مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۲/هفته‌ی دوم تیر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۵

بررسی شیوع فیوژن‌های ژن BCR-ABL در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن با روش Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Multiplex RT-PCR)

فرزاد عالی‌زاده مفرد[۱]، مهدی دریکوند[۱]، فرید دولتشاهی[۲]، پارسا محمد جعفری[۱]، صابر آقامحمدی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لوسمی میلوئید مزمن (CML یا Chronic myeloid leukemia) یک بدخیمی کلونال سلول‌های بنیادی هماتوپتیک است. نوع فیوژن‌ها در بیماران CML اهمیت بالینی دارد و به درک بهتری در فهم پاتوژنز سلول‌های لوکمیک دارای t(۹:۲۲) کمک می‌کند. هدف از انجام این پژوهش، بررسی شیوع موتاسیون‌های BCR-ABL و تعیین فراوانی فیوژن‌های گوناگون ژن BCR-ABL در بیماران مبتلا به CML با روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) بود.

روش‌ها: با کسب اطمینان از مبتلا بودن بیماران و جلب رضایت ایشان، به روش آسپتیک، ۸-۵ میلی‌لیتر خون از بیماران گرفته شد. پس استخراج RNA از نمونه‌های خون، برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs یا Mononuclear cells) سانتریفیوژ انجام و RNA تام استخراج شد. واکنش Multiplex RT-PCR در ۳۵ چرخه انجام شد.

یافته‌ها: از ۴۰ بیمار مورد بررسی از نظر فیوژن‌های BCR-ABL همه مثبت بودند که ۲۱ نفر (۵۲/۵ درصد) دارای فیوژن b3a2 و ۱۶ نفر (۳۸/۸ درصد) دارای فیوژن b2a2 و ۳ نفر (۵/۵ درصد) دارای فیوژن ela2 بودند.

نتیجه‌گیری: یکنواختی محصولات در واکنش و نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان داد که روش RT-PCR به عنوان روشی سریع، حساس و مطمئن برای بررسی شیوع فیوژن‌های ژن BCR-ABL در نمونه‌برداری از خون محیطی به آسانی قابل انجام است. همچنین، تفاوت در میزان شیوع فیوژن‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت نژادی در جامعه‌ی مورد بررسی باشد.

واژگان کلیدی: لوسمی میلوئید مزمن، واکنش زنجیره‌ی پلیمراز معکوس، فیوژن‌های BCR-ABL، ایران

ارجاع: عالی‌زاده مفرد فرزاد، دریکوند مهدی، دولتشاهی فرید، محمد جعفری پارسا، آقامحمدی صابر. **بررسی شیوع فیوژن‌های ژن BCR-ABL در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن با روش Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Multiplex RT-PCR)**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۲): ۵۲۰-۵۱۵

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (CML یا Chronic myeloid leukemia) یک بدخیمی کلونال سلول‌های بنیادی هماتوپتیک است که باعث افزایش رده‌های سلولی اریتروئید، میلوئید و مگاکاریوسیت در خون محیطی و هایپرپلازی در مغز استخوان می‌شود (۲-۱). این لوسمی، در ۹۵ درصد از موارد با یک ناهنجاری کروموزومی به نام فیلادلفیا (PH یا Philadelphia) همراه است که در نتیجه‌ی جابه‌جایی متقابل قسمتی از کروموزوم ۹ و قسمتی از کروموزوم ۲۲ ایجاد می‌شود. هنگامی که قسمت جدا شده‌ی کروموزوم ۹ به کروموزوم ۲۲ می‌چسبد (۵-۳)، باعث ایجاد ژن BCR-ABL و در نتیجه یک ژن هیبریدی می‌شود.

ژن BCR-ABL به پروتئین DK210 ترجمه می‌شود که به عنوان BCR-ABL (P210) شناخته می‌شود. P210، دارای فعالیت مداوم تیروزین کیناز می‌باشد و به نوبه‌ی خود، باعث افزایش رشد سلولی و مهار آپوپتوز می‌شود. Messenger RNA (mRNA) حاصل از نسخه‌برداری این ژن، به طور تقریبی در ۹۵ درصد از مبتلایان به CML و گاهی در لوسمی لنفوپلاستی حاد

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرزاد عالی‌زاده مفرد
Email: khashayarsha2500@gmail.com

(ALL یا Acute lymphoblastic leukemia) دیده می‌شود (۹-۶، ۳). فیوژن‌های BCR-ABL در مبتلایان به CML شامل b3a2، b2a2 و ela2 می‌باشند که دارای اهمیت و فراوانی بیشتری نسبت به فیوژن‌های e19a2، b2a3 و b3a3 می‌باشند (۱۱-۱۰).

بررسی بیان ژن‌های درگیر و میزان شیوع فیوژن‌های مختلف در مبتلایان به CML به طور بالقوه‌ای می‌تواند منجر به راهبردهای تشخیصی و درمانی جدیدی برای این دسته از بیماران شود. از این رو، هدف از انجام این پژوهش، بررسی موتاسیون‌های BCR-ABL و تعیین فراوانی فیوژن‌های گوناگون ژن BCR-ABL در مبتلایان به CML در ارومیه به روش Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (Multiplex RT-PCR) بود.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع توصیفی- تحلیلی بود. این مطالعه، از اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ تا تیر ماه ۱۳۹۴ در ارومیه بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به CML که تحت درمان بودند، انجام شد. پس از کسب اطمینان مبتلا بودن بیماران و جلب رضایت آنان، به روش آسپتیک، ۸-۵ میلی‌لیتر خون از بیماران گرفته شد. سپس سلول‌های خونی از جنبه‌ی ریخت‌شناسی توسط دستگاه خودکار Cell counter شمارش شدند.

در ادامه، RNA از نمونه‌های خون افراد استخراج و برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs یا Mononuclear cells) مورد سانتریفیوژ قرار گرفت و ۱۰۶ سلول تک‌هسته‌ای، با استفاده از محلول LOZIRT (شرکت Invitrogen Gibco) جدا شدند. برای جداسازی RNA، محلول هموژن با ۰/۳ میلی‌لیتر کلروفروم ورتکس شد و به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. قسمت بالایی که حاوی RNA بود، با ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ترکیب و در ۱۵ دقیقه با شتاب ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. در نتیجه، رسوب RNA درته لوله قرار گرفت و پس از مرحله‌ی شستن RNA و خشک کردن رسوب، RNA به دست آمده در ۱۰۰ میکرلیتر بافر TBE (Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid یا Tris-borate-EDTA) قرار گرفت.

پیش از واکنش نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcriptase)، مقدار RNA با روش تعیین چگالی نوری (OD یا Optical density) و اندازه‌گیری کیفیت RNA توسط ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت و باندهای 28S و 16S روی باند مشاهده شدند. پس از کسب اطمینان از کیفیت و مقدار RNA، ساخت complementary DNA (cDNA) با حجم ۱ میکرولیتر از RNA تام استخراج شده انجام شد. برای ساخت cDNA به تناسب تعداد نمونه‌ها، Master mix که شامل M-MLV RT ۱/۲µl (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)، Buffer ۵µl، dNTP ۰/۵µl (Deoxynucleotide triphosphate)، RNase inhibitor ۱µl، $MgCl_2$ ۱ml، DDT ۱µl، Random primer ۱µl (Dichlorodiphenyltrichloroethane)، Total RNA (۱µg) Aµl، H_2O ۸/۳ Aµl DEPC treated (Diethylpyrocarbonate) در حجم ۲۰µl میکرولیتر بود، فراهم شد (تمام محلول‌های Master mix ساخت شرکت Merck آلمان بود).

مخلوط در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تقسیم شد. پس از ۱۲ دقیقه که لوله‌ها در دمای اتاق بودند، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، برای بی‌اثر کردن آنزیم در درون لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۳ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوباسیون انجام گرفت. cDNA ساخته شده تا زمان انجام PCR در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (برای سنتز cDNA از کیت شرکت تکاپوزیست استفاده شد).

با توجه به مناطق شکست در فیوژن‌های ژن BCR-ABL که در مناطق مختلفی قرار داشتند، پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که با انجام یک مرحله‌ی PCR، کلیه‌ی فیوژن‌ها تکثیر شوند. در نتیجه، ژن BCR-ABL به عنوان سکانس پرایمرهای هدف (جدول‌های ۱ و ۲) و نسخه‌های BCR به عنوان شاهد مثبت و آب مقطر به عنوان شاهد منفی به کار برده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای واکنش Multiplex reverse transcription polymerase chain (Multiplex RT-PCR) reaction

نام پرایمر	ردیف پرایمر
BCR-C	5' ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG 3'
B2B	5' ACAGAATTCCGCTGACCATCAATAAG 3'
CA3-	5'GTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'
C5e	5' ATAGGATCCTTTGCAACCGGGTCTGAA 3'

روش Multiplex PCR با به کارگیری دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۳ دقیقه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۵ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۵ دقیقه، ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۱۵ ثانیه، ۹۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، ۷۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۲۵ ثانیه، ۷۳ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۴۵ ثانیه، ۳۱ چرخه از مراحل ۱۰-۵ و در

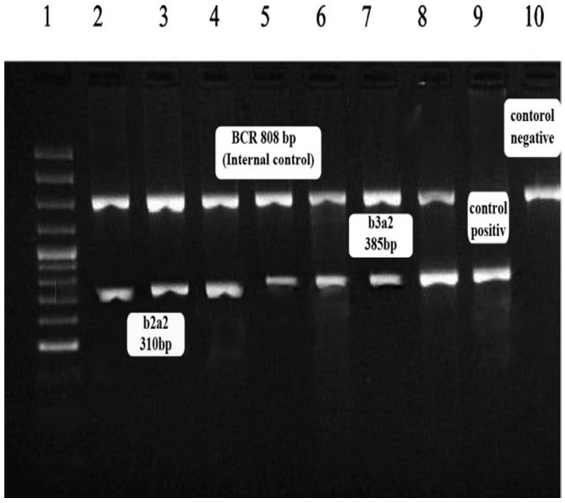
پایان، ۷ دقیقه در ۷۳ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد.

جدول ۲. اندازه‌ی نواحی تکثیر شده بر اساس پرایمرهای طراحی شده برای نسخه‌های BCR-ABL

نام پرایمر	اندازه‌ی ناحیه‌ی تکثیر شده (bp)	محصول
BCR-C/CA3	۱۸۱	ela2
B2B/CA3	۳۸۵	b3a2
	۳۱۰	b2a2
B2B/C5e	۸۰۸	BCR

یافته‌ها

در این پژوهش، تمامی بیمارانی که به CML دچار شده بودند، در آزمایشگاه فوق تخصصی‌خون مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام واکنش Multiplex RCP، نمونه‌های روی ژل گونه‌هایی را که در بیماران مبتلا به CML رونوشت غالب بودند، نشان دادند (شکل ۱). همچنین، شرایطی فراهم شد تا انواع گوناگون ژن‌های ترکیبی BCR-ABL به طور ویژه‌ای بر روی نمونه‌ی cDNA بیماران مبتلا به CML تشخیص داده شوند. فیوژن‌های گوناگون از جمله P320، P210 و P190 مورد بررسی قرار گرفتند و شیوع جهش‌های گوناگون تجزیه و تحلیل شد.



شکل ۱. ستون ۱: نشانگر bp ۱۰۰۰–۱۰۰، ستون‌های ۸–۲: نسخه‌ی BCR ۸۰۸ bp. ستون‌های ۴–۲: مربوط به بیماران مبتلا به Chronic myeloid leukemia (LMC) با واریانت ۳۱۰ bp b2a2. ستون‌های ۸–۵: واریانت ۳۸۵ bp b3a2. ستون ۹: شاهد منفی (آب دو بار تقطیر شده) و ستون ۱۰: شاهد مثبت (BCR). سایر بیماران از نظر کروموزوم Philadelphia منفی بودند.

از ۴۰ بیمار مورد بررسی، از نظر فیوژن‌های BCR-ABL همه مثبت بودند که ۲۱ نفر (۵۲/۵ درصد) دارای فیوژن b3a2، ۱۶ نفر (۳۸/۸ درصد) دارای فیوژن b2a2 و ۳ نفر (۵/۵ درصد) دارای فیوژن ela2 بودند و بیان هم‌زمان b3a2 و ela2 (P210/P190) مشاهده نشد.

کمینه‌ی سن بیماران ۱۶ سال، بیشینه‌ی آن ۶۳ سال و میانگین آن ۱۶/۵۷ ± ۴۵/۰۰ بود. ۲۲ نفر بیماران مرد و ۱۸ نفر زن بودند. در میان زنان، ۵۵/۵۵ درصد دارای فیوژن b3a2 و ۳۸/۸۸ درصد دارای فیوژن b2a2 و ۵/۵۰ درصد دارای فیوژن ela2 بودند. در گروه مردان، ۵۰/۰۰ درصد دارای فیوژن b3a2، ۴۰/۰۹ درصد دارای فیوژن b2a2 و ۹/۱۰ درصد دارای فیوژن ela2 بودند.

بحث

مطالعات اندکی راجع به اهمیت دانستن فیوژن‌های BCR-ABL انجام شده است، اما یافته‌های جدید نشان می‌دهد که نوع فیوژن‌ها در بیماران، می‌تواند اهمیت بالینی داشته باشد و به درک بهتری در فهم پاتوژنز سلول‌های لوکمیک (Leukemic cells) دارای t(۹:۲۲) کمک کند. برای نمونه، در بیماران مبتلا به CML که میزان شیوع فیوژن b3a2 در آنان بیشتر است، مقادیر بالاتر پلاکت (۱۳–۱۲) و همچنین، بقای بیشتری نسبت به بیماران دارای فیوژن b2a2 دیده می‌شود (۱۴).

در مطالعه‌ی یغمایی و همکاران بر روی ۷۵ بیمار مبتلا به CML، تشخیص بر اساس یافته‌های بالینی از نمونه‌های مغز استخوان با استفاده از روش پلیمراز معکوس برای نسخه‌های BCR-ABL بود. در روش RT-PCR، فراوانی فیوژن‌های گوناگون شامل ۶۲ درصد b3a2، ۲۰ درصد b2a2 و ۱۶درصد ela2 بود (۱۲). در یافته‌های مطالعه‌ی Hassan و همکاران، برای تشخیص BCR-ABL در بیماران مبتلا به CML، ۶۸/۸ درصد موارد بازآرایی در ناحیه‌ی b3a2 و ۳۱/۴ درصد در ناحیه‌ی b2a2 یافت شد (۱۵).

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج حاصل از شیوع فیوژن‌های b3a2 و b2a2 به ترتیب ۵۲/۵ و ۳۸/۸ درصد بود؛ در حالی که در مطالعات دیگری نظیر مطالعه‌ی یغمایی و همکاران (۱۲)، شیوع فیوژن‌های b3a2 حدود ۳ برابر فراوانی فیوژن‌های b2a2 در مبتلایان به CML عنوان شده است (۱۲)؛ این تفاوت در میزان شیوع فیوژن‌ها، می‌تواند به دلیل تفاوت نژادی در جامعه‌ی مورد بررسی باشد.

Mino و همکاران در اکوادور شیوع فیوژن‌های b3a2 و b2a2 را به ترتیب ۵ درصد و ۹۵ درصد (۱۶) و نیز Osman و همکاران در سودان که این شیوع را به ترتیب ۴۲ درصد و ۵۴ درصد (۱۷) عنوان کردند. این مطالعات نیز هم‌راستا با مطالعه‌ی حاضر، نتایج متفاوت مطالعه را به دلیل تنوع نژادی در مبتلایان به CML دانستند.

همچنین، میزان فراوانی فیوژن‌های ela2 در این مطالعه، ۵/۵ درصد بود. حضور P190 دال بر پیشرفت بیماری به دلیل مقاومت دارویی در مبتلایان به CML می‌باشد (۱۸) که نظارت بر مقاومت دارویی در بیماران مبتلا، برای جلوگیری از پیشرفت بیماری الزامی است. همچنین، بیان هم‌زمان ela2 و b3a2 مشاهد نشد. علت عدم مشاهده‌ی دیگر گونه‌های BCR-ABL، نایاب بودن سایر گونه‌ها می‌باشد و یا این که امکان دارد به علت عوامل فنی در آزمایش نظیر میزان حساسیت روش یا امکان تفاوت‌های ژنتیک میان جمعیت‌های مورد مطالعه و تنوع فنوتیپی در بیماران مبتلا در این مطالعه باشد (۲۰-۱۹). در نتیجه، از آن جا که شناسایی و بررسی گونه‌های مختلف BCR-ABL نقش به‌سزایی در تشخیص و درمان بیماران CML دارد، با بررسی گونه‌های مختلف BCR-ABL از منظر فراوانی و نوع گونه، می‌توان گام مهمی در پیشبرد روند شناسایی گونه‌های کمیاب و تشخیص و درمان بیماری CML برداشت.

نتیجه‌گیری نهایی این که تفاوت‌های نژادی و جنسی به عنوان عوامل مهم و تأثیرگذار در فراوانی و شیوع فیوژن‌های ژن BCR-ABL می‌توانند تأثیرگذار باشند. همچنین، یکنواختی محصولات در واکنش و نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان داد که روش Multiplex RT-PCR به عنوان روشی سریع، حساس و مطمئن برای بررسی‌های اولیه‌ی شیوع ژن‌های BCR-ABL در نمونه‌برداری از خون محیطی به آسانی قابل انجام است و در تعیین میزان بیماری، بررسی پاسخگویی مراحل درمانی و شناسایی بهبودی بیماری در سلامت بیماران، ابزاری مفید و توانا با اختصاصیت و حساسیت بالایی خواهد بود.

با توجه به شیوع بالای فیوژن BCR-ABL در بیماران مبتلا به CML و اهمیت بالینی و کمک به درک پاتوژنز سلول‌های لوکمیک و در نهایت پیشبرد درمان بیماران، پیشنهاد می‌شود بررسی‌هایی در زمینه‌ی نوع فیوژن‌ها و نشانه‌های اولیه در بیماران مبتلا به CML و ارتباط آن با عود بالینی بیماری انجام شود. لازم است تفاوت‌های نژادی و جنسی، به عنوان عوامل مهم در بررسی‌های آتی در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، از خانم بهار بیرانوند و تمام بیمارانی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Inukai T, Sugita K, Suzuki T, Ijima K, Goi K, Tezuka T, et al. A novel 203 kD aberrant BCR-ABL product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1993; 85(4): 823-5.
2. Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS. Bone Marrow Pathology. 4th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010.
3. Lichtman MA, Williams WS. Williams Hematology. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2006. p. 1264-70.
4. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2007 [Online]. [cited 2007]; Available from: URL: http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2007/index
5. Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. J Manag Care Pharm 2007; 13(8 Suppl A): 4-7.
6. Zhang JG, Goldman JM, Cross NC. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. Br J Haematol 1995; 90(1): 138-46.
7. Gutierrez MI, Timson G, Siraj AK, Bu R, Barbhaya S, Banavali S, et al. Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification, and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. J Mol Diagn 2005; 7(1): 40-7.
8. Foroni L, Gerrard G, Nna E, Khorashad JS, Stevens D, Swela B, et al. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia. Am J Hematol 2009; 84(8): 517-22.
9. Langabeer SE, Haslam K, Kelly J, Leahy M, Vandenberghe E. Acute lymphoblastic leukaemia with an e1a3 BCR-ABL1 fusion. Acta Haematol 2011; 126(4): 214-5.
10. He J, Lipson D, Nahas M, Otto GA, Wang K, Knapp KM, et al. Development and analytical validation of a clinical next generation sequencing-based assay for hematolymphoid malignancies. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA, USA.
11. Chen Y, Wang HW, Chen XH, Xu ZF, Qin YH, Ren FG, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia with atypical BCR-ABL transcript e1a3: a case report and literature review. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 2013; 34(11): 965-6. [In Chinese].
12. Yaghmaie M, Ghaffari SH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Mousavi SA, Irvani M, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcript in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2015; 2(3): 1-5.
13. Perego RA, 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): 1395-401.
14. Prejzner W. Relationship of the BCR gene breakpoint and the type of BCR/ABL transcript to clinical course, prognostic indexes and survival in patients with chronic myeloid leukemia. Med Sci Monit 2002; 8(5): BR193-BR197.
15. Hassan R, Ramli M, Abdullah WZ, BaBa A. Short communication One-Step Multiplex RT-PCR for

detection of BCR/ABL gene in Malay patients with chronic myeloid leukaemia. Asia Pac J Mol Biol Biotechnol 2008; 16(2): 41-4.
16. Mino C, Burgos R, Morillo SA, Santos JC, Fiallo BF, Leone PE. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. Cancer Genet Cytogenet 2002; 132(1): 65-7.
17. Osman EA, Hamad K, Elmula IM, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. Genet Mol Biol 2010; 33(2): 229-31.
18. Junmei Z, Fengkuan Y, Yongping S, Baijun F, Yuzhang L, Lina L, et al. Coexistence of P190 and P210 BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukemia blast crisis resistant to imatinib. Springerplus 2015; 4: 170.
19. Tashfeen S, Ahmed S, Bhatti FA, Ali N. Real time polymerase chain reaction in diagnosis of chronic myeloid leukemia. J Coll Physicians Surg Pak 2014; 24(3): 190-3.
20. Anand MS, Varma N, Varma S, Rana KS, Malhotra P. Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous leukaemia patients in north India. Indian J Med Res 2012; 135: 42-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 11.03.2016
Vol. 34, No. 381, 2nd Week, July 2016
Accepted: 04.06.2016

Prevelance of BCR-ABL Gene Fusions in Patients with Chronic Myeloid Leukemia with Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Farzad Alizadeh-Mofrad[1], Mahdi Darikvand[1], Farid Dolatshahi[2], Parsa Mohammad-Jafari[1], Saber Agha-Mohammadi[1]

Original Article

Abstract

Background: Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal malignancy of hematopoietic stem cells. Type of fusion in these patients can be clinically significant and help to better understand the pathogenesis of leukemic cells with t (9:22). The aim of this study is to check BCR-ABL mutations and determine the prevelance of various gene fusions using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method in patients with CML.

Methods: After making sure of having the disease and signing the written consent, 5-8 ml blood was taken from patients with aseptic technique. After RNA extraction, blood samples were centrifuged to separate mononuclear cells (MNCs) and complete RNA was extracted. Multiplex reaction PCR was carried out in 35 cycles.

Findings: All 40 patients were positive in terms of BCR-ABL fusions. Of them 21 persons (52.5%) had b3a2 fusion and 16 persons (38.88%) with b2a2 fusion and finally 3 persons with ela2 fusion.

Conclusion: Uniformity of reaction products and the results obtained in this study showed that RT-PCR method is feasible as a fast, sensitive and safe method to determine the prevelance of BCR-ABL genes in the sampling of peripheral blood. Also, the difference in the rate of fusion due to racial differences in the population can be studied.

Keywords: Chronic myeloid Leukemia (CML), Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), BCR-ABL fusion, Iran

Citation: Alizadeh-Mofrad F, Darikvand M, Dolatshahi F, Mohammad-Jafari P, Agha-Mohammadi S. **Prevelance of BCR-ABL Gene Fusions in Patients with Chronic Myeloid Leukemia with Multiplex RT-PCR.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(382): 515-20.

1- Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia ,Iran
2- Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan,Iran
Corresponding Author: Farzad Alizadeh-Mofrad, Email: khashayarsha2500@gmail.com