

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

بهزاد پوپک^۱، حمیده راستان^۲، ساغر ربیعی پور^۳، نازیلا صفری^۴، طاهره مدنی اصفهانی^۵،
محمدعلی جهانگیرپور^۶، فاطمه شیخ سفلی^۷، گلاره خسروی پور^۸

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

چکیده

پیش زمینه و هدف: امروزه موتاسیون BRAF V600E به عنوان مارکر مولکولی لوسمی سلول مویی (Hairy Cell Leukemia: HCL) مطرح شده و ردیابی آن ارزش تشخیصی و درمانی یافته است. مقایسه ارزش تشخیصی ردیابی موتاسیون مذکور با دیگر روش های 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 زنجیره ای پلی مرز به روش افتراق آلی صورت گرفت. جهت مقایسه ارزش تشخیصی ردیابی این جهش با سایر روش ها، سابقه ای از انجام تست ردیابی سلول هایی با زوائد مویی در اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بیماران و ایمونوفلورسنت به کمک فلوسیتومتری آنان جمع آوری شد.

یافته ها: وجود سلول های مویی در اسمیرهای مربوط به ۱۴ نفر از بیماران گزارش شده است. نتایج ایمونوفلورسنت این بیماران در ۹ مورد "تشخیص قطعی" در ۴ مورد، "بسیار مشکوک" و در ۱ مورد "مشکوک" بوده، در حالی که موتاسیون BRAF V600E در تمامی آن ها ردیابی شده است. بررسی های میکروسکوپی و فلوسیتومتری در ۳ بیمار باقیمانده وجود لوسمی سلول مویی را نفی کرده و این امر با عدم وقوع موتاسیون فوق الذکر در آن ها همراه بوده است.

بحث و نتیجه گیری: از آنجاکه نتایج آنالیزهای مولکولی تأییدی بر نتایج ۲ روش دیگر بوده است، چنین برمی آید که ردیابی جهش BRAF V600E ارزش تشخیصی بالایی در شناسایی لوسمی سلول مویی دارد و تست تأییدی مناسبی است.

کلیدواژه ها: 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

مویی را برای توصیف سلول های بدخیم در این بیماری به کار بردند که اشاره بر زوائد سیتوپلاسمی مو شکل این سلول ها در بررسی لام خون محیطی با میکروسکوپ فاز کنتراست داشته و سبب گشته است این بیماری را لوسمی سلول مویی^۱ به نامند، اختلالی که

در سال ۱۹۵۸، Bouroncle و همکارانش گروهی از بیماران دارای لوسمی ریتیکولاندوتلیوزیس با ویژگی های بالینی مشخص و متمایز از سایر اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن را توصیف کردند (۱). پس از ۸ سال Schrek و Donnelly برای اولین بار واژه سلول

^۱ دکترای حرفه ای 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 آنکولوژی مولکولی، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران

^۵ کارشناس ارشد هماتولوژی، آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، تهران، ایران

^۶ کارشناس ارشد بیوشیمی 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

^۱ Hairy Cell Leukemia: HCL

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 (۵-۷).

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 از نظر فعالیت اسید فسفاتازی مقاوم به تارتارات (TRAP) و بیان آنتی‌ژن Annexin A1 از دیگر تست‌های تشخیصی این اختلال می‌باشند (۸-۱۱).

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 ... شناسایی شده که بخش عمده این جهش‌ها را موتاسیون BRAF V600E به خود اختصاص داده است (۱۹-۱۳).

ژن BRAF در جایگاه 7q34 قرار گرفته و پروتئین B-raf که سرین - ترئونین کینازی پروتئین کیناز 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 به جایگزینی 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 نتوپلاستیک 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 از آن جهت 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 (کلادربین 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 Tiaci 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 لنفوم‌ها 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 (۱۲، ۲۳).

با توجه به آنچه در باب اهمیت ردیابی موتاسیون BRAF V600E در تشخیص و درمان مبتلایان به لوسمی سلول مویی ذکر شد از یک سو و نیازی که بیماری‌های نادری چون لوسمی سلول مویی به مطالعات گسترده‌تر دارند از سوی دیگر، در این جا سعی داریم گامی هرچند کوچک در جهت بررسی وضعیت جهشی ژن BRAF در مبتلایان ایرانی برداریم و هدف اصلی از انجام این مطالعه آن است که در کنار سایر تست‌های رایج در تشخیص لوسمی سلول مویی، اهمیت ردیابی جهش BRAF V600E را در شناسایی مبتلایان، مورد ارزیابی قرار دهیم و دریابیم آیا نتیجه حاصل از ردیابی این جهش می‌تواند تأییدی بر نتایج سایر تست‌های تشخیصی باشد یا خیر؟

مواد و روش کار

در این مطالعه ۱۷ بیماری که به‌منظور انجام تست‌های تشخیصی و تکمیلی توسط پزشک معالج خود از شهرستان‌های مختلف به آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند، به‌عنوان آزمایشگاه مرجع، معرفی شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیماران مورد مطالعه علائم بالینی خاصی از جمله درد شکمی، بزرگ‌شدگی طحال، ضعف و ... را نشان می‌دادند که می‌توانست بیانگر ابتلای آنان به لوسمی سلول مویی باشد. به‌منظور تشخیص اولیه، هر بیمار سابقه‌ای از انجام معاینات بالینی و تست‌هایی چون بررسی لام‌های تهیه شده از خون محیطی و آسپیره یا بیوپسی مغز استخوان به‌منظور مشاهده سلول‌های مویی و ایمونوفنوتایپینگ به روش فلوسیتومتری جهت ردیابی آنتی‌ژن‌های اختصاصی‌ای که تنها در لوسمی سلول مویی به‌طور همزمان در سطح لنفوسیت‌های B بروز می‌یابند را داشته است. هرچند نتایج به‌دست‌آمده در اکثر این تست‌ها به همراه علائم بالینی بیمار، وجود لوسمی سلول مویی را نشان می‌داد اما در برخی مبتلایان، تشخیص دقیق‌تر برای درمان هدفمند بیماری، نیازمند بررسی‌های بیشتر بوده است. به این منظور یکی از تست‌های تکمیلی درخواست شده برای این بیماران، ردیابی موتاسیون BRAF V600E بوده است تا به این ترتیب بیماران از نظر وجود یک مارکر مولکولی که اخیراً به‌عنوان عامل بروز بیماری مطرح گشته و در تعیین رژیم درمانی اهمیت فراوانی یافته است مورد بررسی قرار گیرند. جهت انجام این تست ابتدا باید DNA ژنومی از نمونه‌های مورد ارزیابی بیماران استخراج شده، سپس به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ازدیاد ژن هدف صورت گیرد و در نهایت با استفاده از کیت‌های تشخیصی اختصاصی، غربالگری جهش انجام شود. استخراج DNA:

استخراج DNA ژنومی بر حسب نوع نمونه مورد ارزیابی به روش‌های متفاوتی صورت گرفت. در مواقعی که نمونه مورد بررسی خون محیطی و یا آسپیره مغز استخوان حاوی ضد انعقاد EDTA بوده است، پس از انجام سانتریفوژ، در خون محیطی لایه باقی‌کوت و در آسپیره مغز استخوان سدیمان را جدا نموده و با استفاده از محلول فایکول کیت استخراج فرمنتاز (USA, Fermentas)، DNA ژنومی از گلبول‌های سفید تک هسته‌ای استخراج شدند. دراستفاده از بیوپسی‌های مغز استخوان فیکس شده در فرمالین و محاط شده در پارافین جهت استخراج DNA، ابتدا چندین برش از بافت تهیه و عمل پارافینه کردن آن‌ها با استفاده از گزیلول انجام شد. سپس نمونه‌ها از الکلی عبور داده شده و به مدت یک شب به همراه پروتئیناز K در دمای ۵۶ درجه نگهداری شدند تا هضم آنزیمی صورت گیرد. در نهایت با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت‌های پارافینه (Germany-Roche)، DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد.

DNA استخراج شده به لحاظ کمی (تعیین غلظت DNA استخراج شده) و کیفی (تعیین درجه خلوص DNA استخراج شده با خوانش جذب نوری آن در OD 260/280) با استفاده از بیوفوتومتر مورد بررسی قرار گرفت و پس از آن به‌منظور دست‌یابی به DNA مورد نظر، الکتروفورز روی ژل آکرل امید انجام شد و نهایتاً ازدیاد ژن هدف (اگر ژن ۱۵ ژن BRAF) با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای آلل‌های نرمال و موتانت صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش افتراق آلی (Allelic Discrimination PCR):

در این مطالعه به‌منظور بررسی کیفی ژن هدف، ازدیاد ژن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش افتراق آلی (Allelic Discrimination PCR) صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ۴۰ سیکل برای DNA ژنومی استخراج شده از خون محیطی و آسپیره مغز استخوان و ۳۸ سیکل برای DNA مستخرج از بافت فیکس شده 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 با غلظت ۱.۵ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۲ میکرو لیتر از DNA الگو با غلظت ۵۰ نانو گرم در میکرو لیتر، ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز taq (Genetbio) و آب مقطر (به مقداری که حجم نهایی به ۵۰ میکرو لیتر رسانده شود)) برای آلل‌های نرمال و موتانت، در هر نمونه به‌طور جداگانه انجام شد.

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 0.5X برای 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 آلل‌های موتانت و نرمال 148bp می‌باشد). از آنجاکه افراد مبتلا به لوسمی سلول مویی جهش BRAF V600E را به صورت

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 به طور 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	۹۴°C	واسرشت سازی اولیه ۴۰ سیکل
۳۰ ثانیه	۹۴°C	واسرشت سازی
۳۰ ثانیه	۵۹°C	اتصال
۱ دقیقه	۷۲°C	گسترش
۱۰ دقیقه	۷۲°C	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: 3'- TAG GTG ATT TTG GTC TAG CTA CCG A - 5'
پرایمر معکوس برای آلل موتانت: 5'- GTA ACT CAG CAG CAT CTC AGG G - 3'
پرایمر مستقیم برای آلل وحشی: 3'- TAG GTG ATT TTG GTC TAG CTA CCG T - 5'
پرایمر معکوس برای آلل وحشی: 5'- GTA ACT CAG CAG CAT CTC AGG G - 3'

یافته‌ها

از میان ۱۷ بیمار مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، وجود لوسمی سلول مویی در ۱۴ مورد از آن‌ها گزارش شده است که از این میان، ۱۳ نفر (۹۲.۸۶ درصد) مذکر و ۱ نفر (۷.۱۴ درصد) مؤنث بوده (نسبت مذکر به مؤنث ۱۳:۱) و متوسط سنی ۴۹.۵ سال (حداقل ۳۳ سال و حداکثر ۸۳ سال) داشته‌اند. سلول‌های لنفونیدی 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 تجزیه و تحلیل‌های میکروسکوپی و فلوسایتمتریک 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 میکروسکوپی، ایمونوفنوتایپینگ و ردیابی موتاسیون BRAF V600E و نوع نمونه مورد ارزیابی
PB: Peripheral Blood, BMA: Bone Marrow Aspirate, BMB: Bone Marrow Biopsy

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

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۱۷ بیمار مبتلا به اختلالات لنفوپرولیفراتیو از نظر وجود یک مارکر مولکولی که گفته می‌شود اساس ژنتیکی لوسمی سلول موئی را پایه ریزی می‌کند، مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایجی را نشان دادند که مؤید نظریه وجود انحصاری موتاسیون BRAF V600E در لوسمی سلول موئی 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 موئی 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 موئی 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 موئی 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 موئی 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 موئی 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 موئی 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 موئی اثبات شده است در این مطالعه نیز تلاش شده است تا تعدادی از بیماران ایرانی مبتلا به این لوسمی از نظر چندین ویژگی کلینیکی از جمله وجود سلول‌های موئی 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 مورد بررسی 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 موئی در مقایسه با روش‌های رایج‌تر در شناسایی این بیماری بوده است، لذا غربالگری اولیه بیماران از طریق مشاهده سلول موئی 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 موئی در نمونه بیمار گزارش شده است نتیجه ایمونوفنوتایپینگ یا به‌طورقطع وجود بیماری را اثبات کرده

ایمونوفنوتایپینگ و عدم وجود موتاسیون BRAF V600E برای آن‌ها همراه بوده است به‌عنوان کنترل منفی این مطالعه در نظر بگیریم، تأییدی برای نتیجه‌گیری‌های خود نیز یافته‌ایم. درنهایت قابل ذکر است که چون مطالعه در آزمایشگاهی صورت گرفته که جنبه ارجاعی داشته و از اکثر مناطق ایران نمونه دریافت می‌کند لذا نتایج به‌دست‌آمده تا حدود زیادی قابل اعتماد است، هرچند که جامعه آماری مورد مطالعه اندک است و موضوع مورد بررسی نیازمند تحقیقات گسترده‌تری است.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از کلیه افرادی که در انجام این مطالعه ما را یاری نموده‌اند، به‌ویژه کارکنان 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. Lasting remissions 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, Houlihan 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, Tacci E, Liso A, Basso K, Sabatini 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. Tacci 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

- 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.

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

Behzad Poopak¹, Hamideh Rastan², Saghar Rabieipoor³, Nazila Safari⁴, Tahereh Madani Esfahani⁵, Mohammad Ali Jahangirpoor⁶, Fatemeh Sheikhsofla⁷, Gelareh Khosravipoor⁸

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 patients' 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