۲: انواع ncRNA ها..... ۱۲

شکل۱ -۳: مکانیسم عملکردی lncRNA ها..... ۱۷

شکل۱-۴: تنظیم هماتوپوئز توسط LncRNA ها..... ۲۰

شکل۱-۵: جایگاه کروموزومی ژن HOTAIR..... ۲۵

شکل۱-۶: اصلاح ساختار کروماتین توسط ژن HOTAIR..... ۲۶

شکل ۲-۱: خصوصیات رده سلولی K562..... ۳۸

شکل۳-۱: مرفولوژی سلول‌های غیر چسبنده‌ی K562 ..... ۵۶

شکل۳-۲: بیان ژن HOAIR در رده‌ی سلولی K562..... ۵۸

شکل۳-۳: بیان ژن HOTAIR در نمونه‌ی بیماران مبتلابهCML ۵۸

شکل ۴-۱: فعال شدن مسیر PI3K/AKT/MTOR..... ۶۷

شکل ۴-۲: تأثیر HOTAIR بر PTEN..... ۷۰

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

دیدگاه رایج و متعارف از تنظیم بیان ژن پیرامون ژن‌های کد کننده پروتئین از طریق مسیر Central dogma متمرکز بود. حال‌آنکه با کشف هزاران RNA غیر کد کننده، به‌طورقطع دیدگاه محققین را ازنظر پیچیدگی‌های ژنوم پستانداران کاملاً تغییر داد. همچنین با توجه نقش بیولوژیکی مهم این RNAهای غیرکد کننده نظیر، تنظیم بیان ژن در مرحله رونویسی[۱] و پس از رونویسی[۲]، دخالت در اپی ژنتیک و حضور در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها، محققین را بر آن داشت تا مطالعات گسترده ایی در مورد فهم نقش و عملکرد این RNAها جدید انجام دهند. تا در آینده‌ی نزدیک به‌عنوان ابزاری جهت تشخیص و پیش‌آگهی بسیاری از بیماری‌ها و جایگزین درمان باشد.

lncRNA ها گروهی از RNA های غیر کد کننده هستند که امروزه مطالعات گسترده ایی بروی آن‌ها انجام می‌گیرد.lncRNAها دارای نقش‌های بیولوژیکی گسترده ایی است و بیان آن‌ها در ارتباط با بسیاری از سرطان‌ها ازجمله بدخیمی‌های خونی است. مطالعات بیوانفورماتیک هزاران lncRNA را شناسایی کرده است، و پایگاه داده‌های جالبی در مورد اینکه lncRNAها چگونه عملکردهای بیولوژیکی مهم را انجام می‌دهند به‌دست‌آمده است[۵]. برخی از LncRNAها ممکن است محصولات جانبی غیر عملکردی باشند درحالی‌که گروهی دیگر با تأثیر بروی ژن‌های واقع در منطقه سیس و ترانس بر بیان

[۱] Transcription

[۲] Posttranscription

ژن تأثیر می‌گذارند. تا به امروز فقط بخش کوچکی از lncRNAها مورد مطالعه قرارگرفته‌اند و مطالعات کاربردی‌تر در آینده می‌تواند به نشان دادن خصوصیات کلی lncRNAها کمک کند[۶]. lncRNA های انسانی در طیفی از فرایندهای دخیل در بیان ژن شرکت می‌کنند، این فرایندها شامل: اپی ژنتیک، پردازش فرعی[۱] ، تخریب RNA و ترجمه می‌باشد[۷].

ژن HOTAIR یکی lncRNAها واقع بر کلاستر ژن HOXC است که اخیراً در بسیاری سرطان‌ها موردمطالعه قرارگرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که میزان بیان ژن HOTAIR در سرطان‌های سینه، سلول‌های کبدی، کارسینومای حنجره، کلورکتال، پانکراس و سرطان ریه به‌طور قابل‌توجهی بالا است[۸, ۹]. مطالعاتی که تاکنون انجام‌شده شواهد رو به رشدی از نقش‌های مهم ncRNAها در سرطان، هم از طریق تنظیم تومورساپرسورها و هم تنظیم مسیرهای انکوژنیک را نشان می‌دهد. بنابراین ncRNAها یک نقش حیاتی در حفظ هموستاز سلولی بازی می‌کنند و زمانی که ما فهم عمیقی از نقش‌های آن‌ها، در سرطان داشته باشیم می‌توانیم از آن‌ها به‌عنوان ابزارهای تشخیصی استفاده کنیم. یکی از اهداف کلیدی برای پیشرفت‌های آینده، شناسایی ncRNAهایی است که می‌توانند به‌صورت بالقوه به‌عنوان بیومارکرهایی برای وضعیت‌های خاص بیماری استفاده شوند. lncRNAها در آینده ممکن است به هدف‌های فارماکولوژیک تبدیل شوند و توانایی ما را برای تنظیم بیان ژن‌های بیماری‌زا بالا ببرند[۱۰, ۱۱].

۱-۲. لوسمی میلوئیدی مزمن

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML[۲]) یک اختلال بدخیم در سلول بنیادی خون‌ساز با شاخص ژنتیکی کروموزوم فیلادلفیا (در ٪۹۵ موارد) و تکثیر بیش‌ازحد سلول‌های رده‌ی میلوئیدی می‌باشد[۱۲]. این لوسمی شایع‌ترین اختلال میلوپرولیفراتیو بوده و حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد جدید تشخیص لوسمی را بین بیماری بزرگ‌سالان به خود اختصاص می‌دهد. میزان شیوع بیماری ۱

[۱] Alternative splicing

[۲] Chronic myeloid leukemia

تا ۱/۶ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال می‌باشد. بیماری می‌تواند در هر سنی رخ می‌دهد اما پیک آن در سن ۵۰ تا ۷۰ سالگی است و تنها ۳ ٪ موارد در کودکان اتفاق می‌افتد. شیوع آن در جنس مذکر کمی بیشتر است. تنها عامل مستعد کننده‌ی این بیماری که تا به امروز شناخته‌شده تابش پرتو است که توسط مطالعاتی که بروی بازماندگان بمب‌های اتمی در ژاپن و بیمارانی که رادیوتراپی دریافت کرده بودند به دست آمد. در مبتلایان به این بیماری هیچ سابقه‌ی فامیلی، ژنوتیپ HLA ی خاص و یا عامل عفونی مشخصی گزارش نشده است[**۱۳**].

CML در سه مرحله‌ی پایدار[۱] ، پیش‌رونده[۲] و بلاستیک[۳] تظاهر می‌یابد . در حدود ۸۰٪ از مبتلایان در مرحله مزمن[۴] تشخیص داده می‌شوند که از ویژگی‌های این مرحله تکثیر یاخته‌های نابالغ رده‌ی میلوئیدی و همچنین گرانولوسیت های بالغ در مغز استخوان و خون محیطی می‌باشد. حدود ۱۰٪ بیماران مبتلابه CML در مرحله پیش‌رونده و ۱۰٪ دیگر در مرحله بحران بلاست که شبیه لوسمی حاد است مراجعه می‌کنند. در گروه بزرگی از بیماران طول مرحله ثابت و پایدار لوسمی به‌طور میانگین ۴ سال است که پس از گذر از مرحله پیش‌رونده وارد مرحله بلاستیک می‌شوند. مرحله پایدار لوسمی در ۴٪ موارد بدون هیچ اخطاری به‌طور ناگهانی وارد مرحله بلاستیک می‌گردد. در سال ۱۹۸۴، Sokal و همکارانش بر اساس، سن بیمار، اندازه‌ی طحال، درصد بلاست و شمارش پلاکت، این بیماری را به سه کلاس، پیش‌آگهی خوب، پیش‌آگهی متوسط و پیش‌آگهی ضعیف تقسیم کردند. این تقسیم‌بندی شایع‌ترین تقسیم‌بندی مورداستفاده است [**۱۴، ۱۵**].

۱-۲-۱. خصوصیات بالینی

شروع بیماری آرام و بدون علامت و بیماری ممکن است به‌طور اتفاقی در آزمایش روتین خون کشف شود. بیمار ممکن است علائم آنمی و کاهش وزن داشته و یا فقط از بی‌حالی شکایت کند.

---

[۱] stable

[۲] accelerated

[۳] blast crisis

[۴] Chronic phase

طحال شروع به بزرگی پیش‌رونده کرده و بیمار شروع به کاهش وزن، تب و عرق شبانه با افزایش متابولیسم در اثر تکثیر زیاد گرانولوسیت ها می‌کند.احساس ناراحتی به دلیل بزرگ شدن طحال ممکن است باعث مراجعه بیمار به پزشک شود. انفارکتوس در طحال، احساس درد در ربع بالایی چپ شکم ایجاد می‌کند. خونریزی و کبودی شدید ممکن است در مراحل بعدی بیماری عارض شده و لنفادنوپاتی، اغلب وجود دارد اما قابل‌تشخیص نیست[۱۶].

۱-۲-۲. خصوصیات آزمایشگاهی

مطالعات نشان داده‌اند که، ۶ ماه قبل از بروز بیماری و تشخیص آن، شمارش معمولی سلول‌های خونی تغییر کرده و عاملی برای تشخیص بیماری است. بررسی خون محیطی لکوسیتوز گرانولوسیتیک را نشان می‌دهد. شمارش گلبول‌های سفید بین ۲۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ در میلی‌متر مکعب متغیر است. تمام طیف گرانولوسیتی از مایلوبلاست تا نوتروفیل در خون و افزایش مطلق منوسیت‌ها نیز دیده می‌شود. میلوبلاست ها کمتر از ۱۰٪ بوده و درصد نسبی میلوسیت های نوتروفیلی با افزایش تعداد کل لکوسیتها افزایش می‌یابد. بازوفیلی به‌طور ثابت وجود داشته و ائوزینوفیلی همراه با ائوزینوفیل های میلوسیت نیز اغلب وجود دارد. منوسیت‌ها نیز در بیشتر بیماران افزایش مطلق دارد. آنمی نورموسیتیک در بیشتر بیماران در هنگام تشخیص وجود دارد و تعداد کمی نورموبلاست هم دیده می‌شود. ترومبوسیتوز در بیش از نیمی از بیماران وجود دارد درحالی‌که کمتر از ۱۵ درصد موارد دچار ترومبوسیتوپنی هستند[۱۷].

آلکالن فسفاتاز نوتروفیل (NAP) در بیش از ۹۰ درصد بیماران مبتلابه CML کاهش‌یافته یا اصلاً وجود ندارد. در مرحله خاموشی CML با تابلوی طبیعی خون، در بیشتر موارد، همچنان NAP پایین می‌ماند و تنها در حدود یک‌سوم از بیماران به حد طبیعی برمی‌گردد. در مراحل شتاب گیرنده و بلاستیک بیماری،NAP افزایش می‌یابد، مانند افراد سالمی که در اثر عفونت NAP افزایش می‌یابد[۱۸].

مغز استخوان شدیداً هایپرسلولار است و آسپیراسیون مغز استخوان به دلیل تراکم سلولی امکان‌پذیر نیست. پیش سازهای ائوزینوفیل و بازوفیل معمولاً افزایش و نورموبلاست ها کاهش دارند. باید به خاطر داشت که حتی یک مغز استخوان تیپیک نیز برای CML نمی‌تواند تشخیصی باشد و از طرف دیگر در بیشتر موارد تشخیص از روی اسمیر خون محیطی گذاشته می‌شود. بیماران دارای کاریوتیپ های مختلفی شامل تریزومی۸ ،تریزومی۹ و ایزوکرموزوم q ۱۷ می‌باشند[۱۷].

۱-۲-۳. ناهنجاری سیتوژنتیک

در سال ۱۹۶۰ کروموزوم فیلادلفیا (Ph) به‌عنوان یک شاخص مهم بیماری CML کشف شد. در سال ۱۹۷۳ جابجایی کروموزومی t(9;22)(q34;q11) مورد شناسایی قرار گرفت. در سال ۱۹۸۰ ژن کایمریک BCR – ABL و خصوصیت انکوپروتئین آن شناسایی شد، و در مطالعه‌ی نشان داده شد القای ژن BCR – ABL به سلول‌های بنیادی موشی در حیوانات آزمایشگاهی منجر به بیماری مشابه CML انسانی شد. جابجایی متقابل کروموزوم ۹ و ۲۲ و ادغام انکوژن ABL[۱] از قطعه شکسته روی کروموزوم ۹ در ناحیه‌ای شکسته از ژن BCR[۲] روی کروموزوم ۲۲ منجر به ادغام BCR/ABL می‌شود. نتیجه‌ی این ادغام موجب کوتاه شدن کروموزوم ۲۲ شده که به آن کروموزوم فیلادلفیا (Ph) گویند. در جابجایی کروموزومی Ph ، اگزون های ناحیه‌ی ´۵ ژن BCR در اگزون های ناحیه‌ی ´۳ ژن ABL1 ادغام می‌گردد. ژن الحاقی BCR/ABL باعث تولید نسخه‌ی جدیدی از RNA می‌شود که خود فاکتور رشد پروتئینی با فعالیت تیروزین کینازی را ایجاد می‌کند. که فراورده آن با توجه به ناحیه شکستگی در ژن BCR پروتئین‌های با خاصیت تیروزین کیناز به وزن مولکولی P190، p210 و p230 کیلو دالتون خواهد بود (شکل ۱-۱). فعالیت تیروزین کینازی پروتئین p210 نسبت به پروتئین‌های طبیعی ،که محصول ژن ABL1 به‌تنهایی بوده، بیشتر است و ۱۴۵ کیلو دالتون وزن دارد. در موارد کمی (حدود ۲۰٪) از لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL) نیز جابجایی کروموزومی Ph مشاهده می‌شود که در بعضی

[۱] Abelson

[۲] Break point Cluster Region