

بررسی بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در فازهای مختلف لوسمی میلوئیدی مزمن

سید هادی موسوی^۱، دکتر یوسف مرتضوی^۲، دکتر حسین درگاهی^۳، نیلوفر شایان^۴
دکتر کامران علی مقدم^۵، دکتر اردشیر قوام زاده^۶، دکتر مسعود ابروانی^۷،
دکتر سید اسدا... موسوی^۸، دکتر سید حمید ا... غفاری^{۹*}

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یک اختلال کلونال سلولهای بنیادی خونساز می باشد، که جزء اختلالات میلوپرولیفراتیو تقسیم بندی می شود و حدود ۱۵ درصد از کل لوسمی ها را تشکیل می دهد. دو پروتئین تنظیم کننده چرخه سلولی که به عنوان سرکوب کننده تومور عمل می کنند، P16^{INK4A} و P14^{ARF} می باشند. منشأ این دو پروتئین لکوس ژن INK4A/ARF انسانی می باشد، که بر روی کروموزوم ۹q۲۱ قرار دارد. P16^{INK4A} و P14^{ARF} به ترتیب کنترل مسیره های رتینوبلاستوما (Rb) و P53 را بعهده دارند. هدف از این مطالعه بررسی نقش این دو ژن به عنوان فاکتوری جهت پیش آگهی و پیشروی بیماری می باشد. **روش بررسی:** مطالعه انجام شده از نوع بررسی مقطعی (Cross sectional) بود. بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در ۷۳ نمونه خون محیطی که از ۴۵ بیمار CML گرفته شده بود با روش RT-PCR مورد مقایسه قرار گرفتند. ۲۶ نمونه در فاز قبل از درمان، ۲۶ نمونه ۳ ماه بعد از درمان با ایماتینیب، ۹ بیمار در فاز تسریع شده و ۱۲ بیمار در فاز بلاستیک بودند. **یافته ها:** از ۴۵ بیمار، ۳۳ نفر مذکر (۷۳٪) و ۱۲ نفر مؤنث (۲۷٪) بودند. از نظر RT-PCR، بیماران مورد مطالعه، تعداد ۲۶ نفر (۳۵٪) ژن P16^{INK4A} مثبت و تعداد ۵۵ نفر (۷۵٪) ژن P14^{ARF} مثبت بودند. بیان این دو ژن بین فازهای مختلف تفاوت معنی داری را نشان نداد ($p > 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: درصد نسبتاً بالایی از بیماران CML، ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} را بیان می کردند؛ با اینکه تفاوت معنی داری در مراحل مختلف بیماری (فازهای تشخیص، تسریع شده و بلاستیک) مشخص نشد، ولی تعداد بیماران مثبت پس از درمان افزایش نشان می داد؛ به نظر می رسد که دلیل این افزایش بیان، افزایش رونویس ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} توسط ایماتینیب باشد.

واژه های کلیدی: لوسمی میلوئیدی مزمن، P16^{INK4A}، P14^{ARF}، RT-PCR

* نویسنده مسئول :
دکتر سید حمید ا... غفاری ؛
مرکز تحقیقات خون و آنکولوژی و پیوند
مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی
تهران
Email: Shghaffari 2000 @
yahoo.com

- دریافت مقاله : اسفند ماه ۱۳۸۶ - پذیرش مقاله : اردیبهشت ماه ۱۳۸۷

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یک اختلال کلونال میلوپرولیفراتیو سلولهای بنیادی خونساز می باشد، که حدود ۱۵ درصد از لوسمی ها را تشکیل می دهد. این لوسمی در ۹۵ درصد موارد همراه با یک ناهنجاری کروموزومی بنام فیلادلفیا (Ph) می باشد که این ناهنجاری در نتیجه جابجایی دو طرفه کروموزومی بدنبال شکست در باند q۳۴ کروموزوم ۹ و شکست در در باند q۱۱ کروموزوم ۲۲ می باشد (q۳۴;q۱۱) (9;22)؛ در

- ۱ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۲ دانشیار گروه پاتولوژی و پزشکی ملکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
- ۳ دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴ کارشناس ارشد مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵ دانشیار مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۶ استاد مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۷ استادیار مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۸ استادیار مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۹ استادیار مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران

MDM2 را پایدار می کند، که این امر توقف چرخه سلولی در هر دو فاز G_1 و G_2/M را القا می کند (۶).

$p14^{ARF}$ ، $P16^{INK4A}$ در حفظ هموستاز سلولی و جلوگیری از فرآیند انکوژنیک نقش حیاتی دارند. ژن این پروتئین ها در اکثر سرطانهای انسانی در اثر حذف ژنی، جهش نقطه ای یا متیلاسیون پروموتور، غیرفعال می شود (۷).

هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن $P16^{INK4A}$ و $P14^{ARF}$ در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن بوده و اهمیت بیان این ژن را در فازهای مختلف بیماری مورد بررسی قرار داده شده است.

روش بررسی

این مطالعه مقطعی بر روی ۷۳ نمونه خون محیطی که از ۴۵ بیمار (۳۳ مرد و ۱۲ زن) لوسمی میلوئیدی مزمن در مرکز خون، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان شریعتی تهران جمع آوری شده بود، انجام گرفت. انتخاب نمونه ها بر اساس وضعیت آزمایشگاهی، بالینی و مطالعه پروند بیماران صورت گرفت. ۵ میلی لیتر نمونه خون وریدی در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته شد و جهت این کار از بیماران رضایت کتبی گرفته شد. متوسط سنی بیماران ۳۸ سال بود (دامنه سنی ۱۷-۷۴). بر طبق وضعیت بالینی و بیولوژیکی و درمانی در زمان آزمایش بیماران به چندین گروه تقسیم شدند که شامل بیماران در فاز مزمن بدون هیچگونه درمان، ۲۶ نمونه؛ بیماران در فاز مزمن پس از درمان، ۲۶ نمونه؛ بیماران در فاز تسریع شده، ۹ نمونه؛ و بیماران در فاز بلاستیک، ۱۲ نمونه، بود. لازم به ذکر است که نمونه های پس از درمان مربوط به سه ماه پس از درمان با ایمانتینب بود.

با استفاده از فایکول سلولهای تک هسته ای جدا شدند، به ازاء هر 10^6 سلول تک هسته ای ۱ میلی لیتر از محلول تریزول (Trizol) به سلولها اضافه شد و ۱۰-۵ ثانیه

نتیجه کایمریسم BCR-ABL بوجود می آید. ژن BCR-ABL به پروتئین ۲۱۰ KD ترجمه می شود که به عنوان BCR-ABL ۲۱۰ شناخته می شود (۱).

این بیماری دارای سه فاز مزمن، تسریع شده و بلاستیک می باشد. اولین فاز، فاز مزمن می باشد که لکوسیتوز نوتروفیلی مشخصه آن است. بعد از این فاز، فاز تسریع شده می باشد که بلاست ها بتدریج افزایش می یابند، این فاز همچنین بوسیله ناهنجاریهای سیتوژنتیک خاصی مانند مضاعف شدن کروموزوم فیلادلفیا، ایزوکروموزومی ۱۷ و تریوزومی ۸ شناخته می شود. آخرین فاز هم فاز بلاستیک می باشد که در آن تعداد زیادی بلاست وجود دارد؛ پیشروی از فاز تسریع شده به فاز بلاستیک حدود ۳ تا ۴ سال به طول می انجامد (۲).

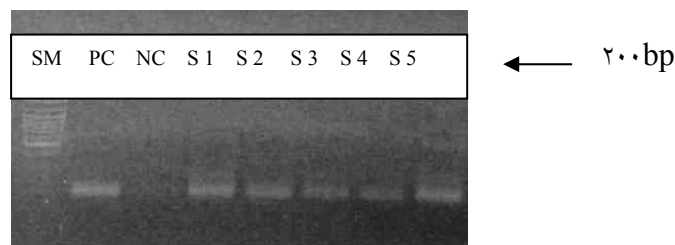
لکوس $INK4A/ARF$ همچنین به نام CDKN2 نیز شناخته می شود که دارای دو پروتئین به نامهای $P16^{INK4A}$ و $P14^{ARF}$ می باشد. این لکوس بر روی کروموزوم ۹q۲۱ قرار دارد (۳). $P16^{INK4A}$ یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی است که از ۱۵۶ اسید آمینه تشکیل شده است و از اتصال آگزون فرعی 1α و آگزون ۲ بوجود می آید. $P16^{INK4A}$ یک مهار کننده چرخه سلولی می باشد که عمل خود را از طریق کنترل مسیر رتینوبلاستوما (Rb) انجام می دهد؛ به نحوی که باعث جلوگیری از فسفوریلاسیون و غیرفعال شدن پروتئین Rb از طریق مهار $CDK4/CDK6$ می شود؛ که در نتیجه باعث توقف پیشروی از فاز G_1 به S می شود (۴).

$P14^{ARF}$ یک پروتئین ۱۴ KD می باشد که دارای ۱۳۲ اسید آمینه است و از آگزون فرعی 1β و آگزون ۲ تشکیل شده است. $P14^{ARF}$ یک محصول از برش و پیوند متناوب از لکوس ARF می باشد و هیچگونه تشابه توالی با پروتئین $INK4A$ ندارد (۳، ۴). پروتئین $p14^{ARF}$ سرکوب کننده رشد سلولی از طریق چندین مسیر وابسته و غیر وابسته به p53 می باشد (۵). $p14^{ARF}$ بطور مستقیم به MDM2 متصل می شود که هم p53 هم

سپس میکروتیوب ها در دستگاه ترموسیکلر (۱۰ دقیقه در 25°C ، ۱ ساعت در 42°C و ۱۰ دقیقه در 75°C) قرار داده شد، و نمونه های cDNA ساخته شدند. به منظور اطمینان از سالم بودن cDNA ساخته شده، نمونه ها توسط یک House Keeping gene مانند ABL، PCR، بررسی شد و در آخر نمونه ها برای ژنهای $P16^{\text{INK4A}}$ و $P14^{\text{ARF}}$ PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای هر واکنش $2.5\mu\text{l}$ بافر با غلظت نهایی $1\times$ ، $0.75\mu\text{l}$ MgCl_2 با غلظت نهایی 1.5mM ، $2.5\mu\text{l}$ dNTP با غلظت نهایی $200\mu\text{M}$ ، $0.5\mu\text{l}$ از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت نهایی 0.2pM ، $0.2\mu\text{l}$ Taq DNA Polymerase با غلظت نهایی 1Unit و $2\mu\text{l}$ cDNA استفاده شد و حجم نهایی با آب استریل مجاور شده با DEPC به $25\mu\text{l}$ رسانده شد. توالی پرایمرهای بکاربرده شده در جدول زیر نشان داده شده است (جدول شماره ۱). مراحل PCR بصورت زیر می باشد: ۴ دقیقه در 95°C جهت شروع سیکل، 40°C ثانیه در 95°C ، 40°C ثانیه در 57°C ، 40°C ثانیه در 72°C و در نهایت ۷ دقیقه در 72°C . این سیکل ۳۵ بار تکرار شد. نمونه های PCR در ژل آگاروز ۳٪ الکتروفورز شدند. اندازه باندهای مربوط به ژنهای $P14^{\text{ARF}}$ و $P16^{\text{INK4A}}$ به ترتیب 180bp و 200bp می باشد. در این آزمایش از آب بعنوان کنترل منفی و از سلولهای رده NB4 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل شماره ۱ و ۲).

ورتنکس شدند. این محلول هموژن (Homogenous) به میکروتیوب های $1/5$ میلی لیتری منتقل گردید. و سپس $0/2$ میلی لیتر کلروفورم به آن اضافه شد، میکروتیوب ها به مدت ۱۰ ثانیه شدیداً تکان داده شد و ۵ دقیقه در دمای 4°C با 13000rpm سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ دو لایه تشکیل شد که لایه بالایی حاوی RNA و لایه پایینی حاوی DNA و پروتئین بود. فاز بالایی را با دقت زیاد و با استفاده از سرسمپلرهای عاری از Rnase برداشته و به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد، سپس $0/5$ میلی لیتر ایزوپروپانول به لوله های حاوی RNA اضافه شد و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و بعد به مدت 4°C با 13000rpm سانتریفوژ شد، بعد از سانتریفوژ مایع رویی دور ریخته شده و رسوب RNA در ته میکروتیوب باقی ماند. رسوب RNA با 1 میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد دوبار شسته شد، و سپس RNA خشک شده در 50 میکرولیتر آب مقطر عاری از RNA حل گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، دانسیته نوری (OD) 260 و 280 محاسبه شد.

به منظور ساخت cDNA، 1 میکروگرم از RNA تام استخراج شده به مدت ۳-۵ دقیقه در 75°C انکوبه شد و سپس master mix را که شامل آنزیم M-MLV، آنزیم RNase inhibitor، بافر $5\times$ ، dNTPs و آب دو بار تقطیر شده مجاور شده با DEPC می باشد به آن اضافه گردید،



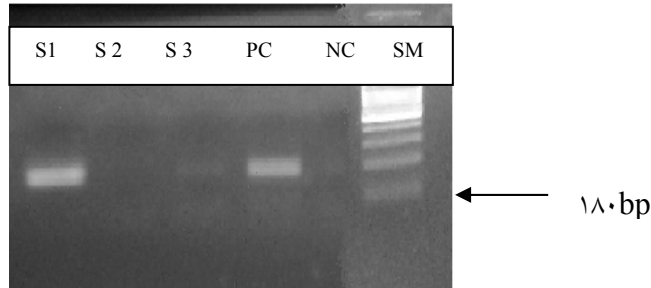
شکل شماره ۱: تصویری از نتایج یک ژل مربوط به ژن $P14^{\text{ARF}}$

NC: کنترل منفی

PC: کنترل مثبت

SM: سایز مارکر

S1 → S5: به ترتیب نمونه های ۱ تا ۵



شکل شماره ۲: تصویری از نتایج یک ژل مربوط به ژن P16^{INK4A}

SM: سایز مارکر PC: کنترل مثبت NC: کنترل منفی
 S1 → -S3 : به ترتیب نمونه های ۱ تا ۵

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در بررسی بیان ژنهای P14^{ARF} و P16^{INK4A}

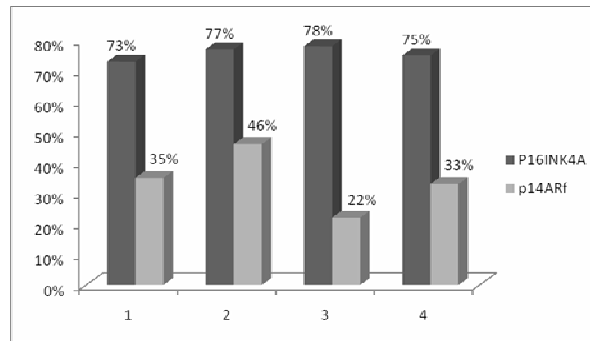
نام پرایمر	توالی 5' به 3'
P16 ^{INK4A} (F)	5' GCT GCC CAA CGC ACC GAA TA 3'
P14 ^{ARF} (F)	5' CCC TCG TGC TGA TGC TAC TGA 3'
(R) P16 ^{INK4A} و P14 ^{ARF}	5' ACC ACC AGC GTG TCC AGG AA 3''

گونه ای است که در ۲۶ نمونه به ترتیب ۱۳ (۵۰٪) و ۱۹ (۷۸٪) نمونه درمورد P16^{INK4A} و P14^{ARF} نتایج PCR مثبت داشتند. در مقایسه فاز مزمن با هر کدام از فازهای تسریع شده (AP) و بلاستیک (BP) بصورت جداگانه، اختلاف معنی داری در بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} دیده نشد (P > 0.05). ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در فازهای تسریع شده از ۹ نمونه به ترتیب ۲ نمونه (۲۲٪) و ۷ نمونه (۷۸٪) و در فاز بلاستیک از ۱۲ نمونه، ۴ نمونه (۳۳٪) و ۹ نمونه (۷۵٪) PCR مثبت بودند (نمودار شماره ۱).

جهت مقایسه بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در فازهای مختلف بیماران CML از Fisher's Exact Test با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته ها

در این بررسی، در مرحله تشخیص (فاز مزمن قبل از درمان) با افزایش نتایج PCR مثبت ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} روبرو بود که در مورد ژن P16^{INK4A}، از ۲۶ نمونه بیماران ۸ نمونه (۳۰٪) و در مورد ژن P14^{ARF} از ۲۶ نمونه بیماران ۱۹ نمونه (۷۳٪) PCR مثبت بودند. نتایج بدست آمده از فاز بعد از درمان با ایمانیتیب نیز به



نمودار شماره ۱: بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در فازهای مختلف بیماران CML بر حسب درصد نمونه

غیرفعال می سازد (۸). پروتئین p14^{ARF} سرکوب کننده رشد سلولی از طریق چندین مسیر وابسته و غیر وابسته به p53 می باشد (۵). p14^{ARF} بطور مستقیم به MDM2 متصل می شود و هم p53 و هم MDM2 را پایدار می کند، که توقف در چرخه سلولی در هر دو فاز G₁ و G₂/M را القا می کند (۶). اطلاعات بسیار کمی در مورد وضعیت بیان تنظیم کننده های چرخه سلولی p16^{INK4A} و p14^{ARF} وجود دارد. mRNA مربوط p16^{INK4A} و p14^{ARF} در سلولهای خون محیطی، سلولهای تک هسته ای مغز استخوان و غدد لنفاوی به مقدار خیلی کم بیان می شوند و افزایش بیان و یا غیر فعال شدن این ژنها ممکن است با بیماریزایی تومور همراه باشد (۶, ۸).

در این تحقیق بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در چهار مرحله مزمن قبل از درمان، بعد از درمان با ایماتینیب، فاز تسریع شده و فاز بلاستیک بیماران مبتلا به CML مورد اندازه گیری قرار گرفت. یافته ها نشان داد که مقدار mRNA مربوط به P16^{INK4A} و P14^{ARF} در فازهای مختلف بیماری اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند. حتی مقایسه فاز مزمن قبل و بعد از درمان توسط آزمون Mann-Whitney اختلاف معنی داری را نیز بین مقدار P16^{INK4A} و P14^{ARF} در این دو مرحله از خود نشان نداد (P > 0.05).

بین مرحله پس از درمان و فاز تسریع شده و همچنین پس از درمان با فاز بلاستیک بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P > 0.05). در مقایسه بیان P16^{INK4A} و P14^{ARF} با گروه های سنی و جنسی بیماران مورد مطالعه، نیز ارتباط معنی داری دیده نشد (P > 0.05). در این مطالعه شمارش WBC و بلاست نیز انجام گردید. شمارش WBC در فاز مزمن بیشترین و در فاز پس از درمان کمترین میزان و شمارش بلاست در فاز بلاستیک بیشترین و در فاز پس از درمان کمترین میزان را داشت. اختلاف معنی داری بین این پارامترها با نتایج مثبت و منفی PCR ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} دیده نشد (P > 0.05).

بحث و نتیجه گیری

لوکوس ژن CDKN2A انسانی در کروموزوم 9p21 قرار دارد و پروتئین های مختلف p16^{INK4A} و p14^{ARF} را کد می کند (۶, ۷). کد کننده های مهار کننده چرخه سلولی P16^{INK4A} و p14^{ARF} به ترتیب کنترل مسیره های رتینوبلاستوما (Rb) و p53 را بعهده دارند. p16^{INK4A} یک مهارکننده کینازای وابسته به چرخه (CKI) می باشد. کینازهای وابسته به چرخه (CDK4 و CDK6) پیشروی از فاز G₁ به سمت فاز S را توسط فسفوریلاسیون تسهیل کرده و در نتیجه پروتئین Rb را

اما در مورد P14^{ARF} در فاز مزمن، ۱۴ نمونه (۵۶٪) قبل از درمان مثبت بودند که تا سه ماه بعد از درمان مثبت باقی ماندند، ۶ نمونه (۲۴٪) قبل از درمان منفی بودند که بعد از درمان مثبت شدند، ۵ نمونه (۲۰٪) قبل از درمان مثبت بودند که بعد از درمان منفی شدند و هیچ نمونه‌ای وجود نداشت که قبل و بعد از درمان منفی باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Cividin و همکارانش انجام شد، نشان دادند که هر چند درمان با ایمانیتیب باعث افزایش بیان این دو ژن می‌شود ولی هیچگونه تغییر معناداری در بیان mRNA مربوط به ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} در بیماران CML ایجاد نمی‌کند (۵). نتایج حاصله از مطالعه حاضر نیز با این یافته مطابقت دارد.

در مطالعه Cividin و همکارانش که اکثر بیماران CML با INF- α درمان شده بودند، بعد از درمان افزایش سطوح بیان mRNA مربوط به P16^{INK4A} و P14^{ARF} را نشان می‌دادند؛ می‌توان نتیجه گرفت که افزایش بیان این دو ژن بعد از درمان با INF- α می‌تواند در نتیجه افزایش رونویسی ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} توسط INF- α باشد (۵).

نتایج بدست آمده در مراحل عود بیماری (فاز تسریع شده و بلاستیک) نیز نتایج بالایی از PCR مثبت را نشان دادند، همچنین در یک مطالعه توسط Taniguchi افزایش بیان P14^{ARF} در ۵ مورد از ۸ مورد بیماران CML در فاز BC و افزایش بیان P16^{INK4A} در ۶ مورد از ۸ مورد گزارش شده است (۸).

غیر فعال شدن ژنهای Rb و P53 در بحران بلاستیک شایع اما در فاز مزمن CML غیر معمول می‌باشد. مشخص شده است که عملکرد طبیعی P53 باعث حفظ فاز مزمن CML می‌شود و P14^{ARF} واسطه این مسیر می‌باشد (۱۱).

Sil و همکارانش گزارش کرده‌اند که حذف ژن P16^{INK4A} با بحران بلاستیک CML مرتبط است و همچنین بیان نموده‌اند که افزایش بیان P16^{INK4A} و

در این بررسی در مرحله تشخیص (فاز مزمن قبل از درمان)، با افزایش نتایج PCR مثبت ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} دیده شد که این نتایج حاصله با نتایج Lee و همکارانش که افزایش بیان ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} به ترتیب در ۳ (۶۰٪) و ۴ (۸۰٪) بیمار از ۵ بیمار مشاهده کرده بودند، مطابقت داشت (۶). دیگر مطالعات انجام شده بر روی سرطانهای مختلف از جمله تومورهای توپر نشان دهنده افزایش بیان این دو ژن در مراحل اولیه تومور می‌باشد (۹).

اگر چه Taschon و همکارانش افزایش سطوح P16^{INK4A} و P14^{ARF} را در AML (لوسمی میلوئیدی حاد) گزارش کرده‌اند، اما نمی‌توان افزایش بیان قابل تشخیصی را در اکثر بیماران AML تعیین کرد با این حال در اکثر بیماران CML افزایش بیان واضحی از P16^{INK4A} و P14^{ARF} در فاز مزمن قابل مشاهده بود (۱۰).

در مطالعات دیگر بدخیمی‌ها، از میان ۷ بیمار AML، ۱ بیمار افزایش بیان P16^{INK4A} و P14^{ARF} را نشان می‌داد که این افزایش مرتبط با حالت عود AML بود. بیان P16^{INK4A} در دو بیمار از ۴ بیمار ALL افزایش داشت، اما سطح بیان P14^{ARF} افزایش را نشان نداده بود. در ۵ بیمار MDS، P16^{INK4A} و P14^{ARF} در دو بیمار افزایش یافته بود (۶).

در این مطالعه نتایج بدست آمده از فاز بعد از درمان با ایماتیب نیز از ۲۶ نمونه‌ای که وجود داشت به ترتیب ۱۳ (۵۰٪) و ۱۹ (۷۸٪) نمونه در مورد P16^{INK4A} و P14^{ARF} نتایج PCR مثبت داشتند. در مورد P16^{INK4A} در فاز مزمن، ۵ نمونه (۲۰٪) قبل از درمان مثبت بودند که بعد از درمان هم مثبت باقی ماندند، ۱۰ نمونه (۴۰٪) قبل و بعد از درمان منفی بودند، ۷ نمونه (۲۸٪) قبل از درمان منفی بودند که بعد از درمان مثبت شدند و فقط ۳ نمونه (۱۲٪) قبل از درمان مثبت بودند که بعد از درمان منفی شدند.

همچنین در مورد لوسمی ها، بیشترین حذف در مورد ALL (لوسمی لنفوبلاستیک حاد) و به خصوص در T-ALL بیشتر می باشد و نسبت حذف در CLL، MM (مالتیپل میلوما)، AML و CML و MDS (سندرم میلودیسیپلازی) بسیار پایین می باشد و به استثناء حذف در بحران لنفوئیدی بلاستیک CML فقط در تعداد کمی از موارد CLL، AML، MM، CML و MDS حذف P16^{INK4A} صورت می گیرد. همچنین گزارش شده است که متیلاسیون P16^{INK4A} در AML، MDS و ALL یک واقعه نادر می باشد و حتی P16^{INK4A} در هیچ مرحله ای از CML غیرفعال نمی شود (۱۴). از نکات قابل ذکر در این تحقیق این است که درصد نسبتاً بالایی از بیماران CML، ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} را بیان می کردند؛ با اینکه تفاوت معنی داری در مراحل مختلف بیماری (فازهای تشخیص، تسریع شده و بلاستیک) مشخص نشد، ولی تعداد بیماران مثبت پس از درمان افزایش نشان می داد؛ به نظر می رسد که دلیل این افزایش بیان، افزایش رونویس ژنهای P16^{INK4A} و P14^{ARF} توسط Imatinib باشد، مشابه آنچه که در INF- α مشاهده شد.

P14^{ARF} نیز ممکن است با پیشرفت CML مرتبط باشد و از طرفی دیگر از دست دادن این ژنها ممکن است همگی در پیشرفت بیماری نقش داشته باشند (۱۲).

در مطالعه دیگری بیان شده است که، افزایش بیان P16^{INK4A} و P14^{ARF} ممکن است نقشی در به تأخیر انداختن پیشروی تومور در CML داشته باشد. افزایش بیان mRNA این دو ژن بطور اخص فراوانی بیشتری در CML دارد، اما در لوسمی حاد اینطور نیست، که این حالت ممکن است مرتبط با تفاوت در پاتوفیزیولوژی بین لوسمی حاد و CML باشد (۶).

نتایج بدست آمده در دیگر لوسمی ها و تومورهای توپیر بدلیل جهش های نقطه ای، حذف و متیلاسیون که در CML خیلی کمتر از دیگر لوسمی ها و تومورهای توپیر رخ می دهد، متفاوت می باشد (۱۳).

در مورد حذف لکوس INK4A/ARF این گونه بیان شده است که این لکوس ها در طیف وسیعی از تومورها شامل ملانوما، آدنوکارسینومای پانکراس، گلیوما، سرطان ریه، سر و گردن، پستان، مغز، تخمدان، لوسمی های خاص و کارسینومای مثانه حذف می شوند (۹).

منابع

1. Lichtman MA, Kipps TJ, Kaushansky K, Beutler E, Seligsohn U, Prchal JT, editors. Williams Hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc; 2006. p. 1264-1270
2. Gree JP, Foerster J, Lukens JN, editors. Wintrobe's Clinical Hematology. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. P.1181-1189
3. Quelle DE, Ashmun RA, Hannon GJ, Rehberger PA, Trono D, Richter KH. Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. Oncogene. 1995 Aug 17;11(4):635-45.
4. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta. 1998 Oct 14;1378(2):F115-77.

5. Cividin M, Ayrault O, Sorel N, Séité P, Brizard F, Blanchet O, et al. Expression of the cell cycle regulators p14ARF and p16INK4a in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2006 Oct; 30(10): 1273-1278.
6. Lee YK, Park JY, Kang HJ, Cho HC. Overexpression of p16INK4A and p14ARF in haematological malignancies. *Clin Lab Haematol.* 2003 Aug; 25(4): 233-237.
7. Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Colomer D, Vela MC, Costa D, Paz MF. Genomic p16 abnormalities in the progression of chronic myeloid leukemia into blast crisis: A sequential study in 42 patients. *Exp Hematol.* 2003 Mar; 31(3): 204-10.
8. Taniguchi T, Chikatsu N, Takahashi S, Fujita A, Uchimar K, Asano S. Expression of p16INK4A and p14ARF in hematological malignancies. *Leukemia.* 1999 Nov;13(11):1760-9.
9. Kim WY, Sharpless NE. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell.* 2006 Oct 20;127(2):265-75.
9. Tschan MP, Vonlanthen S, Cajot JF, Peters UR, Oppliger E, Betticher DC. Different p16INK4a and p14ARF expression patterns in acute myeloid leukemia and normal blood leukocytes. *Leuk Lymphoma.* 2001 Sep-Oct;42(5):1077-87.
10. Beck Z, Kiss A, Toth FD, Szabó J, Bácsi A, Balogh E, et al. Alterations of P53 and RB genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2000 Aug;38(5-6):587-97.
11. Sill H, Goldman JM, Cross NC. Homozygous deletion of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1995 Apr 15; 85(8): 2013-6.
12. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes P15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia,* 1998 June; 12(6): 845-859.
13. Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene.* 2002 May 13;21(21):3475-95.