BRIEF REPORT

Association between rs 1800561 CD38 Gene Polymorphism and Chronic Lymphocytic Leukemia Risk

Morteza Hashemi[1],
Bahman Jalali Kondori[2,3],
Hadi Esmaeili Gouvarchin Ghaleh[4],
Shahrbano Rostami[5]

[1] MSc in Hematology and Blood Banking, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Baqiyatallah Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases (BRCGL), Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Associate Professor, Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received May 16, 2020 ; Accepted September 13, 2020)

Abstract

Background and purpose: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of adult leukemia characterized by the accumulation of seemingly mature type B lymphocytes in peripheral blood and lymphatic organs. One of the main markers used in the diagnosis and prognosis of CLL is the *CD38* gene. Polymorphism is considered to be a major genetic source of phenotypic change within a species and may be involved in developing the disease. Here, the study of *CD38* gene polymorphism (rs 1800561) was done in terms of incidence and relevance to clinical and laboratory parameters in CLL patients.

Materials and methods: In order to confirm the CLL disease, CD5, CD19, and CD23 markers were investigated using immunophenotyping. *CD38* gene polymorphism was studied in 70 patients with CLL and 70 healthy cases as control using a specific PCR method of polymorphism (Tetra-ARMS-PCR). Statistical analyses were performed in SPSS V18 applying Pearson Chi-Square test.

Results: In the patient group, we observed 97% wild-type genotype (CC), 1.5% heterozygote (CT), and 1.5 % homozygote (TT). The present study showed that 98.5% of the control subjects had wild-type (CC) and 1.5% had heterozygote (CT). The frequency of C and T alleles in both patients and control groups was 97.9%, 2.1%, 99.3%, and 0.7%, respectively.

Conclusion: Based on current study, despite differences in frequency of T and C alleles among patients and healthy individuals, no significant difference was found in the occurrence of this polymorphism and the risk of CLL.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, *CD38* gene, rs 1800561, polymorphism

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (191): 102-108 (Persian).

*** Corresponding Author: Bahman Jalali Kondori** - Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: Bahmanjalali2010@gmail.com)

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 191 آذر سال 1399 (108-102)

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs 1800561 ژن *CD38* در میزان ابتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

مرتضی هاشمی[1]
بهمن جلالی کندری[2و3]
هادی اسمعیلی گورچین قلعه [4]
شهربانو رستمی[5]

چکیده

سابقه و هدف: لوسمی لنفوسیتی مزمن، یکی از شایع‌ترین لوسمی‌های بزرگسالان می‌باشد که با انباشت لنفوسیت‌های نوع B به ظاهر بالغ در خون محیطی و اندام‌های لنفاوی مشخص می‌شود. از مهم‌ترین مارکرهای تشخیص و پیش‌آگهی CLL، ژن *CD38* است. پلی‌مورفیسم به عنوان یک منبع ژنتیکی عمده از تغییر فنوتیپی درون یک گونه در نظر گرفته می‌شوند و می‌تواند در میزان ابتلا به بیماری دخیل باشد. بر این اساس، بررسی پلی‌مورفیسم ژن *CD38* (rs 1800561) در میزان ابتلا و ارتباط آن با پارامترهای بالینی و آزمایشگاهی بیماران CLL مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی جهت تایید ابتلا به بیماری CLL، مارکرهای سطحی CD5، CD19 و CD23 با استفاده از روش ایمنوفنوتایپینگ استفاده شد. پلی‌مورفیسم ژن *CD38* در 70 بیمار مبتلا به CLL و 70 فرد سالم به عنوان کنترل، با روش PCR اختصاصی پلی‌مورفیسم (Tetra-ARMS-PCR) مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS18 و Chi square Pearson انجام گرفت.

یافته‌ها: در گروه بیمار، 97 درصد ژنوتیپ طبیعی (CC)، 1/5 درصد هتروزیگوت (CT) و 1/5 درصد هموزیگوت (TT) مشاهده کردیم. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افراد گروه کنترل دارای 98/5 درصد ژنوتیپ طبیعی (CC) و1/5 درصد هتروزیگوت (CT) بودند. میزان فراوانی آلل C و T نیز در دو گروه بیمار و کنترل به ترتیب 97/9 درصد، 2/1 درصد، 99/3 درصد و 0/7 به دست آمد.

استنتاج: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، علی‌رغم تفاوت در فراوانی آلل‌های T و C در بین گروه بیماران و افراد سالم، تفاوت معنی‌داری در بروز این پلی‌مورفیسم و خطر ابتلابه بیماری CLL وجود ندارد.

واژه های کلیدی: لوسمی لنفوسیتی مزمن، ژن *CD38*، rs 1800561، پلی‌مورفیسم

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن، شایع ترین بدخیمی کلونال است که در افراد سالخورده مشاهده می‌شود(1). از ویژگی‌های این بیماری می‌توان به افزایش غیرطبیعی تعداد گلبول‌های سفیدخون اشاره کرد(2). تشخیص نهایی

مولف مسئول: بهمن جلالی کندری - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی E-mail: Bahmanjalali2010@gmail.com
1. کارشناسی ارشد خون شناسی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
2. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
3. استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
4. استادیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
5. دانشیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1399/2/27 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1399/3/12 تاریخ تصویب : 1399/6/23

CLL با استفاده از روش فلوسیتومتری لنفوسیت‌های $CD5^+$، $CD19^+$ و $CD23^+$ صورت می گیرد(3).

روند کلینیکی بیماران مبتلا به CLL به‌طور قابل توجهی ناهمگن است و این بیماری در درجه‌های شدید، تهاجمی و غیرتهاجمی رخ می‌دهد(4). از مهم‌ترین مارکرهای مورد استفاده در تشخیص و پیش‌آگهی CLL، ژن *CD38* است. پروتئین *CD38* یک گلیکوپروتئین غشایی است. همچنین، این پروتئین در سطح بسیاری از سلول‌های ایمنی بدن، از جمله گلبول‌های سفید ($CD4^+$ و $CD8^+$) و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و مونوسیت‌ها یافت می‌شود. واکنش *CD38* با آنتی بادی‌های مونوکلونال موجب ایمنی زایی، تحریک و تمایز سلول‌های K، B و T می‌شود. نقش اصلی *CD38*، تنظیم یون کلسیم از طریق سنتز چرخه آدنوزین دی‌فسفات - ریبوز (cADP-ribose) است(5). این گلیکوپروتئین در عفونت‌های HIV، سرطان خون، لوسمی مولتیپل میلوما، دیابت نوع دو، متابولیسم استخوان و برخی بیماری‌های ژنتیکی نقش دارد(6). پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphisms (SNP تغییرات و تنوع‌های توالی طبیعی با دانسیته بالا در ژنوم‌ها هستند(7).SNPها به عنوان یک منبع ژنتیکی عمده از تغییر فنوتیپی درون یک گونه در نظر گرفته می‌شوند و به عنوان مارکر ژنتیکی مهم به حساب می‌آیند(8). ژن *CD38*، دارای یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی تک آللی است. تغییرات این پلی مورفیسم در موقعیت اگزون 4 که آمینواسید Arg140Trp جایگزین می‌شود و جایگاه ژنوتایپی [4181800561C>T;] 418C>T می‌باشد(9)، که دارای اهمیت بالینی می‌باشد. لذا در مطالعه حاضر، این SNP انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

بیماران

این مطالعه به روش توصیفی انجام شده است. جامعه مورد مطالعه شامل 70 بیمار مبتلا به B-CLL (B-Chronic Lymphocytic Leukemia) که درسال 1398 به بیمارستان شریعتی تهران مراجعه‌کرده بودند. بیماران CLL با محدوده سنی بالای 40 سال که قادر به امضای رضایت‌نامه آگاهانه بودند، در این مطالعه قرار گرفتند. معیارهای خروج بیماران CLL از مطالعه، وجود بیماری عفونی یا بیماری زمینه‌ای (هپاتیت B یا C فعال یا قبل از آن، مورد شناخته شده HIV مثبت، بیماری قلبی ریوی) و درمان بیماری‌های سرطانی طی 5 سال پیش بود. معیارهای ورود برای گروه کنترل، 70 فرد سالم بدون سابقه ابتلا به بیماری عفونی، التهابی و بیماری‌های خود ایمنی (همسان از نظر سن و جنس) مراجعه‌کننده به مرکز هماتولوژی - انکولوژی بیمارستان شریعتی تهران انتخاب شدند. پس از اخذ رضایت آگاهانه و دریافت کد اخلاق از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) (شناسه اخلاقی: IRIR.BMSU.REC.1398.254) و پرکردن فرم اطلاعات دموگرافیک بیماران، نمونه‌گیری انجام شد.

استخراج DNA و آنالیز پلی مورفیسم ژن CD38

حدود 10-5 میلی لیتر نمونه خون در لوله‌های ضد انعقادی EDTA از بیماران CLL و گروه کنترل جمع‌آوری و استخراج DNA ژنومی در این بیماران به روش Salting out انجام گرفت(10). برای پلی‌مورفیسم *CD38*(rs1800561[C-418T]) از روش Tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (Tetra-ARMS-PCR) استفاده شد. در این مطالعه از چهار پرایمر (دو پرایمر خارجی و دو پرایمر داخلی تنظیم شده) استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول شماره 1 ارائه شده است. جهت انجام واکنش PCR، از مستر میکس Hotstart (Ampliqon, Denmark)، 1 میکرولیتر DNA الگو (w100 ng/µL)، 1 میکرولیتر از هر پرایمر (10 µM) و آب مناسب PCR استفاده شد.

جدول شماره 1: توالی پرایمر rs1800561 با روش Tetra-ARMS PCR

پرایمر	توالی(3′ to 5′)	اندازه محصول	جایگزینی نوکلئوتیدی
Forward inner (T allele)	CTGGCCCATCAGTTCACACAGGTCCCGT	266bp	C418T
Reverse inner (C allele)	GCGTGTCCTCCAGGGTGAACATGTCACG	218 bp	C-418T
Forward outer	CACACTCTCTCTCCGCCACTCTCCTGCAC	428bp	-
Revers outer	GGGTGCCTGTGGCTCTGTCCTCCACACT		

Touchdown PCR برای واکنش Tetra Primer ARMS-PCR مورد استفاده قرار گرفت و شامل 21 سیکل با شروع دمای انیلینگ 70 درجه سانتی‌گراد برای30 ثانیه با 0/5 درجه سانتیگراد برای هر سیکل کاهش یافت، که 26 سیکل اضافی با دمای انیلینگ 55 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه کاهش یافت. پس از اتمام واکنش Tetra Primer ARMS-PCR، محصولات PCR در کنار سایز مارکر و کنترل‌ها، در ژل آگارز 3/5 درصد و با استفاده از سایبرگرین بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تفاوت آماری بین مجموعه داده های کمی با آزمون T-student بررسی شد. از تست Fisher's exact test برای برآورد ریسک از نسبت شانس (OR) با فاصله اطمینان 95 درصد (CI) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شد. مقدار P <0/05 از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها و بحث

در این مطالعه، جمعیت مورد بررسی در دو گروه بیماران مبتلا به B-CLL شامل 43 بیمار مرد و 27 بیمار زن با میانگین سنی 58/78 سال و افراد کنترل شامل 45 مرد و 25 زن با میانگین سنی 58/48 سال مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی آماری نشان داد که این دو گروه از لحاظ سن و جنس همسان هستند.

ویژگی‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران و افراد کنترل با استفاده از پرسشنامه اطلاعات دموگرافیک تهیه شد. همچنین سیستم مرحله بندی بیماران بر اساس Rai شامل مرحله 0: لنفوسیتوز، مرحل I: لنفوسیتوز همراه با لنف آدنوپاتی، مرحلهII : لنفوسیتوز همراه با هپاتومگالی، مرحله III: لنفوسیتوز و کم خونی، مرحله IV: لنفوسیتوز و ترومبوسیتوپنی صورت گرفت (جدول شماره 2).

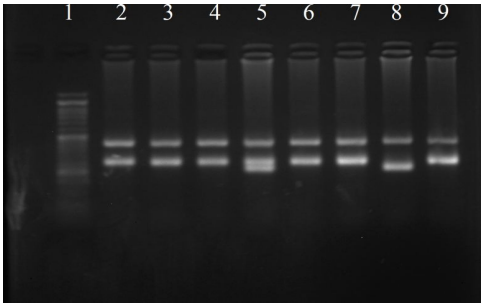
جدول شماره 2: ویژگی‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران و افراد کنترل

پارامتر	گروه بیماران (70 نفر)	گروه افراد کنترل (70 نفر)	سطح معنی داری
سن (سال)	58/78±10/95	58/48±10/88	0/424
جنسیت (مرد/ زن)	27/43	25/45	0/205
تعداد گلبول های سفید ($x10^3/\mu l$)	74±69	7 ±1	p<0/001
مقدار هموگلوبین (g/dl)	11/6±2/8	13/7±1/6	0/691
تعداد پلاکت ($x10^3/\mu l$)	120±632	221±569	0/999

سیستم مرحله بندی Rai : II≥ 43 (61درصد) و II> 27 (39 درصد)

تایید بیماری CLL با استفاده از نتایج بررسی لام خون محیطی و فلوسایتومتری انجام شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش بیان مارکرهای CD5، CD19 و 23 در این بیماران بود.

نمونه‌هایی که واجد دو باند 428 و 218 جفت باز بودند، ژنوتایپ CC (هموزیگوت سالم) و نمونه‌هایی که دارای سه باند برش یافته در اندازه‌های 266، 218 و 428 جفت باز بودند، ژنوتایپ CT هتروزیگوت موتانت) در نظر گرفته شدند. همچنین نمونه‌هایی به عنوان ژنوتایپ TT (هموزیگوت موتانت) در نظر گرفته شد که واجد دو باند 428 و 266 در الکتروفورز بودند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: الکتروفورز محصول‌های PCR ژنوتایپ rs1800561. ردیف 1: DNA مارکر (DNA Ladder marker 50 bp)، ردیف2، 3، 4، 6، 7 و 9: ژنوتایپ GG، ردیف 5: ژنوتایپ GT و ردیف 8: ژنوتایپ TT

فراوانی آلل و محاسبه نسبت آنها تعیین گردید و توزیع ژنوتایپ و آلل‌های مختلف در دو گروه بیمار و کنترل مقایسه شد. فراوانی آلل C به ترتیب 97/7 و 99/7 و فراوانی آلل T به ترتیب 2/1 و 0/7 درصد در دو گروه بیمار و کنترل به دست آمد (جدول شماره 3).

مطالعه حاضر نشان داد که پلی‌مورفیسم ژن (*CD38*] rs1800561 (418 C>T)] نقش مهمی در ابتلا به بیماری B-CLL در جمعیت ایرانی ندارد. بر اساس اطلاعات نویسندگان، این مطالعه اولین بررسی بر روی ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن *CD38* در میزان ابتلا به CLL در جمعیت ایرانی می‌باشد. هم چنین براساس آنالیزهای آماری، ژنوتیپ CT همبستگی (Correlation) با میزان ابتلا به CLL در جمعیت مورد مطالعه نشان نداد. قابل بیان است که تحقیقات محدودی در ارتباط با میزان ابتلا به این بیماری با پلی‌مورفیسم انجام شده است.

مطالعه‌ای Eyada و همکاران در سال 2012 نشان داد که در دیگر واریانت (rs6449182) ژن *CD38* با افزایش ابتلا به CLL ارتباط دارد(11). همچنین نتایج مطالعه Krzysztof Jamroziak و همکاران در سال 2009 نشان می‌دهد که SNP های *CD38* ممکن است بر بیان *CD38* تأثیر بگذارد و در افزایش خطر ابتلا به سرطان B-CLL موثر باشد(12). اگرچه نتایج متناقض در این موارد وجود دارد و تایید‌کننده مطالعه ما می‌باشد(13)، این اختلاف در یافته‌های مطالعه‌های مشابه با مطالعه حاضر می‌تواند ریشه در وجود پلی‌مورفیسم در ژن‌های دخیل در مسیرهای مشابه متابولیکی (Gene-Gene interaction) داشته باشد(14). از طرفی تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم در میزان ابتلا به CLL نقش مهمی دارند(15). فاکتورهای دخیل دیگری از قبیل عوامل محیطی و جغرافیایی در ابتلا به CLL به عنوان عوامل مداخله‌گر روی سطح بیان بعضی ژن‌ها موجب تغییر در میزان خطر ابتلا به بیماری می‌شوند(16). نتایج این مطالعه نشان داد علیرغم تفاوت در فراوانی آلل های T و C در بین گروه بیماران و افراد سالم، تفاوت معنی‌داری در بروز این پلی‌مورفیسم و خطر ابتلا به بیماری CLL وجود ندارد. توصیه می‌گردد انجام پروژه‌های بیشتر با جامعه آماری بزرگ‌تر و با در نظر گرفتن تاثیر عوامل مداخله‌گر نظیر رژیم غذایی، وزن بیماران، سابقه خانوادگی و سبک زندگی در افراد تحت مطالعه انجام گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی افرادی که در پیشبرد این مطالعه ما را یاری نمودند، اعلام می دارند.

جدول شماره 3: فراوانی ژنوتیپی چند شکلی rs 1800561 در افراد بیمار و کنترل (هر گروه 70 نفر)

ژنوتایپ	گروه بیماران (%) N	گروه کنترل(%) N	p	OR**	%95CI***	HWE****
CC*	68(97)	69(98/5)	1,00	-	-	NS
CT	1(1/5)	1(1/5)	0/999	1/01	0/0622-16/5538	
TT	1(1/5)	0	-	-	-	
آلل						
C	137	139	1,00	-	-	
T	3	1	0/622	3/04	0/3127-29/624	
فراوانی آلل (درصد)	C=97/9	C=99/3				
	T=2/1	T=0/7				

* : Group reference

** :Odds Ratio

*** : Confidence Interval

**** : Hardy-Weinberg equilibrium

References

1. Devereux S, Cuthill K. Chronic lymphocytic leukaemia. Medicine 2017;41(5): 278-281.
2. Binder AF, Gabrilove JL. Chronic Lymphocytic Leukemia In: Oh W, Chari A (ed)Mount Sinai Expert Guides: Oncology. New Jersey, US: Wiley; 2019. p. 332-341.
3. Alqasim AMZ, Kareem AA. Flowcytometric Measurement of CD5, CD23, and *CD38* expression as a diagnostic and prognostic markers in CLL patients. Iraqi J Hematol 2015; 4(1): 16-38.
4. Mansouri L, Wierzbinska JA, Plass C, Rosenquist R, editors. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biological impact. Semin Cancer Biol 2018; 51: 1-11.
5. Bürgler S. *CD38* in chronic lymphocytic leukemia (CLL)–from a diagnostic tool to a therapeutic target. J Blood Disord Med 2016; 1(2).
6. Higashida H, Yokoyama S, Huang JJ, Liu L, Ma WJ, Akther S, et al. Social memory, amnesia, and autism: brain oxytocin secretion is regulated by NAD+ metabolites and single nucleotide polymorphisms of *CD38*. Neurochem Int 2012; 61(6): 828-838.
7. Song J, Li J, Sun J, Hu T, Wu A, Liu S, et al. Genome-wide association mapping for cold tolerance in a core collection of rice (Oryza sativa L.) landraces by using high-density single nucleotide polymorphism markers from specific-locus amplified fragment sequencing. Front Plant Sci 2018; 9: 875.
8. Huq MA, Akter S, Nou IS, Kim HT, Jung YJ, Kang KK. Identification of functional SNPs in genes and their effects on plant phenotypes. Plant Biotechnol J 2016; 43(1): 1-11.
9. Żołnierczyk JD, Kiliańska ZM. Polymorphisms Of Chosen Genes In Chronic Lymphocytic Leukemia; Their Relationship With The Disease Course And Prognosis. Int J Adv Pharm Biol Chem 2015; 6(6): 427-443.
10. Suguna S, Nandal D, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. Int J Pharm Pharm Sci 2014; 6(6): 198-199.
11. Eyada TK, Hussein SK, Younan SA, El Ghany WMA, Malek RA. *CD38* Gene polymorphisms and susceptibility to B cell chronic lymphocytic leukemia. Comp Clin Path 2013; 22(4): 573-579.
12. Jamroziak K, Szemraj Z, Grzybowska-Izydorczyk O, Szemraj J, Bieniasz M, Cebula B, et al. *CD38* gene polymorphisms contribute to genetic susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence from two case-control studies in Polish Caucasians. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18(3): 945-953.
13. Polzonetti V, Carpi FM, Micozzi D, Pucciarelli S, Vincenzetti S, Napolioni V. Population variability in *CD38* activity: correlation with age and significant effect of TNF-α-308G> A and *CD38* 184C> G SNPs. Mol Genet Metab Rep 2012; 105(3): 502-507.
14. Han D, Qiao Z, Qi D, Yang J, Yang X, Ma J, et al. Epistatic Interaction Between 5-HT1A and Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms in the Northern Chinese Han Population With Major Depressive Disorder. Front Psychiatry 2019; 10: 218.
15. Kandaswamy R, Sava GP, Speedy HE, Beà S, Martín-Subero JI, Studd JB, et al. Genetic predisposition to chronic lymphocytic leukemia

is mediated by a BMF super-enhancer polymorphism. Cell Rep 2016; 16(8): 2061-2067.

16. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. Blood 2009; 114(16): 3367-3375.