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

علی‌اصغر کیانی[1]، فرهاد شاهسوار[2]، کلثوم احمدی[3]، وحیده حیدری نظرآباد[3]، بنفشه بهمنی[4]، مجتبی گرجی*[5]

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 می‌شود 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 روش‌ها: 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.

یافته‌ها: 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 نتیجه‌گیری: فیوژن b3a2 که تولیدکننده‌ی 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.

واژه‌های 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

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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 پیش ساز 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)، پلی سایتمی ورا، اسنشیال ترومبوسیتمی و میلوفیبروز مزمن با منشأ ناشناخته می‌باشند (۵،۶). لازم به ذکر است که در این تقسیم بندی گروه‌های دیگری همچون لوسمی نوتروفیلی مزمن و سندروم هایپرائوزینوفیلیک هم وجود دارند (۷،۸).

از مهم‌ترین تغییرات ژنتیکی دخالت کننده 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 قرارگرفته و ژن هیبرید ABL-BCR به وجود می‌آید (۱۱-۹). این فیوژن نقش مهمی در فعال نمودن تیروزین ۱۷۷ و درنتیجه آغاز فرایند لوکموژنز 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 پیش آگهی و پاسخ به درمان دارای اهمیت باشد. به گونه‌ای که بیماران دارای فیوژن های b2a2 و b3a2 ایجاد کننده پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتون دارای پیش آگهی 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 فیوژن های ABL-BCR بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

تمامی بیماران با تشخیص احتمالی بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن مراجعه کننده 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 میلوبلاست تا سلول‌های بالغ) به همراه مونوسیت‌ها در گردش خون حضور دارند. تعداد میلوبلاست‌ها کمتر از ده درصد بوده و نوتروفیل‌های بالغ به همراه میلوسیت‌ها بیشترین جمعیت سلول‌های سفید را تشکیل می‌دهند. همچنین رنگ آمیزی آلکالن 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.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

برای تشخیص فیوژن ABL-BCR حدود ۱۰-۵ 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 ترایزول (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 تکثیری و برنامه دمایی به ترتیب در جداول شماره ۱ تا ۳ آورده شده‌اند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای Multiplex PCR

نام پرایمر	توالی ´۵ به ´۳
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 تکثیری با استفاده از پرایمرهای ذکرشده برای فیوژن‌های ABL-BCR

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

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

درنهایت 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 ۱۴±۴۸ 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.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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

			فیوژن	تعداد کل
			b2a2	b3a2	
جنس	مرد	تعداد	۱۰	۱۴	۲۴
		درصد	٪۴۱/۷	٪۵۸/۳	٪۱۰۰
	زن	تعداد	۸	۲۳	۳۱
		درصد	٪۲۵/۸	٪۷۴/۲	٪۱۰۰
تعداد کل		تعداد	۱۸	۳۷	۵۵
		درصد	٪۳۲/۷	٪۶۷/۳	٪۱۰۰

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 نتیجه گیری

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 واریان های ABL-BCR نقش مهمی در تشخیص و درمان بیماران CML دارند (۴،۱۹،۲۰). در این مطالعه بیماران دارای مورفولوژی CML از نظر شیوع فیوژن های ABL-BCR مورد بررسی قرار گرفتند. درنهایت از میان ۵۸ بیمار فیلادلفیا مثبت، 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 ابتلا 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

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

نمودند (۲۴). مطالعات مشابه دیگر نیز کمابیش این مطالب را تأیید می‌نمایند (۲۸-۲۵).

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.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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. Saußele 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.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]