

بررسی مقدماتی اثر دو روش درمانی بر بیان ژن BCR-ABL در بیماران مبتلا به CML

غلامرضا نویدی^۱، دکترحوری رضوان^۲، دکتر سیامک سمیعی^۳، رامین نقی زاده^۴، دکتر عباس حاجی فتحعلی^۵، دکتر فرامرز سلیمانلو^۶، دکتر رهی طاهر نیا^۷، شارمین اسماعیل زاده^۸

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی میلوئید مزمن (CML) بیماری است که به دلیل موتاسیون اختصاصی در سلول‌های بنیادی چند قوه‌ای مغزاستخوان ایجاد می‌شود. وجود کروموزوم فیلادلفیا و عوامل ژنتیک در این بیماری برای نخستین بار در سال ۱۹۷۳ گزارش گردید. امروزه وجود محصول ژن اتصال یافته BCR-ABL که دارای فعالیت غیرطبیعی تیروزین کینازی است و موجب بی‌نظمی در تکثیر سلول‌ها می‌شود در این بیماری ثابت شده است. در این بررسی میزان بیان ژن معیوب در بیماران درمان شده با داروی ایماتینیب مزیلیت (Imatinib Mesylate، Gleevec®) که مهارکننده تیروزین کیناز است و درمان قطعی‌تر با پیوند مغزاستخوان مقایسه شده‌اند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک بررسی تجربی بوده و با تعداد کل بیماران ۳۴ نفر انجام گردید. بیان ژن BCR-ABL در ۱۷ بیمار مبتلا به CML تحت درمان با ایماتینیب مزیلیت و ۱۷ بیمار که پیوند مغزاستخوان شده بودند با روش PCR کمی، با استفاده از دستگاه Light Cycler اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از آزمون Mann-Whitney بررسی گردید.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده در این بررسی مقدماتی بیانگر آن بوده که میزان بیان ژن BCR-ABL در بیمارانی که بیش از ۸ ماه با مقادیر صحیح داروی ایماتینیب مزیلیت درمان شده‌اند مشابه با بیمارانی که پیوند مغزاستخوان شده و در وضعیت عمومی نسبتاً پایداری هستند، می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به این ترتیب می‌توان انتظار داشت که یک داروی مهارکننده مولکولی ممکن است با عواقب درمانی کمتر اثری مشابه درمان قطعی‌تر، مانند پیوند مغزاستخوان داشته باشد. مطمئناً دستیابی به نتایج قطعی نیازمند بررسی‌های کامل‌تر بر روی تعداد بیماران بیشتری می‌باشد.

کلمات کلیدی: Gleevec®، Imatinib Mesylate، CML، BCR-ABL، پیوند مغزاستخوان، CML

تاریخ دریافت: ۸/۱/۸۳

تاریخ پذیرش: ۲۲/۴/۸۴

- ۱- مؤلف مسئول: کارشناس ارشد هماتولوژی-آزمایشگاه بیمارستان دی، خیابان ولیعصر، نبش خیابان شهید عباسپور، کد پستی ۱۴۳۴۸۷۳۱۱۱
- ۲- PhD بیوشیمی-استاد مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
- ۳- PhD بیوتکنولوژی-آزمایشگاه بیمارستان دی
- ۴- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی-آزمایشگاه بیمارستان دی
- ۵- متخصص هماتولوژی، انکولوژی-استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۶- PhD میکروپ شناسی-آزمایشگاه بیمارستان دی
- ۷- پزشک عمومی-آزمایشگاه بیمارستان دی
- ۸- کارشناس بیولوژی مولکولی-آزمایشگاه بیمارستان دی

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن^۱ از دسته بیماری‌های مزمن میلوپرولیفراتیو می‌باشد که به دلیل موتاسیون اختصاصی در سلول‌های بنیادی چند قوه‌ای^۲ مغزاستخوان ایجاد می‌گردد (۱). شیوع این بیماری در جهان ۲ تا ۳ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال گزارش شده است. وابستگی این بیماری با عوامل ژنتیک در سال ۱۹۷۳ توسط راولی گزارش شد (۲). او وجود کروموزوم غیرعادی فیلادلفیا را به عنوان یکی از عوامل بروز CML در بیماران شناسایی نمود. در سال ۱۹۸۰ مشخص شد که کروموزوم فیلادلفیا حاصل اتصال ژن ABL^۳ بر روی کروموزوم ۹ با بخش BCR^۴ بر روی کروموزوم ۲۲ می‌باشد (۳). محصول ژن BCR-ABL، پروتئین‌های مختلفی هستند که به نقطه اتصال در این دو ژن وابسته می‌باشند. اصلی‌ترین این محصولات، پروتئین P۲۱۰ است که فعالیت غیرطبیعی تیروزین کینازی داشته و این فعالیت آن موجب بی‌نظمی در تکثیر سلول‌ها و کاهش پاسخ مرگ طبیعی سلول‌ها^۵ به تحریکات جهش‌زا می‌گردد (۴).

تشخیص بیماری در آزمایشگاه از طریق انجام آزمایش‌های هماتولوژیک، سیتوژنتیک و همچنین آزمایش‌های مولکولی برای تشخیص ژن معیوب و میزان فعالیت آن انجام می‌گردد (۵).

درمان این بیماری با استفاده از روش‌های متعدد شیمی درمانی مانند آلفانترفرون انجام می‌شود. روش درمانی قطعی‌تر، استفاده از پیوند مغزاستخوان به منظور سرکوبی سلول‌هایی است که حامل ژن معیوب BCR-ABL می‌باشند (۶). در سال‌های اخیر داروی جدیدی به نام ایماتینیب مزیت به بازار عرضه گردید. این دارو یک مولکول بازدارنده فعالیت تیروزین کیناز مربوط به ژن BCR-ABL است که نقش اصلی را در بیماری‌زایی CML ایفا می‌کند. به این ترتیب این دارو به عنوان اولین داروی اختصاصی بازدارنده مولکولی است که از FDA آمریکا مجوز مصرف دریافت نمود (۷). هدف از این تحقیق، بررسی اثر این دارو بر بیان ژن BCR-ABL در بیمارانی که به مدت‌های مختلف تحت درمان بوده‌اند و مقایسه آن با اثر پیوند مغزاستخوان بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. تعداد بیمارانی که در این بررسی وارد شدند ۵۰ نفر بودند که در مجموع ۳۴ نفر آن‌ها واجد شرایط استفاده از تنها یک نوع درمان بودند. به این ترتیب ۱۷ بیمار که با داروی ایماتینیب و ۱۷ بیمار که پیوند مغزاستخوان شده بودند مورد مطالعه قرار گرفتند.

این بیماران برحسب مدت زمانی که از درمان آن‌ها گذشته بود به سه گروه تحت درمان کمتر از ۴ ماه، بین ۴ تا ۸ ماه و بیش از ۸ ماه تقسیم بندی شدند.

تخلیص اسید نوکلئیک (RNA):

نمونه خون بیماران با استفاده از EDTA^۶ جمع‌آوری شد، RNA تام آن با استفاده از محلول تخلیص اسید نوکلئیک Tripure isolation ساخت کارخانه رُوش دیاگنوستیکس خالص گردید (۸).

روش RT-PCR کمی:

روش RT-PCR^۷ کمی با استفاده از تکنولوژی Real-Time به وسیله دستگاه Light Cycler ساخت کارخانه رُوش دیاگنوستیکس انجام گردید. در ابتدا از RNA تام تخلیص شده به وسیله هگزامر تصادفی (Random Hexamer) و آنزیم AMV، C-DNA تهیه شد. سپس در جریان PCR، C-DNA به وسیله پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید. به منظور اطمینان از کیفیت خالص سازی و تکثیر اسید نوکلئیک و نیز اندازه گیری بیان ژن، از ژن G6PDH به عنوان ژن کنترلی (House Keeping) استفاده شد. پس از انجام PCR، نرم افزار سیستم Light Cycler (Version 3.5) به طور اتوماتیک با استفاده از دو سری استاندارد‌های گنجانده شده در کار، منحنی غلظت mRNA را رسم و غلظت mRNA هر نمونه را برحسب فمتوگرم تعیین کرد. از تقسیم غلظت mRNA مربوط به

1- Chronic Myelogenesis Leukemia

2- Multipotential Stem Cells

3- Abelson

4- Break point Cluster Region

5- Apoptosis

6- Ethylenediaminetetraacetate

7- Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

بحث

در این بررسی با استفاده از روش RT-PCR کمی، میزان بیان ژن BCR-ABL اندازه گیری گردید. به طور کلی روش های مولکولی رایج برای ارزیابی میزان بیان این ژن، فیش^۱، PCR چندگانه^۲ و RT-PCR کمی است. تمامی آن ها حساسیت و امکان تشخیصی مناسبی را دارا هستند ولی در مطالعات جدید مشاهده گردیده که به منظور ارزیابی میزان بیان این ژن، روش RT-PCR کمی، روشی حساس تر از روش های دیگر می باشد (۹). به طور کلی مؤثرترین درمان CML در کاهش بیان BCR-ABL، پیوند مغزاستخوان است. ولی نتایج به دست آمده در بررسی حاضر به عنوان یک مطالعه مقدماتی بیان کننده آن بوده است که بیان ژن بیمارانی که پیوند مغزاستخوان شده و پس از ۸ ماه وضعیت عمومی نسبتاً پایداری داشته اند مشابه با بیمارانی بوده است که بیش از ۸ ماه تحت درمان با داروی ایماتینیب قرار گرفته بودند ($p=0/05$), در حالی که در مورد بیمارانی که برای مدت کوتاه تری (۴ ماه) درمان شده اند، بیان ژن بیش از موارد پیوند شده بوده است که این مشاهده می تواند مؤید آن باشد که اثر درمانی ایماتینیب تدریجی بوده و به عبارت دیگر مدت زمان و مقدار صحیح داروی مصرف شده عوامل مهمی در نتیجه گیری از درمان می باشد و نتیجه در بهترین شرایط قابل قیاس با پیوند مغزاستخوان است.

این یافته با بررسی های دیگر مانند گزارش کانتاراژیان و همکارانش مطابقت دارد. در این مطالعه انطباق بین RQ-PCR^۳ و نتایج آن در بیماران نسبت به پاسخ سیئوژنتیک در بیمارانی که بیش از ۶ ماه تحت درمان بوده اند بسیار بهتر از بیمارانی بوده که در مدت کوتاه تری درمان شده اند (۱۰). بنابراین به نظر می رسد که استفاده از داروی ایماتینیب به میزان کافی (400mg/d) و مدت مناسب، می تواند به عنوان درمانی مناسب برای بیماران CML در نظر گرفته شود. در یک مطالعه اخیر نشان داده شده که مصرف بیش از 800mg/d نه تنها مفید نبوده است بلکه در بیماران عوارض سمی نیز ایجاد می نماید (۱۱).

- 1- FISH
- 2- Multiplex-PCR
- 3- Relative quantitative PCR

BCR-ABL به G6PDH، نسبت بیان این دو ژن محاسبه و پس از ضرب در عدد ۱۰۰ به صورت درصد گزارش داده شد.

آنالیز آماری :

در این بررسی به علت تعداد کم نمونه ها، آزمون براساس روش Mann-Whitney صورت گرفت، این روش براساس مقایسه رتبه بندی بدون در نظر گرفتن میانگین می باشد.

یافته ها

پس از نمونه گیری از بیماران که همگی به صورت مقطعی به آزمایشگاه مراجعه نمودند، نمونه ها براساس طول زمان مصرف دارو و مدت زمانی که از پیوند مغزاستخوان آن ها می گذشت به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول (I) بیمارانی که از زمان پیوند و مصرف دارویی آن ها کمتر از ۴ ماه می گذشت. گروه دوم (II) بیمارانی که از درمان آن ها با هر یک از دو روش بین ۴ تا ۸ ماه می گذشت و بالاخره گروه سوم (III) بیمارانی که درمان آن ها بیش از ۸ ماه بوده و وضعیت آن ها پایدار شده بود. نتایج به دست آمده از میزان بیان ژن BCR-ABL که بر حسب درصد با احتساب نسبت $BCR-ABL/G6PDH \times 100$ محاسبه گردیده در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

همان گونه که مشهود است میزان بیان ژن در گروه (I) در بیمارانی که تحت درمان با ایماتینیب بوده اند بسیار بالاتر از بیماران پیوند شده بوده در حالی که با طولانی شدن زمان درمان، میزان بیان ژن کاهش یافته است.

جدول شماره ۱: میزان بیان ژن BCR-ABL در دو گروه بیماران درمان شده با BMT و ایماتینیب (درصد)

Groups	Imatinib	BMT	pvalue
کمتر از ۴ ماه	۳/۱	۰/۰۱	۰/۰۲۹
بیشتر از ۸ ماه	۰/۴۸	۰/۰	۰/۰۵

در ارتباط با نحوه کاربرد، برنامه‌های درمانی و موارد استفاده از این دارو هنوز نظرات ضد و نقیض بوده و نیازمند بررسی‌ها و مطالعات بیشتری است، ولی با دانش فعلی به نظر می‌رسد که می‌توان این دارو را برای بیمارانی که به تازگی بیماری آن‌ها تشخیص داده می‌شود به عنوان یک درمان اولیه جهت کاهش شدت علائم تا زمان لزوم پیوند مغزاستخوان و یا در مورد بیمارانی با حدود سنی ۴۵ سال که پیوند مغزاستخوان در آن‌ها یک درمان رایج نمی‌باشد، در نظر گرفت (۱۲).

همچنین تجویز ایماتینیب در تسریع بهبود پیوندهای آلوزن به اثبات رسیده و مشاهده شده که مصرف آن قبل از پیوند اجازه می‌دهد که پیوند با روش کاهش شدت مصرف داروهای مختلف برای آمادگی بیمار انجام شود و این موضوع امکان مرگ و میر را کاهش می‌دهد (۱۲). بنابراین امروزه به غیر از پیوند مغزاستخوان که به عنوان درمان اختصاصی برای CML ناشی از کروموزم فیلادلفیا شناخته شده است، استفاده از ایماتینیب یا Gleevec® به عنوان اولین داروی هدفمند مولکولی برای CML موفقیت فراوانی داشته است ولی آنچه که اخیراً دورنمای شفاف یافتن یک داروی سرطان را تیره نموده است، گزارش مواردی است که به دلیل موتاسیون در BCR-ABL و وجود تیروزین کینازهای جهش یافته و مقاوم به ایماتینیب دیده شده‌اند (۱۳، ۱۴). از دیگر نکات حائز اهمیت در درمان CML با داروی ایماتینیب، احتمال عود بیماری است. در این راستا

اودورو و همکارانش گزارش نمودند که میزان بیان ژن BCR-ABL با احتمال عود بیماری متناسب است و در نتیجه میزان بیان ژن می‌تواند به عنوان یک شاخص پیش‌آگهی در نظر گرفته شود. این پژوهشگران گزارش نموده‌اند که در صورتی که میزان بیان ژن کمتر از ۰/۰۲٪ باشد، احتمال برگشت بیماری در آن‌ها بسیار کم است و در موارد بالاتر از ۰/۰۲٪ احتمال برگشت افزایش می‌یابد (۱۵). در پژوهش حاضر نیز در مورد بیمارانی که بیش از ۸ ماه تحت درمان بوده و درمان آن‌ها کامل شده است، میزان بیان ژن کمتر از ۰/۰۲٪ به دست آمده است. به عبارت دیگر احتمال برگشت بیماری در آن‌ها کم می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این بررسی به عنوان یک مطالعه مقدماتی و اولیه در بیماران CML در ایران، امکان در نظر گرفتن این دارو برای بیماران را نشان می‌دهد. البته واضح است که جهت تصمیم‌گیری قطعی، نیاز به انجام بررسی‌های کامل‌تر بر روی تعداد بیشتری بیمار که تحت درمان‌های کنترل شده قرار گرفته‌اند می‌باشد و نیز هزینه‌های این نوع درمان با درمان‌های موجود مؤثر بایستی مقایسه و ارزیابی گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آزمایشگاه بیمارستان دی که کلیه هزینه‌های مربوط به این طرح را پذیرفت، اعلام می‌دارند.

References:

- 1- Clark DM, Bain Dj. The chronic lymphoid and myeloid leukemia and sustained mastocytosis. In: Blood and bone marrow pathology. Sunita (ed). 2003: 393.
 - 2- Mauri MJ, Druker B. Myeloid disorders. Leukemia Programs, Division of Hematology and Medical Oncology 2001; 6: 223-230.
 - 3- Goldman JM, Junia V. Melo mechanisms of disease, chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. Massachusetts Medical Society. 2003; 349: 1451-61.
 - 4- Reiter A, Sohal J, Kulkarni S, *et al.* Consistent fusion of ZNF 198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the t(8:13) (p11; q12) myeloproliferative syndrome. Blood 1998; 92: 1735-42.
 - 5- Jaspal K, Chase A, John M, Goldman. cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia. Acta hematol 2002:269.
 - 6- Ser Net NJ, BMTS for chronic byelogenous leukemia. Blood and marrow transplant news letter. Nysernet. 1995:28.
 - 7- Brooks L. MSC imatinib mesylate therapy in CML and GIST, chronic myeloid leukemia. 38th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology.
 - 8- Chornczynski P, Sacchi N. Anal Biochem. 1987; 162: 156-159.
 - 9- Eur J, Roanori P, Bassat B, *et al.* Assessment of response to imatinib in CML patients comparison between FISH/Multiplex RT-PCT. Hematol 2004; 73: 243-250.
 - 10- Hagop M, Moshe T, Cortes J, *et al.* QC-PCR values in the total study group by duration of imatinib mesylate therapy clinical cancer.2001;9(10):160.
 - 11- Mahon FX, Deininger MW, Schltheis B, *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to tyrosin kinase inhibitor STI 571; diverse mechanisms of resistance. Blood 2000;96:1070-9.
- ۱۲- گزیده‌هایی از تازه‌های پزشکی، بیماری‌های داخلی و کودکان شماره ۵۲ سال نهم شماره چهار اردیبهشت ۱۳۸۳.
- 13- Nardi V, Azam M, Paley GQ. Mechanisms and implications of imatinib mesylate resistance mutations in BCR-ABL Curr. Opin. Aematol 2004; 1: 35-43.
 - 14- Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, *et al.* Real time PCR can be used as a primary screen to identify imatinib treated patients with CML who have BCR-ABL domain mutation. Blood 2004; 15.
 - 15- Eudoro O, Edward K, Richard S, *et al.* Early detection of BCR-ABL. Transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogenic stem cell transplantation for chronic byeloid leukemia. Blood 2001;15(97):1560-1565.

A preliminary study on the effect of two therapeutic procedures on the expression of BCR-ABL gene in CML patients

Navidi Gh.R.¹ (MS), Rezvan H.² (PhD), Samiei S.¹ (PhD), Naghizadeh R.¹ (MS), Hajifathali A.³ (MD), Soleimanlo F.¹ (PhD), Tahernia R.¹ (MD), Esmaeilzadeh Sh.¹ (BS)

¹Day Hospital Laboratory

²Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

³Shahid Beheshti Medical University

Abstract

Background and Objectives

Chronic myelogenesis leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative disorder resulting from a specific mutation in a pluripotent stem cell. The association of philadelphia chromosome with this disorder was described in 1973. Subsequently, the BCR-ABL fusion gene and its product which is a tyrosin kinase inhibiting apoptosis were introduced. The treatment of choice for these patients is BMT as well as the new molecular treatment of imatinib mesylate. The present study was designed in order to compare the rate of expression of the BCR-ABL gene in patients who had undergone treatment by bone marrow transplantation with those treated by imatinib.

Materials and Methods

Expression of BCR-ABL gene was measured in 34 patients; 17 patients were treated with BMT and 17 with imatinib mesylate using quantitative PCR on a light cycler instrument.

Results

The results obtained in this preliminary study demonstrates that rate of gene expression in patients treated with imatinib mesylate for more than 8 months was similar to that found in patients treated with BMT who were in relatively stable conditions.

Conclusions

This finding may be an indication that imatinib mesylate as a molecular inhibitor can have the same effect as BMT but with less adverse effects. Clearly, definite conclusions require more extensive studies on larger number of patients.

Key words: Gleevec[®], Imatinib Mesylate, CML, BCR-ABL, Bone Marrow Transplantation, CML
SJIBTO 2005; 2(5):151-156

Received : 27 Jan 2005

Accepted : 13 Jul 2005

Correspondence: Navidi Gh.R., MS of Hematology, Day General Hospital Laboratory, Vali-Asr Ave, Abbaspoor St, Postal Code: 1434873111, Tehran, Iran.
Tel: (+9821) 88787666, 88091413; Fax : (+9821) 88771374
E-mail: f_navidi@yahoo.com – fasanavidi@hotmail.com