بسم الله الرحمن الرحيم

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک
۱۰ /۷/ ۱۳۷۴

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون

موضوع:

بررسی آسیبهای ژنتیکی ناشی از پروتکلهای شیمی درمانی در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتیک حاد به روش امتزاج سلولی PCC

استاد راهنما:
دکتر حسین مزدارانی

استاد مشاور:
پروین زرساو

نگارش:
لیلا کریمیان

تابستان ۷۴

۲۰۱۰

به نام آفریدگاری که همهٔ هستی از اوست و بنام همویی که در من تـوان برخویش تاختن ، با خود درآویختن بنهاد.

و سوگند به قلم که جوهر جانم در رگ اوست ، سخت کاویدم ، از سعی نکاهیدم ، از وقت نهراسیدم و این ذره‌ای شد از دریای بی‌پایان علمش و حلقه‌ای شد در سلسلهٔ بی‌انتهای وصلش.

تقدیم به :

کودکانی که آوای خزان ، سبزینهٔ روحشان پژمرده ساخت و با امید به آفرینش چیزی به اندازهٔ بی‌اندازهٔ عشق در قلب کوچکشان و با درود به وجود بردبار تیماردارانشان.

تشکر و سپاس خالصانه خود را بـه کـلیه کسـانیکه در طول مدت تحصیل مرا یاری نمودند تقدیم می‌نمایم:

- جناب آقای دکتر حسین مزدارانی ، استاد مـحترم راهـنما و مـعاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که همیشه از ارشادات ایشان در طی کارعملی و همچنین تدوین و تـنظیم پـایان‌نامه بـهره‌مند بوده‌ام.

- سرکار خانم پروین زرساو ، استاد محترم مشاور و عضو هیئت علمی سازمان انرژی اتمی ایران که همواره برای کمکهای خالصانه و بـی‌دریغ ایشان مدیون خواهم بود.

- سرکار خانم دکتر پروانه وثوق ، آن فرشته نجات کودکان و استاد علم و مربی اخلاق و کلیه پرسنل محترم بخش خون بیمارستان کودکان حضرت علی اصغر (ع) از جمله سرکار خانم سرداری.

- جناب آقای دکتر سعید کاظمی آشتیانی رئیس جهاددانشگاهی عـلوم پزشکی ایران که همواره برادرانه در این راه مرا یاری و تشویق نموده‌اند.

- جناب آقای دکتر شهرام سمیعی ، جناب آقای دکتر حـمید گـورابـی، جناب آقای دکتر احمد حسینی و جناب آقـای دکـتر مـجتبی رضـازاده ولوجردی برای راهنمایی و کمکهای ارزشمندشان .

- سرکار خانم منصوره لباف ، سرکار خانم لیلی باجلان ، سرکار خانم سوسن عبدلی و کلیه همکاران گرامی در مؤسسه رویان.

در خاتمه از مسئولین و همکاران گرامی جهاددانشگاهی عـلوم پـزشکی ایران که برای انجام این تحقیق امکانات و تسـهیلات لازم را در اخـتیار اینجانب قرار داده‌اند ، سپاسگزاری می‌نمایم.

چکیده :

لوسمی لنفوسیتیک حاد (ALL) ، توسعه کلون سلولهای بدخیم لنفوئیدی است . ALL ابتدا در مغز استخوان ظاهر و پس از پیشرفت خون محیطی را گرفتار می‌کند. ALL شایع‌ترین بدخیمی بین کودکان ۸-۲ ساله است. به دلیل اینکه پیش‌آگهی این بدخیمی در کودکان بهتر از بزرگسالان است بازده درمان در کودکان بهتر است. ALL در غالب موارد با ناهنجاریهای ژنتیکی همراه است که این ناهنجاری ویژه کروموزوم خاصی نمی‌شود اما از شایع‌ترین ناهنجاریهای ژنتیکی در ALL جابجایی بین کروموزومهای (۸:۱۴) ، (۸:۲) یا (۸:۲۲) گزارش شده است. از روشهای متداول درمان ALL استفاده از داروهای شیمی درمانی و رادیوتراپی است که نشان داده شده تغییرات سیتوژنتیکی پایدار و ناپایدار را در سلولهای بدخیم و سالم ایجاد می‌نماید . یکی از روشهای آنالیز سیتوژنتیکی استفاده از تراکم زودرس کروموزوم (PCC) است. در تحقیق حاضر آسیبهای کروموزومی ناشی از پروتکلهای شیمی درمانی در بیماران مبتلا به ALL با روش PCC مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

در این تحقیق ، ۵ بیمار مبتلا به ALL در مرحلهٔ Induction مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به مراحل به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. بیماران قبل از درمان ، بیماران روز ۱۴ درمان ؛ بیماران روز ۲۸ درمان ؛ ۵ نفر نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند که بیماریهایی جز لوسمی و بدخیمی داشتند.

نتایج بررسی آسیبهای ژنتیکی به روش آنالیز PCC نشان می‌دهد که فراوانی بروز آسیبهای ناپایدار کروموزومی در بیماران مبتلا به ALL بیشتر از افراد شاهد مشاهده می‌شود. ($P<0/00001$) که از نظر آماری ارتباط معنی داری است.

همچنین نمونه‌های بررسی شده بیمارانی که در مراحل مختلف تحت درمان با داروهای شیمی درمانی قرار گرفتند ، افزایش در فراوانی آسیبهای کروموزومی مشاهده می‌گردد ، این اثر که در سلولهای بدخیم ایجاد می‌شود موجب تغییرات ژنتیکی در سلولهای سالم بیمار نیز می‌شود. از این‌رو بررسی میزان آسیبهای کروموزومی لنفوسیتها پس از اعمال رژیمهای درمانی گوناگون می‌تواند مبین آسیب ژنتیکی سلولهای مغز استخوان باشد.

در مقایسه با روشهای متداول سیتوژنتیکی روش PCC دارای محاسن بسیاری است از جمله :

در تکنیک PCC بلافاصله پس از تهیه نمونه خون از افراد مورد نظر این امکان وجود دارد که پس از ۳ الی ۴ ساعت به کروموزومهای قابل دسترسی دست یافت درحالیکه در روشهای متداول حداقل به ۴۸ ساعت زمان نیاز است. از آنجائیکه در روش PCC سلولهای خون به مرحله کشت نرفته و سیکل سلولی را طی نمی‌کنند لذا تعمیر کروموزومی که در مرحلهٔ همانندسازی (S) صورت می‌گیرد اتفاق نمی‌افتد. بنابراین با توجه به عدم ترمیم آسیبها و تراکم زودرس مولکول DNA با پروتئینها فراوانی آسیبهای کروموزومی بیشتری با استفاده از PCC مشاهده می‌شود.

فهرست

عنوان صفحه

فصل اول :

۱-۱- لوسمی ۲
۱-۲- اتیولوژی ۳
۱-۱-۲- اختلالات ژنتیکی و کروموزومی ۳
۱-۲-۲- عوامل فیزیکی ، شیمیایی ، دارویی و محیطی مؤثر در لوسمی ۴
۱-۲-۲-۱- الف) عو مل فیزیکی ۴
۱-۲-۲-۲- ب) مواد شیمیایی ۴
۱-۲-۲-۳- ج) مواد د رویی ۵
۱-۲-۲-۴- د) ویروس ها ۵
۱-۳- بروز و شیوع لوسمی ۵
۱-۴- پاتوفیزیولوژی ۶
۱-۵- لوسمی لنفوسیتیک حاد ALL ۶
۱-۵-۱- طبقه‌بندی ALL براساس فنوتیپ ایمونولوژیک ۷
۱-۵-۱-۱- الف) ALL شایع ۷
۱-۵-۱-۲- ب) ALL نوع T-cell ۷
۱-۵-۱-۳- ج) ALL نوع B-cell ۷
۱-۵-۱-۴- د) ALL نوع خنثی ۸
۱-۵-۲- تظاهرات بالینی و آزمایشگاهی ۸
۱-۵-۳- درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد ۹
۱-۵-۴- پیش آگهی در ALL ۱۱
۱-۶- سلول و چرخه سلولی ۱۲
۱-۷- شیمی درمانی ۱۶
۱-۸- عود یا مقاومت سرطان به درمان ۱۷
۱-۹- تقسیم‌بندی داروهای ضدلوسمی ۱۷
۱-۹-۱- الف) مواد الکیله کننده چندعاملی ۱۸
۱-۹-۱-۱- تأثیر عوامل الکیله کننده بر روی ملکول DNA ۱۹
۱-۹-۲- ب) استروئیدها ۲۰

۱-۹-۳- ج) داروهای ضدمتابولیت ۲۰
۱-۹-۴- د) Oncolytic alkaloid ۲۱
۱-۹-۵- هـ)آنتی‌بیوتیکها ۲۱
۱-۹-۶- و) مواد ضدسرطانی متفرقه ۲۱
۱-۱۰- اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر مواد ژنتیکی سلول ۲۲
۱-۱۱- اهمیت مطالعات سیتوژنتیکی ۲۶
۱-۱۲- روشهای بررسی سیتوژنتیکی ۲۷
۱-۱۲-۱- الف) آنالیز متافاز ۲۷
۱-۱۲-۲- ب) روش آزمون میکرونوکلئی ۲۸
۱-۱۲-۳- ج) تراکم نارس کروموزوم ۲۹
۱-۱۲-۳-۱- تاریخچه ۳۰
۱-۱۲-۳-۲- تعریف PCC ۳۱
۱-۱۲-۳-۳- موروفولوژی PCC ۳۱
۱-۱۲-۳-۴- عوامل مؤثر در القاء PCC ۳۶
۱-۱۲-۳-۵- تفاوت بین کروموزومهای زودرس متراکم شده و کروموزومهای متافاز ۳۶
۱-۱۲-۳-۶- استفاده از PCC برای بررسی آسیبهای ژنتیکی در لوسمی ۳۷
۱-۱۲-۳-۷- مطالعه PCC در بیماران مبتلا به لوسمی قبل از درمان ۳۸
۱-۱۲-۳-۸- تغییرات PCC در خلال درمان القای پس‌رفت ۴۴
۱-۱۳- پیش‌بینی عود لوسمی انسان ۴۶
۱-۱۴- اهمیت کلینیکی تشخیص زودرس بیماری ۴۷
۱-۱۵- اهمیت استفاده از PCC در مطالعات سیتوژنتیک ۴۹
۱-۱۶- هدف از انجام پروژه ۵۱

فصل دوم:

۲-۱- مواد و وسایل مصرفی ۵۲
۲-۲- وسایل مورد استفاده ۵۳
۲-۳- روش تهیه محیط کشت Ham's F10 ..... ۵۳
۲-۳-۱- محلول ذخیره (Stock) ۵۳
۲-۳-۲- محیط Working ۵۴
۲-۴- تهیه محلول بافر PBS (Phasphate Buffer Solution) ۵۴
۲-۵- تهیه تریپسین ۵۵

۲-۶- تهیه کلشی‌سین ۵۵
۲-۷-کاربرد PEG ۵۵
۲-۷-۱- درجه حرارت و PH ۵۶
۲-۷-۲- غلظت PEG ۵۷
۲-۷-۳- ترکیبات دیگر محلول PEG ۵۷
۲-۷-۴- طرز تهیه PEG ۵۸
۲-۸- تهیه محلول MgCl2 (۲۰ mM) ۵۸
۲-۹-محلول نمکی رقیق KCl ۵۹
۲-۱۰-تهیه محلول ثبوت ۵۹
۲-۱۱- تهیه سلولهای تک‌لایه‌ای CHO و نگهداری آن ۵۹
۲-۱۱-۱- تریپسینیزه کردن سلولهای تک لایه‌ای CHO ۶۲
۲-۱۱-۲- تهیه سلولهای میتوزی CHO ۶۲
۲-۱۲- بیماریابی و خونگیری ۶۴
۲-۱۳-جداسازی لنفوسیتها ۶۴
۲-۱۴- امتزاج سلولها در محلول ۶۵
۲-۱۵- تهیه لام برای آنالیز PCC ۶۸
۲-۱۶- روش آماری ۶۸

فصل سوم:

۳-۱- نتایج و بررسی آسیبهای کروموزومی به روش آنالیز PCC در گروه شاهد ۷۰
۳-۲- نتایج و بررسی آسیبهای کروموزومی به روش آنالیز PCC در گروه‌بیماران قبل‌ازدرمان ... ۷۴
۳-۳- نتایج و بررسی آسیبهای کروموزومی به روش آنالیز PCC در گروه‌بیماران روز۱۴درمان .. ۷۸
۳-۴- نتایج و بررسی آسیبهای کروموزومی به روش آنالیز PCC در گروه‌بیماران‌روز ۲۸درمان... ۸۲
۳-۵- مقایسه آسیبهای مشاهده شده در PCC بیماران قبل‌ازدرمان-روز۱۴درمان-روز۲۸درمان. ۸۶
۳-۶- مقایسه‌نتایج آسیبهای‌کروموزومی‌به‌روش آنالیزPCCدرگروه بیماران با گروه شاهد..... ۸۹

فصل چهارم :

۴-۱- رابطه بین ایجاد آسیبهای کروموزومی با مراحل درمان ۹۶

فهرست منابع ۱۰۱
ضمائم ۱۱۶
خلاصه انگلیسی ۱۲۳

فصل اول:

مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱-لوسمی

لوسمی‌ها گروه چندگانه‌ای[1] ازنئوپلاسم‌ها هستندکه ازتغییرشکل بدخیم سلولهای خونساز[2] به وجود می‌آیند . سلولهای لوسمیک اساساً در مغز استخوان وبافتهای لنفاوی تکثیرپیدا می‌کنند لذا در خونسازی طبیعی و ایمنی بدن اختلال ایجاد می‌کنند[۱]. لوسمی براساس اینکه کدام نوع سلول گرفتارشده است (میلوئیدیالنفوئید) و نیز براساس سیر طبیعی[3] بیماری به اشکال حاد و مزمن طبقه‌بندی می‌شود[۱]. لوسمی‌های حاد ، اگر وادار به پس‌رفت[4] یا خاموشی نشوند ، معمولاً درعرض سه‌ماه به زندگی بیمارپایان می‌دهند. مغزاستخوان معمولاً مملو از یاخته‌های ابتدایی ردهٔمبتلا بوده و در آنها شواهد بسیار کمی حاکی از تمایز دیده‌می‌شود[۲]. لوسمی‌های مزمن سیرطبیعی طولانی دارند[۱].

لوسمی حدوداً صدوپنجاه‌سال پیش ،توسط Virchow , Bennet و Gragie به طورهمزمان شرح داده شد[۳]. نام لوسمی (خون سفید) ازدوکلمهٔLeuko به معنی سفید و Mia به معنی خون گرفته شده است. این نامگذاری توسط Virchow ۱۸۴۷ به علت مشاهده لکوسیتهای فراوان در خون یک بیمارلوسمیک که احتمالاً لوسمی مزمن بود بکار برده شد[۴]. درسال ۱۸۵۷ فرم حاد بیماری توسط Fredrich ارائه شد. بااین‌حال لوسمی حاد به عنوان یک بیماری کلینیکی جداگانه درسال ۱۸۸۹ توسط Epstein معرفی شد[۳]. درسال ۱۸۷۰ Neuman مغزاستخوان رابعنوان منشاء سلولهای خونی و پیدایش لوسمی معرفی نمود[۵]. درسال ۱۸۹۱ تکنیکهای ویژه‌ای برای رنگ‌آمیزی سلولهاتوسعه‌یافت که نتیجه این رنگ‌آمیزیها توانایی بهتر در فهم پاتوژنز لوسمی و همچنین کمک درتمایز آن از دیگر حالتهای غیربدخیمی خون بود. درسال ۱۸۹۱ Paul Ehrlich بااستفاده از روش رنگ‌آمیزی ، سلولهای خونی را لنفوبلاستیک و میلوبلاستیک فرم حادنامگذاری نمود[۵]. درسال ۱۹۲۰ رادیوتراپی به عنوان یک روش مؤثر در درمان لوسمی مزمن مورد استفاده قرارگرفت پس ازآن کورتیکواستروئیدها و داروهای ضد اسیدفولیک به

1- Heterogeneous
2- Hematopoietic
3-Natural History
4-Remission

عنوان داروهای مؤثر در شیمی‌درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد[1] مورد استفاده قرارگرفت Blerman در سال ۱۹۵۰ استفاده از انتقال خون ، اشعه و داروهای آنتی‌بیوتیک را درافزایش طول عمر بیماران لوسمیک مطرح نمود[۶].

۱-۲-اتیولوژی :

علت لوسمی دراغلب بیماران شناخته نشده است[۱]. فاکتورهای مستعدکننده بروز لوسمی شامل وضعیت ژنتیکی ، تابش‌گیری از پرتوهای یونساز ، موادشیمیایی و ویروس‌های سرطان‌زا می‌باشد[۸ و ۷].

۱-۱-۲-اختلالات ژنتیکی و کروموزومی :

تغییرات درمولکول DNA که نهایتاً به صورت اختلالات کروموزومی تظاهرمی‌کنند دو دسته هستند :

۱- تغییرات اولیه که برای سرطان زایی اساسی هستند.

۲- تغییرات ثانویه که با پیشرفت بیماری ارتباط دارند و می توانند تصادفی[2] یااختصاصی[3] باشند[۹].

اختلالات کروموزومی ممکن است تغییرات تعدادی (دیپلوئیدی کاذب[4] ، هیپودیپلوئیدی[5] و هیپردیپلوئیدی[6]) و یا ساختمانی باشد[۱۰]. پایدارترین تغییرات کروموزومی در ALL جابجایی[7] [۸:۱۴] است و یا در موارد کمتری جابجایی (۸:۲) و یا(۸:۲۲) گزارش شده است. درمجموع ۱۰۰ درصد موارد ALL که فرم L3 است یکی ازاین تغییرات مشاهده می‌شود. در یک تعداد دیگر جابجایی (۹:۲۲) وجوددارد

1- Acute lymphoblastic Leukemia(ALL)
2- Random
3- Specific
4- Pseudodiploid
5- Hyperdiploid
6- Hypodiploid
7- Translocation

که معمولاً در ۵ درصد ALL کودکان و ۲۰درصد ALL بزرگسالان دیده‌می‌شود و در یک تعداد دیگر جابجایی (۴:۱۱) و (۱:۱۹)است که کمتر دیده‌می‌شود و دربرخی از اختلالات ژنیتکی مثل سندرمهای دان[1]، بلوم[2]، کلاین‌فیلتر[3]، آنمی‌فانکونی[4] و ویسکوت آلدریچ[5] لوسمی حاد شیوع بیشتری دارد. در سندرمهای بلوم و آنمی‌فانکونی که به عنوان سندرمهای شکنندگی کروموزوم معروفند احتمال گرفتاری به لوسمی حادبیشتراست. احتمالاً بروزشکستگیهادرایجاد جابجایی‌های پایداری که به لوسمی منجر می‌شود، دخالت دارند [۱۱].

۱-۲-۲- عوامل فیزیکی، شیمیایی، دارویی و محیطی مؤثر در ایجاد لوسمی:

۱-۲-۲-۱-الف) عوامل فیزیکی:

شواهد بسیاری وجوددارد که پرتوهای یونساز ایجاد لوسمی می‌کنند درافرادی که تابش‌گیری شغلی داشته‌اند، در بیمارانی که درمان سرطان و رادیوتراپی شده‌اند و یابازماندگان بمب اتمی ژاپن، فراوانی لوسمی بیشترازجوامع دیگر گزارش شده‌است. احتمالاً بروز لوسمی به مقدار دریافتی پرتوبستگی دارد[۱].

۱-۲-۲-۲- ب) مواد شیمیایی:

بنزن و سایرهیدروکربنهای آروماتیک زمینه رابرای ابتلا به لوسمی حاد مساعدمی‌کنند. درمان با عوامل الکیله کننده و سایر داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی نیز وقوع لوسمی حاد را افزایش‌می‌دهند[۱].

1- Down's syndrom
2- Bloom's syndrom
3- KlineFelter's syndrom
4- Fanconi's Anemia
5- Wiskott-Aldrich