

بررسی تأثیر مهار بیان ژن نوکلئوستمین بوسیله siRNA بر مهار رشد و القاء تمایز در رده سلولی NB4 لوسمی پرومیلوسیتیک حاد انسانی

سیدمحمدامین موسوی*^۱، نازیلا مقترن بناب^۲، محمدعلی حسینپور فیضی^۳، ایرج اسودی کرمانی*^۴

تاریخ دریافت: 1391/09/22، تاریخ پذیرش: 1391/12/21

چکیده

پیش زمینه و هدف: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) نوعی بیماری خونی بدخیم می‌باشد که در اثر تکثیر بی رویه و عدم تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز ایجاد می‌شود. از راهکارهای اخیر در درمان لوسمی شناسایی مسیرهای سیگنالی درگیر در سلول‌های بنیادی سرطان خون می‌باشد. نوکلئوستمین نقش عمده‌ای در کنترل رشد و خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی دارد. در مطالعه حاضر، اثرات سرکوب بیان ژن نوکلئوستمین بر روی رشد، تمایز و مرگ رده سلولی NB4 به عنوان مدل APL برای اولین بار بررسی شده است.

مواد و روش کار: سلول‌های NB4 در حضور غلظت ۲۰۰nM از siRNA اختصاصی ژن نوکلئوستمین کشت داده شدند. سطح بیان ژن نوکلئوستمین توسط RT-PCR نیمه کمی بررسی گردید. به منظور بررسی مهار رشد و مرگ سلولی به ترتیب آزمون دفع رنگ تریپان بلو و میکروسکوپ فلورسنت به کار گرفته شد. تمایز از نظر ریخت شناسی و بیولوژیکی به ترتیب با استفاده از رنگ آمیزی رایت-گیمسا و فعالیت بیگانه خواری ذرات لاتکس بررسی شد.

یافته‌ها: نوکلئوستمین دارای بیان بالایی در سلول‌های NB4 می‌باشد. ۴۸ ساعت پس از تیمار، سطح mRNA نوکلئوستمین در مقایسه با سلول‌های کنترل به میزان ۳۶/۱ درصد کاهش یافت. ۷۲-۱۲ ساعت پس از تیمار رشد سلول‌ها به میزان ۳۵/۱ درصد کاهش یافت و همراه با آن ویژگی‌های تمایز نظیر کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم و هضم ذرات لاتکس مشاهده شد که تمایز به سمت رده مونوسیت-ماکروفاژی را تأیید کرد.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات مهار رشدی و تمایزی مهار نوکلئوستمین در سلول‌های NB4، خاموشی بیان این ژن می‌تواند به عنوان یک هدف بالقوه در درمان بیماران APL پیشنهاد شود.

کلید واژه‌ها: نوکلئوستمین، تمایز، مهار رشد، siRNA، NB4

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره چهارم، ص ۱۳۲-۱۲۱، اردیبهشت ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: آذربایجان شرقی، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۷۴۱

Email: moosav_m@tabrizu.ac.ir, asvadikermani@tbzmed.ac.ir

مقدمه

حاد (APL)^۱ یکی از زیر نوع‌های AML می‌باشد که در اثر جابه‌جایی کروموزومی بین ژن پرومیلوسیتیک لوسمی (PML) در روی کروموزوم ۱۵ و ژن رسپتور آلفا رتینوئیک اسید (RAR)^۲ در روی کروموزوم ۱۷ ایجاد می‌شود و منجر به توقف بلوغ پیش‌سازهای میلوپوسیتیک و تجمع پرومیلوسیت‌های نابالغ

لوسمی میلوئیدی حاد (AML)^۳ یک نوع سرطان خون بدخیم می‌باشد که با تجمع بلاست‌های نابالغ و تمایز نیافته در مغز استخوان به دلیل اختلال در روند طبیعی تمایز سلول‌های بنیادی میلوئیدی مشخص می‌شود (۱). لوسمی پرومیلوسیتیک

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۴ استاد، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۵ Acute myelocytic leukemia

^۶ Acute promyelocytic leukemia

^۷ Retinoic acid receptor

^۸ Stem cell

مولکول‌های siRNA^۵ که از اعضای عملکردی فرآیند RNAi هستند، مولکول‌های RNA دو رشته‌ای ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتیدی می‌باشند و به واسطه مجموعه‌های خاموش‌کننده القا شده با RNA^۶ منجر به تجزیه mRNA مکمل می‌شوند (۱۵).

در این مطالعه بر آن شدیم تا برای اولین بار اثرات مهار ژن نوکلئوستمین به واسطه siRNA را بر میزان رشد و تکثیر، مرگ و تمایز رده سلولی NB4 به عنوان مدل آزمایشگاهی APL، بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول:

رده سلولی NB4 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت RPMI-1640 (Biosera، انگلستان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^۷ (Biosera، انگلستان) و آنتی‌بیوتیک‌های استروپتومايسين (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) (سیناژن، تهران) در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد.

طراحی و سنتز siRNA

اولیگوهای دو رشته‌ای ۲۱ نوکلئوتیدی siRNA علیه ژن نوکلئوستمین با استفاده از برنامه انتخاب siRNA (siRNA TargetFinder) در سایت اینترنتی Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) علیه واریانت‌های mRNA نوکلئوستمین (NM_014366, Eurofins NM_206825, NM_206826) انتخاب و توسط شرکت MWG Operon به صورت نشان‌دار با فلورسین در انتهای ۳' سنتز شد. siRNA اختصاصی نوکلئوستمین مورد استفاده در این تحقیق، قبلاً توسط نیک پور و همکاران در مطالعه عملکرد نوکلئوستمین در رده سلولی سرطانی مثانه انسانی به کار گرفته شده است (۱۱). بنا به توصیه شرکت سازنده اولیگوها با بافر siMAX به صورت محلول در آورده شده و تا موقع مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. توالی siRNA سنتز شده برای نوکلئوستمین به شرح زیر می‌باشد:

سنس: 5'-GAACUAAAACAGCAGCAGAdTdT-3'

آنتی‌سنس:

5'-UCUGCUGCUGUUUAGUUCdTdT-3'

در خون و مغز استخوان می‌شود (۲). با وجود پیشرفت‌های اخیر هنوز درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و به نظر می‌رسد علت آن مقاومت دارویی و عدم ریشه‌کنی سلول بنیادی^۸ سرطانی باشد.

بنابراین شناخت مکانیسم‌های درگیر در رشد، تمایز و مرگ سلول بنیادی می‌تواند کمک شایانی در درمان این بیماری‌ها نماید. سلول‌های بنیادی سرطانی زیر مجموعه کوچکی از سلول‌های سرطانی هستند و مشابه با سلول‌های بنیادی دارای توانایی خودنوزایی^۱ می‌باشند. هر گونه اختلال در پدیده خودنوزایی و عدم کنترل آن در سلول‌های بنیادی در نتیجه اختلال در عملکرد ژن‌هایی که در تنظیم این فرآیند دخیل می‌باشند، منجر به تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و تشکیل تومور می‌شود. لذا یک روش درمانی برای حذف این سلول‌ها، از کار انداختن خودنوزایی آن‌هاست (۳). یکی از ژن‌های درگیر در خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی، ژن نوکلئوستمین^۲ (NS) می‌باشد که توسط تیسای و همکاران در سال ۲۰۰۲ میلادی در سلول‌های بنیادی و برخی رده‌های سلولی سرطانی کشف شد (۴). پروتئین نوکلئوستمین که در هستک سلول متمرکز است از طریق اتصال به گوانوزین تری فسفات (GTP) و هیدرولیز آن، بین هستک و شیره هسته در تعادل دینامیک می‌باشد (۵). نوکلئوستمین با ورود به شیره هسته و میانکشی با پروتئین سرکوبگر تومور به نام p53 در عملکرد مهاری چرخه سلولی از طریق مهار مستقیم p53 و یا از طریق پیشبرد عملکرد سایر مهارکننده‌های p53 از قبیل MDM2^۳ اختلال ایجاد می‌کند (۶). مطالعات اخیر نشان داده است که نوکلئوستمین به عنوان یک مارکر سلول بنیادی محسوب می‌شود و به میزان بالایی در انواع مختلف سلول‌های بنیادی و نیز برخی رده‌های سلولی سرطانی از قبیل رده سلولی هپاتوکارسینوما (HepG2)، دهانه رحم (Hela)، استئوسارکوما (OS-732)، سرطان مثانه (5637)، سرطان معده (SGC-7901)، سینه (MMK-7)، پروستات (PC-3)، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (HL-60) و برخی از انواع بافت‌های سرطانی بیان می‌شود (۷-۱۲). این خصوصیت نشان دهنده نقش عمده نوکلئوستمین در حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی می‌باشد (۱۳). بدین ترتیب به نظر می‌رسد مهار عملکردی ژن نوکلئوستمین با استفاده از استراتژی RNAi^۴ منجر به کاهش توان خودنوزایی سلول‌های سرطانی گردد.

RNAi فرآیندی است که طی آن یک مولکول RNA دو رشته‌ای از بیان ژن در سطح mRNA معینی جلوگیری می‌کند (۱۴).

¹Self renewal

²Nucleostemin

³Murine Double Minute 2

⁴RNA interference

^۵Small interfering RNA

^۶RNA induced silencing complex

^۷Fetal Boviner Serum

تیمار سلول‌ها با *siRNA* اختصاصی نوکلئوستمین

یک روز پیش از تیمار، 3×10^5 سلول در هر میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم و آنتی‌بیوتیک در فلاسک کشت سلول کشت داده شدند. در روز تیمار 2×10^5 سلول به ازای هر چاهک ظرف ۲۴ خانه (SPL life science، کره جنوبی) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. در یک تیوپ جداگانه اولیگوهای *siRNA* با غلظت ۲۰۰ نانومولار به ازای هر چاهک، به ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول *Hiperfect transfection reagent* (Qiagen، امریکا) به مخلوط بالا افزوده و ورتکس گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از این مدت، محلول حاصل به چاهک حاوی سلول منتقل شده و پلیت به آرامی تکان داده شد تا کمپلکس تیمار به طور یکنواخت در چاهک پخش شود. بعد از گذشت ۶ ساعت، ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم ۱۲ درصد و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک اضافه شد (۱۶). در آزمایش *RNAi* علاوه بر *siRNA* طراحی شده‌ی اختصاصی نوکلئوستمین، از یک *siRNA* نامرتبط (*IR/Irrelevant*) نیز برای نرمالیزه کردن آثار غیراختصاصی احتمالی فرایند *RNAi* استفاده شد. آنالیز بر روی نمونه‌های تیمار شده با *NS-siRNA* همراه با نمونه‌های تیمار شده با *IR-siRNA* در شرایط مشابه صورت گرفت تا از مداخله‌ی اثرهای غیراختصاصی *RNAi* در تفسیر نتایج جلوگیری به عمل آید.

توالی نامرتبط زیر به عنوان کنترل منفی انتخاب شد:

5'-CACCGCCTCTCATCGTCGTC-3'

استخراج *RNA* و واکنش رونویسی معکوس (*RT-PCR*)

استخراج *RNA* از سلول‌های NB4 تیمار شده با *siRNA* نوکلئوستمین و سلول‌های کنترل ۴۸ ساعت پس از تیمار با استفاده از محلول *RNX-plus* (سیناژن، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مقادیر یکسان از *RNA* اولیه (۱ میکروگرم) با آنزیم *DNaseI* تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT (فرمنتاز، کانادا) و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم *RT* (*RevertAidTM M-MLV*) (فرمنتاز، کانادا) به *cDNA* تبدیل شد. به منظور بررسی بیان ژن، واکنش *PCR* با $2/5$ میکرولیتر *cDNA* به همراه $dNTP$ ، $MgCl_2$ ، بافر $10 \times$ ، آنزیم *Taq* پلیمرز (سیناژن، تهران)، آغازگرهای پایین دست و بالادست و آب در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این تحقیق، ژن بتا^۲ میکروگلوبولین ($\beta 2m$)^۱ که یک ژن خانه‌زاد^۲ می‌باشد، به عنوان

کنترل داخلی انتخاب شد. شماره دستیابی ژن‌های تحت مطالعه، توالی پرایمرها و طول محصولات *PCR* در جدول ۱ آورده شده است. مطالعه ریخت شناسی سلول‌های NB4 پس از مهار بیان ژن نوکلئوستمین

جهت بررسی تأثیر مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر ظاهر سلول‌های NB4، تعداد 3×10^4 سلول در ظروف ۹۶ چاهکی کشت داده شد. سلول‌ها با همان غلظت *siRNA* نوکلئوستمین، برای فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده با *siRNA* در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده، توسط میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی رشد و زیستایی^۳ سلولی

برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تربیان بلو استفاده شد. برای این منظور تعداد 3×10^4 سلول در هر چاهک ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. تیمار سلول‌ها با *siRNA* انجام شد و در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تربیان بلو (Sigma، امریکا) مورد شمارش قرار گرفت (۱۶).

بررسی تغییرات ریخت شناسی آپوپتوز

به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (حاوی $10^4 \times 5$ سلول) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (Sigma، امریکا) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن، بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه اسمیر، تغییرات ریخت شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon، ژاپن) مشاهده گردید (۱۷).

بررسی تغییرات ریخت شناسی تمایز

تعداد 3×10^4 سلول در ظروف ۹۶ چاهکی کشت داده شد. سلول‌ها، برای فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با *siRNA* تیمار شدند و آزمون بلع ذرات لاتکس و رایت-گیمسا به ترتیب زیر انجام شد. در آزمون لاتکس توانایی سلول‌های کنترل و تیمار شده جهت بلع ذرات لاتکس دارای پوشش پروتئینی مورد ارزیابی قرار گرفت. سوسپانسیون ذرات لاتکس به نسبت ۱:۱۰ با بافر فسفات سرد رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده با 10^4 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم ۲۰ درصد مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 و

^۱ $\beta 2m$ microglobulin

^۲ house keeping

^۳ Viability

مهار بیان ژن نوکلئوستمین توسط siRNA سبب کاهش

رشد در سلول‌های NB4 می‌شود

رشد و زیستایی سلول‌های NB4 پس از تیمار با siRNA با استفاده از آزمون تریپان بلو بررسی شد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تیمار با siRNA باعث کاهش رشد سلول‌های NB4 به صورت وابسته به زمان شد. شمارش سلول‌های تیمار شده و کنترل با کمک لام هموسایتمتر در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار انجام گرفت. درصد رشد مشاهده شده در این زمان‌ها به ترتیب برابر ۹۱ درصد، ۷۶/۵ درصد، ۷۴/۲ درصد، ۶۴/۹ درصد می‌باشد (شکل ۲- الف) که P value آن‌ها در جدول ۲- الف آمده است. آنالیز آماری این داده‌ها کاهش معنی داری در میزان رشد سلول‌ها نشان داد. میزان زیستایی نیز در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل بررسی گردید (شکل ۲- ب). داده‌ها نشان داد که تا ۴۸ ساعت تفاوت با اهمیتی از نظر آماری در زیستایی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل دیده نمی‌شود ($P = 0.168$). به هر حال در زمان‌های طولانی‌تر یعنی ۷۲ ساعت کاهش معنی داری (تا ۱۶/۴%) در زیستایی نشان داده شد (جدول ۲- ب).

مهار ژن نوکلئوستمین سبب القای تمایز در سلول‌های

NB4 می‌شود

سلول‌های NB4 با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین تیمار شدند و تغییرات ظاهری آن‌ها در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت اتصالات سلول به سلولی مشاهده شد و سلول‌ها به صورت توده‌هایی در کنار هم دیده شدند (شکل ۳). در فاصله‌ی بین زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، اتصالات چسبندگی بین سلولی بیشتر شده، سلول‌ها تغییر شکل داده، برخی از سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل بزرگ تر شدند و به شکل دوکی همراه با زوائد شبیه پای کاذب درآمدند (شکل ۳).

این مشخصات از نظر ظاهری بسیار شبیه مشخصات سلول‌های خونی مونوسیت - ماکروفاژی می‌باشند؛ بنابراین این گونه استنباط می‌گردد که تیمار سلول‌های NB4 با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین سبب القاء یک سری تغییرات ظاهری شبیه تمایز مرحله به مرحله از مونوسیت به ماکروفاژی می‌شود. به منظور بررسی بیشتر اثرات تمایزی از رنگ آمیزی رایت-گیمسا (شکل ۴- الف) و یک شاخص زیست رفتاری یعنی توانایی بیگانه خواری ذرات لاتکس استفاده شد. سلول‌های NB4 سلول‌های کروی و دارای حالت چند شکلی^۱ با نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا می‌باشند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار این سلول‌ها، کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم،

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سلول‌ها ۲ بار با بافر فسفات سرد شستشو داده شدند. سلول‌های دارای حداقل ۱۰ ذره لاتکس بلعیده شده به عنوان سلول‌های دارای توانایی بیگانه خواری در نظر گرفته شدند (۱۸). جهت انجام رنگ آمیزی رایت-گیمسا ابتدا ۱۰ میکرولیتر از رسوب حاوی سلول‌ها روی لام قرار داده شد و پس از خشک شدن اسمیر و تثبیت آن توسط متانول ۱۰۰ درصد به مدت ۴ دقیقه با محلول‌های رایت و گیمسا رنگ آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) بررسی شد (۱۶).

نوع مطالعه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2007، SPSS نسخه ۱۴ و آزمون آماری Student-T-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و داده‌های با ارزش $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی بیان بالای نوکلئوستمین را در سلول‌های NB4 نسبت به سلول‌های تیمار شده تأیید کرد (شکل ۱- الف). پس از اطمینان از بیش بیان این ژن در رده سلولی NB4، سلول‌ها مطابق مطالعات مشابه توسط siRNA تیمار شدند (۱۸). رده سلولی NB4 به عنوان یک مدل از APL می‌باشد که بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان یک مارکر سرطانی در آن بالا می‌باشد و جهت ارزیابی تأثیر siRNA به عنوان مدل مطلوبی به حساب می‌رود. لازم به توضیح است که انتخاب غلظت بهینه برای siRNA بر مبنای اثرات آن در مقالات مختلف (۱۸) و مطالعات اولیه صورت گرفته در آزمایشگاه بوده است. بنابراین سلول‌های NB4 با غلظت ۲۰۰ nM از siRNA اختصاصی نوکلئوستمین تیمار شدند. در نتیجه این تیمار کاهش معنی داری در سطح mRNA ژن نوکلئوستمین مشاهده شد. ۴۸ ساعت بعد از تیمار، سطح mRNA نوکلئوستمین به میزان ۳۶/۱ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.03$) (شکل ۱- ب). اندازه‌گیری مهار بیان نوکلئوستمین در قیاس با ژن $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی صورت گرفت. به منظور بررسی بیان ژن نوکلئوستمین به صورت نیمه کمی، شدت باند مربوطه و نیز باند $\beta 2m$ با استفاده از نرم افزار UVitech در هر نمونه تعیین و نسبت نوکلئوستمین به $\beta 2m$ در دو گروه سلول‌های تیمار شده و کنترل با استفاده از نرم افزار SPSS 14.0 و آزمون آماری Student-t-test مقایسه گردید. شکل ۱- ج قابلیت ورود siRNA در سلول‌های NB4 را نشان می‌دهد.

¹ Polymorphic

در کنار مطالب گفته شده در بالا، داده‌های حاصل از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی با AO/Et Br حاکی از آن است که تعداد کمی از سلول‌های NB4 تیمار شده توسط siRNA پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، کروماتین بسیار فشرده یا قطعه قطعه به رنگ سبز یا نارنجی درخشانی را دارا می‌باشند که نشان دهنده آن است که پس از تیمار سلول‌های NB4 با siRNA و پس از تمایز نهایی این سلول‌ها مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول‌ها رخ می‌دهد (شکل ۵). در واقع این داده‌ها سازگار با نتایج شکل ۲ در مورد مشاهده کاهش زیستایی ۱۶ درصد در زمان ۷۲ ساعت در سلول‌های تیمار شده بود و تأیید می‌کند که مرگ خفیفی از نوع آپوپتوز روی می‌دهد.

لوبیایی شدن هسته، تغییر شکل و واکوئل دار شدن سیتوپلاسم توسط رنگ آمیزی رایت-گیمسا مشاهده شد که این موارد از شاخصه‌های سلول‌های رده مونوسیتی- ماکروفاژی می‌باشند. داده‌های به دست آمده از آزمون بلع ذرات لاتکس نشان دهنده توانایی این سلول‌ها در هضم ذرات لاتکس ۴۸ ساعت پس از تیمار با siRNA می‌باشد (شکل ۴- ب). لازم به ذکر است که تغییر واضحی در مشخصات ظاهری سلول‌های تیمار شده با siRNA غیراختصاصی نوکلئوستمین (siRNA نامرتب: IR) دیده نشد.

پس از تمایز نهایی سلول‌های NB4 تیمار شده با NS-siRNA، مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول‌ها رخ می‌دهد

جدول شماره (۱): توالی پرایمرهای به کار رفته برای تکثیر ژن $\beta 2m$ و نوکلئوستمین.

آغازگر $\beta 2m$ (NM004048): قطعه حاصل از PCR ۱۹۱ جفت باز می‌باشد.

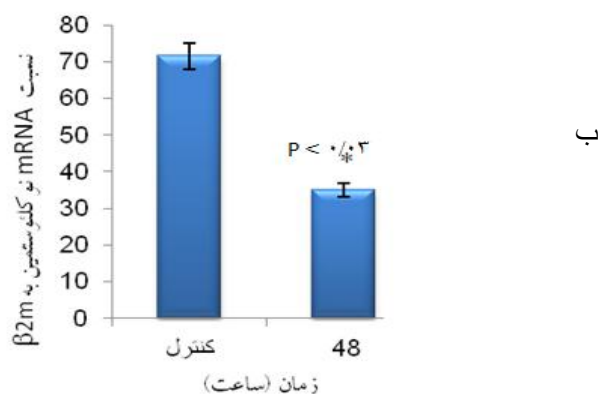
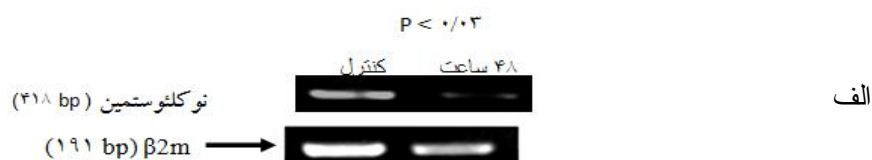
آغازگر جلویی 5'-CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3'

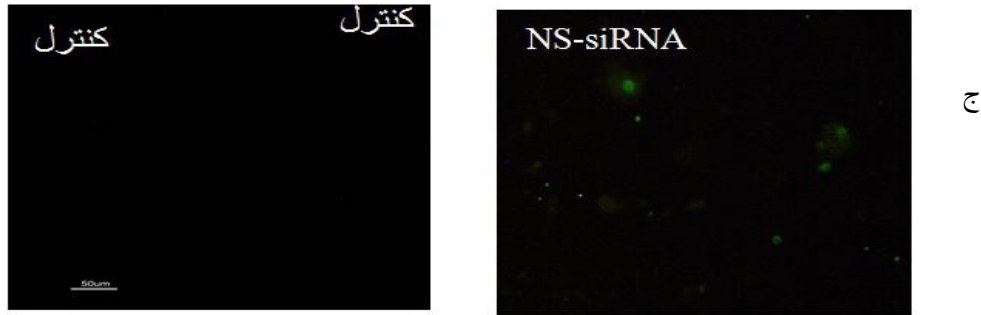
آغازگر برگشتی 5'-GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3'

آغازگر نوکلئوستمین (NM014366, NM206825, NM206826): قطعه حاصل از PCR ۴۱۸ جفت باز می‌باشد.

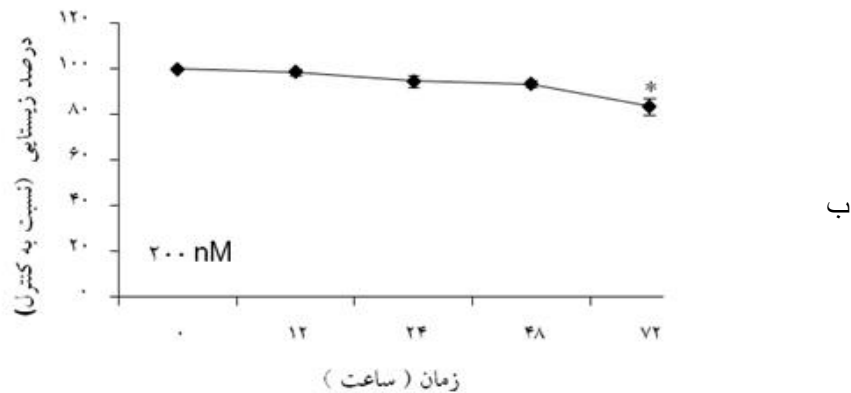
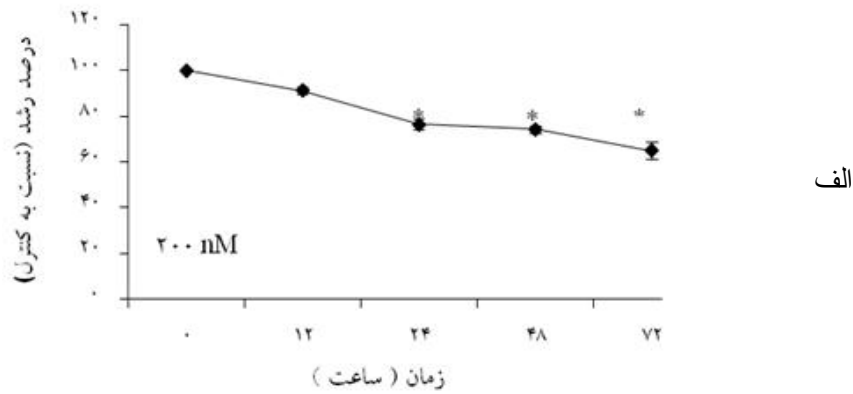
آغازگر جلویی 5'-AAAGCCATTCGGGTTGGAGT-3'

آغازگر برگشتی 5'-ACCACAGCAGTTTGGCAGCAC-3'





شکل شماره (۱): بررسی اثرات اختصاصی نوکلئوستمین بر بیان این ژن. الف) اثرات NS-siRNA بر میزان بیان mRNA نوکلئوستمین در سلول‌های NB4 به کمک الکتروفورز ژل آگارز و RT-PCR. سلول‌های NB4 توسط siRNA تیمار شدند و بعد از ۴۸ ساعت بیان ژن نوکلئوستمین توسط RT-PCR بررسی گردید. ب) نمودار نسبت mRNA نوکلئوستمین به $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی. داده‌های معنی دار از نظر آماری با ستاره مشخص شده‌اند. ج) مطالعه قابلیت ورود siRNA نوکلئوستمین در سلول‌های NB4. شکل سمت: چپ تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های NB4 کنترل بدون تیمار، شکل سمت راست: تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های NB4 تیمار شده با siRNA نشان‌دار شده توسط فلورسین ۴۸ ساعت پس از تیمار



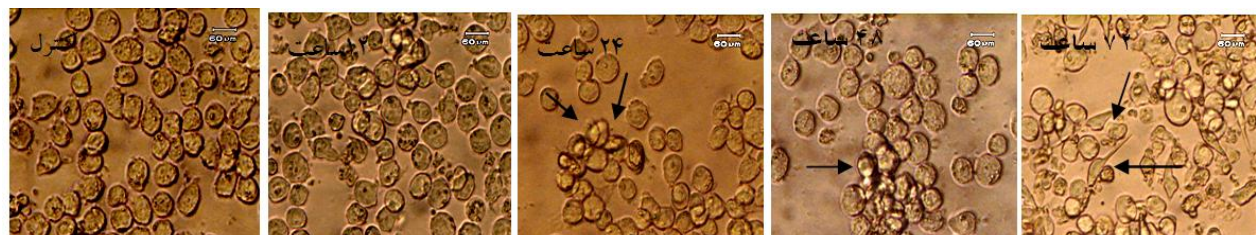
شکل شماره (۲): نمودار اثرات مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر روی رشد و زیستایی سلول‌های NB4. سلول‌ها پس از تیمار با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین و در فاصله‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ توسط آزمون تریپان بلو مورد مطالعه قرار گرفتند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند. نتایج از سه آزمایش مستقل و حاصل سه بار تکرار می‌باشد و داده‌های دارای ($P < 0.05$) از نظر آماری معنی دار می‌باشند.

جدول شماره (۲): الف) مقایسه آماری درصد رشد سلول‌های NB4 تیمار شده با NS-siRNA با استفاده از تست آماری Student-T-test

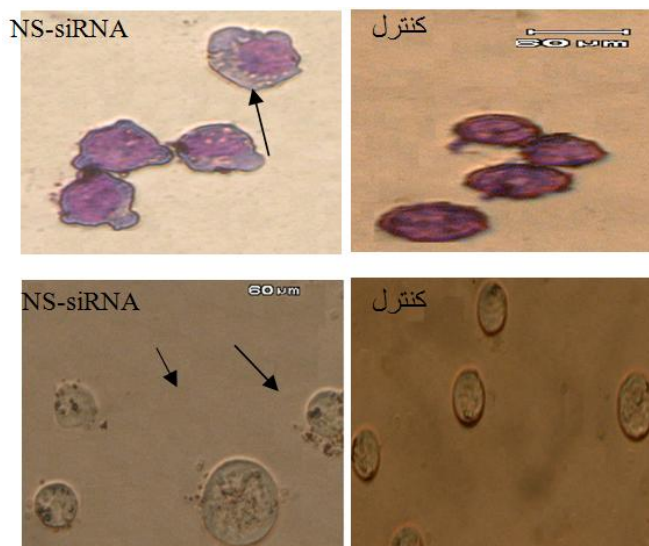
غلظت (نانو مولار)	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰ کنترل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۲۰۰ nM	۹۱/۲	۷۶/۵	۷۴/۲	۶۴/۹
p Value	p = ۰/۱۴۸	p = ۰/۰۳۱	p = ۰/۰۱۱	p = ۰/۰۰۲

جدول شماره (۲): ب) مقایسه آماری درصد زیستایی سلول‌های NB4 تیمار شده با NS-siRNA با استفاده از تست آماری Student-T-test

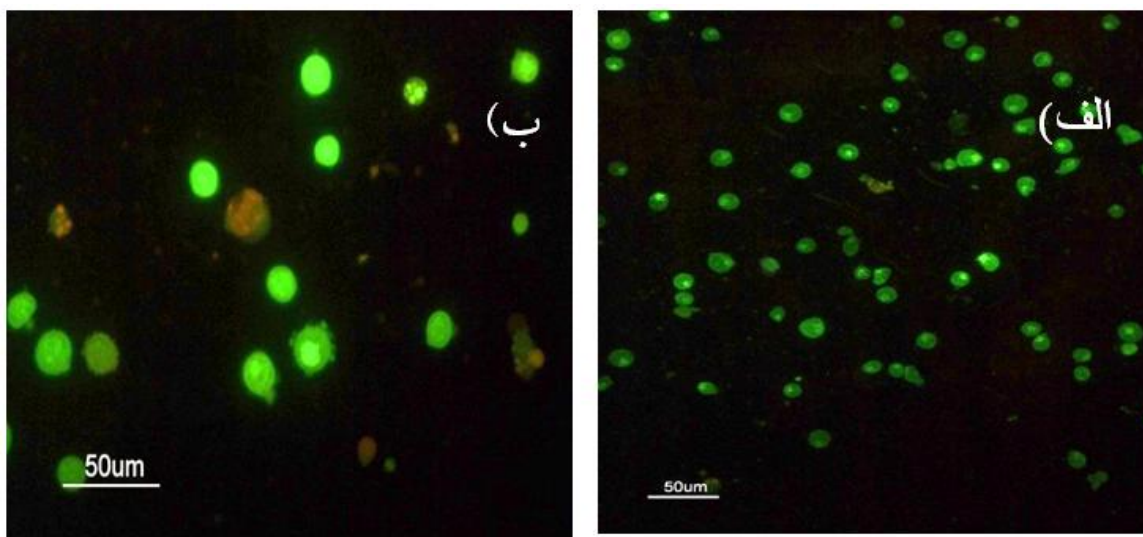
غلظت (نانو مولار)	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰ کنترل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۲۰۰ nM	۹۸/۶	۹۴/۶	۹۳/۴	۸۳/۶
p Value	p = ۰/۳۳۲	p = ۰/۲۰۵	p = ۰/۱۶۸	p = ۰/۰۴۲



شکل شماره (۳): تأثیر مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر ریخت شناسی سلول‌های NB4. سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ نانومولار NS-siRNA تیمار شدند و تغییرات ظاهری آن‌ها در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با میکروسکوپ نوری (درشت نمایی ۴۰×) مورد بررسی قرار گرفت. تغییر شکل و دوکی شدن سلول‌های NB4 با فلش نشان داده شده است.



شکل شماره (۴): اثرات مهار ژن نوکلئوستمین بر ریخت شناسی سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 به مدت ۴۸ ساعت با NS-siRNA تیمار شدند. الف) ریخت شناسی سلول‌ها توسط رنگ آمیزی رایت-گیمسا بررسی شد. سلول‌های تیمار شده با NS-siRNA ویژگی‌های ریخت شناسی تمایز مونوسیتی هم چون تراکم هسته‌ای، هسته لوبیایی شکل و تغییر شکل و واکوئل دار شدن سیتوپلاسم را نشان دادند (با فلش نشان داده شده‌اند). ب) سلول‌های NB4 به مدت ۴۸ ساعت NS-siRNA تیمار شدند و ویژگی‌های زیست رفتاری آن‌ها توسط آزمون بلع ذرات لاتکس بررسی شد (با فلش نشان داده شده‌اند).



شکل شماره (۵): اثرات مهار ژن نوکلئوستمین بر آپوپتوز سلول‌های NB4. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با NS-siRNA تیمار شدند و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید-آکریدین اورنج توسط میکروسکوپ فلورسنس بررسی شدند. (الف) تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های کنترل بدون تیمار siRNA. (ب) تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های تیمار شده توسط NS-siRNA. وجود سلول‌های سبز و یا نارنجی با هسته‌ی متراکم حاکی از وقوع آپوپتوز می‌باشد (در اینجا با علامت فلش نشان داده شده‌اند)

بحث

بیماری خونی لوسمی با ازکارافتادن و توقف مسیرهای بلوغ میلوئیدی شناسایی می‌شود. به همین دلیل یک راهکار درمانی برای درمان لوسمی القا تمایز نهایی و پیری متعاقب آن است (۱۹). این رویکرد در APL بسیار کارآمد هست. لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد (APL) زیر نوع M3 از AML می‌باشد (۲۰). رده سلولی NB4 به عنوان مدل آزمایشگاهی APL می‌تواند مدل مناسبی برای بررسی نقش نوکلئوستمین در تنظیم خودنوایی و تکثیر این سلول‌ها در نظر گرفته شوند. در این مطالعه، بیان نوکلئوستمین در رده سلولی NB4 و اثرات ناشی از مهار این ژن به واسطه استراتژی siRNA گزارش شده است. ژن نوکلئوستمین بیان بالایی را در سلول‌های NB4 نشان داد. در مطالعات قبلی نیز بیش بیان نوکلئوستمین در رده‌های مختلف سرطانی از قبیل رده سلولی هپاتوکارسینوما (Hep G2)، دهانه رحم (Hela)، استئوسارکوما (OS-732)، سرطان مثانه (5637)، سرطان معده (SGC-7901)، سینه (MMK-7)، پروستات (PC-3)، لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد (HL-60) و برخی از انواع بافت‌های سرطانی گزارش شده است (۷-۱۲).

که تیمار سلول‌های NB4 با ۲۰۰ nM از siRNA اختصاصی نوکلئوستمین دارای اثرات مهار رشدی می‌باشد و مهار رشد غالب‌ترین اثر تیمار تا ۷۲ ساعت است. مهار نوکلئوستمین توسط siRNA اختصاصی نوکلئوستمین در رده سلولی NB4 سبب کاهش در نرخ تکثیر سلولی شد، به طوری که پس از گذشت ۷۲ ساعت این کاهش تا حدود ۳۵/۱ درصد از کل جمعیت سلول‌ها را شامل بود. در مطالعه‌ای که توسط مولی و همکاران در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی انجام گرفته است، نیز نتایج مشابهی مبنی بر کاهش نرخ تکثیر سلولی به دست آمده است (۲۱). در رده سلولی سرطانی مثانه 5637 و رده سلولی دهانه رحم (Hela) نیز میزان تکثیر سلول‌ها با مهار نوکلئوستمین کاهش یافته است (۲۳، ۲۲). این یافته‌ها مبنی بر کاهش القا شده در نرخ تکثیر سلولی در پی مهار نوکلئوستمین، نشان دهنده نقش تنظیمی عمده نوکلئوستمین در پیشبرد چرخه سلولی و خودنوایی سلول‌های سرطانی و سلول‌های بنیادی می‌باشد. با این حال در مطالعه‌ای که توسط کافینه و همکاران انجام شد با سرکوب بیان ژن نوکلئوستمین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، تغییر قابل ملاحظه‌ای در نرخ تکثیر سلولی مشاهده نشد (۱۳).

مطالعات ما آشکار کرد که تیمار با siRNA در ۷۲ ساعت سبب القای تمایز سلول‌های NB4 می‌شود. وقوع تمایز به موازات مهار رشد

بررسی بیان نوکلئوستمین در نمونه‌های خونی سالم نشان داده است که به جز چند مورد نادر دارای بیان کم، این ژن در نمونه‌های خونی سالم بیان نمی‌شود (۱۲). نتایج مطالعات ما حاکی از آن است

که سلول‌های بالغ خونی دارای طول عمر کوتاهی در بدن و آزمایشگاه می‌باشند. بنابراین در نتیجه آپوپتوز می‌میرند (۲۰). اما در رده سلولی سرطانی پروستات (PC-3) در اثر تیمار با پلاسمید حاوی ShRNA اختصاصی نوکلئوستمین کاهش رشد و افزایش آپوپتوز اولیه دیده شده است (۱۰).

نتایج حاصل از بررسی مرگ برنامه ریزی شده سلولی در رده سلولی سرطان مثانه توسط رنگ‌های اختصاصی آنکسین V-FITC و پروپیدوم آیویدید نشان داده است که مهار بیان نوکلئوستمین در رده سلولی 5637 منجر به وقوع آپوپتوز می‌شود (۱۱). در سلول‌های HL-60 در اثر خاموشی بیان ژن نوکلئوستمین آپوپتوز دیده شده است (۲۵). نتایج مطالعات ما در سلول‌های خونی به نظر می‌رسد آپوپتوز مستقیم نیست چون ما در زمان طولانی دیدیم. در واقع آپوپتوز خودبخودی^۳ بعد از تمایز دیده می‌شود که در مونوسیت نشان داده شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که غالب‌ترین اثر تیمار سلول‌های NB4 با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین مهار رشد است که در پی آن تمایز سلولی روی داده و مرگ سلولی خودبخودی پس از وقوع تمایز در زمان‌های تیمار طولانی‌تر روی می‌دهد.

نتیجه‌گیری

مهار ژن نوکلئوستمین در سلول‌های NB4 منجر به اثرات مهار رشدی و القاء تمایز در این سلول‌ها شد. چنانچه بتوان توسط روش‌های مهار ژن نوکلئوستمین خاصیت تکثیر سلول‌های لوسمی را کاهش داده و آن‌ها را به سمت تمایز سوق دهیم، گام مهمی در جهت درمان بیماران APL صورت گرفته است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از بیمارستان شهید قاضی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و امور پژوهشی دانشگاه تبریز که هزینه‌ی این طرح را تقبل فرموده‌اند ابراز می‌دارند.

نیاز به توقف چرخه سلولی برای تمایز را پیشنهاد می‌کند. کاهش بیان نوکلئوستمین می‌تواند خروج سلول‌ها از چرخه سلولی نرمال و در نهایت تمایز را القا کند (۸). اتصال سلول به سلول و اتصال سلول‌های تیمار شده به پلیت‌های کشت از جمله نشانه‌های تمایز سلول‌های لوسمی به سمت مونوسیت-ماکروفاژی است (۱۹). بررسی‌های ریخت شناسی و بیولوژیکی سلول‌های NB4 توسط آزمون بلع ذرات لاتکس و رنگ آمیزی رایب-گیمسا نیز حاکی از وقوع تمایز به سمت رده مونوسیت-ماکروفاژی پس از مهار ژن نوکلئوستمین می‌باشد. در یک مطالعه مشابه در بررسی اثرات مهار ژن نوکلئوستمین در رده سلولی HL-60 نیز نتایج مشابهی مبنی بر القای تمایز در این سلول‌ها به سمت رده مونوسیت-ماکروفاژی به دست آمده است (۸). هر چند میزان مهار رشد و القای تمایز در HL-60 بیش از مطالعه ما بوده است که علت آن می‌تواند کارایی بالاتر shRNA اختصاصی بکار رفته در HL-60 در خاموش کردن ژن نوکلئوستمین باشد (۸). چندین ترکیب نیز همچون^۱ DMSO و^۲ ATRA سبب القای تمایز سلول‌های AML به سمت گرانولوسیت می‌شوند (۲۰). ۱۲-۱- تترادکانوئیل-۱۳ استات (TPA) و ۱-۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 سلول‌های AML را به سمت مونوسیت و ماکروفاژ سوق می‌دهند (۱۹).

گرچه تمایز درمانی در درمان APL نسبت به شیمی درمانی بسیار کارآمدتر می‌باشد بقای طولانی مدت هنوز حل نشده است (۱۹). این بدان معنی است که به راهکارها و عوامل درمانی جدید کارآمدتری نیاز است. ما نشان دادیم که در اثر مهار بیان ژن نوکلئوستمین در سلول‌های NB4 کاهش زیستایی چندانی وجود ندارد و مرگ خفیفی از نوع آپوپتوز رخ می‌دهد که در زمان‌های بالای ۷۲ ساعت پس از تیمار و در زمان‌هایی به وقوع می‌پیوندد که می‌تواند مربوط به آپوپتوز خودبخودی بعد از تمایز نهایی سلول‌های NB4 تیمار شده با siRNA باشد. داده‌های میکروسکوپ فلورسانس نیز وقوع خفیف آپوپتوز را در ۷۲ ساعت تأیید کردند. هم چنین گزارش شده است که آپوپتوز دارای نقش مهمی در حذف گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌های فعال شده است. این بدان دلیل است

³ Spontaneously

¹Dimethyl sulfoxide

²All-trans retinoic acid

References:

1. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *Engl J of Med* 1999; 341: 1051-62.
2. Zhou GB, Chen SJ, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy. *Hem* 2005; 10: 270-80.
3. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 1-28.
4. Tsai RYL, McKay RDG. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002; 16(23):2991-3003.
5. Robert YL, Tsai RYL, McKay RDG. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 2005; 168(2):179-84.
6. Ma H, Pederson T. Depletion of the Nucleolar Protein Nucleostemin Causes G1 Cell Cycle Arrest via the p53 Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 2007; 18(7): 2630-5.
7. Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, et al. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9):1246-9.
8. Yue B, Lu J, Wang Y, Yu L, Wang Q, Liu S, et al. Effects of Nucleostemin gene silencing on morphology and cytochemistry of HL-60 cells. *Life Sci J* 2008; 5 (2): 9-14.
9. Liu SJ, Zhang ZH, Zhang DQ, Sui XM, Liu Y, Cai ZW, et al. Gene profiling after knocking-down expression of nucleostemin in HeLa cells using oligonucleotide DNA microarray. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25(4):575-83.
10. Liu RL, Zhang ZH, Zhao WM, Wang M, Qi SY, Li J, et al. Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. *China Med J* 2008; 121(4):299-304.
11. Nikpour P, Mowla SJ, Jafarnejad SM, Fischer U, Schulz WA. Differential effects of Nucleostemin suppression on cell cycle arrest and apoptosis in the bladder cancer cell lines 5637 and SW1710. *Cell Prolif* 2009; 42(6):762-9.
12. Yue B, Sun L, Zhao X, Chen Y, Wang Q, Liu S, et al. Expression of Nucleostemin Gene in Human Acute Leukemic Cells. *Life Sci J* 2006; 3(2):12-16.
13. Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of Proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem Cells* 2006; 24(4):1113-20.
14. Matokanovic M, and Barisic K. RNA Interference as a tool in Therapeutics, *Food Technol Biotechnol* 2009; 47 (3) 229-35.
15. Sledz CA, Williams BRG. RNA interference in biology and disease. *Blood* 2005; 106(3):787-94.
16. Ahmadi AH, Moosavi MA. The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line. *Arak Med Univ J (AMUJ)* 2010; 13(3): 1-11. (Persian)
17. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The Cytotoxic and Anti-proliferative Effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat Cells Is Reduced by Guanosine. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38(4): 391-8.
18. Moosavi MA, Seyed Gogani N, Asvadi I, Asadi M. Nucleostemin gene silencing by siRNA and growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction of K562 leukemia cell line. *Arak Medical University Journal (AMUJ)* 2012 □ 14(59): 104-16.
19. Meshkini A, Yazdanparast R, Haidari M. Differentiation and Apoptosis of U937 Leukemia Cells by an Active Compound from *Dendrostellera lessertii*. *Iran Biomed J* 2009 □ 13 (1): 35-42.
20. Lanotte M, Thouvenin MV, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible

- cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 1991; 77: 1080-6.
21. JafarNejad SM, Mowla SJ, Matin M. Functional Inhibition of nucleostemin Gene-according of self-renewal ability- in bone marrow derived mesenchymal stem cells by RNAi strategy. *J Iran Anatomic Sci* 2006; 4(3):205-14.
22. Nikipour P, Jafarnejad SM, Forouzandeh M, Mowla SJ. Knocking down of nucleostemin gene expression in human bladder cancer cell line by RNA interference strategy. *Modarres J Med Sci* 2007-8; 10 (3):85-93.
23. Sijin L, Ziwei C, Yajun L, Meiyu D, Hongwei Z, Guofa H, et al. The Effect of Knocking-down Nucleostemin Gene Expression on the in vitro Proliferation and in vivo Tumorigenesis of HeLa Cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23(3): 529-38.
24. Yue B, Yu L, Wang Y, Effects of silent nucleostemin gene expression on apoptosis of HL-60 cells in vitro. 2009;17(2):319-23.

STUDY THE EFFECT OF NUCLEOSTEMIN GENE SILENCING BY SIRNA ON GROWTH INHIBITION AND DIFFERENTIATION IN NB4 PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE

Moosavi MA^{1*}, Moghtaran Bonab N², Hoseinpour Feizi MA³, Seyed Gogani N⁴, Asvadi Kermani F^{5*}

Received: 05 Nov, 2012; Accepted: 01 Feb, 2013

Abstract

Background & Aims: Acute promyelocytic leukemia (APL) is a malignant hematopoietic disorder caused by indefinite proliferation and lack of differentiation of leukemia stem cells. Elucidation of signaling pathways involved in leukemic stem cells are current strategies in treatment of leukemias. In this content, nucleostemin (NS) plays a critical role in proliferation and self renewal of stem and cancer cells. In the present study, effects of NS gene silencing on proliferation, differentiation and apoptosis in NB4 cell line as an APL model have been studied for the first time.

Materials & Methods: NB4 cell line was cultured in the presence of 200 nM NS-siRNA and after transfection with Nucleostemin specific siRNA nucleostemin gene expression pattern was evaluated by Semi-quantitative RT-PCR. Trypan blue exclusion test and fluorescent microscopy were used to study growth inhibitory and apoptotic effects, respectively. Differentiation was studied morphologically and biologically using Wright-Giemsa staining and latex particle phagocytic activity, respectively.

Results: NS gene was highly expressed in NB4 cells. NS-siRNA transfection into NB4 cells at 200 nM inhibited nucleostemin mRNA level up to 36.1% after 48h when compared to corresponding control cells. Between 12-72 hours after transfection, the cell growth was decreased up to 35.1% and differentiation characteristics such as decrease in nuclear cytoplasm ratio and ingestion of latex particles were observed, confirmed that differentiation toward monocytic/macrophagic Linage.

Conclusion: According to differentiating and growth inhibitory effects of NS inhibition in NB4 cells, it can be proposed as a new target for treatment of APL patients.

Keywords: Nucleostemin, Differentiation, Growth inhibition, siRNA, NB4

Address: Department of Zoology, Faculty of Natural, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Tel: +98-411-3392741

E-mail: moosav_m@tabrizu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2013; 24(2): 132 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Department of Zoology, Faculty of Natural Science, The University of Tabriz, Tabriz, Iran

² MSc of Biochemistry, Department of Zoology, Faculty of Natural Science, The University of Tabriz, Tabriz, Iran

³ Professor, Department of Zoology, Faculty of Natural Science, The University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴ MSc of Biochemistry, Department of Zoology, Faculty of Natural Science, The University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁵ Professor, Hematology and Oncology Research Center, The Medical Science University of Tabriz, Tabriz, Iran