

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

غلامرضا نویدی<sup>۱</sup>، دکترحوری رضوان<sup>۲</sup>، دکتر سیامک سمیعی<sup>۳</sup>، رامین نقی زاده<sup>۴</sup>، دکتر عباس حاجی فتحعلی<sup>۵</sup>، دکتر فرامرز سلیمانلو<sup>۶</sup>، دکتر رهی طاهرنیا<sup>۷</sup>، شارمین اسماعیل زاده<sup>۸</sup>

### 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: ۸/۱۱/۸۳

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 میکروبی شناسی- آزمایشگاه بیمارستان دی
- ۷- پزشک عمومی- آزمایشگاه بیمارستان دی
- ۸- کارشناس بیولوژی مولکولی- آزمایشگاه بیمارستان دی

**مقدمه**

لوسمی میلوئید مزمن<sup>۱</sup> از دسته بیماری‌های مزمن میلوپرولیفراتیو می‌باشد که به دلیل موتاسیون اختصاصی در سلول‌های بنیادی چند قوه‌ای<sup>۲</sup> 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 به‌عنوان یکی از عوامل بروز CML در بیماران شناسایی نمود. در سال ۱۹۸۰ مشخص شد که کروموزوم فیلادلفیا حاصل اتصال ژن ABL<sup>۳</sup> بر روی کروموزوم ۹ با بخش BCR<sup>۴</sup> 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 P210 است که فعالیت غیرطبیعی تیروزین کینازی داشته و این فعالیت آن موجب بی‌نظمی در تکثیر سلول‌ها و کاهش پاسخ مرگ طبیعی سلول‌ها<sup>۵</sup> 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 به‌منظور سرکوبی سلول‌هایی است که حامل ژن معیوب BCR-ABL می‌باشند (۶). در سال‌های اخیر داروی جدیدی به‌نام 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 به‌عنوان 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<sup>۶</sup> جمع‌آوری شد، RNA تام آن با استفاده از محلول تخلیص اسید نوکلئیک Tripure isolation ساخت کارخانه رُش دیاگنوستیکس خالص گردید (۸).

**روش RT-PCR کمی:**

روش RT-PCR<sup>۷</sup> کمی با استفاده از تکنولوژی Real-Time به‌وسیله دستگاه Light Cycler ساخت کارخانه رُش دیاگنوستیکس انجام گردید. در ابتدا از RNA تام تخلیص شده به‌وسیله هگزامر تصادفی (Random Hexamer) و آنزیم AMV، C-DNA تهیه شد. سپس در جریان PCR، C-DNA به‌وسیله پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید. به‌منظور اطمینان از کیفیت خالص‌سازی و تکثیر اسید نوکلئیک و نیز اندازه‌گیری بیان ژن، از ژن G6PDH به‌عنوان ژن کنترلی (House Keeping) استفاده شد. پس از انجام PCR، نرم‌افزار سیستم Light Cycler (Version 3.5) به‌طور 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 Myelogenous 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 اندازه‌گیری گردید. به طور کلی روش‌های مولکولی رایج برای ارزیابی میزان بیان این ژن، فیش<sup>۱</sup>، PCR چندگانه<sup>۲</sup> و RT-PCR کمی است. تمامی آن‌ها 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 حساس‌تر از روش‌های دیگر می‌باشد (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 بیان‌کننده آن بوده است که بیان ژن بیمارانی که پیوند مغزاستخوان شده و پس از ۸ ماه وضعیت عمومی نسبتاً پایداری داشته‌اند 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 کوتاه‌تری (۴ ماه) درمان شده‌اند، بیان ژن بیش از موارد پیوند شده بوده است که این مشاهده می‌تواند مؤید آن باشد که اثر درمانی ایماتینیب تدریجی بوده و به عبارت دیگر مدت زمان و مقدار صحیح داروی مصرف شده عوامل مهمی در نتیجه‌گیری از درمان می‌باشد و نتیجه در بهترین شرایط قابل قیاس با پیوند مغزاستخوان است. این یافته با بررسی‌های دیگر مانند گزارش کانتاراژیان و همکارانش مطابقت دارد. در این مطالعه انطباق بین RQ-PCR<sup>۳</sup> و نتایج آن در بیماران نسبت به پاسخ سیئورنیتیک در بیمارانی که بیش از ۶ ماه تحت درمان بوده‌اند بسیار بهتر از بیمارانی بوده که در مدت کوتاه‌تری درمان شده‌اند (۱۰). بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از داروی ایماتینیب به میزان کافی ( $400\text{mg/d}$ ) و مدت مناسب، می‌تواند به عنوان درمانی مناسب برای بیماران CML در نظر گرفته شود. در یک مطالعه اخیر نشان داده شده که مصرف بیش از  $800\text{mg/d}$  نه تنها مفید نبوده است بلکه در بیماران عوارض سمی نیز ایجاد می‌نماید (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 نمونه‌ها، آزمون براساس روش Mann-Whitney صورت گرفت، این روش براساس مقایسه رتبه‌بندی بدون در نظر گرفتن میانگین می‌باشد.

### یافته‌ها

پس از نمونه‌گیری از بیماران که همگی به صورت مقطعی به آزمایشگاه مراجعه نمودند، نمونه‌ها براساس طول زمان مصرف دارو و مدت زمانی که از پیوند مغزاستخوان آن‌ها می‌گذشت به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول (I) بیمارانی که از زمان پیوند و مصرف دارویی آن‌ها کمتر از ۴ ماه می‌گذشت. گروه دوم (II) بیمارانی که از درمان آن‌ها با هر یک از دو روش بین ۴ تا ۸ ماه می‌گذشت و بالاخره گروه سوم (III) بیمارانی که درمان آن‌ها بیش از ۸ ماه بوده و وضعیت آن‌ها پایدار شده بود. نتایج به دست آمده از میزان بیان ژن BCR-ABL که برحسب درصد با احتساب نسبت  $BCR-ABL/G6PD \times 100$  محاسبه گردیده در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

همان‌گونه که مشهود است میزان بیان ژن در گروه (I) در بیمارانی که تحت درمان با ایماتینیب بوده‌اند 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

اودورو و همکارانش گزارش نمودند که میزان بیان ژن BCR-ABL با احتمال عود بیماری متناسب است و در نتیجه میزان بیان ژن می‌تواند به‌عنوان 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٪ به‌دست آمده است. به‌عبارت دیگر احتمال برگشت بیماری در آن‌ها کم می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

این بررسی به‌عنوان 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.

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 به‌نظر می‌رسد که می‌توان این دارو را برای بیمارانی که به تازگی بیماری آن‌ها تشخیص داده می‌شود به‌عنوان 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 بیماران انجام شود و این موضوع امکان مرگ و میر را کاهش می‌دهد (۱۲). بنابراین امروزه به‌غیر از پیوند مغزاستخوان که به‌عنوان درمان اختصاصی برای CML ناشی از کروموزم فیلادلفیا شناخته شده است، استفاده از ایماتینیب یا Gleevec<sup>®</sup> به‌عنوان 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 به‌دلیل 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

### 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. 38<sup>th</sup> 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, Schlttheis 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.<sup>1</sup> (MS), Rezvan H.<sup>2</sup> (PhD), Samiei S.<sup>1</sup> (PhD), Naghizadeh R.<sup>1</sup> (MS), Hajifathali A.<sup>3</sup> (MD), Soleimanlo F.<sup>1</sup> (PhD), Tahernia R.<sup>1</sup> (MD), Esmaeilzadeh Sh.<sup>1</sup> (BS)

<sup>1</sup>Day Hospital Laboratory

<sup>2</sup>Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

<sup>3</sup>Shahid 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<sup>®</sup>, 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