

فیوژن B3A2 شایع ترین نوع موتاسیون ABL-BCR در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن در استان لرستان

علی اصغر کیانی^۱، فرهاد شاهسوار^۲، کلثوم احمدی^۳، وحیده حیدری نظرآباد^۳، بنفشه بهمنی^۴، مجتبی گرجی^{۵*}

۱- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۴- دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۵- استادیار، گروه خون و انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۳ / پاییز ۹۵ / مسلسل ۶۹

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۶/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۵/۸/۱۵

*** مقدمه:** لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) زمانی تشخیص داده می شود که وجود کروموزوم فیلادلفیا و فیوژن های ABL-BCR در بیماران اثبات شود. در این مطالعه ۵۸ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن از نظر شیوع انواع فیوژن های ABL-BCR مورد بررسی قرار گرفتند.

*** مواد و روش ها:** پس از تکمیل پرسشنامه اطلاعات پایه، نمونه خون بیماران با کسب رضایت آگاهانه گرفته شد. RNA از نمونه خون استخراج شد. با استفاده از سنتز cDNA و روش Multiplex RT-PCR فیوژن های مختلف ABL-BCR از جمله فیوژن های b3a2، b2a2 و e1a2 مورد مطالعه قرار گرفتند.

*** یافته ها:** از میان ۵۸ بیمار که از نظر فیوژن های ABL-BCR مثبت بودند، ۱۸ نفر (۳۰/۵ درصد) فیوژن b2a2، ۳۷ نفر (۶۲/۷۱ درصد) فیوژن b3a2 و سه نفر (۳/۰۸ درصد) فیوژن e1a2 را دارا بودند. ۲۵ مرد و ۳۳ زن در این مطالعه حضور داشتند که برخلاف مطالعات مشابه، جمعیت زنان مبتلا به CML از مردان مبتلا بیشتر بود.

*** بحث و نتیجه گیری:** فیوژن b3a2 که تولیدکننده پروتئینی ۲۱۰ کیلو دالتونی است، دارای بیشترین شیوع در بین بیماران مورد مطالعه بود. نتایج این مطالعه در استان لرستان (به استثنای جمعیت بیشتر زنان مبتلا) با سایر مطالعات انجام شده در ایران مطابقت داشت.

*** واژه های کلیدی:** فیوژن b3a2، کروموزوم فیلادلفیا، ABL-BCR.

* آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه خون و انکولوژی.

پست الکترونیک: mogorji@yahoo.com

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن، معروف‌ترین بیماری میلوپرولیفراتیو مزمن است. این نئوپلاسم برخلاف لوسمی‌های حاد، دارای وقفه در تمایز و بلوغ سلولی نیست و در نتیجه شمارش بالای سلول‌های غالباً تمایز یافته رده‌های میلوئیدی در مغز استخوان و خون محیطی بیماران مشاهده می‌گردد (۱). سن ابتلا به این بیماری از کودکی تا کهن‌سالی متغیر است، اما وقوع آن بیشتر در سنین میان‌سالی است. شیوع در مردان ۱/۷ برابر بیشتر از زنان است (۲).

تکثیر کلونال و بدخیم پیش‌ساز مشترک میلوئیدی مغز استخوان را بیماری میلوپرولیفراتیو مزمن گویند (۱،۳). بر اساس آخرین تقسیم‌بندی سازمان بهداشت جهانی، چهار گروه اصلی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن شامل لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) (۴)، پلی‌سایتمی ورا، اسنشال ترومبوسیتمی و میلو فیبروز مزمن با منشأ ناشناخته می‌باشند (۵،۶). لازم به ذکر است که در این تقسیم‌بندی گروه‌های دیگری همچون لوسمی نوتروفیلی مزمن و سندروم هایپرآنوژینوفیلیک هم وجود دارند (۷،۸).

از مهم‌ترین تغییرات ژنتیکی دخالت‌کننده در ایجاد CML می‌توان به جابجایی دوطرفه میان بازوهای بلند کروموزوم‌های شماره ۹ و ۲۲ و تشکیل کروموزوم فیلادلفیا اشاره نمود. در جابجایی فیلادلفیا قسمت ۳' ژن ABL از کروموزوم ۹q۳۴ در کنار ژن BCR از کروموزوم ۲۲q۱۱ قرار گرفته و ژن هیبرید ABL-BCR به وجود می‌آید (۱۱) - (۹). این فیوژن نقش مهمی در فعال نمودن تیروزین ۱۷۷ و در نتیجه آغاز فرایند لوکوموز به عهده دارد (۱۲).

بر اساس ناحیه شکست ژن BCR، فیوژن‌های مختلف ABL-BCR شامل b2a2 و b3a2 (ایجادکننده پروتئین P210 کیلو دالتونی) و یا e1a2 (ایجادکننده پروتئین P190 کیلو دالتونی) و یا b2a3 و b3a3 (ایجادکننده پروتئین P230 کیلو دالتونی) و یا e19a2 (ایجادکننده پروتئین P230 کیلو دالتونی) به وجود خواهند آمد

(۱۰،۱۳). شایان ذکر است که نوع فیوژن می‌تواند در پیش‌آگهی و پاسخ به درمان دارای اهمیت باشد. به گونه‌ای که بیماران دارای فیوژن‌های b2a2 و b3a2 ایجادکننده پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتون دارای پیش‌آگهی بهتری نسبت به سایر موارد ABL-BCR می‌باشند (۱۰).

تاکنون در استان لرستان مطالعه‌ای به‌منظور بررسی وضعیت نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن از نظر موتاسیون‌های ذکر شده انجام نشده است و در این مطالعه برای نخستین بار در استان روش تشخیص فیوژن‌های نام برده شده در بخش مولکولی مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی راه اندازی شد و پرایمرها به‌گونه‌ای استفاده شدند که قادر به شناسایی تمامی این فیوژن‌ها باشند (۱۴،۱۵). در مطالعه حاضر بیماران دارای مورفولوژی لوسمی میلوئیدی مزمن از نظر فیوژن‌های ABL-BCR بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

تمامی بیماران با تشخیص احتمالی بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن مراجعه‌کننده به درمانگاه‌های فوق تخصصی خون استان در طی پنج سال با کسب رضایت آگاهانه از نظر فیوژن‌های مختلف ABL-BCR مورد بررسی قرار گرفتند. شایان ذکر است که بیماران با تشخیص احتمالی لوسمی میلوئیدی مزمن شامل افرادی هستند که معمولاً دارای گرانولوسیتوز مطلق خون محیطی می‌باشند که در آن تمامی رده‌های گرانولوسیتی شامل رده‌های نوتروفیلی، ائوزینوفیلی و بازوفیلی (از میلو بلاست تا سلول‌های بالغ) به همراه مونوسیت‌ها در گردش خون حضور دارند. تعداد میلو بلاست‌ها کمتر از ده درصد بوده و نوتروفیل‌های بالغ به همراه میلو سیت‌ها بیشترین جمعیت سلول‌های سفید را تشکیل می‌دهند. همچنین رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز نوتروفیلی در بسیاری از بیماران منفی می‌باشد. تشخیص قطعی بیماری CML زمانی است که بیماران دارای فیوژن ABL-BCR یا همان کروموزوم فیلادلفیا باشند.

برای تشخیص فیوژن ABL-BCR حدود ۵-۱۰ ml نمونه خون محیطی بیماران بر روی ضد انعقاد EDTA تهیه گردید و در مدت کمتر از دو ساعت سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNCs) توسط فایکول جداسازی شده و عملیات استخراج RNA با استفاده از تریزول (Sigma, USA TRIZOL) انجام می‌شد.

از RNA استخراج شده cDNA (Fermentase) بر اساس پروتکل کیت سنتز می‌شد. سپس توسط روش Multiplex RT-PCR فیوژن‌های مختلف ABL-BCR شامل b2a2, b3a2, e1a2, b2a3, b3a3 و e19a2 مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص فیوژن‌های مربوطه پرایمرهای مورد استفاده، اندازه ناحیه تکثیر و برنامه دمایی به ترتیب در جداول شماره ۱ تا ۳ آورده شده‌اند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای Multiplex PCR

نام پرایمر	۳' به ۵' توالی
CA3-	5'TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'
C5e-	5'ATAGGATCCTTTGCAACCGGGTCTGAA 3'
B2B	5'ACAGAATTCCGCTGACCATCAATAAG 3'
BCR-C	5'ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG 3'

از سل لاین K562 به‌عنوان کنترل مثبت (b3a2) و از نمونه افراد سالم نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۲. اندازه ناحیه تکثیر با استفاده از پرایمرهای ذکر شده

برای فیوژن‌های ABL-BCR

اندازه ناحیه تکثیر (جفت باز)	محصول	نام پرایمر
۸۰۸	BCR	B2B/C5e-
۳۸۵ ۳۱۰	b3a2 b2a2	B2B/CA3-
۴۸۱	e1a2	BCR-C/CA3-

باند ۸۰۸ به‌عنوان کنترل داخلی پروتکل بوده و در تمامی بیماران و نیز افراد کنترل سالم، مثبت بود. منفی بودن این باند به معنی عدم کارکرد صحیح روش محسوب می‌شد.

جدول ۳. برنامه دمایی Multiplex PCR

مراحل PCR	دمای هر سیکل	زمان هر سیکل بر حسب ثانیه
۱	۱۰۰°	۱۰
۲	۹۶°	۶۰
۳	۵۸°	۱۲۰
۴	۷۲°	۹۰
۵	۱۰۰°	۲۰
۶	۹۷°	۲۰
۷	۵۶°	۳۵
۸	۶۲°	۱۵
۹	۷۵°	۱۰
۱۰	۷۳°	۳۵
	۳۱ بار از مرحله ۵ تا ۱۰	
۱۱	۷۲°	۶۰۰

در نهایت داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و روش آمار توصیفی شامل میانگین، انحراف معیار و فراوانی‌ها و آمار تحلیلی آنالیز واریانس چند متغیره مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

از میان صد نفر بیمار دارای مورفولوژی میلوپرولیفراتیو مزمن، ۵۸ نفر از نظر کروموزوم فیلادلفیا مثبت بودند. از ۵۸ بیمار مورد مطالعه ۱۸ نفر (۳۰ درصد) دارای فیوژن b2a2، ۳۷ نفر (۶۳/۹ درصد) دارای فیوژن b3a2 و سه نفر (۵/۱ درصد) دارای فیوژن e1a2 بودند. میانگین سنی شرکت‌کنندگان 48 ± 14 سال بود که ۲۴ نفر آن‌ها مرد و ۳۱ نفر زن بودند (جدول ۴). نکته جالب توجه افزایش تعداد زنان مبتلا نسبت به مردان بود. شیوع b2a2 در مردان ۴۱/۷ درصد و شیوع b3a2 در مردان ۵۸/۳ درصد بود. در حالی که شیوع b2a2 در زنان ۲۵/۸ درصد و شیوع b3a2 در زنان مبتلا ۷۴/۲ درصد بود.

جدول ۴. فراوانی فیوژن‌ها در افراد مورد مطالعه بر اساس جنس

	تعداد کل	فیوژن	
		b3a2	b2a2
جنس	تعداد	۱۴	۱۰
	درصد	۵۸/۳٪	۴۱/۷٪
	تعداد	۲۳	۸
	درصد	۷۴/۲٪	۲۵/۸٪
مرد	تعداد	۵۵	۱۸
	درصد	۶۷/۳٪	۳۲/۷٪
زن	تعداد	۲۴	۱۰
	درصد	۱۰۰٪	۴۱/۷٪

فراوانی فیوژن‌های b2a2، b3a2 و e1a2 به ترتیب ۵/۳۰ و ۷۱/۶۲ و ۸۰/۳ بود که نشان می‌دهد فیوژن b3a2 تولیدکننده‌ی پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی دارای بیشترین شیوع در بین بیماران مورد مطالعه بوده است. از سوی دیگر آمار جهانی مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن نشان دهنده میزان شیوع بیشتر بیماری در مردان است در صورتی که در این مطالعه نسبت ابتلای زنان بیش از مردان بود و همچنین فیوژن b2a2 در زنان دارای شیوع کمتری از مردان بود (۲۵/۸ درصد در مقابل ۴۱/۷ درصد).

قوام زاده و همکاران با مطالعه ۷۹ بیمار ایرانی مبتلا به CML در سال ۲۰۰۸ شیوع b3a2 را ۶۲ درصد و شیوع b2a2 را ۲۰ درصد گزارش نمودند (۲۱).

بن‌نور و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که سطح پلاکت در بیماران دارای فیوژن b3a2 با افزایش بیشتری نسبت به سطح پلاکت در بیماران دارای فیوژن b2a2 همراه بوده است درحالی‌که در سایر پارامترها تفاوت معناداری وجود نداشت (۲۲). در مطالعه مشابه دیگر، پررگو و همکاران ارتباط فیوژن‌های b2a2 و b3a2 با پارامترهایی مثل سن و جنس و WBC و Hb و plt را بررسی و مشخص نمودند که سطح پلاکت در گروه b3a2 بیشتر از توالی b2a2 بوده است (۲۳). روساس و همکاران نیز ارتباط معنی‌داری بین فیوژن b3a2 و افزایش شمارش پلاکت در مکزیک گزارش

همانطور که در جدول ۴ آمده است، فراوانی فیوژن‌ها نشان می‌دهد که میزان ابتلای زنان به CML بیش از مردان است و از طرفی زنان از نظر فیوژن b2a2 دارای فراوانی کمتری نسبت به مردان و از نظر فیوژن b3a2 دارای فراوانی بیشتری نسبت به مردان می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

لوسمی میلوئیدی مزمن به بدخیمی مزمن رده میلوئیدی سلول‌های خونی گفته می‌شود که با افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون با درجات مختلفی از عدم بلوغ سلول‌های گرانولوسیتی در هنگام تشخیص همراه است (۱۶). نوسان بلاست‌ها و پرومیلوسیت‌ها در بیماران درمان نشده مشاهده می‌شود، تعداد پلاکت‌ها در زمان تشخیص بالاست و درجات خفیفی از آنمی نورموکرومیک و نورموسیتیک وجود دارد (۶، ۱۷).

مطالعات نشان می‌دهند که ۸ درصد از تمامی انواع لوسمی در انگلستان به لوسمی میلوئید مزمن اختصاص دارد و هر روز دو مورد جدید CML تشخیص داده می‌شوند و بیش از پنجاه درصد این افراد دارای سن بالای ۶۵ سال هستند. این در حالی است که آمار ابتلا به CML در ایالات متحده حدود ۱۰ درصد است (۱۸). شناسایی واریان‌های ABL-BCR نقش مهمی در تشخیص و درمان بیماران CML دارند (۴، ۱۹، ۲۰). در این مطالعه بیماران دارای مورفولوژی CML از نظر شیوع فیوژن‌های ABL-BCR مورد بررسی قرار گرفتند. درنهایت از میان ۵۸ بیمار فیلادلفیا مثبت،

نمودند (۲۴). مطالعات مشابه دیگر نیز کمابیش این مطالب را تأیید می‌نمایند (۲۵-۲۸).
علی‌رغم ویژگی‌های نژادی در لرستان، نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج سایر مطالعات انجام‌شده در ایران، مشابه بود. هرچند که در مطالعه حاضر، زنان مبتلا به CML جمعیت بیشتری را به خود اختصاص داده بودند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی لرستان به سبب حمایت مالی و نیز از مسئولین محترم مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی خرم‌آباد مراتب سپاس و قدردانی خود را اعلام می‌نماییم.

References

1. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc.* 2015; 90(10): 1440-1454.
2. Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukaemia. STI 571 magnifies the therapeutic dilemma. *Eur J Cancer.* 2001; 37(5): 561-568.
3. Sarwar S, Siddiqui N, Zafar W, Fasih S, Basit A, Hameed A. Characteristics and outcomes of patients with chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2015; 27(2): 371-374.
4. Radich J. Major progress in understanding progression in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2015; 212(10): 1482.
5. Killock D. Haematological cancer: Repositioned to attack CML cells. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015; 12(11): 624.
6. Dasgupta A, Kumar L. Chronic myeloid leukaemia: A paradigm shift in management. *Natl Med J India.* 2014; 27(6): 316-323.
7. Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Porwit A. World Health Organization (WHO) Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Core Curriculum for Oncology Nursing.* 2015:167.
8. Sharma N, Magistroni V, Piazza R, Citterio S, Mezzatesta C, Khandelwal P, et al. BCR/ABL1 and BCR are under the transcriptional control of the MYC oncogene. *Mol Cancer.* 2015; 14: 132.
9. Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, Branford S, Shah NP, Sawyers CL, et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 2005; 435(7046): 1267-1270.
10. Deng Z, Li Y, Li YF. Immunological status of chronic myelogenous leukemia patients with complete cytogenetic response after treatment. *Tumori.* 2015; 101(3): 323-327.
11. Wylie A, Schoepfer J, Berellini G, Cai H, Caravatti G, Cotesta S, et al. ABL001, a potent allosteric inhibitor of ABL-BCR, prevents emergence of resistant disease when administered in combination with nilotinib in an in vivo murine model of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2014; 124(21): 398.
12. Cilloni D, Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clinical Cancer Research.* 2012; 18(4): 930-937.
13. Azzato EM, Bagg A. Molecular genetic evaluation of myeloproliferative neoplasms. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37(1): 61-71.
14. Amirzargar A, Bagheri M, Ghavamzadeh A, Alimoghadam K, Khosravi F, Rezaei N, et al. Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenous leukaemia. *Int J Immunogenet.* 2005; 32(3): 167-171.
15. Wilson G, Frost L, Goodeve A, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. BCR-ABL Transcript With an e19a2 (c3a2) Junction in Classical Chronic Myeloid Leukemia. *Blood.* 1997; 89(8): 3064-3064.
16. Méndez-Ferrer S, García-Fernández M, de Castillejo CL. Convert and conquer: the

- strategy of chronic myelogenous leukemic cells. *Cancer Cell*. 2015; 27(5): 611-613.
17. Ernst T, Schmidt M, Rinke J, Schäfer V, Waldau A, Obstfelder E, et al. Molecularly Defined Clonal Evolution in Patients with Chronic Myeloid Leukemia Independent of the BCR-ABL Status. *Blood*. 2014; 124(21): 4513.
18. Beinortas T, Tavorienė I, Žvirblis T, Gerbutavičius R, Jurgutis M, Griškevičius L. Chronic myeloid leukemia incidence, survival and accessibility of tyrosine kinase inhibitors: a report from population-based Lithuanian haematological disease registry 2000–2013. *BMC Cancer*. 2016; 16: 198.
19. Jabbour E, Mathisen MS, O'Brien S. 10 years of progress in chronic myelogenous leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012; 10(9): 1049-1053.
20. Dvorak P, Lysak D, Vokurka S. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients-worldwide battlefield. *Neoplasma*. 2015; 62(2): 167-171.
21. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Jahani M, Mousavi S-A, Irvani M, Bahar B, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Arch Iran Med*. 2008; 11(3): 247-251.
22. Bennour A, Ouahchi I, Achour B, Zaier M, Youssef YB, Khelif A, et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Medical oncology*. 2013; 30(1): 1-6.
23. Perego R, Costantini M, Cornacchini G, Gargantini L, Bianchi C, Pungolino E, et al. The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*. 2000; 36(11): 1395-1401.
24. Rosas-Cabral A, Martinez-Mancilla M, Ayala-Sanchez M, Vela-Ojeda J, Bahena-Resendiz P, Vadillo-Buenfil M, et al. [Analysis of Bcr-abl type transcript and its relationship with platelet count in Mexican patients with chronic myeloid leukemia]. *Gaceta medica de Mexico*. 2003; 139(6): 553-559.
25. Fava C, Rege-Cambrin G, Saglio G. The choice of first-line chronic myelogenous leukemia treatment. *Ann Hematol*. 2015; 94(2): 123-131.
26. Sauße S, Silver RT. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann Hematol*. 2015; 94(2): 159-165.
27. Höglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol*. 2015; 94(2): 241-247.
28. Crampe M, Langabeer SE. Comment on: Technical Issues Behind Molecular Monitoring in Chronic Myeloid Leukemia. *Mol Diagn Ther*. 2015; 19(4): 251-252.