Archive of SID

تشخیص مولکولی کروموزوم فیلادلفیا (BCR-ABL Fusion Gene)

*دکتر محمدرضا عباس زادگان،** دکتر عباس شیردل ، دکتر جمشید سروری، دکتر آرش خامنه باقری،
بهجت غلامی، مهران غلامین، مجتبی سنکیان
*آزمایشگاه ژنتیک انسانی ، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
** گروه بیماریهای داخلی، بیمارستان قائم (عج)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

کروموزوم فیلادلفیا در ۹۵ درصد بیماران مبتلا به CML یافت می شود. این ترانسلوکاسیون در نتیجه انتقال دو طرفه ژن bcr از کروموزوم ۲۲ و abl از کروموزوم ۹ است. ژن حاصل از ترانسلوکاسیون یعنی bcr/abl در بررسی با PCR، عمدتاً به دو شکل در بیماران مبتلا به CML قابل مشاهده است: bcr/abl با اندازه های نوکلئوتیدی ۲۳۴ bp و ۳۰۴ bp . این قطعه را می توان با استفاده از PCR تکثیر و تشخیص داد. با این روش تشخیصی می توان یك سلول مبتلا را در میان یك میلیون سلول سالم ردیابی کرد. اهمیت این روش کارایی آن در یافتن Minimal Residual Disease پس از پیوند مغز استخوان است. تشخیص MRD در فاصله ۱۲-۶ ماه پس از پیوند یك فاکتور باارزش و مستقل برای پیش بینی احتمال عود در آینده است. در این مطالعه از تکنیك Multiplex nested RT-PCR برای شناسایی انواع ترانسلوکاسیونهای فیلادلفیا بر روی بیماران مبتلا به CML و بیماری که پیوند آلوژنیك مغز استخوان را دریافت کرده بود، استفاده شد. در این بیمار باند مربوط به bcr/abl ردیابی نشد و فقط بیان مربوط به β_2 مایکروگلبولین مشاهده گردید و به این وسیله MRD رد شد. همچنین تکنیك RT-PCR رقابتی جهت اندازه گیری بیان ژن bcr/abl راه اندازی گردید.

کلمات کلیدی:CML, bcr/abl , MRD, RT-PCR

مقدمه

لوسمی میلوییدی مزمن از جمله بیماریهای بدخیم درگیرکننده سلولهای مغز استخوان است. این بیماری با افزایش رده گرانولوسیتها به خصوص نوتروفیلها و بزرگی طحال و افزایش گلبولهای سفید در شمارش سلولهای خونی، مشخص می شود (۶). مشخصه این بیماری وجود یك ترانسلوکاسیون بین قطعات انتهایی بازوی بلند کروموزوم ۹و۲۲ است که منجر به ایجاد کروموزوم فیلادلفیا می شود کروموزوم فیلادلفیا یك کروموزوم ۲۲ است که تحت این ترانسلوکاسیون قرار گرفته باشد. در طی این ترانسلوکاسیون انکوژن ABL از کروموزوم ۹ به انتهای بلند کروموزوم ۲۲ منتقل می شود و به طور مشابه ژن C-SIS از کروموزوم ۲۲ به کروموزوم ۹ منتقل می گردد. قطعه ′۳ انکوژن abl به قطعه ′۵ ژن BCR متصل می شود و ایجاد هیبرید bcr/abl را می کند که بیان آن یك نسخه RNA است که درجریان ترجمه به یك پروتئین KD ۲۱۰ تبدیل می شود و این پروتئین با فعالیت تیروزین کینازی خود توانایی ایجاد لوسمی دارد (۱۰) . استفاده از پیوند مغز استخوان (اتولوگ و یا آلوژنیك) می تواند منجر به حذف سلولهای بیان کننده bcr/abl و در نتیجه تثبیت خونسازی از سلولهایی شود که از نظر سیتوژنتیکی نرمال هستند (۵، ۱۱). با استفاده ازRT-PCR می توان بیان این هیبرید ژنی یعنی bcr/abl mRNA راتشخیص داد وبه فعالیت این انکوژن در بیمار پی برد. (۹،۲).

Minimal Residual Disease به وجود سلولهای بیان کننده bcr/abl mRNA در نمونه های به دست آمده از خون یا مغز استخوان بیمارانی گفته می شود که پس از درمان به فاز رمیسیون رفته اند. PCR می تواند این سلولهای مبتلا را از

www.SID.ir

Archive of SID

طریق تکثیر نسخه bcr/abl mRNA شناسایی کند(۹،۸) . با این تکنیک می توان حتی یك سلول دارای انکوژن مزبور را در زمینه 10^5 تا 10^6 سلول سالم شناسایی کرد (۹). در مطالعه ای در مرکز سرطان شناسی Huchinson مشخص گردید که حتی یك تست مثبت RT-PCR برای انکوژن bcr/abl پس از پیوند مغز استخوان در فاصله ماه ۱۲-۶ پس از پیوند یك فاکتور مستقل برای عود بیماری در آینده است (۹). لازم به ذکر است که تا ۶ ماه نخست پس از پیوند اکثر بیماران از نظر بیان انکوژن bcr/abl مثبت بودند اما در ۲/۳ آنها نتیجه تست در ادامه پیگیری منفی می گردید که به خاطر پدیده اثر ضدلوسمی پیوند (Graft versus leukemia) است(۳). پس ارزش این تست در فاصله زمانی ماه ۱۲-۶ پس از پیوند است. اگر بیماری در این فاصله دارای یك تست PCR مثبت از نظر انکوژن bcr/abl باشد ۴۵٪ احتمال عود بیماری در آینده را دارد در حالی که میزان عود برای فردی که در این فاصله زمانی دارای تست منفی است ۳٪ است (۹). فاصله زمانی متوسط از مثبت شدن RT-PCR تا عود بیماری در حدود ۷ ماه بوده است (۹). همانطور که گفته شد درصدی از موارد مثبت و نه همه انها احتمال عود در آینده را خواهند داشت برای افتراق این موارد از موارد مثبتی که دچار عود نمی شوند از روش دیگری به نام Quantitative RT-PCR رقابتی استفاده می شودکه استفاده از آن محدودیت زمانی خاصی هم ندارد (۷). در این روش از یك رده سلولی به عنوان استاندارد داخلی استفاده می شود که از نظر انکوژن bcr/abl مثبت است و با استفاده از آن می توان تعداد سلولهای بیان کننده bcr/abl در بیمار را اندازه گرفت و با مقایسه آن با آزمون مشابهی که چند ماه بعد صورت می گیرد به افزایش یا کاهش تعداد سلولهای مزبور پی برد (۱۲،۷). در صورت افزایش تعداد سلولهای مبتلا می توان گفت که با عدم به کارگیری اقدامات درمانی اضافی بیمار دچار عود بیماری در آینده خواهد شد. کروموزوم فیلادلفیا در ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد لوسمی حاد لنفوسیتی (ALL) مشاهده می شود. در CML ،bcr/abl mRNA از اتصال C-abl اگزون۲ به bcr اگزون۲ و یا bcr اگزون ۳حاصل می شود (b3:a2 یا b2:a2) که اینها پروتئین P210 را کد می کنند. در لوسمی حاد میلوسیتی نقطه اتصال در قسمت ابتدایی تر اولین اینترون بزرگbcr صورت می گیرد ($e_1 : a_2$) . با توجه به این موضوع برای بررسی انواع ترانسلوکاسیونهای مربوط به کروموزوم فیلادلفیا از روش Multiplex nested RT-PCR استفاده می شود که در یك زمان قادر به تشخیص انواع ترانسلوکاسیونهای کروموزوم فیلادلفیا می باشد.

هدف ما در این مطالعه راه اندازی RT-PCR و Q-RT-PCR برای مطالعه بیماری CML بود. لذا ابتدا با استفاده از نمونه های بیماران دچار CML روش RT-PCR را راه اندازی نمودیم و آنگاه با استفاده از آن به بررسی MRD در یك بیمار پیوندی پرداختیم و سرانجام روش Q-RT-PCR را برای تعیین تعداد سلولهای بیان کننده انکوژن bcr/abl راه اندازی کردیم.

مواد و روشها

بیمار: بیمارانی که در این مطالعه شرکت نمودند عبارت بودند از پنج بیمار دچار لوسمی میلوییدی مزمن که نمونه های آنها در فاز مزمن بیماری تحت بررسی قرار گرفت. بیمار دیگر بیماری بود که ۶ سال قبل تحت پیوند آلوژنیك مغز استخوان قرار گرفته بود و در زمان مطالعه در رمیسیون بالینی بسود. این بیماران از سوی پزشك متخصص بیماریهای خون که درمان آنها را برعهده داشت به این مرکز معرفی گردیدند.

جداسازی لوکوسیتهای تک هسته ای: با استفاده از محلول فایکول لوکوسیتهای تك هسته ای بیماران را جدا نمودیم.

جداسازی RNA: با استفاده از TRIZOL (GIBCO BRL) اقدام به جداسازی RNA نمودیم و کیفیت RNA استخراج شده را با الکتروفورز بر روی ژل آگارز تعیین نمودیم. یك RNA سالم باید حاوی باندهای rRNA(28s)، mRNA(18s)، tRNA(5s) باشد (۱).

www.SID.ir

Archive of SID

PCR: در این مطالعه از تکنیک Multiplex nested RT-PCR استفاده گردید که در آن از سه جفت پرایمر خارجی (external) - برای بررسی نسخه های P210,P190 و β_2M (ژن بتادومیکروگلبولین) به عنوان کنترل کیفیت RNA بیمار- در مخلوط واکنش اولیه PCR و سه جفت پرایمر داخلی (internal) در مخلوط واکنشی مرحله دوم استفاده شد. در واکنش تکثیری مرحله اول ۵ میکرولیتر از RNA به ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنشی حاوی، پرایمرهای (۵۰ mM) KCl، (۱۷۰ nM) ALLC،D (۵۰۰ nM) CMLC،D β_2M(forward, reveres) به مقدار ۳۰۰ nM، ۴ واحد آنزیم Rnasin (شرکت Promega)، (۱/۵ nM) $MgCl_2$، (۲۰۰ nM) dNTP، (۰/۱٪) X100 Triton، (۱۰ nM) Tris HCl، ۴۰ واحد آنزیم MULV (شرکت Fermentase) و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase (شرکت سیناژن) و $DEPC + H_2O$ بود (جدول شماره ۱ توالی پرایمرها). بعد از ریختن مواد مذکور میکروتیوبها در دستگاه PCR (ترموسایکلر) با شرایط زیر قرار گرفتند. ۴۲°C به مدت ۳۰ دقیقه، سپس ۵ دقیقه در ۹۵ °C و سپس ۴۰ سیکل که شامل ۳۰ ثانیه در۹۴ °C، ۱ دقیقه در ۵۵ °C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C و در نهایت پس از ۴۰ سیکل یک مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ °C قرار می دهیم. ۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنشی اول به مخلوط واکنشی دوم که حاوی (۵۰۰ nM) CMLA,B، (۱۷۰ nM) ALLA,B، (۷۵ nM) β_2M(F,R)، (۵۰ nM) KCl، (۱۰ nM) Tris، (۰/۱٪) HCl، 0.1%TritonX100، (۱۵۰ nM) dNTP، (۱/۳۵nM) $MgCl_2$ و ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase و $DEPC + H_2O$ بود تا حجم کلی به ۲۵ میکرولیتر برسد. سپس در داخل ترموسیکلر با شرایط: ۵ دقیقه در ۹۵ °C و ۴۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، ۱ دقیقه در ۵۵ °C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C در پایان به مدت ۱دقیقه در ۷۲ °C قرار گرفت (۴).

الکتروفورز: محصول نهایی واکنش را بروی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید تحت الکتروفورز قرار دادیم. باندهای مورد بررسی مربوط به β_2M با وزن۳۷۰ bp و bcr/abl با وزنهای ۲۳۴ bp یا ۳۰۴ bp بود که در بین باندهای ۲۰۰ تا ۴۰۰ از Ladder قرار می گرفتند.

Quantitative RT-PCR : در این روش مقدار ثابتی از RNA بیمار با غلظتهای مختلف از RNA یک رده سلولی استاندارد که از نظر انکوژن bcr/abl مثبت بود با RT-PCR تحت آزمایش قرار گرفت. وزن مولکولی mRNA انکوژن bcr/abl مربوط به بیمار و نیز رده سلولی استاندارد از هم متفاوت بود (۷). رقتهای مختلفی از RNA استاندارد با مقدار ثابتی از RNA بیمار در میکروتیوبها تحت چرخه های حرارتی تکثیری قرار گرفتند. هر چه فراوانی RNA هدف بیشتر باشد باند حاصله از آن قوی تر است. در میکروتیوبها RNA بیمار و نیز استاندارد داخلی هر دو وجود داشتند. اگر مقدار RNA استاندارد بیشتر باشد باند قوی تری از انکوژن در مقایسه با نمونه بیمار خواهد داد و بالعکس (۷). با مقایسه باندها به نقطه ای می رسیم که شدت دو باند با هم برابر است و اینجاست که می توان به مقدار سلولهای مبتلا در نمونه بیمار با توجه به مقدار سلولهای استاندارد در آن رقت پی برد. به این صورت که شدت باندهای حاصله را با استفاده از یك نرم افزار مربوط به اندازه گیری دانسیته تعیین کردیم. شدت باند حاصل از نمونه بیمار را T_n و شدت باند حاصل از نمونه استاندارد را C_n و تعداد لوکوسیتهای رده سلولی استاندارد در هر واکنش را C_o نامیدیم. آنگاه محور مختصاتی ترسیم نمودیم که محور xهای آن را $\log C_o$ و محور عرضهای آن را (yها) $\log T_n/C_n$ تشکیل داده بود. در جایی که شدت دو باند با هم برابر می شد (یعنی $T_n/C_n = 1$) بروی نمودار یافتیم آنگاه با یافتن این محل بروی نمودار، طول آن بروی محور x را به دست آوردیم که همان $\log C_o$ است و در نتیجه C_o را محاسبه کردیم. C_o به دست آمده معرف تعداد سلولهای استانداردی است که معادل آن در نمونه بیمار وجود دارد. چون استاندارد داخلی ما

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: توالی پرایمرها

CMLA: 5' -TGG	AGC	TGC	AGA	TGC	TGA	CCA	ACT	CG-3'
CMLB: 5' -ATC	TCC	ACT	GGC	CAC	AAA	ATC	ATA	CA-3'
CMLC: 5' -GAA	GTG	TTT	CAG	AAG	CTT	CTC	C-3'	
CMLD: 5' -TGA	TTA	TAG	CCT	AAG	ACC	CGG	A-3'	
ALLA: 5'- AGA	TCT	GGC	CCA	ACG	ATG	GCG	AGG	GC-3'
ALLB: 5'- ATC	TCC	ACT	GGC	CAC	AAA	ATC	ATA	CA-3'
ALLC: 5'- ACC	ATC	GTG	GGC	GTC	CGC	AAG	A-3'	
ALLD: 5'- TGA	TTA	TAG	CCT	AAG	ACC	CGC	A-3'	
3'β_2M: 5'- CCT	CCA	TGA	TGC	TGC	TTA	CAT	GTC-3'	
5'β_2 M: 5'- ATG	TCT	CGC	TCC	GTG	GCC	TTA	GCT-3'	

RNA جدا شده از رده سلولی K562 بود عدد مزبور را در۸۲ ضرب کردیم تا تعداد لوکوسیتهای مبتلای بیمار در مقیاس مورد نظر (در مطالعه ما در یك میلیون لوکوسیت تك هسته ای) بدست آید(۷) چرا که بیان انکوژن bcr/abl در یك سلول K562 ، ۸۲ برابر یك سلول مبتلا در یك فرد دچار CML است (۷). چرخه های حرارتی و مقادیر مواد مورد استفاده دقیقاً نظیر آزمایش RT-PCR ذکر شده است تنها تفاوت در نحوه اضافه کردن RNA است (۴). میزان RNA که اضافه نمودیم، ۵ مایکرولیتر بود. اما ۲/۵ مایکرولیتر آن در همه میکروتیوبها متعلق به RNA بیمار و ۲/۵ مایکرولیتر دیگر رقتهای مختلف RNA استاندارد در RNA مربوط به فرد سالم بود. بطوری که RNA توتال در همه میکروتیوبها یکسان بود (۷) در آزمایشی که انجام دادیم RNA توتال در هر میکروتیوب، RNA جداشده از یك میلیون لوکوسیت تك هسته ای بود.

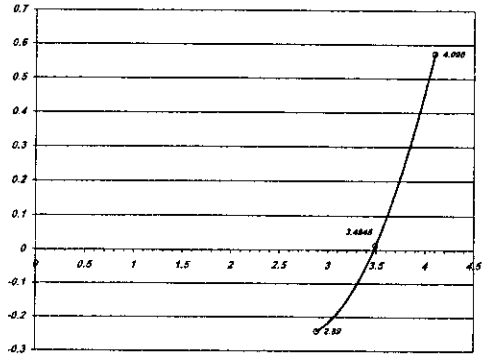
نتایج

با بررسی که بروی نمونه بیماران مبتلا به CML صورت گرفت توانستیم انکوژن bcr/abl را در این بیماران در سلولهای لوکوسیتی تك هسته ای ردیابی نماییم. در این مطالعه هر دو نوع ترانسلوکاسیون قابل مشاهده در بیماران دچار CML دیده شد که با توجه به پرایمر مورد استفاده دارای وزنهای مولکولی bp ۲۳۴و bp ۳۰۴بودند (شکلهای ۱ و ۲).

در یك نمونه سالم که فاقد انکوژن مزبور بود تنها ژن بتا مایکروگلبولین تکثیر می یافت که به صورت قطعه ای با وزن bp ۳۷۵ مشخص می شد. در آزمایشی که بروی یك بیمار با پیوند مغز استخوان انجام گرفت. انکوژن bcr/abl تکثیر نیافت و قابل مشاهده نیست و تنها ژن بتا دو میکروگلبولین مشاهده می شود که این بیان کننده عدم وجود MRD در بیمار است (شکل ۳).

در نتایج PCR کمیتی دانسیته باندهای مربوط به k562 و باندهای مربوط به بیمار اندازه گیری شد (با استفاده از Kodak ID Image Analysis Software Version 3.5).

با توجه به نمودار ترسیم شده تعداد سلولهای لوسمی بیمار ۸۰ هزار سلول مبتلا در یك میلیون لوکوسیت تك هسته ای بود (شکل۴ و نمودار ۱).

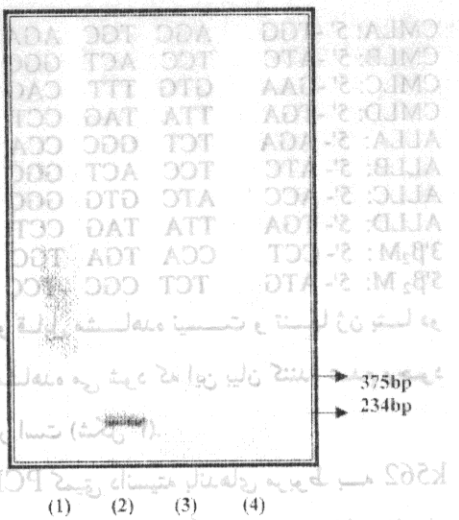


نمودار ۱: محور xها $\log C_0$ است که C_0 غلظت سلولهای k562 است و محور yها $\log T_n/C_n$ است و در آن T_n دانسیته کل ناحیه باند داده شده مربوط به k562 و C_n دانسیته کل ناحیه باند داده شده مربوط به بیمار است. جایی که این نمودار محور x را قطع می کند(y=0) غلظتی از k562 است که بیان انکوژن در آن معادل بیان سلولهای لوسمی در بیمار است.

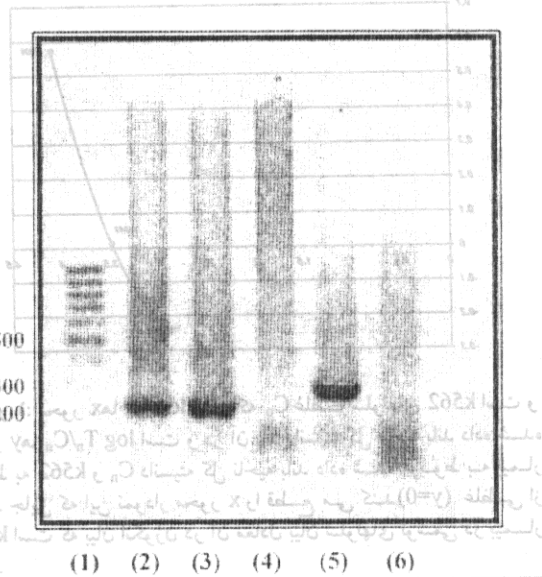
	Lane 3	Lane 4	Lane 5
دانسیته K562	۷۹۴۳۹	۶۴۵۶۴	۵۱۰۲۶
دانسیتهPatient	۲۱۲۳۰	۶۱۸۲۸	۸۹۰۵۸
Log T_n/C_n=	۰/۵۷۳	۰/۰۲	-۰/۲۴۱۸
Log C_0=	۴/۰۹۶	۳/۴۹۴۸	۲/۸۹

www.SID.ir

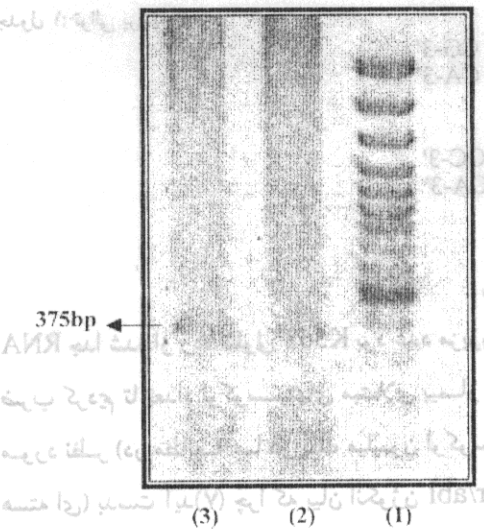
Archive of SID



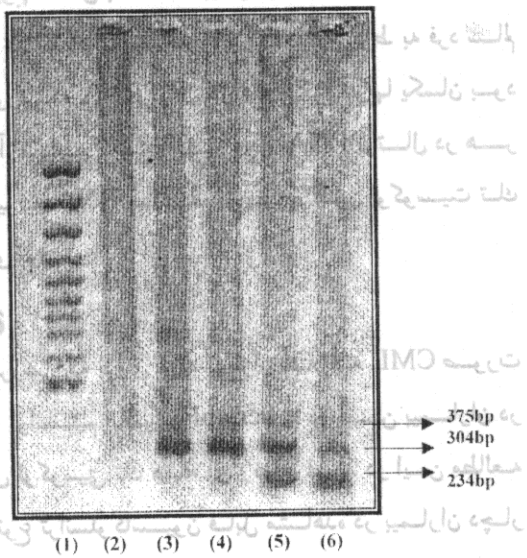
شکل ۱: متعلق به بیماری با CML در فاز مزمن است. نمونه شماره ۱ استاندارد وزن مولکولی (Ladder)، نمونه شماره دوم باندی به وزن مولکولی bp ۲۳٤ دیده می شود که مربوط به انکوژن bcr/abl است. در خط سوم نمونه فرد سالم قرار دارد و در آن باند مربوط به انکوژن bc/abl وجود ندارد و تنها باند مربوط به B_2M (۳۷۵ bp) دیده می شود (ژن طبیعی)، نمونه شماره ٤ کنترل منفی.



شکل ۲: نمونه شماره ۱ استاندارد وزن مولکولی DNA. نمونه شماره ۲ و ۳ بیمار CML که از نظر انکوژن (۲۳٤bp) bcr/abl مثبت می باشد. نمونه شماره ٤ بیمار CML که از نظر انکوژن bcr/abl منفی می باشد. نمونه شماره ٥ بیمار CML که دارای انکوژن (۳۰٤ bp) bcr/abl می باشد. نمونه شماره ٦ کنترل منفی واکنش RT-PCR می باشد.



شکل ۳: در لاین دوم نمونه مربوط به یک فرد سالم است و در آن باند مربوط به ژن B_2 مایکروگلبولین قرار دارد. لاین سوم متعلق به نمونه فردی که مبتلا به CML بوده و ٦ سال قبل تحت پیوند آلوژنیک مغز استخوان قرار گرفته است در این لاین باند قابل مشاهده مربوط به ژن B_2 مایکروگلبولین است و هیچ باندی مربوط به انکوژن تکثیر نیافته است که بیانگر عدم MRD در بیمار مذبور است.



شکل ٤: باندهای bp ۳۰٤ مربوط به رده سلولی k562 و bp ۲۳٤ مربوط به بیمار می باشد. در لاینهای ٤،٥،٦ رقتهای ۱/۱۲ و ۱/٤۸ و ۱/۱۹۲ از سلول K562 قرار دارد که RNA جداشده از ۱۲٥۰۰ و ۳۱۲٥ و ۷۸۱ سلول k562 است و همانطور که مشاهده می شود هر چه نمونه رقیقتر شود باندهای مربوط به آن رقیقتر و باندهای مربوط به بیمار قوی تر می گردد. جایی که دانسیته این دو باند با هم برابر می شود بیان mRNA در این غلظت در دو نمونه یکسان می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

این روش تشخیصی که با استفاده از خون محیطی بیمار صورت می گیرد به روشهای تهاجمی نظیر بیوپسی مغز استخوان نیاز ندارد و تنها چند ساعت به طول می انجامد و این در مقایسه با روشهای سیتوژنتیك که حداقل دو هفته به طول می انجامد و حساسیت بسیار پایین تری در مقایسه با PCR دارد، روش برتری است و هزینه آن نیز در مقایسه با کاریوتایپینگ ارزان تر است. در مطالعه فوق در بیمارانی که در فاز مزمن و تحت درمان با روشهای مرسوم شیمی درمانی بوده اند انکوژن bcr/abl قابل مشاهده بود که این موید همان نتایجی است که در مطالعات دیگر هم تایید شده است. مساله ای که وجود دارد عدم مشاهده باند مربوط به ژن بتا دو میکروگلبولین در نمونه بیماران مبتلا به CML در فاز مزمن است (تصویر ۱ و ۲) که این به دلیل اساس رقابت در واکنش Multiplex است که در آن واکنش به سمت تکثیر قطعه ای پیش می رود که فراوانتر است و چون RNA مربوط به bcr/abl فراوانتر از β_2 mRNA است پس تکثیر انکوژن bcr/abl بسیار بیشتر بوده و بروی ژل قابل مشاهده است. در نمونه بیماری که ۶ سال قبل پیوند شده بود انکوژن bcr/abl مشاهده نگردید و تنها قطعه مربوط به ژن بتا دومیکروگلبولین تکثیر یافت که این موید عدم وجود MRD در بیمار بوده و بسیار ارزشمند است چرا که یك تست سایتوژنتیك منفی پس از پیوند در یك بیمار قادر به رد MRD نیست و این به دلیل حساسیت پایین تر این تست است. در PCR رقابتی انجام شده تعداد سلولهای مبتلای بیمار در فاز مزمن اندازه گیری شد. با بررسی مجدد این تعداد سلول در آینده می توان به سیر بیماری پی برد بخصوص اگر این تست برای بیمارانی به کار رود که پیوند آلوژنیك مغز استخوان را تحمل کرده اند و تست PCR آنها از نظر انکوژن bcr/abl مثبت باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بر اساس طرح پژوهشی تایید شده توسط شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام پذیرفت. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی و اعضاء محترم شورای پژوهشی دانشگاه صمیمانه تشکر می نمائیم. همچنین از سرکار خانم امیری که در تایپ و تنظیم مقاله ما را یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. Chomcynski P. and Sacchi, 1987, Anal. Biochem., 162,156.
2. Gehly G. B., Bryant E. M., Lee A. M., Kidd P.G., Thomas E. D., 1989, Chimeric BCR/ABL messenger RNA as a marker for minimal residual disease in patient with bone marrow transplantation, Blood, 78:458.
3. Hochhous A., Weiss A., PlaRosce, Emg M., Mc Muller, Sall S., Reiter A., Kuhn C., Berger U., 2000, Ncp: Detection and Quantification of residual disease in chronic Myelid leukemia, Leukemia, 14:1998-1005
4. Lee A., Kink J., Edmands S. and Radich J., 1995, Multiplex PCR of bcr/abl Fusion Transcripts in philadelphia positive acute lymphoblastic Leukemia, PCR Methods and Applications 283-287.
5. Meir Wetzler. Bloomfield C. D., Harison's Principles of Internal Medicine, Vol 1, 14th Ed., 1998, 691-694
6. Micheal J., Keuting G., Kokko M., Okner S., The chronic leukemia Cecil textbook of Medicine, Vol- 1, 20th Ed., 1990, 825-830
7. Moravoca J., lukasova M., Stary J., Haskovee, 1998, Simple competitive two-step bone marrow transplantation, Leukemia, 12: 1303 - 1312.
8. Morgan G. J., Janssen J. W. G., Guo A. P., Wiedemann L. M., Goldman J. M., Bartram C. R., *et al., 1989,* Polymerase chain reaction for detection of residual leukemia, Lancet, 1: 928.
9. Radich J. P., Gehly, Gooley T., Bryant E.,.Clift R.A Colins S. *et al., 1995,* PCR detection of BCR-ABL fusion transcript after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia, result and implication in 346 patients, Blood, 85:2632-2683.
10. Shinton N. K., CRC Desk Reference for Hematology, 1998.
11. Thomas E. D., Clift A., Fefer A., Appelbwn F. R., Beatly P., Bensinger W. I., *et al., 1986,* Bone Marrow Transplantation for the treatment of CML, Ann. Intern. Med., 104:155.
12. Thompson J. D., Brodsky I., Yunis J. J., 1992, Molecular quantification of residual disease in CML after bone marrow transplantation, Blood, 79: 1629.

www.SID.ir