

The prognostic relevance of BCR-ABL1 transcript type, Sokal score and smoke as synergistic factor with complete cytogenetic response in CML patients treated with different TKI modalities

Dariush Radin¹, Mohammad Hamid², Mohammad Kargar³, Mojtaba Jafarinia⁴

¹ PhD Student, Department of biology, Marvdasht branch, Islamic azad university, Marvdasht, Iran

² Associate Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of biology, Marvdasht branch, Islamic azad university, Marvdasht, Iran

Abstract

Background: In chronic myeloid leukemia (CML), the influence of BCR-ABL1 transcript type, Sokal risk score and smoke on disease phenotype and cytogenetic response to treatment is still unknown and arguable. The objective of this study was to determine the prognostic significance of transcript types, risk score and smoking status among patients with CML treated with different tyrosine kinase inhibitor modalities.

Materials and methods: Sixty CML patients were analyzed by Multiplex RT-PCR for molecular typing and banding standard protocols to follow the cytogenetic response of medications at intervals of 3 and 6 months.

Results: The most common transcript type was e14a2 (n=35, 58.3%). There was a significant difference in cumulative incidence (CI) of complete cytogenetic response (CCR) between e14a2 and e13a2 groups (P=0.04). The time to achieve CCR was shorter in e14a2 transcript (P=0.01). The risk of resistance to drug was 4 fold higher in e13a2 group compared to e14a2. No difference was observed in CI of CCR between risk score groups (P>0.05). In smoker patients with e13a2 transcript, response to drug was lower (18 fold) than to non-smokers.

Conclusion: The patients with e14a2 transcript may be associated with better and faster response to imatinib. Sokal risk score is not an efficient predictive tool for response based on transcript type. The smoke in patients expressing e13a2 may induce resistance.

Keywords: BCR-ABL transcript, Chronic myeloid leukemia, Sokal risk score, Complete cytogenetic response, TKI, Smoke.

Cited as: Radin D, Hamid M, Kargar M, Jafarinia M. The Prognostic Relevance of BCR-ABL1 Transcript Type, Sokal Score and Smoke as Synergistic Factor with Complete Cytogenetic Response in CML Patients Treated with Different TKI Modalities. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(2): 139-148.

Correspondence to: Mohammad Hamid

Tel: +98 9122858058

E-mail: hamid143@yahoo.com

ORCID ID: 0000-0002-4625-0713

Received: 4 Sep 2021; **Accepted:** 24 Nov 2021

ارتباط پیش آگهی نوع ترانسکرپیت BCR-ABL1، Sokal Score و سیگار به عنوان عامل سینرژیسیم با پاسخ کامل سیتوژنتیکی در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن تحت درمان با روش‌های مختلف مهار کنندگان تیروزین کینازی

داریوش رادین^۱، محمد حمید^۲، محمد کارگر^۳، مجتبی جعفری نیا^۴

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

^۲ دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۳ استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

^۴ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در بیماری CML تاثیر نوع ترانسکرپیت، Sokal score و دود سیگار روی فنوتیپ بیماری و پاسخ سیتوژنتیکی به درمان هنوز ناشناخته و بحث برانگیز است. هدف از این مطالعه تعیین اهمیت پیش آگهی نوع ترانسکرپیت، Sokal score و سیگار در بیماران CML تحت درمان با روش‌های مختلف درمانی تیروزین کینازی بود.

روش بررسی: در این مطالعه ۶۰ بیمار مبتلا به CML در آنالیز وارد شدند. تایپینگ مولکولی جهت تعیین نوع ترانسکرپیت به وسیله Multiplex RT-PCR انجام شد و پروتکل استاندارد بندینگ جهت پیگیری پاسخ سیتوژنتیکی در فواصل ۳ و ۶ ماه به کار برده شد.

یافته‌ها: عمومی‌ترین نوع ترانسکرپیت، $e14a2$ (۵۸/۳ درصد) بود. در بروز تجمعی پاسخ کامل سیتوژنتیکی بین دو گروه ترانسکرپیت $e14a2$ و $e13a2$ تفاوت معنی داری وجود داشت ($P=0.04$). زمان دریافت پاسخ کامل سیتوژنتیکی در بیماران دارای ترانسکرپیت $e14a2$ کوتاه‌تر بود ($P=0.01$). ریسک مقاومت و عدم پاسخ به دارو در گروه $e13a2$ چهار برابر بیشتر از گروه $e14a2$ بود. هیچ تفاوت معنی داری در بروز تجمعی پاسخ کامل سیتوژنتیکی در بین گروه‌های risk score وجود نداشت ($P>0.05$). در میان بیماران سیگاری با ترانسکرپیت $e13a2$ پاسخ به درمان در مقایسه با غیرسیگاری‌ها با همان ترانسکرپیت، ۱۸ بار کمتر بود.

نتیجه‌گیری: بیماران با ترانسکرپیت $e14a2$ مرتبط با پاسخ بهتر و سریع‌تر به ایماتینیب هستند. Sokal risk score ابزار پیش بینی کننده کارآمدی برای پاسخ مبتنی بر نوع ترانسکرپیت نیست. دود سیگار در بیماران بیان کننده $e13a2$ ممکن است که مقاومت به درمان را سبب شود. **واژگان کلیدی:** ترانسکرپیت BCR-ABL1، لوسمی میلوئیدی مزمن، Sokal score، پاسخ کامل سیتوژنتیکی، مهار کننده.

مقدمه

نشانه سیتوژنتیکی بیماری لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) کروموزوم فیلادلفیاست (Ph)، که از ترانسلوکاسیون متقابل بین

کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ (t(9;22)(q34;q11.2)) حاصل می‌شود (۲). این ترانسلوکاسیون منجر به تشکیل انکوژن BCR-ABL1 می‌شود که کد کننده پروتئین bcr-abl1 با فعالیت تیروزین کینازی مداوم است (۳، ۴). ترانسکرپیت BCR-ABL1 بسته به جایگاه شکست در ژن BCR می‌تواند سائزهای مختلفی داشته باشد (۵). نقاط شکست ژن BCR روی کروموزوم ۲۲ عموماً بین اگزون‌های $e13(b3)$ و $e12(b2)$ یا بین $e14(b4)$ و $e13(b3)$ در

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، پلاک ۶۹ - کد پستی: ۱۳۱۶۹۲۳۵۵۱، محمد حمید

(email: hamid143@yahoo.com)

ORCID ID: 0000-0002-4625-0713

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۳

میلی گرم در روز و نیلوتینیب بر اساس نوع ترانسکریپت BCR-ABL1 بررسی کرده است. هدف از این مطالعه، تعیین اهمیت پیش آگهی نوع ترانسکریپت، Sokal score بیماران و سیگار به عنوان یک Synergistic factor در وضعیت پاسخ بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن تحت درمان با دزهای مختلف ایماتینیب و همچنین نیلوتینیب بود.

مواد و روشها

جمعیت بیماران

نمونه خون محیطی از ۶۰ بیمار فاز مزمن لوسمی میلوئیدی با BCR-ABL مثبت یا Ph^+ در زمان تشخیص جمع آوری شد و در فواصل ۳ ماهه و سپس ۶ ماهه برای مانیتورینگ پاسخ سیتوژنتیکی فالوآپ شدند. رضایت نامه کتبی از بیماران جهت شرکت در مطالعه گرفته شد و مطالعه در کمیته اخلاقی انستیتو پاستور ایران تایید شد. اطلاعات بالینی بیماران از نظر سن، جنس، تعداد گلبولهای سفید خون و پلاکتها، سائز طحال، وضعیت سیگار و غیره جهت تهیه دادههای دموگرافیکی ثبت شد و محاسبه Sokal risk score بر اساس فرمول ارائه شده توسط Sokal و همکارانش (۱۸) صورت گرفت و بیماران در سه دسته Low risk، Intermediate risk و High risk طبقه بندی شدند. بیماران با ایماتینیب ۴۰۰ میلی گرم در روز و ۸۰۰ میلی گرم و در مواردی نیلوتینیب ۴۰۰ میلی گرم دو بار در روز به عنوان خط اول درمان یا در افراد شکست خورده با ایماتینیب به عنوان خط دوم درمان، تحت درمان قرار گرفتند. میانگین زمانی درمان با ایماتینیب ۴۸ ماه و در محدوده ۳ تا ۱۴۲ ماه بود. مشخصات کلی بیماران در جدول ۱ نشان داده شده است.

تعاریف پاسخ به درمان و وضعیت سیگار

مفاهیم پاسخ به درمان شامل پاسخ سیتوژنتیکی مازور (MCR) و پاسخ سیتوژنتیکی کامل (CCR) بر اساس معیارهای پاسخ در شبکه اروپایی لوکمیا (ELN) تعریف شدند (۲۱-۱۹). افراد سیگاری به صورت زیر تعریف شدند: ۱- سیگاری فعال (Active smoker): افرادی که حداقل یک بسته سیگار را در روز مصرف می کردند، ۲- سیگاری غیر فعال (Passive smoker): افرادی که یا در معرض دود سیگار بودند یا در روز چند نخ سیگار مصرف می کردند، ۳- غیر سیگاری (Non smoker): افرادی که هرگز سیگار مصرف نکردند.

آنالیز سیتوژنتیکی

آنالیز سیتوژنتیکی بیماران با استفاده از نمونه سلول مغز استخوان ابتدا در فواصل سه ماهه و سپس ۶ ماهه طبق آنچه قبل

ناحیه M-BCR اتفاق می افتد و دو ترانسکریپت متفاوت ایجاد می شود. نقطه شکست در ژن ABL هم معمولاً بین اگزونهای a1 و a2 ایجاد می شود. این نقاط شکست به بازآراییهای مختلف BCR-ABL منجر می شود و عمدتاً دو ترانسکریپت e13a2(b2a2) و e14a2(b3a2) ایجاد می شود که پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی را کد می کنند، این دو ترانسکریپت کایمیریک BCR-ABL1 فقط در ۲۵ اسید آمینه (۷۵ جفت باز) از نظر طولی با هم متفاوت هستند. در بعضی از بیماران هر دو ترانسکریپت مورد اشاره همزمان بیان می شود و با فراوانی بسیار کمتری شکستهای دیگری در ژن BCR اتفاق می افتد و منجر به تشکیل ترانسکریپتهای دیگری می شود (۶). ایماتینیب مسیلات (IM) (با نام تجاری Gleevec) یک داروی مهار کننده تیروزین کینازی موثر و اختصاصی BCR-ABL1 است که عموماً به عنوان خط اول درمان در بیماران با فاز مزمن بیماری به کار می رود. علیرغم میزان بالای پاسخ سیتوژنتیکی و هماتولوژیکی به ایماتینیب، بیش از ۴۰ درصد بیماران در طول ۲۴ ماه به دارو پاسخ مطلوب نمی دهند و مقاوم می شوند (۷). داروهای نسل دوم مانند داساتینیب و نیلوتینیب به عنوان خط اول درمان یا خط دوم درمان در بیمارانی که در پاسخ به ایماتینیب شکست می خورند پاسخهای سیتوژنتیکی و مولکولی را به مقدار زیادی بهبود می بخشند (۶). اهمیت پیش آگهی نوع ترانسکریپت روی میزان پاسخ به دارو و فنوتیپ بیماری در بیماران تحت درمان با داروهایی مانند اینترفرون (۸) و ایماتینیب با دز استاندارد ۴۰۰ میلی گرم در روز (۹، ۱۰) و یا نسل دوم مهار کنندگان تیروزین کینازی (2GTKI) (۶) گزارش شده است. بعضی مطالعات دریافتند که نوع ترانسکریپت، فاکتور پیش آگهی برای پاسخ به دارو نیست (۱۱) و مطالعات دیگر گزارش کردند که نوع ترانسکریپت با سطح پاسخ بیمار به دارو ارتباط دارد (۱۳، ۱۲، ۶). در مطالعه‌ای توسط Vega-Ruiz و همکارانش (۱۴) و همچنین مطالعه دیگر توسط رستمی و همکارانش (۵) روی بیماران CML ایرانی دریافتند که بیماران حامل ترانسکریپت e14a2 پاسخ بهتر و سریع تری به دز استاندارد ایماتینیب می دهند. در تعدادی از مطالعات اپیدمیولوژیکی همراهی دود سیگار با خطر ابتلا به لوکمیا (۱۵) و یا تاثیر دود سیگار روی مقاومت و عدم پاسخ به دارو در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن (۱۶) بررسی شده است. مواد شیمیایی موجود در سیگار عمدتاً بنزن موجب ابرنمائی-های سیتوژنتیکی شده و خطر ابتلا به لوکمیا را افزایش می دهند (۱۷). به نظر می رسد این اولین مطالعه است که وضعیت پاسخ به دارو را در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن ایرانی با روشهای مختلف درمانی از جمله با ایماتینیب ۴۰۰ میلی گرم در روز، ۸۰۰

توضیح داده شده است (۲۲)، در محیط کشت حاوی فیتوهمالوتینین انکوبه و کشت شدند و سپس طبق پروتکل استاندارد بندینگ آنالیز شدند، بدین صورت که در ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 (PAN, German) غنی شده با سرم جنین گاو 20% (Gibco, USA) و $450 \mu\text{g/ml}$ فیتوهمالوتینین (Gibco, USA) در دمای 37°C درجه سانتی گراد و تحت شرایط استاندارد کشت شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت به سلول‌ها کلسمید (Gibco, USA) افزوده شد و سپس آن سلول‌ها هاروست و گستره‌های متافازی تهیه شدند. بعد از طی مرحله aging بر روی کروموزوم‌ها G بندینگ انجام شد و در واقع آنالیز کاربوتایپ روی کروموزوم‌های متافازی آماده شده با تکنیک رنگ آمیزی G بندینگ انجام شد و سپس بر اساس روش‌های استاندارد وضوح باندی در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ در نظر گرفته شد. برای هر فرد بیمار حداقل ۲۰ الی ۲۵ گستره متافازی بررسی شد. تفسیر همه کاربوتایپ‌ها مطابق با پیشنهاد International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) انجام شد. پاسخ سیتوزنتیکی به درمان نسبت به درصد متافازهای Ph^+ شناسایی شده توسط آنالیز بندینگ کروموزومی بر اساس معیارهای پاسخ در شبکه اروپایی لوکمیا (ELN) تعریف شد:

آنالیز مولکولی

در آنالیز مولکولی به منظور تایپینگ مولکولی، ابتدا RNA از گلبول‌های سفید خون با استفاده از ترایزول استخراج شد و خلوص آن با استفاده از ژل الکتروفورز تعیین شد و غلظت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Biofact) طبق دستور العمل شرکت مربوطه ساخته شد. واکنش Multiplex RT-PCR به منظور تکثیر همزمان ترانسکریپت‌های مختلف BCR-ABL به عنوان ژن هدف و همچنین ترانسکریپت BCR به عنوان کنترل داخلی در یک واکنش منفرد به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل

مخلوطی از ۱۲/۵ میکرولیتر از master mix hot start (شرکت امپلیکون)، ۲/۵ میکرولیتر از مخلوط چهار پرایمر که توالی آنها عیناً از مطالعه (۲۳) گرفته شد (CA3، C5e، BCR-c و B2B)، ۸ میکرولیتر آب فاقد آنزیم نوکلئاز و ۱ میکرولیتر از cDNA الگو انجام شد. برنامه واکنش PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای 95°C درجه سانتی گراد برای ۱۵ دقیقه، ۳۰ سیکل با 95°C درجه برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها 67°C درجه برای ۱ دقیقه و دمای گسترده‌گی 72°C درجه به مدت ۵ دقیقه، جهت تکثیر نهایی بود. محصولات PCR روی ژل الکتروفورز ۲ درصد مشاهده شدند و سایز باندهای مختلف ۸۰۰ جفت بازی برای ژن BCR، ۳۸۵ جفت بازی برای ترانسکریپت e14a2 و ۳۱۰ جفت بازی برای ترانسکریپت e13a2 حاصل شد. در این مطالعه از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از تکثیر ترانسکریپت BCR بعنوان کنترل داخلی استفاده شد.

رعایت اصول اخلاقی

این تحقیق با گزینش و کد شماره 1033 و کد اخلاقی IR.PII.REC.1397.56 به تایید انستیتو پاستور ایران رسیده است.

آنالیز آماری

مقایسه میانگین متغیرهای خونی و سایر ویژگی‌های دموگرافیکی با استفاده از t-test و Exact Fisher test انجام شد. Odds ratio (OR) با ۹۵ درصد فاصله اطمینان (CI) برای ارزیابی همراهی بین نوع ترانسکریپت و پاسخ به درمان و همچنین بین نوع ترانسکریپت و سیگار محاسبه شد. بروز تجمعی CCR (cumulative incidence CCR) در دو گروه ترانسکریپت با آنالیز کاپلان مایر محاسبه و معنی‌داری آن با Log rank test نشان داده شد. همه آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مشخصات کلی بیماران

مشخصات	انحراف از معیار \pm میانگین	میان	دامنه تغییرات
تعداد بیماران	۶۰		
جنس (زن/مرد)	۳۲/۲۸		
سن (سال)	$46/78 \pm 16/20$	۴۹	۱۷-۸۱
تعداد گلبول‌های سفید ($\times 10^9/L$)	$165/590 \pm 122/857$	۱۲۹/۸۵۰	۲۳-۵۵۰
تعداد پلاکت‌ها ($\times 10^9/L$)	$452/650 \pm 274/826$	۳۸۲/۵	۱۶۸-۱۵۴۷
سایز طحال (cm)	$10/80 \pm 7/56$	۵/۴۴	۰/۲۵
مدت زمان درمان با ایماتینیب (ماه)	$55/25 \pm 35/76$	۴۸	۳-۱۴۲
مدت زمان پیگیری بیماران (ماه)	$61/13 \pm 37/8$	۴۹	۴-۲۱۶

یافته‌ها

آنالیز نوع ترانسکرپت

در این مطالعه از ۶۰ بیمار مورد بررسی، ترانسکرپت e14a2 بالاترین فرکانس را داشت (n=35,58.33%) و ترانسکرپت e13a2 هم در ۲۵ نفر (۴۱/۶۷ درصد) از بیماران مشاهده شد. در این مطالعه هیچ نوع ترانسکرپت نادری در میان بیماران یافت نشد.

آنالیز فاکتورهای تشخیصی و پیش‌گویی کننده بر اساس نوع ترانسکرپت

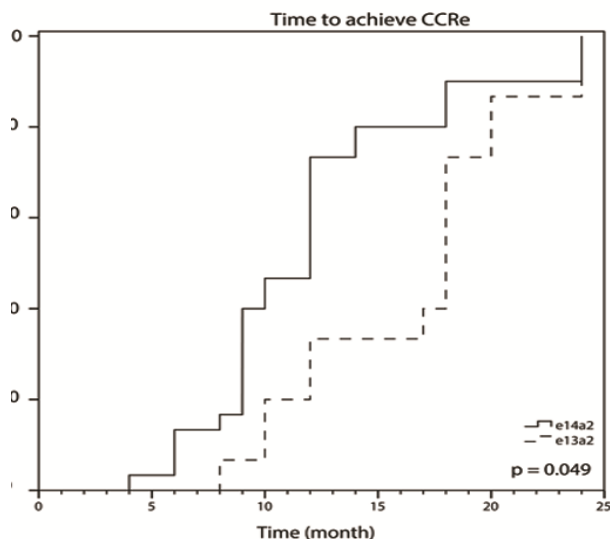
در این بیماران ویژگی‌های بالینی و دموگرافیکی مانند سن، جنس، شمارش WBC و پلاکت‌ها، سائز طحال و وضعیت سیگار در هر دو نوع ترانسکرپت یکسان بود و اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0.05$) (جدول ۲). طبقه بندی بیماران بر حسب Sokal risk score نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری برای دسته High risk بین دو گروه ترانسکرپت وجود دارد (۵/۷ درصد برای ترانسکرپت e14a2 در مقابل ۲۸ درصد برای ترانسکرپت e13a2) ($P=0.02$)، به عبارتی تعداد افراد بیشتری با نشان High risk در گروه ترانسکرپت e13a2 قرار گرفتند. از طرفی طبقه بندی بیماران بر حسب نوع و دز دارو نشان داد که بیشترین تعداد بیمارانی که ایماتینیب با دز ۴۰۰ میلی گرم در روز را دریافت کردند در گروه ترانسکرپت e14a2 قرار داشتند و تفاوت قابل توجه و معنی‌داری از نظر نوع و دز دارو بین دو گروه ترانسکرپت e14a2 و e13a2 وجود داشت ($P<0.05$). طول مدت زمان درمان با ایماتینیب به طور معنی‌داری بین دو گروه ترانسکرپت متفاوت بود (۵۸ ماه برای e13a2 در مقابل ۴۳ ماه برای e14a2) ($P=0.05$). (جدول ۲)

تاثیر نوع ترانسکرپت و Sokal risk score به عنوان فاکتور

پیش‌آگهی در پاسخ بیماران به دارو

در بازه زمانی ۲۴ ماه در مجموع از ۳۵ بیمار با ترانسکرپت e14a2، ۳۰ بیمار پاسخ کامل سیتوژنتیکی (CCR) را دریافت کردند و فقط ۵ بیمار موفق به دریافت CCR نشدند. از طرفی از مجموع ۲۵ بیمار e13a2، ۱۵ بیمار CCR را کسب کردند؛ لذا اختلاف معنی‌داری در میزان و سرعت پاسخ بیماران به دارو بین دو گروه ترانسکرپت وجود داشت، به طوری که ریسک عدم پاسخ به دارو و یا مقاومت به درمان در گروه e13a2، ۴ برابر بیشتر از گروه e14a2 بود (نسبت شانس=۴، ۹۵ درصد فاصله اطمینان:

۱۳/۸۱-۱/۱۵؛ $P=0.02$). آنالیز کاپلان-مایر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بروز تجمعی CCR (Cumulative incidence of CCR) بین دو گروه ترانسکرپت وجود دارد ($P=0.04$) (شکل ۱).



شکل ۱. پلات کاپلان مایر. آنالیز کاپلان مایر برای زمان حصول CCR در بیماران با ترانسکرپت های e14a2 و e13a2 نشان می‌دهد که بیماران با ترانسکرپت e14a2 پاسخ بهتر و سریع‌تر به دارو می‌دهند.

میانگین زمانی برای دریافت CCR در گروه e14a2، ۱۲ ماه و این زمان برای e13a2، ۱۸ ماه بود ($P=0.01$). این یافته‌ها نشان داد که میزان پاسخ سیتوژنتیکی بهتر و سریع‌تری برای e14a2 در مقایسه با e13a2 وجود داشت. در این مطالعه، تفاوت معنی‌داری در سه گروه sokal risk score برای Cumulative incidence of CCR وجود نداشت ($P=0.33$) و نشان داد که در این مطالعه Sokal score در پیش‌بینی پاسخ و دست‌یابی به CCR کارایی چندانی ندارد (جدول ۳).

تاثیر وضعیت سیگار روی پاسخ به دارو

با در نظر گرفتن افراد با وضعیت سیگار active و passive به عنوان گروه سیگاری (smoker) و افراد بدون مصرف سیگار در گروه غیر سیگاری (non smoker) بر اساس نوع ترانسکرپت، تاثیر سیگار روی پاسخ به درمان بررسی شد. در گروه ترانسکرپت e14a2 اختلاف معنی‌داری بین آنهایی که سیگاری بودند و آنهایی که سیگاری نبودند در دو گروه پاسخ دهنده به دارو و غیر پاسخ دهنده به دارو وجود نداشت ($P=0.68$). اما نتیجه اینتراکشن ترانسکرپت e13a2 با سیگار نشان داد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای به

جدول ۲. مشخصات بیماران بر اساس نوع ترانسکریپت

پارامترها	نوع ترانسکریپت	سطح معنی داری
	e13a2 (n=۲۵)	e14a2 (n=۳۵)
جنس (زن/مرد)	۱۴/۱۱	۱۸/۱۷
سن (سال)		
انحراف از معیار \pm میانگین	۴۷/۶۴ \pm ۱۵/۹۰	۴۶/۱۷ \pm ۱۶/۹۰
میانگین	۵۲	۴۵
دامنه تغییرات	۲۰-۸۱	۱۷-۷۴
سایز طحال (cm)		
میانگین	۵/۵۶	۵/۲۴
میانگین	۲	۱/۵
دامنه تغییرات	۰-۲۵	۰-۲۵
تعداد گلبول های سفید ($\times 10^9/L$)		
میانگین	۱۹۴/۵۲۴	۱۴۴/۹۴۷
میانگین	۱۴۰	۱۲۰
دامنه تغییرات	۲۷-۵۵۰	۲۳-۴۹۴
تعداد پلاکت ها ($\times 10^9/L$)		
میانگین	۴۲۸/۹۶۰	۴۶۹/۵۷۱
میانگین	۳۷۹	۳۸۶
دامنه تغییرات	۱۶۸-۱۰۸۶	۱۷۰-۱۵۴۷
Sokal score (N,%)		
زیاد	۷(۲۸٪)	۲(۵/۷٪)
متوسط	۸(۳۲٪)	۱۱(۳۱/۴۵٪)
کم	۱۰(۴۰٪)	۲۲(۶۲/۸۵٪)
میانگین	۸/۳۳	۱۱/۶۷
نوع درمان		
ایماتینیب (۴۰۰ mg/day)	۷(۲۸٪)	۲۴(۶۸/۵۷٪)
ایماتینیب (۸۰۰ mg/day)	۱۴(۵۶٪)	۱۰(۲۸/۵۷٪)
نیلوتینیب (۴۰۰ mg/twice)	۴(۱۶٪)	۱(۲/۸۶٪)
وضعیت سیگار (N,%)		
سیگاری (غیرفعال+فعال)	۱۴(۵۶٪)	۱۸(۵۱/۴۳٪)
غیر سیگاری	۱۱(۴۴٪)	۱۷(۴۸/۵۷٪)
مدت زمان درمان با ایماتینیب (ماه)		
میانگین	۶۵/۰۴	۴۸/۲۵
میانگین	۵۸	۴۳
دامنه تغییرات	۳-۱۴۲	۳-۱۲۰

جدول ۳. کارایی sokal score در پیش بینی پاسخ سیتوژنتیکی کامل

Sokal score	بروز تجمعی پاسخ کامل سیتوژنتیکی (%)	سطح معنی داری
کم	٪۷۹	۰/۳۳
متوسط	٪۶۸	
زیاد	٪۳۳	

میزان ۱۸ برابر پاسخ کمتر در افراد سیگاری گروه e13a2 (جدول ۴). (P=۰/۰۱؛ ۱/۷۵-۱۸۴/۶)

یافت شد (نسبت شانس=۱۸، ۹۵ درصد فاصله اطمینان: میزان ۱۸ برابر پاسخ کمتر در افراد سیگاری گروه e13a2)

جدول ۴. تاثیر سیگار روی پاسخ سیتوژنتیکی کامل بر اساس نوع ترانسکرپت

نوع ترانسکرپت	سیگار	غیر پاسخ دهنده ها	پاسخ دهنده ها	سطح معنی داری	فاصله اطمینان ۹۵٪	نسبت شانس
e13a2	-	۱	۱۰	-	- (رفرنس) ۱	
e13a2	+	۹	۵	۰/۰۱	۱۸۴/۶ - ۱/۷۵	۱۸
e14a2	-	۲	۱۵	-	- (رفرنس) ۱	
e14a2	+	۳	۱۵	۰/۶۸	۰/۲۱ - ۱۰/۳۰	۱/۵۰

بحث

در این مطالعه ما تاثیر سه فاکتور شامل نوع ترانسکرپت، Sokal risk score و سیگار به عنوان یک فاکتور محیطی سینرژیک را روی پاسخ سیتوژنتیکی بیماران CML در پاسخ به روش‌های مختلف درمانی بررسی کردیم. مطالعات اندکی راجع به اهمیت دانستن ترانسکرپت‌های BCR-ABL انجام شده است، اما یافته‌های جدید اهمیت بالینی نوع ترانسکرپت‌ها در درک بهتر پاتوژنز سلول‌های لوکمیک با ترانسلوکاسیون t(9;22) را نشان می‌دهد. به طور مثال، در بیماران مبتلا به CML که شیوع ترانسکرپت e14a2 در آنها بیشتر است، مقادیر پایین‌تر گلبول‌های سفید خون و مقادیر بالاتر پلاکت در مقایسه با بیماران با ترانسکرپت e13a2 دیده می‌شود (۶). در مطالعه ما فراوانی ترانسکرپت‌های e14a2 و e13a2 به ترتیب ۵۸/۳۳ و ۴۱/۶۷ درصد بودند، که این نتیجه مشابه با نتایج دیگر مطالعات بود (۱۳، ۱۲، ۹). Mino و همکارانش در اکوادور نتایج متفاوت با مطالعه ما را گزارش کردند و فرکانس ترانسکرپت‌های e14a2 و e13a2 را به ترتیب ۵ درصد و ۹۵ درصد (۲۴) و همچنین Osman و همکارانش در سودان این شیوع را به ترتیب ۴۲ درصد و ۵۴ درصد (۲۵) عنوان کردند. به نظر می‌رسد که نتایج متفاوت در مطالعات به دلیل تفاوت‌های قومیتی و نژادی است. در مطالعه حاضر، بعد از پیگیری وضعیت بیماران و آنالیز سیتوژنتیکی آنها در مورد نحوه پاسخ به دارو در فواصل مختلف دریافتیم که بیماران با ترانسکرپت نوع e14a2 پاسخ سیتوژنتیکی بهتر و زودتری به دارو نسبت به گروه بیماران با ترانسکرپت e13a2 دادند، به طوری که ریسک عدم پاسخ به دارو و مقاومت به دارو در گروه e13a2، ۴ برابر بیشتر از گروه e14a2 بود. در مورد تاثیر نوع ترانسکرپت روی نحوه پاسخ به دارو و نتایج بالینی تنها چند مطالعه در عصر ایماتینیب گزارش شده است، که در این مطالعات نیز اهمیت بالینی نوع ترانسکرپت به دلایلی مانند تعداد متفاوت بیماران مورد بررسی، سوگیری درکارایی تکثیر PCR، روش‌های مختلف و زمان پیگیری متفاوت هنوز بحث برانگیز است. از جمله

مطالعات هم راستا با نتایج مطالعه ما عنوان کردند که بیان ترانسکرپت e14a2 در بیماران با پاسخ سیتوژنتیکی زودتر و بهتری به دارو همراه است (۶، ۵). در عدم موافقت با مطالعه ما، پاسخ بهتر و زودتر در بیماران با ترانسکرپت e13a2 گزارش شد (۱۳، ۲۶). یافته‌های ما نشان داد که بروز تجمعی پاسخ کامل سیتوژنتیکی (cumulative incidence: CCR) بین دو گروه ترانسکرپت تفاوت معنی‌داری دارد، بدین معنی که در نتیجه پیگیری بیماران در یک بازه زمانی خاص ۲۴ ماهه تعداد بیماران با ترانسکرپت e14a2 که توانستند رویداد دستیابی به پاسخ کامل سیتوژنتیکی را تجربه کنند بیشتر و سریع‌تر در مقایسه با گروه e13a2 بود، اما مطالعه Hanfstien و همکارانش (۱۰) هیچ تفاوت معنی‌داری برای بروز تجمعی CCR را مشاهده نکردند. در برخی مطالعات گزارش شده است که وجود ۲۵ اسید آمینه اضافی در ترانسکرپت نوع e14a2 منجر به تغییر ساختار دمین اتصال کیناز BCR-ABL شده و این مساله موجب کاهش فعالیت تیروزین کینازی و در نهایت پاسخ بهتر بیماران با ترانسکرپت e14a2 می‌شود (۶). Hai و همکارانش (۲۷) نیز حضور ۲۵ اسید آمینه اضافه کد شده توسط اگزون e14 در نوع e14a2 را که در e13a2 وجود ندارد را موجب تفاوت‌هایی در دمین همولوژی SRC (SH1-SH3) و دمین اتصال DNA می‌دانند که موجب تنظیم فعالیت تیروزین کینازی در پروتئین BCR-ABL می‌شود. در مطالعه حاضر و همچنین گزارشی از Sharma و همکارانش (۱۳) هیچ تفاوت معنی‌داری برای ویژگی‌های بالینی و دموگرافیکی مانند سن، جنس، مقادیر گلبول‌های سفید خون و پلاکت‌ها و سائز طحال بین دو نوع ترانسکرپت مشاهده نشد، در حالی که مقادیر گلبول‌های سفید خون پایین‌تر و پلاکت بیشتر برای e14a2 (۶) و مقدار پلاکت کمتر برای e13a2 در مطالعات دیگر گزارش شده‌اند (۱۰). از آنجا که نوع دارو و دز متفاوت یک دارو در زمان و عمق پاسخ بیماران به دارو می‌تواند موثر باشد، در این مطالعه سه روش درمانی مختلف بر اساس نوع ترانسکرپت بررسی و مشاهده شد که بیشتر بیماران که در گروه e14a2 بودند دز استاندارد ۴۰۰ میلی گرم در روز را

مصرف کردند و از این نظر با گروه e13a2 متفاوت بود ($P < 0.05$). از طرفی گروه e13a2 در بازه زمانی ۲۴ ماه با ایماتینیب ۴۰۰ میلی گرم پاسخ ضعیف تر و با زمان طولانی تر نشان دادند و برای دز بالاتر و داروی نیلوتینیب پاسخ بهتر داشتند (نتایج نشان داده نشده است). این یافته با گزارش Jain و همکارانش (۶) که تنها مطالعه در ارزیابی روش های مختلف درمان است موافق است. به نظر می رسد که یافته اخیر تا حدی می تواند ابزار مناسبی برای انتخاب داروی مناسب برای بیماران بر اساس نوع ترانسکرپیت آنها باشد. در این مطالعه بیماران بر حسب Sokal risk score به سه گروه با ریسک پایین، ریسک متوسط و ریسک بالا طبقه بندی شدند. تفاوت معنی داری از نظر تعداد افراد با ریسک بالا بین دو گروه ترانسکرپیت وجود داشت و افراد بیشتری با ریسک بالا در گروه e13a2 قرار گرفتند، اما میانگین درجات ریسک و بروز تجمعی پاسخ کامل سیتوژنتیکی (Cumulative incidence of CCR) در یک بازه زمانی بین دو گروه، هم راستا با سایر مطالعات (۲۸) متفاوت نبود و دریافتیم که Sokal risk score ممکن است ابزار کارا و مناسبی برای پیش بینی پاسخ کامل سیتوژنتیکی بر حسب نوع ترانسکرپیت نباشد. این در حالی است که در یک مطالعه صرف نظر از نوع ترانسکرپیت گزارش کردند که sokal score پیش بینی کننده مناسبی برای دریافت پاسخ کامل سیتوژنتیکی است (۲۹) و در مطالعه دیگر مشاهده شد که بیماران با ترانسکرپیت e14a2 دارای sokal score بالاتری در مقایسه با ترانسکرپیت e13a2 بودند (۳۰). در مطالعه حاضر برای اولین بار مشاهده شد که سیگار ممکن است بر اساس نوع ترانسکرپیت در پاسخ به دارو نقش داشته باشد، به طوری که افراد سیگاری دارای ترانسکرپیت e13a2 در

مقایسه افراد غیر سیگاری با همان ترانسکرپیت، ۱۸ برابر پاسخ کمتری به دارو می دهند. در مورد نوع ترانسکرپیت e14a2، تفاوت معنی داری بین افراد سیگاری و غیر سیگاری در مورد پاسخ به دارو وجود نداشت. به نظر می رسد که با توجه به تفاوت ساختاری دو نوع ترانسکرپیت، ترکیبات و سموم موجود در سیگار روی ساختار ترانسکرپیت e13a2 تاثیر گذاشته و موجب افزایش فعالیت تیروزین کینازی و در نهایت پاسخ کمتر به دارو می شود. تاکنون مطالعه ای در تاثیر سیگار روی پاسخ به دارو بر اساس نوع ترانسکرپیت صورت نگرفته است. اما چند مطالعه اپیدمیولوژیکی تاثیر سیگار را روی ریسک ابتلا به CML و AML و همچنین روی پاسخ به دارو بررسی کرده اند و نشان دادند که سیگار به عنوان یک عامل سینرژیسم و در اینتراکشن با ژن های ترانسپورتر دارویی می تواند در ایجاد بیماری و مقاومت به دارو موثر باشد (۱۶، ۱۵). به طور خلاصه نتایج این مطالعه نشان داد که بیماران با ترانسکرپیت e14a2 پاسخ بهتر وزودتری به دارو می دهند و افراد با ترانسکرپیت e13a2 به دز استاندارد ایماتینیب مقاوم هستند و در دز بالاتر و یا نسل دوم مهار کننده تیروزین کینازی پاسخ بهتری به دارو می دهند. Sokal risk score ابزار پیش بینی کننده کارایی برای پاسخ به دارو بر اساس نوع ترانسکرپیت نیست و سیگار در افراد با ترانسکرپیت e13a2 موجب مقاومت به دارو می شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه بیماران شرکت کننده به دلیل همکاری و مساعدت در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می کنیم.

REFERENCES

- Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984;36:93-9.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996 ;2:561-6.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
- Rostami G, Hamid M, Jalaeikhoo H. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
- Jain P, Kantarjian H, Patel KP, Gonzalez GN, Luthra R, Shamanna RK, et al. Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2016;127:1269-75.
- Lucas C, Wang L, Austin G, Knight K, Watmough S, Shwe K, et al. A population study of imatinib in chronic myeloid leukaemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials. *Leukemia* 2008;22:1963-6.

8. Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol* 1995;89:546-54.
9. Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, Davies A, Knight K, Watmough SJ, et al. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica* 2009;94:1362-7.
10. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica* 2014;99:1441-7.
11. Polampalli S, Choughule A, Negi N, Shinde S, Baisane C, Amre P, et al. Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. *Genet Mol Res* 2008;7:1138-49.
12. De Lemos J, de Oliveira CM, Scerni A, Bentes AQ, Beltrão AC, Bentes I, et al. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res* 2005;4:803-11.
13. Sharma P, Kumar L, Mohanty S, Kochupillai V, Sharma P, Kumar L, et al. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. *Ann Hematol* 2010;89:241-7.
14. Vega-Ruiz A, Kantarjian H, Shan J, Wierda W, Burger J, Verstovsek S, et al. Better Molecular Response to Imatinib for Patients (pts) with Chronic Myeloid Leukemia (CML) in Chronic Phase (CP) Carrying the b3a2 Transcript Compared to b2a2. *Blood* 2007; 110: 1939.
15. Ugai T, Matsuo K, Sawada N, Iwasaki M, Yamaji T, Shimazu T, et al. Smoking and subsequent risk of leukemia in Japan: The Japan Public Health Center-based Prospective Study. *J Epidemiol* 2017;27:305-310.
16. Mohammadi F, Rostami G, Assad D, Shafiei M, Hamid M, Jalaiekhoo H. Association of SLC22A1, SLC01B3 Drug Transporter Polymorphisms and Smoking with Disease Risk and Cytogenetic Response to Imatinib in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Lab Med* 2021;52:584-596.
17. Björk J, Albin M, Mauritzson N, Strömberg U, Johansson B, Hagmar L. Smoking and acute myeloid leukemia: associations with morphology and karyotypic patterns and evaluation of dose-response relations. *Leuk Res* 2001;25:865-72.
18. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984;63:789-99.
19. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006;108:1809-20.
20. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;10:6041-51.
21. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122:872-884.
22. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002;16:53-9.
23. Yaghmaei M, Ghafari S, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Jahani M, Mousavi S, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Arch Iran Med* 2008;11:247-251.
24. Mino C, Burgos R, Morriolo 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;132:65-7.
25. Osman EA, Hamad K, Elmula IM, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet Mol Biol* 2010;33:229-31.
26. Lee M, Kantarjian H, Talpaz M, Deisseroth A, Freireich E, Trujillo J. Association of the responsiveness to interferon therapy with the bcr/abl splicing pattern in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1992;80:210a.
27. Hai A, Kizilbash NA, Zaidi SHH, Alruwaili J, Shahzad K. Differences in structural elements of Bcr-Abl oncoprotein isoforms in Chronic Myelogenous Leukemia. *Bioinformation* 2014;10:108-114.

28. Nachi M, Kihel I, Entasoltane B, Brahimi M, Yafour N, Guella D, et al. Impact of the major BCR-ABL1 transcript type on clinical and biological parameters and molecular response in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2020;S1658-3876(20)30145-X.
29. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3358-63.
30. Deb P, Chakrabarti P, Chakrabarty S, Aich R, Nath U, Ray SS, et al. Incidence of BCR-ABL transcript variants in patients with chronic myeloid leukemia: Their correlation with presenting features, risk scores and response to treatment with imatinib mesylate. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2014;35:26-30.