خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۳ پاییز ۸۵ (۲۴۱-۲۳۳)

ارزیابی بیان ژن WT1 به عنوان شاخصی برای بررسی حداقل بیماری باقیمانده در مبتلایان به AML

تورج همتی[۱]، دکتر حمیداله غفاری[۲]، دکتر کامران علی‌مقدم[۳]، دکتر احمد قره‌باغیان[۴]،
شهربانو رستمی[۵]، آسیه عشوری[۶]

چکیده

سابقه و هدف

ژن WT1 یک فاکتور نسخه‌برداری را کدگذاری می‌کند که در تمایز و تکثیر سلول‌های پیش ساز هماتوپوئتیک نقش دارد. این ژن در بافت‌های خاصی مانند کلیه، تخمدان و قلب نیز بیان می‌شود. ارزیابی کمی بیان ژن WT1 می‌تواند پارامتر مفید و کارآمدی برای بررسی حداقل بیماری باقیمانده(MRD) در لوکمی‌ها باشد.

مواد وروش‌ها

مقدار نسبی بیان ژن WT1 در خون محیطی ۶۲ بیمار مبتلا به AML با استفاده از روش Real time Quantitative بررسی شد. همه این بیماران تازه تشخیص (new case) بودند و با توجه به در دسترس بودن یا نبودن بیماران، پی‌گیری تا حدود ۳ سال انجام شد. این مطالعه از نوع بنیادی و کاربردی بود، به صورت مقطعی انجام شد و نحوه نمونه‌برداری از نوع تصادفی و از بین مبتلایان به لوکمی حاد میلوئیدی بر اساس معیارهای تشخیصی اولیه از سوی بخش بالینی بود. میزان بیان WT1 در آن‌ها با میزان بیان WT1 در خون محیطی ۲۴ فرد سالم مقایسه شد(میزان بیان WT1 در سلول‌های K562 معادل 10^{-6} در نظر گرفته شد).

یافته‌ها

مقادیر قابل توجهی از بیان ژن WT1 در نمونه‌های زمان تشخیص در لوکمی‌های حاد(بیش از ۸۰٪ موارد) ملاحظه شد. با انجام شیمی درمانی، بیان WT1 کاهش یافت(در زمان درمان القایی حدود ۲-۱ لگاریتم و در زمان درمان تحکیمی حدود ۴-۳ لگاریتم). همبستگی واضحی بین مقادیر نسبی بیان ژن WT1(کمتر از ناحیه خاکستری در مقابل بیشتر از ناحیه خاکستری) و پیش آگهی احتمال وقوع عود در موارد AML مشاهده شد. بیمارانی که در پی‌گیری‌های متعدد میزان بیان WT1 در آن‌ها کمتر از ناحیه خاکستری باقی ماند، از بهبودی کلینیکی بالاتری بهره‌مند بودند. در حالی‌که ۶ مورد از بیماران که در نهایت مبتلا به عود شدند، میزان بیان WT1 در آن‌ها حدود ۶-۱ ماه قبل از بروز عود بالینی از ناحیه خاکستری فراتر رفت.

نتیجه گیری

WT1 یک فاکتور مولکولی مفید و کارآمد برای تشخیص حداقل بیماری باقیمانده، ارزیابی تاثیر درمان و پیش‌بینی عود در مبتلایان به AML است.

کلمات کلیدی: ژن WT1، حداقل بیماری باقیمانده(MRD)، PCR

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۸۵/ ۷/۲۵

۱ – مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲- PhD ژنتیک ـ استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۳- فوق تخصص خون ـ استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۴- PhD ایمونو هماتولوژی بالینی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۶- کارشناس ارشد آمار حیاتی ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

مقدمه

علت اصلی عدم موفقیت در درمان لوکمی‌های حاد، عود بیماری است. امروزه مطالعات زیادی صورت گرفته که ارزیابی حداقل بیماری باقیمانده در پیش‌بینی وقوع عود را مفید می‌داند(۳-۱). تشخیص MRD به طور کلی براساس شاخص‌های مولکولی یا ایمونولوژیکی استوار است. این شاخص‌ها در سلول‌های لوکمیک (نه در سلول‌های نرمال) حضور دارند. بنابراین تشخیص اختصاصی لوکمی توسط آن‌ها ممکن است. روش PCR قادر است وجود یک سلول لوکمیک را در بین 10^5 تا 10^6 سلول سالم تشخیص دهد اما این روش را فقط می‌توان برای لوکمی‌هایی به کار برد که شاخص‌های مولکولی ویژه‌ای مانند CBFβ-MYH11، AML1-MTG8، PML-RARα، BCR-ABL را داشته باشند. به همین دلیل به کارگیری چنین شاخص‌هایی به موارد معدودی از لوکمی‌ها(حدود ۵۰ درصد AMLها) محدود می‌شود زیرا درصد بالایی از لوکمی‌ها فاقد چنین مارکرهایی هستند(۲). بنابراین بایستی اهداف ژنی جایگزینی را پیدا نمود که در اکثریت بیماران لوکمیک بیان شود. این شاخص‌ها، اختصاص به نوع خاصی از لوکمی ندارند(مانند P53، FLT3 و WT1). لذا نحوه عملکرد یا میزان بیان چنین شاخص‌هایی بایستی در کلون لوکمیک متفاوت از سلول‌های سالم باشد. یکی از این شاخص‌ها که بیش از سایرین مورد توجه واقع شده است، ژن تومور ویلمز (WT1) است. WT1 روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ و در باند ۱۳(p۱۳ ۱۱) واقع شده و یک ژن سرکوب‌گر تومور است که در پاتوژنز تومور ویلمز که یک نئوپلاسم کلیوی کودکان است نقش دارد(۴). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که WT1 در بیش از ۸۰٪ بیماران AML به میزان زیادی بیان می‌شود. بنابراین استفاده از WT1 به عنوان یک هدف مولکولی برای تشخیص MRD مورد توجه ما نیز قرار گرفت. مطالعات اولیه متعددی درخصوص استفاده از WT1 به منظور تعیین ارزش پیش‌آگهی دهندگی آن و هم‌چنین برای ارزیابی MRD در لوکمی‌ها انجام شده است(۶، ۵). اطلاعات ارایه شده برای تعیین ارزش پیش‌آگهی دهندگی WT1 متناقض هستند(۱۰-۷). با این اوصاف ارزیابی کمی ژن WT1 در پیش‌بینی زودهنگام وقوع عود به ویژه در لوکمی‌های حاد میلوئیدی مفید و کارآمد است(۱۱). این نتایج نشان داد که مطالعاتی بیشتر با بهره‌گیری از روشی حساس‌تر که از ویژگی‌های آن کمی بودن است باید انجام شود تا ارزش بیان WT1 را برای نظارت بر مراحل درمان و وقوع عود بررسی نماید.

ما روش حساس، قابل اعتماد و کمی RQ-PCR را برای تعیین میزان بیان WT1 به کار بردیم. برای تعیین MRD از بیان هم‌زمان ژن β-actin به عنوان کنترل داخلی استفاده کردیم. از آن‌جا که هدف ما روتین کردن این روش بود لذا فقط از نمونه‌های خون محیطی(نه نمونه مغز استخوان) استفاده کردیم.

مواد و روش ها

بیماران مورد مطالعه ۶۲ نفر مبتلا به انواع AML بودند(جدول ۱).

جدول ۱: اطلاعات بیماران لوکمیک این مطالعه

گروه‌ها و زیرگروه‌های لوکمی‌ها		فراوانی (تعداد بیماران)	درصد	جنس زن/ مرد	محدوده سنی	متوسط سنی
AML	M1	۲	۳/۲	۲۹/۳۱	۱۴-۸۰	۳۰/۰
	M2	۶	۹/۷			
	M3	۴۸	۷۷/۴			
	M4	۲	۳/۲			
	M6	۲	۳/۲			
	unknown	۲	۳/۲			

تمام بیماران این طرح، تازه تشخیص بودند و محدوده سنی آن‌ها ۱۴ تا ۸۰ سال(میانگین ۳۰ سال) بود. تشخیص اولیه و قطعی بیماری‌ها بر اساس یافته‌های بالینی، مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی و یافته‌های مولکولی انجام شد. میزان WT1 در خون محیطی این بیماران در زمان تشخیص و پی‌گیری مورد آزمایش قرار گرفت. برای کنترل منفی و تعیین میزان زمینه بیان ژن WT1، ۲۴ نمونه خون محیطی از ۲۴ فرد سالم به روش

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

مشابه تهیه و آزمون شد. به عنوان کنترل مثبت و هم‌چنین برای تهیه منحنی استاندارد و بررسی کیفیت و کارآیی واکنش RQ-PCR از سلول‌های K562 که یک رده سلولی اریترولوکمیک فیلادفیلا مثبت است و ژن WT1 را به مقدار زیاد بیان می‌کند استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد و سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول جدا شدند. RNA تام با استفاده از تریزول از سلول‌ها خارج و توسط کلروفرم جدا شده، با ایزوپروپانل رسوب داده شد و توسط اتانول شستشو و تخلیص گردید. رسوب حاصل در آب DEPC(Diethyl Procarbonate Treated Water) حل گردید. نسخه‌برداری معکوس(RT) با استفاده از هگزامرهای راندوم برای RNA توتال انجام شد(۱µg/۲۰µL) و تا زمان انجام RQ-PCR، نمونه‌های cDNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

طراحی آغازگرها و پروب‌های Taq Man:

آغازگرها و پروب‌های Taq Man (پروب‌ها و آغازگرهایی که برای روش Realtime یا Lightcycler طراحی و استفاده می‌شوند) برای ژن‌های WT1 و β-actin(ژن مرجع) طراحی شدند. به منظور طراحی آغازگرها و پروب‌ها، از نرم‌افزار OLIGO۶/۶(آمریکا) و بر اساس سکانس‌های mRNA WT1 و β-actin منتشر شده در NCBI (National Center for Biotechnology Information) استفاده کردیم. بعد از کنترل نهایی در Pub Med و با استفاده از نرم افزار بلاست(Blast)، صحت و دقت طراحی بررسی شد و ساخت آن‌ها به شرکت MWG(بیوتک آلمان) سفارش داده شد. پروب‌های WT1 و β-actin در انتهای '5 با ماده ۶- کربوکسی فلوئورسئین(FAM) و در انتهای '3 با ماده ۶- کربوکسی تترامتیل رودآمین(TAMRA) نشاندار شدند(جدول ۲).

PCR کمی به روش Real Time:

مخلوط واکنشی PCR و سیکل‌های حرارتی بر اساس پیشنهادات دستورالعمل دستگاه Lightcycler و با چندین بار آزمون و خطا بهینه شدند.

جدول ۲: آغازگرها و پروب‌های طراحی شده برای Real-Time

Target	Primers&Probe Sequences		Amplicon
WT1 Taqman Light cycler	Forward P.	5'-GAT AAC CAC ACA ACG CCC ATC-3'	۹۰
	Reverse P.	5'-CAC ACG TCG CAC ATC CTG AAT-3'	
	Probe	5'-ACA CCG TGC GTG TGT ATT CTG TAT TGC-3' 5'-FAM & 3'-TAMRA	

: PCR

Target	Primers&Probe Sequences		Amplicon
β-actin Taqman Light cycler	Forward P.	5'-CCC AGC ACA ATG AAG ATC AAG ATC AT-3'	۹۹
	Reverse P.	5'-ATC TGC TGG AAG GTG GAC AGC GA-3'	
	Probe	5'-TGA GCG CAA GTA CTC CGT GTG GAT CGG CG-3' 5'-FAM&3'-TAMRA	

واکنش Taq Man PCR توسط دستگاه Light Cycler رُوش (دیاگنوستیکا) انجام شد. برای رسم منحنی‌های استاندارد از یک نمونه کنترلی مثبت(از نظر بیان WT1) از RNA حاصل از سلول‌های K562 استفاده، cDNA ساخته شد و سپس به طور سریال ۵ لگاریتم رقت پله‌ای تهیه شد. این رقت‌های سریال از cDNA در مقادیر زیاد تهیه شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در آمپلی فیکاسیون WT1 که با به کارگیری رقت‌های استاندارد از K562 cDNA انجام شد، شدت فلوئورسانس با افزایش تعداد سیکل که متناسب با تجمع محصول PCR بود افزایش یافت. منحنی استانداردی که از این طریق رسم شد همبستگی خطی قوی را بین سیکل آستانه و لگاریتم غلظت اولیه WT1 نشان داد. منحنی استاندارد مشابه‌ای برای ژن β-actin نیز رسم شد. میزان بیان WT1 در سلول‌های K562 معادل 10^6 در نظر گرفته شد و به صورت بیان نسبی WT1/β-actin تعریف شد که در این مقاله به اختصار از عبارت میزان بیان WT1 استفاده شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

برای اندازه‌گیری کمی میزان بیان WT1 در نمونه‌های بیماران، در هر ران کاری یکی از رقت‌های سریال استاندارد را به عنوان کالیبراتور مورد آزمایش قرار دادیم. سطح بیان WT1 در نمونه‌ها براساس مقایسه انجام شده از نمونه کالیبراتور با منحنی استاندارد تعیین می‌شد(کالیبراتور نمونه‌ای مثبت است که نسبت بیان WT1 به β-actin در آن ثابت و معین می‌باشد). مقدار نسبی بیان ژن WT1 در هر نمونه به این صورت محاسبه می‌شد که ابتدا میزان بیان ژن WT1 که از روی منحنی مربوطه تعیین شده بود را به میزان بیان β-actin همان نمونه تقسیم کرده(که این عمل را نرمال‌سازی به یک ژن داخلی یا مرجع گویند) و سپس عدد حاصل را به عدد حاصل از تقسیم میزان بیان WT1 در کالیبراتور به β-actin تقسیم می‌نماییم.

فرمول محاسبه مقدار نسبی بیان ژن تقسیم WT1 (از کتابچه راهنمای استفاده از دستگاه) :

$$\text{Normalized Ratio}=\frac{\frac{\text{WT1 Con.(Sample)}}{\beta\text{-actin Con.(Sample)}}}{\frac{\text{WT1 Con.(Calibrator)}}{\beta\text{-actin Con.(Calibrator)}}}$$

حساسیت PCR برای ژن‌های WT1 و β-actin در حدود 10^5 بود. نقش ژن کنترل داخلی(house keeping gene)، ژنی که در یک فرد و در افراد مختلف و در تمام سلول‌های هسته‌دار به ویژه سلول‌های هماتوپویتیک در زمان‌های متفاوت بیان ثابت و زیادی دارد، این است که تمام تغییراتی که ممکن است از زمان تهیه خون محیطی تا پایان ساخت cDNA در یک نمونه رخ بدهد را اصلاح می‌کند و امکان مقایسه یک نمونه را با نمونه‌های دیگر فراهم می‌نماید(مانند مقدار سلول‌های تک هسته‌ای برداشت شده، تفاوت‌های حاصل در استخراج RNA، تخریب RNA، کیفیت RNA، خطاهای پیپتینگ و تفاوت‌های حاصل در ساخت cDNA). نقش کالیبراتور، اصلاح اختلافاتی است که ممکن است بین نوع آمپلی فیکاسیون دو ژن هدف و مرجع مانند اتصال پروب وجود داشته باشد. نقش منحنی استاندارد تصحیح efficiency واکنش‌های PCR در ران‌های کاری متفاوت است.

آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS Version ۱۰ انجام شد. آزمون Mann whitney برای بررسی تفاوت موجود در میزان بیان ژن WT1 در افراد سالم و زمان تشخیص در مبتلایان به AML استفاده شده است. آزمون Roc Curve برای بررسی فاصله زمانی بین دو مرحله بهبودی بالینی و آغاز عود مولکولی و آزمون Risk Estimate Detection جهت تعیین خطر نسبی بروز و عود به کار گرفته شدند.

یافته ها

بیماران مورد مطالعه ۶۲ نفر مبتلا به انواع AML بودند. میانگین سنی افراد سالم ۲۵/۷ و محدوده سنی آن‌ها ۳۶/۷– ۲۱/۸ سال بود(نمودار ۱). میزان بیان WT1 را در انواع لوکمی‌های میلوئیدی نشان می‌دهد. مقایسه این موارد با میزان بیان WT1 در افراد سالم اختلاف معنی‌داری را نشان داد($p<0/001$). در حالی‌که میزان بیان WT1 در این دسته از لوکمی‌ها در زمان تشخیص بالا بود.

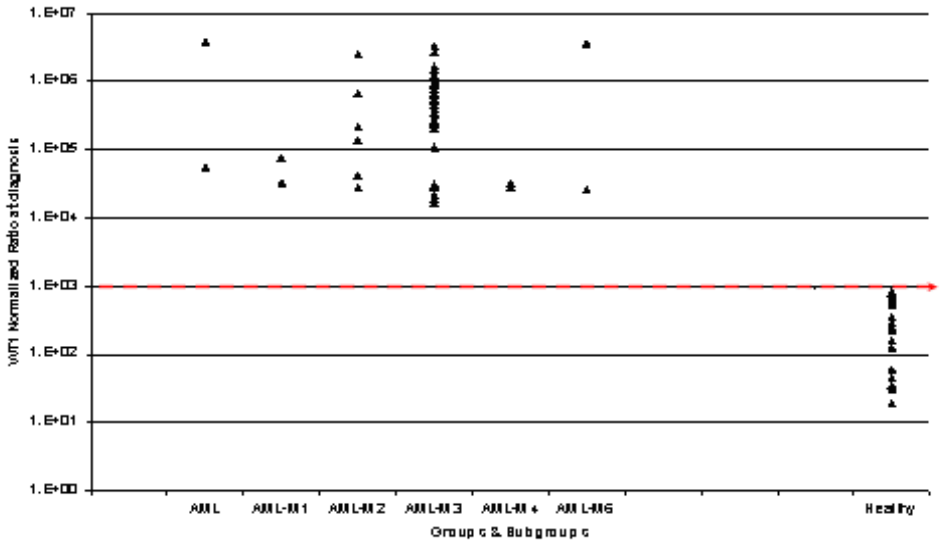
کینتیک WT1 در بیماران مبتلا به AML:

به منظور ارزیابی بررسی میزان بیان WT1 طی مراحل تشخیص و درمان لوکمی‌ها، تغییرات بیان WT1 را در طول دوره درمان و بعد از آن مورد بررسی قرار دادیم. نتایج به دست آمده در ۴۳ بیمار تحت مطالعه نشان داد که میزان بیان WT1 در هنگام تشخیص بالا بود($۶/۴\times10^5$) و در ۶ مورد پی‌گیری که بیماران در بهبودی کلینیکی بودند، این میزان با ۱ الی ۳ لگاریتم کاهش به حدود $۷/۸\times10^2$ رسید. در بیمارانی که در نهایت به عود بالینی مبتلا شدند، ۱ الی ۶ ماه قبل از بروز نشانه‌های عود بالینی میزان بیان WT1 شروع به افزایش کرد. در زمان عود بالینی میزان بیان WT1 شدیداً افزایش یافت و به حدود زمان تشخیص باز گشت.(۸×10^5، ۱ الی ۳ لگاریتم افزایش). میزان بیان WT1 حتی در زمان بهبودی کلینیکی کمی بالاتر از سطح بیان WT1 در افراد سالم است.

تشخیص حداقل بیماری باقیمانده و پیش‌بینی وقوع عود:

هدف اصلی اجرای این تحقیق یافتن آستانه‌ای از بیان WT1 در پی‌گیری‌های بیماران لوکمی میلوئیدی بود که بین بیماران پرخطر و کم‌خطر تفاوتی قایل شود. به این

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]



نمودار ۱: بیان نسبی و کمی ژن WT1 در زمان تشخیص لوکمی‌های میلوئیدی به روش Real-Time RT-PCR

همان‌طور که ملاحظه می‌شود هر یک از نقاط نشان‌دهنده مقدار بیان WT1 در زمان تشخیص هر یک از بیماران است. زیر گروه ها روی محور Xها آمده است. خط نقطه‌چین نشان‌دهنده بالاترین مقدار بیان در افراد سالم است.

منظور روند تغییرات بیان WT1 را در زمان بهبودی کلینیکی تا بروز عود بالینی مورد توجه قرار دادیم. همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد، در مبتلایان به AML در زمان بهبودی بالینی میزان بیان به حدود $۷/۸\times۱۰^{۲}$ کاهش یافت. بر این اساس ملاحظه شد که در تمام این بیماران در مقطعی از دوران درمان، میزان بیان WT1 نسبت به سطح متوسط آن در بهبودی بالینی افزایش یافت و در پی‌گیری‌های بعدی بیشتر شد. در نهایت بعد از زمان ۶ ماه یا کمتر به عود بالینی انجامید.

این مقطع را می‌توان آغاز عود مولکولی دانست. میزان بیان WT1 در این مقطع $۵/۱\times۱۰^{۳}$ تعیین گردید. نکته قابل توجه فاصله زمانی بین دو مرحله بهبودی کلینیکی و آغاز عود(مولکولی) و هم‌چنین مقدار بیان WT1 بین این دو مرحله است. به منظور بررسی موضوع و تایید آن تجزیه آماری Roc Curve انجام شد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحلیل، ناحیه‌ای از بیان WT1 که دارای حداکثر حساسیت(۱۰۰٪) در زمان بهبودی کلینیکی باشد($۱/۹\times۱۰^{۳}$) تا ناحیه‌ای که دارای حداکثر ویژگی(Specificity) در زمان قبل از عود باشد($۳/۹\times۱۰^{۳}$) به عنوان ناحیه خاکستری(Gray zone) تعیین شد.

خصوصیت ناحیه خاکستری این است که اگر سطح بیان WT1 در فرد بیماری در مراحل پی‌گیری به این ناحیه وارد شود، بایستی تحت نظارت بیشتری قرار بگیرد و مقدار بیان WT1 در چنین بیماری به فواصل زمانی کوتاه‌تر اندازه‌گیری گردد تا در صورت ادامه روند افزایشی می‌توان از خطر وقوع عود(در مرحله مولکولی نه بالینی یا هماتولوژیک) آگاه شد.

بر مبنای همین تحلیل مشخص شد که تمامی بیمارانی که در بهبودی کامل کلینیکی باقی ماندند، مقادیر بیان WT1 در آن‌ها به این ناحیه وارد نشد و یا اگر در موردی میزان بیان WT1 به این محدوده افزایش پیدا کرد، در پی‌گیری‌های بعدی دوباره کاهش یافت.

مقایسه بین بیان و سایر شاخص‌های مولکولی MRD:

برای پی‌بردن به ارزش بررسی بیان WT1 به عنوان یک مارکر برای تشخیص MRD در لوکمی‌های میلوئیدی، میزان بیان WT1 را در دوره پی‌گیری ۷ بیمار مبتلا به AML-M3 که دارای سیتوژنیک(۱۷؛ t(۱۵ و PML-RARα بودند، ارزیابی کردیم. برای این مقصود نمونه‌های خون محیطی مربوط به زمان تشخیص و پی‌گیری‌های بعدی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

مورد استفاده قرار گرفت(بررسی فیوژن PML-RARα به روش Real-Time با کیت مربوطه که از شرکت رُوش تهیه شده بود، انجام گردید). تقریباً در تمام موارد الگوی بیان WT1 به موازات ژن PML-RARα تغییر کرد. تجزیه و تحلیل، همبستگی مطلوبی را بین نحوه بیان ژن‌های WT1 و PML-RARα نشان داد (p=۰/۰۰۱ و r=۰/۶۷۵).

بحث

بالا بودن میزان بیان WT1 در زمان تشخیص، کاهش آن در بهبودی کلینیکی و افزایش مجدد آن در هنگام عود نشان‌دهنده مفید و کارآمد بودن ارزیابی WT1 برای تشخیص اولیه عود است. به منظور اطمینان از قابل اعتماد بودن بیان WT1 به عنوان شاخصی برای MRD، میزان بیان WT1 را به صورت کمی در نمونه‌هایی که دارای شاخص PML-RARα بودند اندازه‌گیری کردیم. یک همبستگی قوی(p<۰/۰۰۱) در میزان بیان ژن بین WT1 و PML-RARα مشاهده شد. این نتیجه نیز نشان داده که ارزیابی WT1 به روش کمی دارای اعتبار بوده و قابل اعتماد است. با توجه به این که مقدار زمینه‌ای بیان WT1 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد سالم بسیار کم($۲/۹\times۱۰^{۲}$) بود، حساسیت روش بین $۱۰^{-۴}$ تا $۱۰^{-۵}$ تعیین شد.

با اندازه‌گیری‌های مداوم سطح WT1 با استفاده از روش Real-time، سعی کردیم MRD را در بیماران مبتلا به لوکمی حاد میلوئیدی تعیین کنیم. دکتر اینو و همکارانش با کنترل مداوم بیماران خود ملاحظه کردند که در تعدادی از بیماران لوکمیک، ۲ الی ۸ ماه قبل از عود بالینی، MRD به حد قابل اندازه‌گیری افزایش یافت. در بعضی از بیماران با قطع شیمی درمانی، MRD به تدریج یا به سرعت افزایش یافت. در حالی‌که در بیمارانی که درمان تحکیمی را تمام کردند، MRD منفی شد(۶). دکتر کروزر و همکارانش نیز با اندازه‌گیری WT1 در مبتلایان به لوکمی حاد پی بردند که WT1 پارامتر قدرتمندی در تعیین حداقل بیماری باقیمانده است(۱۲). دکتر اگاوا و همکارانش WT1 را کاندید مناسبی برای تعیین MRD در بیماران لوکمیک(ALL، AML، CML) که پیوند آلوژن دریافت کرده بودند دانستند. دکتر اوگاوا از WT1 به عنوان یک شاخص MRD عمومی در لوکمی‌ها نام برد(۱۳). دکتر گارج و همکارانش نشان دادند که WT1 فاکتور مولکولی مفیدی برای بررسی حداقل بیماری باقیمانده در لوکمی‌هاست. بر اساس مطالعه دکتر گارج در موارد عود، میزان بیان WT1 ۲ الی ۴ ماه قبل از بروز عود هماتولوژیک افزایش می‌یابد(۱۴). در اجرای طرح حاضر MRD با روش کمی Real-time PCR برای ژن WT1 در ۵۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفت. محدوده تغییرات بیان WT1 در دوران بهبودی در حدود $۷/۸\times۱۰^{۲}$ در بیماران AML بود، اما در تمام موارد منتهی به عود، میزان بیان WT1 به طور مستمر افزایش نشان داد تا این که به عود آشکار انجامید. در این مبتلایان از ۱۰ درصد موارد میزان بیان WT1 در مقطعی از دوره درمان به حدود $۵/۱\times۱۰^{۳}$ رسید(وقوع عود مولکولی) و از آن پس به طور مداوم افزایش یافت. عود بالینی بین ۱ تا ۶ ماه بعد از این نقطه آغازی تظاهر یافت. میزان بیان ژن WT1 در زمان عود بالینی به اندازه ۳-۱ لگاریتم افزایش یافت. در حالی‌که همه بیمارانی که میزان بیان WT1 در آن‌ها به $۵/۱\times۱۰^{۳}$(AML) نرسید، همگی در بهبودی کلینیکی به سر بردند.

تجزیه و تحلیل آماری به روش Roc Curve نشان داد که ناحیه‌ای از بیان WT1 که در حدفاصل بهبودی کلینیکی و آغاز عود مولکولی قرار دارد، (ناحیه خاکستری) منطقه‌ای است که بین بیماران با ریسک بالا و پایین تفاوت ایجاد می‌کند. لذا بیمارانی که سطح بیان WT1 در آن‌ها به این محدوده افزایش می‌یابد بایستی تحت مراقبت بیشتری قرار بگیرند و در فواصل زمانی کوتاه‌تری بررسی شوند.

آزمون تخمین خطر نشان داد که احتمال بروز عود در بیماران AML حداقل ۲۷ و حداکثر ۳۱ برابر بیشتر از مواردی بود که میزان بیان در آن‌ها به محدوده خاکستری افزایش نیافت(p<۰/۰۰۰۱). بر این مبنا افزایش به حد تعیین شده در مرحله قبل از عود، بیان‌کننده عود مولکولی و به احتمال قریب به یقین وقوع عود بالینی در آینده‌ای نه چندان دور بود. بر اساس اطلاعات به دست آمده از این طرح، فاصله زمانی بین عود مولکولی تا عود بالینی ۱ تا ۶ ماه تعیین شد. لذا توصیه می‌شود افزایش مداوم و پیشرونده در میزان بیان WT1 به بیش از منطقه خاکستری به منزله مثبت شدن MRD و آغاز عود مولکولی در نظر گرفته شود.

در خصوص استفاده از خون محیطی به جای مغز

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

استخوان باید گفت از آن‌جا که سلول‌های خون محیطی محصول فعالیت خون‌سازی مغز استخوان هستند، لذا منعکس کننده وقایع رخ داده در مغز استخوان می‌باشند. دسترسی آسان به خون محیطی مزیتی انکارناپذیر است که انجام آزمایش را در هر آزمایشگاهی ممکن می‌کند(۱۵). نکته دیگر این که توقف در روند تمایز یک رده سلولی باعث تکثیر و حضور این سلول‌ها در خون محیطی می‌شود. توفیق در درمان باعث کاهش تعداد سلول‌های لوکمیک به طور متناسب و همگام در خون محیطی و مغز استخوان می‌شود. دکتر سیلونی و همکارانش نیز با بررسی بیان WT1 در نمونه خون محیطی و مغز استخوان در مبتلایان به لوکمی‌های حاد اظهار داشتند چون مقدار بیان WT1 در خون محیطی افراد سالم و در بیمارانی که در بهبودی کلینیکی بودند بسیار کم است، لذا اندازه‌گیری میزان بیان WT1 در خون محیطی می‌تواند حتی حساس‌تر از مغز استخوان در آشکار سازی عود باشد(۱۱).

نتیجه‌گیری

نتیجه نهایی این که ارزیابی مولکولی میزان بیان WT1 به روش کمی RQ-PCR قادر است به درستی و با قابلیت تکرار بالا، حداقل بیماری باقیمانده در بیماران مبتلا به لوکمی‌های حاد میلوئیدی را بدون در نظر گرفتن وجود یا عدم شاخص‌های استاندارد به ما نشان بدهد. اگر چه این نیاز وجود دارد که نتایج تحقیق حاضر در ابعاد وسیع‌تر مورد تایید واقع گردد، با این حال ما معتقدیم که ارزیابی بیان WT1 یک آزمون ضروری برای پیشگیری و مدیریت بر عود در بیماران لوکمیک است. در صورت بیشتر بودن تعداد نمونه، حضور تمام زیر گروه‌های FAB(British، American، France) و انجام پی‌گیری طولانی‌تر و برقراری ارتباط بیشتر با بخش بالینی، یقیناً نتایج ارزشمندتری حاصل خواهد آمد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

References :

1- Cave H, Van der Werfften Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E.: Clinical Significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for research & Treatment of Cancer-childhood Leukemia Cooperative Group , N Engl J Med 1998; 27 : 591-598.
2- Liu Yin JA, Tobal K. Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methodologies, clinical & biological significance. British Journal of Haematology 1999 ; 106 : 578-590.
3- San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopezberges C, Gonzalez M, Caballero D, Garcia-Marcos MA, Ramos F, Fernandes-Calvo J, Calmuntia MJ, Diaz-Mediavilla J, Orfao A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients . Blood 1997; 90:2465-2470.
4- Call KM, Glaser TM, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Rose EA, et al. Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide Gene at the Human Chromosome 11 Wilms' Tumor Locus, Cell 60: 509-520(1990).
5- Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, et al. High levels of Wilms' Tumor gene (WT1) m RNA in Acute Myeloid Leukemias are Associated with a worse Long-Term Out come. Blood 1997; 90: 1217-1225.
6- Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Naka gawa M, Yamagami T, Miwa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in Acute Leukemia . Blood 1994; 84; 3071-3079.
7- Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, Miyake S, et al. Abberrant overexpression of the wilms' tumor gene (WT1) in human Leukemia. Blood 1997; 89: 1405-1412.
8- Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, et al. Wilms tumor gene (WT1) competes with differentiation- inducing Signal in hematopoietic progenitor cells. Blood. 1998; 91: 2969-2976.
9- Schmid D, Heinze G, Linnertin B, Tisljiar K, Kusec R, Geissler K, Sillaber C, Laczika K, Mitterbauer M, Zochbauer S, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, jager U, Gaiger A,: Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. Leukemia 1997; 11: 639-643.
10- Gaiger A, Schmid D, Heinze G, linnerth B, Greinix H, Kalhs P, Tisljiar K, Priglinger S, Laczika K, Mitterbauer M, Novak M, Mitterbauer G, Mannhakter C, Haas OA, Lechner K, Jager U,: Detection of WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia.Leukemia 1998 ; 12: 1886-1894.
11- Cilloni D, Gottardi E, Micheli D, Fava M, Messa F, Carturan S, *et al*. Quantitative assessment of WT1 expression by real-Time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute Leukemia patients. Leukemia. 2002 ; 16:2115-2121.
12- Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, Appeltc C, Na IK, le Coutre P, *et al*. Fluorescent 5'–exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms'tumor gene(WT1) mRNA : implication for monitoring human Leukemias . British Journal of Haematology. 2001 ; 114: 313-318.
13- Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsabio A, *et al*. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction & management of relapse following allognic stem cell transplantation in acute type leukemia. Blood. 2003 ; 101 :1698-1704 .
14- Garg M, Moore H, Tobal Kh, LiuYin JA. Prognostic Significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by Competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukemia . British Journal of Haematology 2003; 123: 49-59.
15- Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human Leukemias. Leukemia 1992; 6: 405- 409.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]

Assessment of Wilms tumor gene (WT1) in acute myeloid leukemia patients as a new marker to detect Minimal Residual Disease (MRD)

Hemmaty T.[1](MS) ,Ghaffari H.[2](PhD), Alimoghaddam K.[2](MD), Gharehbaghian A.[1](PhD), Rostami Sh.[2](MS), Ashouri A.[2](MS)

[1]Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center
[2]Hematology, Oncology & BMT Research Center, Dr. Shariati Hospital

Abstract

Background and Objectives

WT1 gene encodes a transcription factor that is involved in differentiation and proliferation of hematopoietic precursor cells as well as some other tissues like kidney, ovary, heart, etc. Quantitative assessment of WT1 gene expression is proposed as a useful marker in MRD detection and leukemia management.

Materials and Methods

To assess the relevance of this gene, we analysed peripheral blood mononuclear cells of 62 AML patients (new cases) for the expression level of WT1 mRNA using Real-time quantitative RT-PCR. We followed the analysis up to 3 years, depending on patient availability. This study as a fundamental and applicable one was done cross-sectionnaly. Samples were obtained randomly from the AML patients referred to the BMT center, and selection was based on the diagnostic criteria defined by clinical wards. WT1 expression in MNCs of patients was compared with 24 healthy individuals (K562 cells considered to express WT1 gene equivalent to 10^6).

Results

Samples for diagnosis showed significantly high levels of WT1 expression (>80%). After chemotherapy, its expression decreased (diminished about 1-2 log within induction therapy and around 3-4 log after consolidation therapy). There was a noticable correlation between the relative expression levels of WT1 and predicition of relapse (lower than gray zone versus higher than). Patients whose WT1 expression levels remained lower than the gray zone benefit from a better compete remission. On the contrary, 1-6 months prior to overt clinical relapse in 6 patients, their WT1 expression raised to levels upper than gray zone.

Conclusions

This study revealed that WT1 is a useful marker for detecting minimal residual disease, assessing chemotherapy effects, and prediciting relapse in AML patients.

Key words: WT1 gene, Minimal Residual Disease (MRD), PCR
SJIBTO 2006; 3(3):233-241

Received: 14 Jan 2006
Accepted: 17 Oct 2006

Correspondence: Hemmaty T, MS of Hematology. IBTO Research Center.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel:(09821)88601501-20; Fax:(09821)88601556
E-mail: *Turadj Hemmati224@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-12]