Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

مقاله پژوهشی

بررسی ارزش تشخیصی ردیابی جهش BRAF V600E در بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی سلول مویی

بهزاد پوپک [۱]، حمیده راستان [۲]، ساغر ربیعی‌پور [۳]، نازیلا صفری [۴]، طاهره مدنی اصفهانی [۵]،
محمدعلی جهانگیرپور [۶]، فاطمه شیخ‌سفلی [۷]، گلاره خسروی‌پور [۸]

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۴/۰۹/۱۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه موتاسیون BRAF V600E به‌عنوان مارکر مولکولی لوسمی سلول مویی (Hairy Cell Leukemia: HCL) مطرح‌شده و ردیابی آن ارزش تشخیصی و درمانی یافته است. مقایسه ارزش تشخیصی ردیابی موتاسیون مذکور با دیگر روش‌های رایج در شناسایی این بیماری در مبتلایان ایرانی هدف اصلی این مطالعه است.

مواد و روش کار: ردیابی جهش BRAF V600E در ۱۷ بیمار، به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش افتراق آللی صورت گرفت. جهت مقایسه ارزش تشخیصی ردیابی این جهش با سایر روش‌ها، سابقه‌ای از انجام تست ردیابی سلول‌هایی با زوائد مویی در اسمیرهای تهیه‌شده از نمونه‌های بیماران و ایمونوفنوتایپینگ به کمک فلوسیتومتری آنان جمع‌آوری شد.

یافته‌ها: وجود سلول‌های مویی در اسمیرهای مربوط به ۱۴ نفر از بیماران گزارش شده است. نتایج ایمونوفنوتایپینگ این بیماران در ۹ مورد " تشخیص قطعی" در ۴ مورد، "بسیار مشکوک" و در ۱ مورد "مشکوک" بوده، درحالی‌که موتاسیون BRAF V600E در تمامی آن‌ها ردیابی شده است. بررسی‌های میکروسکوپیک و فلوسیتومتریک در ۳ بیمار باقیمانده وجود لوسمی سلول مویی را نفی کرده و این امر با عدم وقوع موتاسیون فوق‌الذکر در آن‌ها همراه بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری: ازآنجاکه نتایج آنالیزهای مولکولی تأییدی بر نتایج ۲ روش دیگر بوده است، چنین برمی‌آید که ردیابی جهش BRAF V600E ارزش تشخیصی بالایی در شناسایی لوسمی سلول مویی دارد و تست تأییدی مناسبی است.

کلیدواژه‌ها: لوسمی سلول مویی، پروتئین سرین – ترئونین کیناز، موتاسیون BRAF V600E

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره دهم، ص ۸۸۹-۸۸۱، دی ۱۳۹۴

آدرس مکاتبه: خیابان شریعتی، خیابان خاقانی، تهران، ایران، کد پستی:۱۹۳۹۵/۱۴۹۵، تلفن: ۰۹۱۲۱۱۹۶۴۲۲،
Email: bpoopak@gmail.com

مقدمه

در سال ۱۹۵۸، Bouroncle و همکارانش گروهی از بیماران دارای لوسمی رتیکولواندوتلیوزیس با ویژگی‌های بالینی مشخص و متمایز از سایر اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن را توصیف کردند (۱). پس از ۸ سال Donnelly و Schrek برای اولین بار واژه سلول مویی را برای توصیف سلول‌های بدخیم در این بیماری به کار بردند که اشاره بر زوائد سیتوپلاسمی مو شکل این سلول‌ها در بررسی لام خون محیطی با میکروسکوپ فاز کنتراست داشته و سبب گشته است این بیماری را لوسمی سلول مویی [1] به‌نامند، اختلالی که

[۱] دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی، دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول)
[۲] کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران
[۴] کارشناس ارشد انکولوژی مولکولی، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران
[۵] کارشناس ارشد هماتولوژی، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران
[۶] کارشناس ارشد بیوشمی سرطان، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران
[۷] کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران
[۸] پزشک، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران

[1] Hairy Cell Leukemia: HCL

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

تقریباً ۲ درصد از تمامی لوسمی‌ها را به خود اختصاص داده است (۳،۲).

هرچند که سن ابتلا به این بیماری طیف گسترده‌ای دارد، اما اکثراً در دهه ششم زندگی و بیشتر در مردان بروز می‌یابد، به‌گونه‌ای که نسبت مردان مبتلا به زنان مبتلا در اکثر نقاط دنیا به‌طور متوسط ۴ به ۱ گزارش شده است (۴). از ویژگی‌های بارز این بیماری می‌توان به دوره کند، سیتوپنی، آنمی و اسپلنومگالی اشاره کرد که بر اساس آن‌ها اکثر بیماران به‌صورت اتفاقی و معمولاً به دنبال درد شکمی ناشی از بزرگ‌شدگی طحال و یا سطوح پایینی از لکوسیت‌ها و پلاکت‌ها در یک تست چکاپ تشخیص داده می‌شوند و سن بالا، سطوح پایین هموگلوبین و اسپلنومگالی شدید در آن‌ها با پروگنوز بدتری همراه است (۷-۵).

از تست‌های بالینی و کلینیکی متعددی جهت تشخیص لوسمی سلول مویی استفاده می‌شود. در بررسی‌های بالینی، پزشک معمولاً به دنبال طحال و غدد لنفاوی بزرگ‌شده می‌گردد و مشاهده لنفوسیت‌های دارای زوائد سیتوپلاسمی در لام تهیه‌شده از خون محیطی و آسپیره یا بیوپسی مغز استخوان یکی از ابتدایی‌ترین و البته مهم‌ترین تست‌های کلینیکی در تشخیص این بیماری است. از سوی دیگر به دلیل آنکه سلول‌های لوسمیک در این بیماری علاوه بر آنتی‌ژن‌های عمومی لنفوسیت‌های B (CD19, CD20, CD22)، آنتی‌ژن‌های سطحی ویژه‌ای چون CD11c, CD25 و CD103 را، آن‌هم به‌طور هم‌زمان، بیان می‌کنند و چنین هم‌زمانی‌ای در بیان این آنتی‌ژن‌ها در سایر اختلالات مشابه دیده نشده است، از ایمونوفنوتایپینگ به روش فلوسیتومتری به‌منظور ردیابی این آنتی‌ژن‌ها، حتی در شرایطی که سطوح پایینی از سلول‌های لوسمیک در خون محیطی و آسپیره مغز استخوان وجود دارد، به‌عنوان یک تست تشخیصی تمایزی استفاده می‌شود. بررسی سلول‌های لوسمیک ازنظر فعالیت اسید فسفاتازی مقاوم به تارتارات (TRAP) و بیان آنتی‌ژن Annexin A1 از دیگر تست‌های تشخیصی این اختلال می‌باشند (۱۱-۸).

باوجود مطالعات بسیاری که در زمینه بررسی علائم لوسمی سلول مویی و روش‌های تشخیصی آن صورت گرفته است هنوز اطلاعات جامعی در مورد اساس ژنتیکی این اختلال به‌دست نیامده و این امر نیازمند تحقیقات گسترده‌تری است. بااین‌حال در بررسی‌های مولکولی به نقش کلیدی موتاسیون ژن BRAF در بروز، تشخیص و درمان هدفمند این بیماری اشاره شده است (۱۲).

پس از انتشار اولین گزارش در سال ۲۰۰۲ مبنی بر وجود ژن BRAF جهش‌یافته در سرطان‌های انسانی، تاکنون جهش‌های متعددی در این ژن در ارتباط با پیدایش، تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی ازجمله سرطان‌های کولون، تخمدان، پستان، کارسینوم پاپیلاری تیروئید، گلیوما، ملانوما و ... شناسایی‌شده که بخش عمده این جهش‌ها را موتاسیون BRAF V600E به خود اختصاص داده است (۱۹-۱۳).

ژن BRAF در جایگاه 7q34 قرارگرفته و پروتئین B-raf را که سرین – ترئونین کینازی پروتوانکوژنیک و یکی از اجزای مسیر RAS – RAF – MEK – ERK – MAPK است، کد می‌کند (۲۰). شایع‌ترین موتاسیون این ژن، جهش ترانسورس T→A در اگزون ۱۵ و نوکلئوتید ۱۷۹۹ آن است که منجر به‌جایگزینی گلوتامیک اسید به‌جای والین در موقعیت ۶۰۰ زنجیره پلی پپتیدی پروتئین B-raf می‌شود و بر همین اساس است که موتاسیون مذکور را به‌صورت BRAF V600E نیز نشان می‌دهند. با وقوع جهش، پروتئین خاصیت انکوژنیک یافته، فعالیت کینازی آن تا ۱۰ برابر نسبت به حالت نرمال افزایش می‌یابد و با افزایش رشد، تکثیر و نامیرایی شرایط را در جهت تغییرات نئوپلاستیک پیش می‌برد (۲۲، ۲۱، ۱۳).

لوسمی سلول مویی یکی از اختلالاتی است که اخیراً به نقش جهش BRAF V600E در آن اشاره شده و اهمیت ردیابی این جهش در تشخیص افتراقی آن از سایر اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن مشابه، همچون لنفوم ناحیه حاشیه‌ای طحال، موردبررسی قرار گرفته است. تشخیص افتراقی این لوسمی از اختلالات مشابه خود ازآن‌جهت اهمیت یافته است که برخلاف درمان‌هایی چون اسپلنکتومی و استعمال اینترفرون آلفا، که منجر به بهبود نسبی بیماران مبتلا به لوسمی سلول مویی در گذشته می‌شدند، درمان‌های نوینی ازجمله آنالوگ‌های پورین (کلادریبین و پنتوستاتین) ایجاد شده‌اند که اثرات درمانی قابل توجهی در مبتلایان به این لوسمی دارند، در حالیکه چنین نتیجه‌ای را در بیماری‌های مشابه به آن در پی نخواهند داشت. بر اساس این یافته‌ها، ردیابی جهش BRAF V600E یکی از رایج‌ترین تست‌هایی است که امروزه در مواجهه با یک اختلال لنفوپرولیفراتیو مزمن درخواست می‌شود (۴).

گزارشات متعددی از بررسی نقش جهش BRAF V600E در مبتلایان به لوسمی سلول مویی در سراسر جهان وجود دارد. برای مثال Tiacci و همکارانش طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که تمامی بیماران مبتلا به لوسمی سلول مویی مورد بررسی آن‌ها حامل جهش BRAF V600E در DNA ژنومی خود بوده‌اند، در حالیکه هیچ یک از مبتلایان به دیگر لنفوم ها یا لوسمی‌های سلول B ارزیابی شده توسط آن‌ها چنین واریانتی را نشان نمی‌دادند. از سوی دیگر در گزارشی از یک مطالعه گذشته نگر در غرب ایران نشان داده شد که تنها ۹ درصد از مبتلایان به لوسمی سلول مویی حامل موتاسیون مورد بحث بوده‌اند (۲۳،۱۲).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

بـا توجه به آنچه در باب اهمیت ردیابی موتاســیون BRAF V600E در تشخیص و درمان مبتلایان به لوسمی سلول مویی ذکر شـد از یک سـو و نیازی که بیماری‌های نادری چون لوسمی سلول مویی به مطالعات گسـترده‌تر دارند از سوی دیگر، در این جا سعی داریم گامی هرچند کوچک در جهت بررسـی وضـعیت جهشی ژن BRAF در مبتلایـان ایرانی برداریم و هـدف اصــلی از انجام این مطالعه آن اسـت که در کنار سـایر تسـت‌های رایج در تشـخیص لوسمی سلول مویی، اهمیت ردیابی جهش BRAF V600E را در شــناســایی مبتلایان، مورد ارزیابی قرار دهیم و دریابیم آیا نتیجه حـاصــل از ردیـابی این جهش می‌توانـد تـأییدی بر نتایج ســایر تست‌های تشخیصی باشد یا خیر؟

مواد و روش کار

در این مطـالعـه ۱۷ بیمـاری کـه بـه‌منظور انجام تســت‌های تشـخیصـی و تکمیلی توسـط پزشـک معالج خود از شهرستان‌های مختلف به آزمایشـگاه تشـخیص طبی و تخصـصـی پیوند، به‌عنوان آزمایشــگاه مرجع، معرفی شــده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیماران مورد مطالعه علائم بالینی خاصــی ازجمله درد شــکمی، بزرگ‌شـدگی طحال، ضـعف و ... را نشـان می‌دادند که می‌توانست بیانگر ابتلای آنان به لوسـمی سلول مویی باشد. به‌منظور تشخیص اولیه، هر بیمار سـابقه‌ای از انجام معاینات بالینی و تست‌هایی چون بررسـی لام های تهیه شـده از خون محیطی و آسـپیره یا بیوپسی مغز استخوان به‌منظور مشاهده سلول‌های مویی و ایمونوفنوتایپینگ به روش فلوسـیتومتری جهت ردیابی آنتی‌ژن‌های اختصاصی‌ای که تنها در لوسمی سلول مویی به‌طور همزمان در سطح لنفوسیت‌های B بروز می‌یابند را داشـته است. هرچند نتایج به‌دست‌آمده در اکثر این تست‌ها به همراه علائم بالینی بیمار، وجود لوسمی سلول مویی را نشــان می‌داد اما در برخی مبتلایان، تشــخیص دقیق‌تر برای درمان هدفمند بیماری، نیازمند بررسـی‌های بیشـتر بوده است. به این منظور یکی از تسـت‌های تکمیلی درخواسـت شـده برای این بیماران، ردیابی موتاسـیون BRAF V600E بوده اسـت تا به این ترتیـب بیمـاران ازنظر وجود یک مارکر مولکولی که اخیراً به‌عنوان عامل بروز بیماری مطرح گشــته و در تعیین رژیم درمانی اهمیت فراوانی یافته اسـت مورد بررسی قرار گیرند. جهت انجام این تست ابتدا باید DNA ژنومی از نمونه‌های مورد ارزیابی بیماران استخراج شـده، سـپس به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ازدیاد ژن هدف صــورت گیرد و در نهایت با اســتفاده از کیت‌های تشــخیصــی اختصاصی، غربالگری جهش انجام شود.

استخراج DNA:

اســتخراج DNA ژنومی بر حســب نوع نمونه مورد ارزیابی به روش‌های متفاوتی صورت گرفت. در مواقعی که نمونه مورد بررسی خون محیطی و یا آسـپیره مغز استخوان حاوی ضد انعقاد EDTA بوده است، پس از انجام سانتریفوژ، در خون محیطی لایه بافی کوت و در آسـپیره مغز اسـتخوان سـدیمان را جدا نموده و با استفاده از محلول فـایکول کیـت اســتخراج فرمنتاز (Fermentas، USA)، DNA ژنومی از گلبول‌های سـفید تک هسـته‌ای اسـتخراج شدند. دراستفاده از بیوپسی های مغز استخوان فیکس شده در فرمالین و محاط شده در پارافین جهت استخراج DNA، ابتدا چندین برش از بافت تهیه و عمل دپارافینه کردن آن‌ها با استفاده از گزیلول انجام شـد. سپس نمونه‌ها از الکل عبور داده شده و به مدت یک شب به همراه پروتئیناز K در دمای ۵۶ درجه نگهداری شــدند تا هضــم آنزیمی صورت گیرد. در نهایت با استفاده از کیت استخراج DNA از بـافـت‌های پارافینه (Germany-Roche)، DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد.

DNA اســتخراج شــده به لحاظ کمی (تعیین غلظت DNA استخراج شده) و کیفی (تعیین درجه خلوص DNA استخراج شده بـا خوانش جـذب نوری آن در OD 260/280) بـا اســتفـاده از بیوفوتومتر مورد بررســی قرار گرفت و پس از آن به‌منظور دســت یابی به DNA مورد نظر، الکتروفورز روی ژل آکریل آمید انجام شد و نهـایتـاً ازدیـاد ژن هـدف (اگزون ۱۵ ژن BRAF) بـا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای آلل های نرمال و موتانت صــورت گرفت.

واکـنـش زنـجـیره‌ای پلی مراز بـه روش افتراق آللی (Allelic Discrimination PCR):

در این مطالعه به‌منظور بررســی کیفی ژن هدف، ازدیاد ژن به کمـک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به روش افتراق آللی (Allelic Discrimination PCR) صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در ۴۰ ســیکل برای DNA ژنومی استخراج شده از خون محیطی و آسپیره مغز استخوان و ۳۸ سیکل برای DNA مســتخرج از بافت فیکس شــده در فرمالین و محاط شده در پارافین با حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر (شامل ۵ میکرو لیتر بافر PCR، ۳ میکرو لیتر کلرید منیزیم با غلظت ۲۵ میکرو مولار، ۱ میکرو لیتر dNTP بـا غلظـت ۱.۵ میکرو لیتر از هر یـک از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۲ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۵۰ نـانو گرم در میکرولیتر، ۱ واحـد آنزیم DNA پلی مراز taq (Genetbio) و آب مقطر (بـه مقـداری کـه حجم نهـایی بـه ۵۰ میکرولیتر رســانده شــود)) برای آلل های نرمال و موتانت، در هر نمونه به‌طور جداگانه انجام شد.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

مراحل انجام PCR بر حسب اینکه DNA ژنومی از چه نمونه‌ای استخراج شده باشد، در جداول شماره ۱ و ۲ و توالی پرایمرهای مصرفی در جدول شماره ۳ ذکر شده است.

در پایان، الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید با بافر TBE 0.5Xبرای محصول نهایی PCR انجام شد و وجود یا عدم وجود جهش بر اساس باندهای مشاهده شده برای نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی مشخص گردید (طول قطعه امپلیفیه شده برای آلل های موتانت و نرمال 148bp می‌باشد). ازآنجاکه افراد مبتلا به لوسمی سلول مویی جهش BRAF V600E را به‌صورت هتروزیگوت دریافت می‌کنند، تنها در صورتی یک فرد مبتلا را حامل جهش در نظر می‌گیریم که هر دو باند نمایانگر آلل موتانت و آلل طبیعی به‌طور همزمان در نمونه مورد ارزیابی از وی، قابل مشاهده باشند. در این مطالعه از دیگر روش‌های تشخیصی مانند بررسی فعالیت اسید فسفاتازی مقاوم به تارتارات (TRAP) سلول‌های لوسمیک و بیان آنتی‌ژن Annexin A1 توسط این سلول‌ها، به دلیل آنکه نتایج حاصل از بررسی آن‌ها در سایر بدخیمی‌های مشابه و دیگر رده‌های سلولی نیز مثبت می‌شود استفاده نشده است (۲۵، ۲۴، ۱۱).

جدول (۱): مراحل انجام PCR در شرایطی که DNA ژنومی از خون محیطی و آسپیره مغز استخوان حاوی ضد انعقاد جدا می‌شود.

مدت زمان	دما	مرحله
۵ دقیقه	°C۹۴	واسرشت سازی اولیه
		۴۰ سیکل
۳۰ ثانیه	°C۹۴	واسرشت سازی
۳۰ ثانیه	°C۵۹	اتصال
۱ دقیقه	°C۷۲	گسترش
۱۰ دقیقه	°C۷۲	گسترش نهایی

جدول (۲): مراحل انجام PCR در شرایطی که DNA ژنومی از بافت فیکس شده در فرمالین و محاط شده در پارافین جدا می‌شود.

مدت زمان	دما	مرحله
۵ دقیقه	۹۵°C	واسرشت سازی اولیه
		۳۸ سیکل
۴۰ ثانیه	۹۵°C	واسرشت سازی
۱ دقیقه	۵۸°C	اتصال
۳۰ ثانیه	۷۲°C	گسترش
۱۰ دقیقه	۷۲°C	گسترش نهایی

جدول (۳): توالی پرایمرهای به کار رفته در ردیابی موتاسیون BRAF V600E به روش Allelic Discrimination PCR

انواع پرایمرها و توالی آن‌ها
پرایمر مستقیم برای آل موتانت: 5’- TAG GTG ATT TTG GTC TAG CTA CCG A -3’
پرایمر معکوس برای آلل موتانت: 5’- GTA ACT CAG CAG CAT CTC AGG G- 3’
پرایمر مستقیم برای آلل وحشی: 5’- TAG GTG ATT TTG GTC TAG CTA CCG T- 3’
پرایمر معکوس برای آلل وحشی: 5’- GTA ACT CAG CAG CAT CTC AGG G -3’

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

یافته‌ها

از میان ۱۷ بیمار مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند که در این مطالعه موردبررسی قرارگرفته‌اند، وجود لوسمی سلول مویی در ۱۴ مورد از آن‌ها گزارش شده است که از این میان، ۱۳ نفر (۹۲.۸۶درصد) مذکر و ۱ نفر (۷.۱۴درصد) مؤنث بوده (نسبت مذکر به مؤنث ۱۳:۱) و متوسط سنی ۴۹.۵ سال (حداقل ۳۳ سال و حداکثر ۸۳ سال) داشته‌اند. سلول‌های لنفوئیدی با زوائد مویی شکل در اسمیر تهیه شده از نمونه‌های مربوط به ۱۳ نفر از این بیماران مشاهده شد. بررسی نحوه بیان آنتی‌ژن‌های سطح لنفوسیت‌های B این بیماران با انجام تست ایمونوفنوتایپینگ به کمک فلوسیتومتری در ۹ بیمار به‌طور قطعی بیانگر وجود لوسمی سلول مویی بوده و ۵ بیمار دیگر، مشکوک به ابتلا به این اختلال بوده‌اند. این در حالیست که بررسی وضعیت جهشی ژن BRAF برای تمامی این ۱۴ بیمار نشان‌دهنده وجود جهش BRAF V600E در DNA ژنومی آن‌ها بوده است. در سوی دیگر تجزیه‌وتحلیل‌های میکروسکوپیک و فلوسایتومتریک برای ۳ بیمار باقی مانده به‌منظور مشاهده سلول‌های مویی و ارزیابی بروز آنتی‌ژن‌های سطح لنفوسیت‌های B در جهت تشخیص نوع اختلال، بیانگر عدم ابتلای این افراد به لوسمی سلول مویی بوده که این امر با عدم رخداد موتاسیون BRAF V600E در ژنوم آن‌ها نیز همراه بوده است. نتایج ۳ تست بررسی میکروسکوپی اسلاید، ایمونوفنوتایپینگ به کمک فلوسیتومتری و ردیابی جهش به همراه نوع نمونه مورد ارزیابی، برای هر یک از بیماران به تفکیک در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

جدول (۴): نتایج بررسی‌های میکروسکوپیک، ایمونوفنوتایپینگ و ردیابی موتاسیون BRAF V600E و نوع نمونه مورد ارزیابی

PB: Peripheral Blood, BMA: Bone Marrow Aspirate, BMB: Bone Marrow Biopsy

نتیجه ردیابی موتاسیون	نتیجه ایمونوفنوتایپینگ	میزان بیان آنتی‌ژن‌های سطحی لنفوسیت‌ها			میزان لنفوسیت‌های غیرنرمال دارای زوائد مویی شکل	نوع نمونه	سن	جنسیت	ردیف
		CD103	CD25	CD11c					
مثبت	بسیار مشکوک	۱۱٪	۹٪	۱۴٪	دیده شده	BMA/PB	۶۳	مذکر	۱
مثبت	تشخیص قطعی	۴۰٪	۶۸٪	۷۲٪	۴۳٪	BMA	۳۳	مذکر	۲
مثبت	تشخیص قطعی	۸۷٪	۳۵٪	۷۵٪	۷۱٪	PB	۴۱	مذکر	۳
مثبت	تشخیص قطعی	۷۳٪	۷۰٪	۶۴٪	۶۴٪	BMA/BMB	۳۴	مذکر	۴
مثبت	تشخیص قطعی	۲۳٪	۱۰٪	۶٪	۱۶٪	BMA/BMB	۵۰	مذکر	۵
مثبت	مشکوک	۱۰٪	۲۳٪	۲۴٪	۱-۲٪	BMA/PB	۶۶	مذکر	۶
مثبت	تشخیص قطعی	۳۵٪	۶۸٪	۲۶٪	۳۱٪	PB	۴۳	مذکر	۷
مثبت	تشخیص قطعی	۲۵٪	۲۸٪	۱۹٪	۹٪	BMA/BMB	۶۳	مذکر	۸
مثبت	تشخیص قطعی	۴۶٪	۴۵٪	۳۳٪	۴۱٪	PB	۴۱	مذکر	۹
مثبت	تشخیص قطعی	۳۴٪	۱۲٪	۱۴٪	۶٪	BMA/BMB	۴۹	مؤنث	۱۰
مثبت	بسیار مشکوک	۳۵٪	۱۸٪	۲۶٪	۱-۲٪	BMA/BMB	۴۷	مذکر	۱۱
مثبت	تشخیص قطعی	۷۰٪	۳۰٪	۳۶٪	۷٪	BMA/BMB	۸۳	مذکر	۱۲
مثبت	بسیار مشکوک	۲٪	۶٪	۱۰٪	۰٪	PB	۴۲	مذکر	۱۳
مثبت	بسیار مشکوک	۲۲٪	۲۷٪	۱۱٪	۵-۸٪	BMA/PB/BMB	۳۸	مذکر	۱۴
منفی	منفی	<۱٪	<۱٪	<۱٪	۰٪	PB/BMB	۶۶	مذکر	۱۵
منفی	منفی	۱٪	۵۳٪	۱۶٪	۰٪	BMA/PB	۶۰	مذکر	۱۶
منفی	منفی	<۱٪	۲۶٪	۱۳٪	۱٪	BMA	۴۳	مذکر	۱۷

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۱۷ بیمار مبتلا به اختلالات لنفوپرولیفراتیو ازنظر وجود یک مارکر مولکولی که گفته می‌شود اساس ژنتیکی لوسمی سلول مویی را پایه ریزی می‌کند، مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایجی را نشان دادند که مؤید نظریه وجود انحصاری موتاسیون BRAF V600E در لوسمی سلول مویی در مقایسه با سایر اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن و ارزش تشخیصی بالای ردیابی آن در شناسایی این بیماری بوده است.

در سال ۲۰۱۱، Tiacci و همکارانش با تعیین توالی کل اگزون های مربوط به سلول لوسمیک یک فرد مبتلا به لوسمی سلول مویی و مقایسه آن با توالی اگزون های سلول نرمال همان فرد به وجود ۵ جهش سوماتیکی پی بردند و با تعیین توالی سنگر وجود این جهش‌ها را تأیید نمودند. یکی از این جهش‌ها، موتاسیون BRAF V600E در اگزون ۱۵ ژن BRAF بوده است که سابقاً به نقش آن در سایر بدخیمی‌ها اشاره و مطالعات بسیاری پیرامون آن انجام شده بود. بنابراین آن‌ها تحقیقات خود را در زمینه مطالعه این جهش و نقش آن در تشخیص و درمان هدفمند لوسمی سلول مویی در ۴۷ بیمار مبتلای دیگر نیز ادامه دادند و به نتایجی رسیدند که نشان می‌داد تمامی بیماران مورد مطالعه آن‌ها دارای جهش مذکور بوده‌اند در حالیکه هیچ یک از بیماران مبتلا به سایر اختلالات مشابه به لوسمی سلول مویی در بررسی‌های انجام شده توسط آن‌ها حامل جهش اشاره شده نبودند. باوجود آنکه در نمونه‌های مورد بررسی Tiacci و همکارانش سلول‌های لوسمیک در حد آستانه‌ای جهت تشخیص به روش تعیین توالی سنگر (30%) وجود داشته‌اند و ممکن است نمونه‌ای مورد بررسی قرار گرفته باشد که حاوی این میزان سلول لوسمیک نبوده و لذا نتیجه تست برای آن به‌صورت کاذب، منفی گزارش شده باشد، اما آن‌ها این موضوع را نادیده نگرفته‌اند که وجود بیماران مبتلا به لوسمی سلول مویی که حامل جهش BRAF V600E نباشند و به عبارتی منفی حقیقی باشد امکان پذیراست، زیرا جامعه آماری مورد بررسی آن‌ها در مقایسه با تعداد بیماران مبتلا در سطح جهانی بسیار اندک است (۱۲).

در مطالعه دیگری که توسط Xi و همکارانش به‌منظور ردیابی جهش BRAF V600E در مبتلایان به لوسمی سلول مویی انجام شد مشخص گردید که از میان ۵۳ بیمار مبتلای مورد مطالعه آن‌ها ۱۱ بیمار فرم طبیعی (غیرموتانت) الل های ژن BRAF را دارند (۲۶).

همچنین در نتایج منتشر شده در سال ۲۰۱۵ از یک مطالعه گذشته نگر توسط پاینده و همکاران بر روی ۱۱ بیمار مبتلا به لوسمی سلول مویی در غرب ایران، که در آن علائم بالینی در زمان تشخیص، شمارش افتراقی سلول‌های خونی، نوع درمان، نرخ بقا و وجود جهش در ژن BRAF بیماران، مورد ارزیابی قرار گرفته است، گزارش شده که تمامی بیماران، مذکر و با متوسط سنی ۵۰ سال بوده‌اند و همگی پان سایتوپنی داشته‌اند، اما تنها ٪۹ از آن‌ها حامل جهش BRAF V600E در ژنوم خود بوده‌اند (۲۳).

بر اساس این یافته‌ها و آنچه که تا به امروز در مورد لوسمی سلول مویی اثبات شده است در این مطالعه نیز تلاش شده است تا تعدادی از بیماران ایرانی مبتلا به این لوسمی ازنظر چندین ویژگی کلینیکی ازجمله وجود سلول‌های مویی در اسمیرهای تهیه شده از خون محیطی، آسپیره و یا بیوپسی مغز استخوان بیمار، نحوه بروز آنتی‌ژن‌ها در سطح لنفوسیت‌های B و وضعیت جهشی ژن BRAF مورد ارزیابی قرار گیرند. در مطالعه حاضر برخلاف برخی مطالعات انجام شده، که در بالا به آن‌ها اشاره شده است، ارتباط جهش BRAF V600E با پاسخ به درمان و میزان بقای بیمار ارزیابی نشده و تعداد بیماران محدود است.

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه بیانگر آن است که متوسط سن مبتلایان موردبررسی کم‌تر از میزان گزارش‌شده در مطالعات جهانی است که این امر نشان‌دهنده بروز این بیماری در سنین پایین‌تری در جمعیت ایرانی نسبت به جمعیت سایر نقاط جهان می‌باشد و به لحاظ جنسیت درگیر، نسبت مردان مبتلا به زنان مبتلا ۱۳ به ۱ است . غالبیت جنس مذکر بر مؤنث مشابه گزارش‌های به‌دست‌آمده از دیگر مطالعات انجام‌گرفته در سراسر جهان هست. هرچند نسبت مرد به زن در مبتلا شدگان(۱،۱۳) بیشتر از مقادیر گزارش‌شده می‌باشد. این میزان می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که ابتلای زنان ایرانی به این لوسمی بسیار نادرتر از آن چیزی است که در سطح جهانی رخ می‌دهد، هرچند که بیان این نسبت‌ها و نتیجه‌گیری از آن‌ها نیازمند جامعه آماری وسیع‌تری است.

از آنجائی که هدف اصلی از انجام این مطالعه بررسی ارزش تشخیصی ردیابی جهش BRAF V600E در مبتلایان به لوسمی سلول مویی در مقایسه با روش‌های رایج‌تر در شناسایی این بیماری بوده است، لذا غربالگری اولیه بیماران از طریق مشاهده سلول مویی در اسمیر تهیه‌شده از خون محیطی، آسپیره و یا بیوپسی مغز استخوان، که یکی از روش‌های ابتدایی اما دقیق در شناسایی این بیماری است، صورت گرفت. مرحله دوم غربالگری با بررسی چگونگی بیان آنتی‌ژن‌های سطح لنفوسیت‌های B به کمک فلوسیتومتری انجام شد و درنهایت تست تکمیلی بررسی وضعیت جهشی ژن BRAF برای تمامی بیماران در نظر گرفته شد. در مواردی که وجود سلول مویی در نمونه بیمار گزارش شده است نتیجه ایمونوفنوتایپینگ یا به‌طورقطع وجود بیماری را اثبات کرده

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

و یا شـــک به وجود بیماری را گزارش کرده اســـت اما تحت هیچ شرایطی ابتلای فرد به این اختلال را رد نکرده است و این در حالی است که تست بررسی وجود موتاسیون BRAF V600E در تمامی این موارد مثبت گزارش شـده اسـت. بنابراین چون تسـت ردیابی موتاسیون BRAF V600E نتیجه‌ای همسو با سایر روش‌های رایج در شـناسـایی لوسـمی سلول مویی دارد، می‌توان نتیجه گرفت که این تست یک تست تأییدی مناسب در تشخیص هرچه دقیق‌تر این اختلال اســـت و به دلیل آنکه حتی بیمارانی که در بررســـی‌های میکروسکوپیک و ایمونوفنوتایپینگ مشکوک به ابتلای به لوسمی سـلول مویی می‌باشند، موتاسیون مذکور را در DNA ژنومی خود نشان داده‌اند، چنین حاصل می‌شود که این تست ارزش تشخیصی بالایی دارد. چنانچه ســه بیماری را که عدم مشـاهده سـلول‌های مویی در اســـمیر تهیـه‌شـــده از نمونه‌های آن‌ها با گزارش منفی ایمونوفنوتایپینگ و عدم وجود موتاســـیون BRAF V600E برای آن‌هـا همراه بوده اســـت به‌عنوان کنترل منفی این مطالعه در نظر بگیریم، تـأییدی برای نتیجه‌گیری‌های خود نیز یافته‌ایم. درنهایت قابل ذکر اسـت که چون مطالعه در آزمایشـگاهی صورت گرفته که جنبه ارجاعی داشـــته و از اکثر مناطق ایران نمونه دریافت می‌کند لذا نتایج به‌دست‌آمده تا حدود زیادی قابل اعتماد است، هرچند که جامعه آماری موردمطالعه اندک است و موضوع موردبررسی نیازمند تحقیقات گسترده‌تری است.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم اســـت از کلیه افرادی که در انجام این مطالعه ما را یـاری نموده‌انـد، بـه‌ویژه کـارکنان بخش مولکولی و هماتولوژی آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند تشکر نماییم.

References:

1. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. Blood 1958; 13(7): 609-30.
2. Schrek R and Donnelly WJ. “Hairy” cells in blood in lymphoreticular neoplastic disease and “flagellated” cells of normal lymph nodes. Blood 1966; 27: 199–211.
3. Mey U, Strehl J, Gorschluter M. Advances in the treatment of hairy-cell leukaemia. Lancet Oncol 2003; 4: 86–94.
4. Grever MR. How I treat hairy cell leukemia. Blood 2010; 115(1): 21-8.
5. Savoie L, Johnston JB. Hairy cell leukemia. Curr Treat Options Oncol 2001; 2(3): 217-24.
6. Foucar K, Falini B, Catovsky D, Stein H. Hairy cell leukaemia. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al., eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2008; 4: 188-90.
7. Grever M, Kopecky K, Foucar MK. Randomized comparison of pentostatin versus interferon alfa-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia: an intergroup study. J Clin Oncol 1995; 13(4): 974-82.
8. Piro LD, Carrera CJ, Carson DA, Beutler E. Lastingremissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. N Engl J Med 1990; 322(16): 1117-21.
9. Golomb HM. Hairy cell leukemia: lessons learned in twenty-five years. J Clin Oncol 1983; 1(10): 652-6.
10. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. Leuk Lymphoma. 1993; 14: 57-61.
11. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). Lancet 2004;363(9424):1869–70.
12. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. N Engl J Med 2011; 364: 2305-15.
13. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 2002;417(6892):949–54.
14. Lade-Keller J, Rømer KM, Guldberg P, et al. Evaluation of BRAF mutation testing

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018

methodologies in formalin-fixed, paraffin-embedded cutaneous melanomas. J Mol Diagn. 2013; 15: 70-80.

15. Ardekani GS, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2012; 7(10): e47054.
16. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. JAMA. 2013; 309(14): 1493-1501.
17. Guerra A, Fugazzola L, Marotta V, et al. A high percentage of BRAFV600E alleles in papillary thyroid carcinoma predicts a poorer outcome. J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97: 2333-2340.
18. Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. Ann Surg. 2007; 246(3): 466-470.
19. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. J Natl Cancer Inst. 2013; djt173.
20. Vultur A, Villanueva J, Herlyn M. Targeting BRAF in advanced melanoma: a first step toward manageable disease. Clin Cancer Res. 2011; 17(7): 1658-1663.
21. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(11): 5399–5404.
22. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell. 2004; 116(6): 855-867.
23. Payandeh M, Sadeghi M, Sadeghi E. Hairy cell leukemia: A retrospective study on 11 patients in the Western of Iran. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research. 2015; 9(3):133-137.
24. Falini B, Tiacci E. Hairy cell leukemia. In: Magrath IT, Boffetta P, Potter M, et al., eds. The lymphoid neoplasms. 3rd ed.New York: Oxford University Press. 2010; 471-81.
25. Hoyer JD, Li CY, Yam LT, Hanson CA, Kurtin PJ. Immunohistochemical demonstration of acid phosphatase isoenzyme 5(tartrate-resistant) in paraffin sections of hairy cell leukemia and other hematologic disorders. Am J Clin Pathol. 1997; 108(3): 308-315.
26. Xi L, Arons E, Navarro W, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. Blood. 2012; 119(14): 3330–3332.

Original Article

EVALUATING THE DIAGNOSTIC VALUE OF BRAF – V600E MUTATION DETECTION IN IRANIAN PATIENTS WITH HAIRY CELL LEUKEMIA

Behzad Poopak[1], Hamideh Rastan[2], Saghar Rabieipoor[3], Nazila Safari[4], Tahereh Madani Esfahani[5], Mohammad Ali Jahangirpoor[6], Fatemeh Sheikhsofla[7], Gelareh Khosravipoor[8]

Received: 29 Sep, 2015; Accepted: 1 Dec, 2015

Abstract

Background & Aims: BRAF-V600E mutation has recently been considered as a molecular marker in diagnosis of Hairy Cell Leukemia (HCL). Detection of this mutation has found a diagnostic and therapeutic value. The aim of the present study was comparing the diagnostic value of BRAF V600E mutation detection with other previous methods in diagnosis of HCL patients.

Materials & Methods: Detection of BRAF V600E mutation in 17 patients was performed with allelic discrimination polymerase chain reaction (PCR). The ppatients' history including results of previous diagnostic tests such as peripheral blood or bone marrow smears as well as flow cytometry immunophenotyping were also collected in order to compare the diagnostic value of BRAF V600E mutation testing with other routine methods in diagnosis of HCL.

Results: Lymphoid cells with hairy-like projections were observed in smears of 14 patients. Immunophenotyping by flow cytometry for HCL in these patients were reported as "Definitely Diagnosed" in 9 cases, "Highly Suspicious" in 4 cases and "Suspicious" in 1 case, while BRAF V600E mutation were detected in all of them. Microscopic and flow cytometric analysis for three remaining patients ruled out the presence of HCL, which were related with absence of BRAF V600E mutation in these patients.

***Conclusion*:** Since the results of mutation detection confirmed the final report of two other tests, it can be concluded that BRAF V600E mutation detection has a high diagnostic value and is an appropriate confirmation test in this regard.

Keywords: Hairy Cell Leukemia (HCL), Serine - threonine kinase protein, BRAF V600E mutation

Address: Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Khaghani St, Shariati Ave , Tehran, Iran, Post Code: 19395/1495.
Tel: +989121196422

Email: bpoopak@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 26(10): 889 ISSN: 1027-3727

[1] *DCLS, PhD in Hematology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *MSc in Genetics, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[3] *MSc in Biotechnology, Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, Iran*
[4] *MSc in Molecular Oncology, Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, Iran*
[5] *MSc in Hematology, Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, Iran*
[6] *MSc in Biochemistry of Cancer, Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, Iran*
[7] *MSc in Cell and Molecular Biology, Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, Iran*
[8] *General Practitioner, Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, Iran*

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 20:30 +0330 on Tuesday February 20th 2018