

Original Paper

Comparison of the effect of lead acetate and Sodium Sulfide poisoning on *Npm1* gene expression in adult male rats

Razieh Mottahedzadeh, Ph.D in Biology – Physiology, Shiraz, Iran.

ORCID 0000-0001-8928-9485

*Saeed Khatamsaz (Ph.D), Corresponding Author, Associate Professor, Department of Biology, College of Science, Jeroft Branch, Islamic Azad University, Jeroft, Iran. E-mail: saeed1617@yahoo.com

ORCID 0000-0001-7332-9657

Mohammad Javad Mokhtari (Ph.D), Assistant Professor, Department of Biology, College of Science, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran.

ORCID 0000-0001-5066-9632

Abstract

Background and Objective: Evaluation of effective factors in the incidence of leukemia, especially pollutants, such as Sodium Sulfide and lead acetate, can contribute to the treatment of cancer and prevention of disease. *Npm1* gene is a multiple Phosphoprotein that contains several action domains. *Npm1* gene is encoded between nucleus and cytoplasm and performs several functions including protein ribosome transfer and control of centrosome proliferation. *Npm1* mutations are transferred from the nucleus to the cytoplasm. This study was conducted to compare the effect of lead static poisoning and sodium sulfide on *Npm1* gene expression in adult male rats.

Methods: In this experimental study, 48 adult male rats were allocated into 6 groups. The experimental groups include control, the first and second experimental groups were received sodium sulfide with doses of 300 mg/kg/bw and 600 mg/kg/bw, respectively. The third and fourth experimental groups were received lead acetate with doses of 30 mg/kg/bw and 60 mg/kg/bw, respectively. The fifth experimental groups were received maximum doses of sodium sulfide and lead acetate, respectively. Lead acetate and sodium sulfide were gavaged daily for 4 months. After that, blood was taken from the mice and RNA was extracted. Then, CDNA synthesis and *Npm1* gene expression compared to Ywhaz gene were evaluated quantitatively using Real Time PCR.

Results: *Npm1* gene expression reduced in groups were received sodium sulfide at doses of 300 and 600 mg/kg body weight. *Npm1* expression increased in lead static groups with doses of 30 and 60 mg/kg body weight.

Conclusion: This study showed that by increasing the expression of *Npm1* gene expression, Threshold Cycle value decreases.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, Lead, *Nucleophosmin* Gene, Rats

Received 12 Apr 2020

Revised 19 Jan 2021

Accepted 1 Jan 2021

Cite this article as: Mottahedzadeh R, Khatamsaz S, Mokhtari MJ. [Comparison of the effect of lead acetate and Sodium Sulfide poisoning on *Npm1* gene expression in adult male rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021 Spring; 23(1): 31-37. [Article in Persian]

مقایسه اثر مسمومیت با استات سرب و سولفید سدیم در میزان بیان ژن *Npm1* موش‌های صحرائی نر بالغ

ORCID 0000-0001-8928-9485

ORCID 0000-0001-7332-9657

ORCID 0000-0001-5066-9632

دکتر راضیه متحدزاده، دکتری تخصصی زیست شناسی - فیزیولوژی، شیراز، ایران.

* دکتر سعید خاتم ساز، دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران.

دکتر محمدجواد مختاری، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ارزیابی عوامل مؤثر در بروز لوسمی به خصوص مواد آلاینده مانند استات سرب و سولفید سدیم می‌توانند کمک شایانی به درمان سرطان و همچنین پیشگیری از این بیماری نماید. *Npm1* یک فسفوپروتئین چند منظوره است که شامل چندین *domain* عملکردی است. ژن *Npm1* بین هسته و سیتوپلاسم رمزگذاری شده و چندین عملکرد شامل انتقال ریبوزوم پروتئینی و کنترل تکثیر سانتروم را انجام می‌دهد. جهش‌های *Npm1* از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. این مطالعه به منظور مقایسه اثر مسمومیت با استات سرب و سولفید سدیم در میزان بیان ژن *Npm1* موش‌های صحرائی بالغ انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۸ سر موش صحرائی نر بالغ به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل کنترل، گروه‌های تجربی اول و دوم دریافت کننده سولفید سدیم به ترتیب با دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ mg/kg/bw و گروه‌های تجربی سوم و چهارم دریافت کننده استات سرب به ترتیب با دوزهای ۳۰ و ۶۰ mg/kg/bw و گروه تجربی پنجم دریافت کننده دوز حداکثری سولفید سدیم و استات سرب بودند. استات سرب و سولفید سدیم روزانه به مدت ۴ ماه گاوژ شد. بعد از آن خونگیری از موش‌ها انجام و استخراج RNA صورت گرفت. سپس *CDNA* سنتز و میزان بیان ژن *Npm1* نسبت به ژن *Ywhaz* با استفاده از *Real Time PCR* کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان بیان ژن *Npm1* در گروه‌های دریافت کننده سولفید سدیم با دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، کاهش یافت. میزان بیان ژن *Npm1* در گروه‌های دریافت کننده استات سرب با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که با افزایش میزان بیان ژن *Npm1* مقدار *Threshold Cycle* کاهش می‌یابد.

کلید واژه‌ها: لوسمی لنفوئید حاد، سرب، ژن *Npm1*، موش صحرائی

* نویسنده مسؤول: دکتر سعید خاتم ساز، پست الکترونیکی saeed1617@yahoo.com

نشانی: جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن ۰۳۴-۲۳۲۳۰۳۵۵

وصول مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۲۴، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۱۰/۳۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۱۳

مقدمه

مسمومیت با سرب اثرات زیادی داشته و تغییراتی در زیر میکروسکوپ یافت می‌شود. محدودده سرب خون (Pb Blood) حدود ۷۰-۸۰ Mg/dl است. سطح سرب در بزرگسالان ۲۰-۳۰ Mg/dl و در کودکان کمتر از ۴۰ Mg/dl است (۳). سرب اثرات مستقیمی در سیستم خون دارد که سنتز هموگلوبین به وسیله آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز آهن مهار می‌شود. همچنین کاهش اریتروسایت‌ها به وسیله افزایش غشاء سلول‌های شکننده صورت می‌گیرد (۴).

مکانیسم سرب در بدن به طور دقیق مشخص نیست؛ ولی ممکن است شامل انتقال فعال یا انتشار از طریق سلول‌های اپی‌تلیال روده (سلول) یا بین سلولی (پاراسلولی) باشد و ممکن است شامل سرب یونیزه (Pb²⁺) به صورت معدنی یا آلی باشد (۵).

گوگرد توسط Antoine Lavoisier به رسمیت شناخته شد. گوگرد جامد، زرد، شکننده و بی بو است (۶). گوگرد یک ترکیب

سرب به عنوان یک ماده صنعتی بسیار مورد استفاده قرار گرفته و قرار گرفتن جوامع امروزی در معرض آلاینده‌های محیطی اجتناب‌ناپذیر گشته است. عوارض حاصل از مواجهه با این آلاینده‌ها به خصوص تغییر بیان ژن *Npm1* تا حدودی ناشناخته است (۱). ترکیبات سرب به دو گروه ارگانیک و غیرارگانیک تقسیم می‌شوند. ترکیبات ارگانیک سرب، ترکیب کربن و هیدروژن هستند. ترکیبات سرب که با بنزین ترکیب می‌شوند؛ نظیر تترااتیل سرب و تترااتیل سرب مثال‌هایی از این گروه هستند. ترکیبات غیرارگانیک سرب شامل اکسید سرب و کلرید سرب است (۲).

در مطالعات حیوانی مشخص شده که سرب علت تومور یا مشکلات سلامتی است. همچنین مطالعات نشان داده که علت سرطان نوع تغییراتی است که در سلول‌های سرطانی شکل می‌گیرد. بیش از ۲۰ تا ۲۵ سال قبل پاتولوژیست‌ها توضیح دادند که

ضروری در فعالیت فیزیولوژیکی طبیعی است و با اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها ترکیب می‌شود. انسان‌ها مواد تغذیه‌ای مورد نیاز برای گوگرد را توسط گیاهان و جانوران در رژیم غذایی خود که در شیر، پنیر، پیاز، تخم مرغ، میوه و سبزیجات است؛ تامین می‌کنند (۷).

در سرطان، متابولیسم مس و گوگرد دچار بی‌نظمی و منجر به اثرات جانبی مخرب می‌شود. این اطلاعات به وسیله مطالعاتی که در غلظت این عناصر صورت گرفته؛ مشخص شده و نشان داده شده است که بیماران مبتلا به سرطان تغییراتی در مقدار مس و گوگرد را نشان می‌دهند. در ونکوور کانادا روی ترکیبات گوگرد آلی مطالعاتی انجام شد و مشخص گردید که ترکیبات گوگرد آلی علت سرطان است (۸).

ترکیبات بیولوژی گوگرد، شامل سیستین، متیونین، گلو تاتیون و ترکیبات دیگر گوگرد است. گوگرد یک عنصر ضروری برای زندگی است و در فرآیندهای بیوشیمیایی استفاده می‌شود. در انسان شواهد زیادی وجود دارد که دستگاه تنفسی یکی از اهداف اصلی مسمومیت با گوگرد است. اثرات تنفسی در انسان به صورت حاد و مزمن رخ می‌دهد. به طور کلی، شرایط محیط گرم به افزایش شدت اثرات تنفسی گوگرد می‌انجامد (۹).

5q35 موقعیت ژن *Npm1* (*nucleophosmin1*) بر روی کروموزوم است. *Npm1* یک پروتئین چندتایی (multiple) است که عمدتاً بین بخش‌های هسته‌ای و سیتوپلاسم در داخل هسته مرکزی قرار داشته و بخشی از آن در ریبوزوم و تنظیم P53 قرار دارد (۱۰).

Npm نوکلئوفسمین یک فسفوپروتئین با میزان بیان بالا در سلول‌های در حال تکثیر و عضوی از خانواده پروتئینی نوکلئوپلاسمین *Npm* است که عمدتاً در حالت طبیعی در هسته قرار دارد (۱۱-۱۳). جهش‌های *Npm1* ارتباط مستقیم با شمارش سلول‌های سفید خون، کاربوتایپ نرمال و جهش‌های FLT3 ITD (*internal tandem duplication*) دارند. *Npm1* غالباً در هسته و برای فعالیت مولکول‌های نگهبان (Guard) پروتئین‌ها، به جابه‌جایی پروتئین‌های ریبوزومی در غشاء هسته کمک می‌کنند (۱۴). به‌نظر می‌رسد جهش‌های *Npm1* منجر به کسب تغییرات ژنتیکی اضافی توسط سلول‌های لوسمییک (Acute Myeloid Leukemia: AML) می‌گردند (۱۵). این مطالعه به منظور مقایسه اثر مسمومیت با استات سرب و سولفید سدیم در میزان بیان ژن *Npm1* موش‌های صحرایی

بالغ انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 200 ± 10 گرم در محدوده سنی ۲/۵ تا ۳ ماه تهیه شده از مؤسسه سرم‌سازی رازی کرج در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و آزمایشگاه ژنتیک دکتر گودرزی شیراز در سال ۱۳۹۶ انجام شد. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب وزارت بهداشت رعایت گردید. همچنین مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش (IR.IAU.KAU.REC.1398.121) دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون قرار گرفت.

به‌طور کلی حیوانات به ۶ گروه ۸ تایی به شرح زیر تقسیم شدند. گروه کنترل: مداخله‌ای صورت نگرفت.

گروه تجربی اول: ایجاد مسمومیت با دریافت سولفید سدیم با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه (در ساعت ۸ صبح) به مدت ۴ ماه از طریق گاوآژ (۱۷ و ۱۶).

گروه تجربی دوم: ایجاد مسمومیت با دریافت سولفید سدیم با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه (در ساعت ۸ صبح) به مدت ۴ ماه از طریق گاوآژ (۱۷ و ۱۶).

گروه تجربی سوم: ایجاد مسمومیت با دریافت استات سرب با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه (در ساعت ۸ صبح) به مدت ۴ ماه از طریق گاوآژ (۱۷ و ۱۶).

گروه تجربی چهارم: ایجاد مسمومیت با دریافت استات سرب با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه (در ساعت ۸ صبح) به مدت ۴ ماه از طریق گاوآژ (۱۷ و ۱۶).

گروه تجربی پنجم: ایجاد مسمومیت با دریافت استات سرب با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن توام با دریافت سولفید سدیم با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن روزانه (در ساعت ۸ صبح) به مدت ۴ ماه از طریق گاوآژ (۱۷ و ۱۶).

برای انتخاب دوز سولفات سدیم طبق مطالعه Jakubowski و همکاران (۱۶) از دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و برای انتخاب دوز استات سرب طبق مطالعه Sunday و همکاران (۱۷) از دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد. گروه توام استات سرب و سولفید سدیم نیز بر اساس دوز ماکزیمم انتخاب شدند.

در پایان ۴ ماه از موش‌ها خونگیری به‌عمل آمد. با استفاده از

جدول ۱: طراحی پرایمر، ژن *YWHAZ* و ژن *Npm1*

Gene Name	Oligo	Primer seq. 5'-3'	Length	GC%	Amplicon (bp)
<i>Ywhaz</i>	F	TCGAGTATTGAGCAGAAGACGG	22	44	157
	R	GCCAAGTAGCGGTAGTAGTCAC	22	40	
<i>Npm1</i>	F	GGAAGACTCGATGGACATGGAC	22	54.5	153
	R	CCTGCTCCTAAACTGACCGTTC	22	54.5	

جدول ۲: مقایسه گروه‌های مختلف و اثر بیان ژن *Npm1*

گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار	اختلاف میانگین	p-value
کنترل	۰/۹۹±۰/۳	۲۱/۲	۰/۰۰۰۸**
تجربی اول	۸/۱۵±۰/۳۸	-۸/۵۲	۰/۱۲۴
تجربی دوم	۰/۶۸±۰/۳۹	۱۰/۰۳	۰/۵۸
تجربی سوم	۱/۰۶±۰/۳۸	۱۰/۴۸	۰/۰۰۰۳**
تجربی چهارم	۴/۲۳±۰/۳۹	-۶/۳۲	۰/۰۰۱۹*
تجربی پنجم	۰/۶۳±۰/۳۴	۱۲/۶۷	۰/۰۰۹۵*

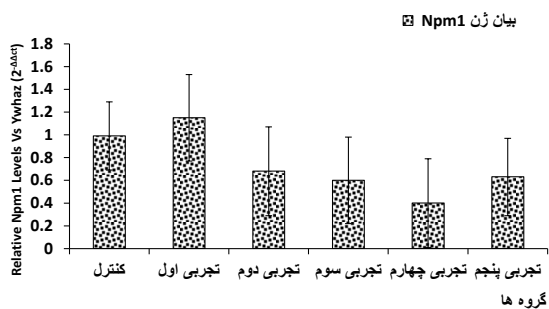
$P < ۰/۰۰۱$ **, $P < ۰/۰۵$ *

گروه‌های تجربی اول و دوم دریافت کننده سولفید سدیم به ترتیب با دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن گروه‌های تجربی سوم و چهارم دریافت کننده استات سرب به ترتیب با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن گروه تجربی پنجم دریافت کننده استات سرب با دوز ۶۰ و سولفید سدیم با دوز ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن

مطالعه از تحلیل واریانس یک راهه در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز مربوط به ژن *Npm1* گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ و نمودار یک آمده است. میزان بیان ژن *Npm1* در گروه‌های دریافت کننده سولفید سدیم با دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، کاهش یافت. میزان بیان ژن *Npm1* در گروه‌های دریافت کننده استات سرب با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، افزایش یافت.



نمودار ۱: بیان ژن *Npm1* در گروه‌های مورد مطالعه

تکثیر میزان CT نمونه‌ها نشان داد که میانگین میزان بیان ژن *Npm1* از نظر آماری معنی‌دار است ($P < ۰/۰۰۱$).

نتایج مربوط به بررسی منحنی ذوب ژن *Npm1* نشان داد که منحنی دمای ذوب از دمایی در محدوده ۷۵ درجه سانتی‌گراد شروع به افزایش می‌کند و با افزایش دما میزان جدا شدن دو رشته بیشتر می‌شود. دمای منحنی ذوب مربوط به ژن *Npm1* در دماهای ۷۹/۸ درجه سانتی‌گراد و ۷۵/۵ درجه سانتی‌گراد که دمای Tm آنها است؛ به دست آمد که در این دما ۵۰ درصد دو رشته از هم جدا و ۵۰ درصد آن هنوز دو رشته‌ای است (نمودار ۲).

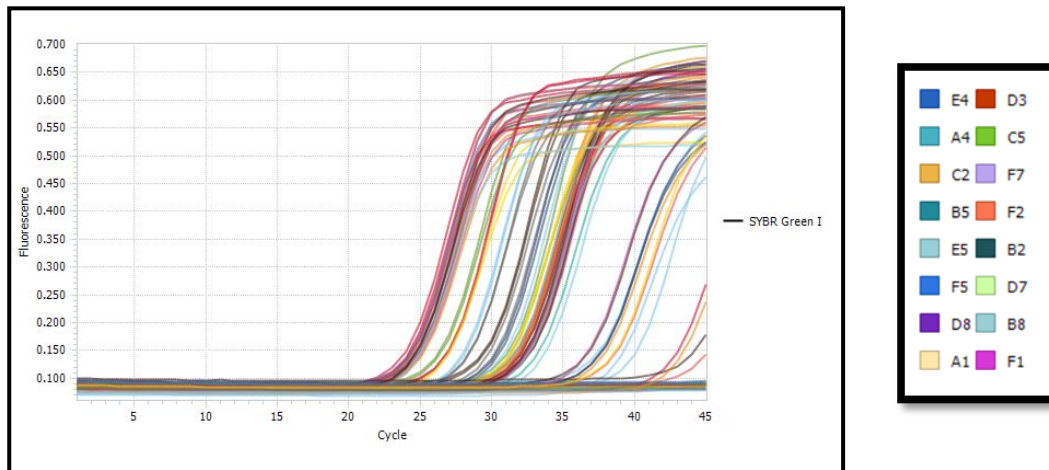
بحث

در این مطالعه اثر مسمومیت استات سرب و سولفید سدیم بر میزان بیان ژن *Npm1* موش‌های صحرایی نر بالغ بررسی شد. در گروه‌های تجربی اول و دوم، میزان بیان ژن *Npm1* کاهش و در

کیت استخراج RNA و کیت CDNA سطح بیان ژن اندازه‌گیری شد. برای بررسی میزان بیان ژن *Npm1*، پرایمر طراحی شد. بعد از طراحی، این پرایمرها از شرکت پیشگام، ساخت کره جنوبی تهیه گردید. پرایمرها، توسط نرم افزار الیگو طراحی شدند. *YWHAZ* که یک ژن با تغییرات بیان بسیار ناچیز است به عنوان ژن کنترل داخلی Reference Gene استفاده گردید. توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن های *Npm1* و *Ywhaz* در جدول یک آمده است.

بررسی ژن *Npm1* پس از استخراج RNA، با دستگاه Real-Time PCR، مقایسه انجام شد. سپس نتایج به دست آمده از آزمایشات توسط دستگاه Real-Time PCR به وسیله نرم‌افزار Graph Pad Prism و همچنین نرم‌افزار آماری SPSS-23 مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آنالیز Graph Pad Prism برای ژن، به این صورت بود که هر ژن با ژن کنترل مقایسه و با استفاده از فرمول خاص محاسبه می‌شود. اگر تفاوت efficiency داشت؛ از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ و اگر تفاوت efficiency نداشت؛ از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. منظور از $2^{-\Delta\Delta CT}$ مقدار بیان ژن است.

برای مطالعه آماری میزان تغییرات بیان نسبی ژن‌ها در نمونه‌ها با گروه کنترل، از نرم‌افزار Graph Pad Prism استفاده شد. این نرم‌افزار مستقل و قابل اطمینان برای محاسبه افزایش و کاهش بیان ژن است. برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن *Npm1* به وسیله بیان ژن *Ywhaz* به عنوان ژن مرجع، نرمال‌سازی شد. اطلاعات آماری با به کار بردن متد $2^{-\Delta\Delta CT}$ نمایش و متوسط متغیرها بیان شدند. با کمک نمودارهای تکثیر میزان CT (Threshold Cycle) نمونه‌ها مشخص شد و به کمک منحنی ذوب (Melt curve) در صورت وجود باندهای غیراختصاصی و پرایمر دایمر وجود محصول غیراختصاصی مشخص شد. CT هر نمونه (هم نمونه ژن مورد نظر و هم نمونه ژن کنترل داخلی) به صورت جداگانه برای نرم‌افزار تعریف شد. در منحنی ذوب، ژن *Npm1* برای تعیین پرایمر دایمر و اطمینان از حضور احتمالی رشته‌های غیراختصاصی استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های مورد



نمودار ۲: نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن (*Melting Curves*)

خود را در سیتوپلاسم و هسته سلولها وارد نموده و منجر به اختلالات ژنتیکی شده و جهشها را به وجود می آورند. این مواد شیمیایی می توانند در بدن ضمایم DNA را تشکیل داده و بنابراین منجر به آسیب DNA شوند (۲۰).

مطالعه Mariucci و همکاران نشان داد حضور یا عدم وجود ژن خاص جهش یا تغییرات در بیان ژن می تواند باعث طبقه بندی AML شود و بر روی آن تاثیر بگذارد (۲۱).

Francastel و همکاران مشاهده کردند که در معرض قرار گرفتن سرب در محیط کار به صورت معنی داری باعث افزایش شکسته DNA می شود. علت سرطان، تخریب DNA است. اثرات سرب به وسیله ترمیم DNA آسیب دیده با دیگر مواد شیمیایی است که مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲).

در مطالعه Ballinger بیان شد که سرب به طور عمده در بافت نرم و استخوان ذخیره می شود. سرب باعث ایجاد آسیب های عصبی، هماتولوژیکی، دستگاه گوارش، باروری و گردش خون می شود که البته تمام این موارد مربوط به دوز و مقدار زمان قرار گیری در معرض سرب است (۲۳).

در مطالعه Clark وزن بدن و کلیه در حیوانات تیمار شده با سرب در مقایسه با حیوانات گروه شاهد افزایش آماری معنی داری یافت و مشخص گردید که سرب می تواند از راه جفت وارد بدن جنین شده و ضایعاتی را ایجاد نماید (۲۴).

در مطالعه Greben و همکاران که روش موش های صحرایی انجام شد؛ مشخص گردید سولفات سدیم به وسیله روده جذب می شود. در یک آزمایش ۷۴-۵۷ درصد از سولفات سدیم (Na₂SO₄) طی ۲۴ ساعت بعد از رادیو اکتیو از طریق ادرار دفع شد (۲۵).

در این مطالعه، تکثیر میزان CT نمونه ها نشان داد که میانگین میزان بیان ژن *Npm1* از نظر آماری معنی دار است.

گروه های تجربی سوم و چهارم میزان بیان ژن *Npm1* افزایش نشان داد. به طوری که هر چه میزان بیان ژن *Npm1* افزایش یابد؛ مقدار CT کمتر می شود.

جهش در زمینه های ژنتیکی نیز وابسته به عوامل مختلف از جمله عوامل محیطی است. یکی از عوامل محیطی دخیل وجود استات سرب و سولفید سدیم است (۱۸).

در مطالعه حاضر، بعد از گاواز سولفید سدیم و استات سرب به مدت ۴ ماه، خونگیری از موش های صحرایی و شمارش گلبول های سفید مشخص شد که در گروه های تجربی دوم و پنجم افزایش گلبول های سفید مشاهده شده است. در نتیجه میزان سرطانی شدن در این دو گروه نسبت به بقیه گروه ها بیشتر بود. احتمال می رود که در این گروه ها تعداد گلبول قرمز نسبت به گروه های دیگر کمتر شده باشد و به این دلیل گلبول های سفید افزایش یافتند. بر اساس این آزمایش نتیجه می گیریم که هر چه گلبول های سفید افزایش یابند؛ میزان بیان ژن *Npm1* کاهش می یابد. می توان نتیجه گیری کرد که احتمال سرطانی شدن در این گروه به خاطر افزایش تعداد گلبول های سفید زیاد است.

در مطالعه Fuller و همکاران مشخص شد سرطان خون یکی از کشنده ترین سرطان ها است و یکی از عوامل بروز آن، عوامل ژنتیکی است. لذا هر گونه پژوهش در زمینه ژنتیکی سرطان از اهمیت ویژه ای برخوردار است. جهش در زمینه های ژنتیکی نیز وابسته به عوامل مختلف از جمله عوامل محیطی است. یکی از عوامل محیطی دخیل وجود استات سرب و سولفید سدیم است (۱۹).

در مطالعه Singer و همکاران مشخص شد؛ به طور معمول انسان به واسطه محیط های آلوده و غیره در معرض مواد سرطان زا و موتاسیون زا قرار دارد. در طبیعت بیش از صد هزار نوع ترکیب شیمیایی وجود دارد که به طور مستقیم یا غیرمستقیم اثرها و صدمات

اتصال سرب به ALAD ظرفیتی تقریباً ۸۵۰ میکرو گرم در دسی لیتر گلبول قرمز (۴۰ میکرو گرم در دسی لیتر خون) تخمین زده شده است. دو پروتئین دیگر مرتبط با سرب در سلول قرمز شناخته شده است. یک پروتئین ۴۵ KD (۵/۵ mg/L) و پروتئین کوچک دیگر با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ KD شناسایی شده است. از سه پروتئین اصلی اتصال دهنده سرب در گلبول قرمز ALAD بیشترین وابستگی به سرب را دارد. به نظر می رسد که سطح سرب زیر ۴۰ Mg/dl باشد (۵).

مطالعه Parcell نشان داد که شواهد زیادی در انسان وجود دارد که دستگاه تنفسی یکی از اهداف اصلی مسمومیت با گوگرد است. اثرات تنفسی در انسان به صورت حاد و مزمن رخ می دهد. به طور کلی، شرایط محیط گرم به افزایش شدت اثرات تنفسی گوگرد می انجامد. معمولاً مسمومیت با گوگرد استنشاقی است و از طریق تنفس آن رخ می دهد و تماس مداوم با گوگرد، تحریک های غشاهای مخاطی را به دنبال دارد. بسیاری از افراد که ساعات طولانی در معرض این ماده قرار می گیرند؛ به برونشیت مبتلا شده و دچار سرفه های متعدد و ناراحتی های تنفسی می شوند. معمولاً گوگرد بوی تندی دارد و در معرض قرار گیری طولانی مدت، ممکن است سبب تغییر حس بویایی شود که در نتیجه می تواند عفونت های تنفسی، علائم برونشیت مزمن و کاهش عملکرد ریوی را به دنبال داشته باشد. این حالت برای کودکان خطر بیشتری دارد. قرار گرفتن در معرض عنصر گوگرد موجود در بنزین و استنشاق آن می تواند خطر ابتلا به سرطان را هم ایجاد کند (۹).

با توجه به این مطالعه، به طور قطعی نمی توان مکانیسم های مسبب تغییرات بیولوژیک را مشخص نمود. چرا که عوامل متنوعی در نحوه اثر گذاری گوگرد و سرب بر موجودات زنده دخیل هستند. بنابراین پژوهش های گسترده دیگری برای تعیین مکانیسم عمل و چگونگی اثر این مواد بر موجودات زنده لازم است تا الگویی مشخص برای درمان بیماران سرطانی به دست آید.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش میزان بیان ژن *Npm1* مقدار Threshold Cycle کاهش می یابد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه (شماره ۹۳۰۵۴۳۰۳۴) خانم راضیه متحدزاده برای اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته زیست شناسی جانوری - فیزیولوژی از دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون بود. بدین وسیله از مسؤولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به خاطر موافقت در استفاده از خانه حیوانات و نیز از آزمایشگاه ژنتیک دکتر گودرزی شیراز به خاطر استفاده از امکانات آزمایشگاه، نهایت سپاس و قدردانی خود را اعلام می داریم.

جهش های ژن *Npm1* در بیماران دارای تعداد گلبول های سفید بیشتر، اتفاق می افتد. جهش های *Npm1*، در اگزون ۱۲، در ناحیه C-terminal پروتئین *Npm1* اتفاق می افتد و اخیراً در AML توصیف شده است (۱۱).

Tachdjian و همکاران اطلاعات زیادی درباره ژن ها و پروتئین ها و نقش آنها در تولید سلول های طبیعی و سرطانی گزارش کردند. یکی از اکتشافات مهم آنها، نقش ژن های جهش یافته در تولید سلول های سرطانی بود. عوامل محیطی که باعث موتاسیون های ژنتیکی می شوند؛ در حال شناسایی هستند. با کمک روش های مختلف مولکولی قادریم تا قدرت بیان ژن ها و پروتئین های معیوب را تعیین نمایم. حتی پیدا کردن بیومارکرهای جدید که شاخص یک نوع سرطان هستند؛ در تشخیص زودرس و معالجه به موقع بیماری سرطان کمک های شایان توجهی را می نماید. پس از تعیین شکل های فضایی پروتئین های معیوب، می توان داروهای ضد سرطان جدیدی را ساخت که بتواند سلول های در حال سرطانی شدن را هدف قرار داده و از تولید و رشد آنها به سلول های سرطانی جلوگیری شود (۱۸).

بیماران با جهش های ژن *Npm1*، گلبول های سفید و بلاست های مغز استخوان بیشتری نسبت به سایر بیماران داشتند. جهش ها در *Npm1* در ۳۵ درصد بیماران مبتلا به AML، دیده شده است. به علاوه، جهش های *Npm1* ارتباط مستقیمی با AML با افزایش گلبول سفید دارند. جهش های *Npm1* اغلب با جهش های FLT3، در جهش نوع ITD اتفاق می افتد (۲۶).

Guidotti و همکاران به این نتیجه رسیدند که دقیقاً مکانیسم سرب در بدن مشخص نیست؛ ولی ممکن است شامل انتقال فعال یا انتشار از طریق سلول های اپی تلیال روده (سلول) یا بین سلولی (پاراسلولی) باشد و ممکن است شامل سرب یونیزه به صورت معدنی یا آلی باشد. سرب خون به سرعت توسط گلبول های قرمز خون گرفته می شود؛ جایی که به چندین پروتئین داخل سلول متصل می شود. اگرچه مکانیسم های خارج کننده سرب از غشاء سلول به طور کامل مشخص نیست؛ نتایج نشان می دهد که دو مسیر و احتمالاً سه مسیر برای انتقال تسهیل کننده سرب در سراسر غشاء سلول قرمز وجود دارد. مسیر اصلی پیشنهاد شده مبدل آنیونی است که به Hco3 وابسته است و توسط مهار کننده های مبادله آنی مسدود می شود. دومین مسیر کوچک که وابستگی به Hco3 ندارد و وابسته به مهار کننده آنیون نیست؛ ممکن است وجود داشته باشد. سرب و کلسیم ممکن است مسیر نفوذ پذیری را نیز داشته باشند که ممکن است یک کانال Ca2+ باشد. سرب از طریق اریتروسایت ها به وسیله مسیرهای انتقال فعال شامل ATPase, Ca2+, Mg2 منتقل می شود. ALAD لیگاند اتصال اولیه برای سرب در اریتروسایت ها است.

References

1. Brady SN, Yu Y, Maggi Jr LB, Wber JD. ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov; 24(21): 9327-38. DOI: 10.1128/MCB.24.21.9327-9338.2004
2. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic & Clinical Pharmacology.* 12th ed. New York: McGrawHill. 2010.
3. Cornelis R, Caruso J, Crews H, Heumann K. *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health.* John Wiley & Sons, Ltd. 2005; p: 100. DOI: 10.1002/0470856009
4. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Giuseppe Pelicci P. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol.* 2002 Jul; 4(7): 529-33. DOI: 10.1038/ncb814
5. Guidotti TL, McNamara J, Moses MS. The interpretation of trace element analysis in body fluids. *Indian J Med Res.* 2008 Oct; 128(4): 524-32.
6. Wenninger JA, McEwen GN, eds. *Canterbury RC. International cosmetic ingredient dictionary handbook.* 7th ed. Washington D.C: The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association. 1997. PP: 229-32.
7. Fleischauer AT, Arab L. Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *J Nutr.* 2001 Mar; 131(3s): 1032S-40S. DOI: 10.1093/jn/131.3.1032S
8. Grimble RF. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr.* 2006 Jun; 136(6 Suppl): 1660S-1665S. DOI: 10.1093/jn/136.6.1660S
9. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev.* 2002 Feb; 7(1): 22-44.
10. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan V, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009 Sep; 361(11): 1058-66. DOI: 10.1056/NEJMoa0903840
11. Bacher UI, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood.* 2006 May; 107(10): 3847-53. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3522
12. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood.* 2005 Dec; 106(12): 3747-54. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2168
13. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood.* 2000 Dec; 96(13): 4075-83.
14. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002 Dec; 100(13): 4325-36. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0772
15. Grisendi S, Pandolfi PP. NPM mutations in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2005 Jan; 352(3): 291-92. DOI: 10.1056/NEJMe048337
16. Jakubowski EM, Sidell FR, Evans RA, Carter MA, Keeler JR, McMonagle JD, et al. Quantification of thiodiglycol in human urine after an accidental sulfur mustard exposure. *Toxicol Methods.* 2000; 10(2): 143-50. DOI: 10.1080/10517230050083375
17. Sunday Abraham M, Iliyasu MO, Wilson OH, Augustine Oseloka I, Uduak Emmanuel U. Preventive activity of ascorbic acid on lead acetate induced cerebellar damaged in adult Wistar rats. *Medical and Health Science Journal.* 2012; 13(4): 99-104. DOI: 10.15208/mhsj.2012.68
18. Tachdjian G, Aboura A, Lapierre JM, Viguier F. Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann Genet.* 2000 Jul-Dec; 43(3-4): 147-54. DOI: 10.1016/s0003-3995(00)01028-5
19. Fuller PJ, Chu S, Fikret S, Burger HG. Molecular pathogenesis of granulosa cell tumours. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 May; 191(1): 89-96. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00059-x
20. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SKR, Shih IM. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol.* 2002 Apr; 160(4): 1223-28. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)62549-7
21. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2010 May; 28(14): 2348-55. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.3730
22. Francastel C, Schübeler D, Martin DI, Groudine M. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Nov; 1(2): 137-43. DOI: 10.1038/35040083
23. Bellinger DC. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr.* 2008 Apr; 20(2): 172-77. DOI: 10.1097/MOP.0b013e3282f4f97b
24. Clark AR. Placental transfer of lead and its effects on the newborn. *Postgrad Med J.* 1977 Nov; 53(625): 674-78. DOI: 10.1136/pgmj.53.625.674
25. Greben HA, Maree JP, Mnqanqeni S. Comparison between sucrose, ethanol and methanol as carbon and energy sources for biological sulphate reduction. *Water Sci Technol.* 2000; 41(12): 247-53.
26. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005 Jan; 352(3): 254-66. DOI: 10.1056/NEJMoa041974