ارتباط موتاسیون ژن الاستاز II با علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی در نوتروپنی دوره‌ای و نوتروپنی مادرزادی شدید

مرحوم ابوالحسن فرهودی[۱]، قاسم آهنگری[۲]، زهرا چاوش‌زاده*[۳]، اصغر رامیار[۴]، مسعود موحدی[۱]، محمد قره‌گزلو[۱]، مرضیه حیدرزاده[۱]، محمدرضا فضل‌الهی[۱]، محمد حسن بمانیان[۱]، محبوبه منصوری[۳]، فریبرز زندیه[۱]

۱- مرکز تحقیقات آسم و آلرژی، مرکز طبی‌کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- گروه پزشکی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی
۳- گروه آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- گروه هماتولوژی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول:: تهران، بیمارستان مفید، بخش آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تلفن: ۴۴۰۹۰۳۱۸
email: Zahra_chavoshzadeh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: همراهی موتاسیون ژن کدکننده الاستاز نوتروفیل (ELA2) با اختلالات نوتروپنی مزمن شدید نشان داده شده است و تنوع زیادی در موتاسیون این ژن گزارش شده است. این مطالعه به بررسی آنالیز ژن ELA2، تظاهرات بالینی و آزمایشگاهی بیماران می‌پردازد. ***روش بررسی:*** طی سالهای ۸۴-۱۳۸۲، ۲۱ بیمار با اختلال Cyclic Neutropenia (CN) یا Severe Congenital Neutropenia (SCN) انتخاب و آنالیز ژن ELA2 با دو روش RT-PCR و Automated Capillary Sequencing انجام شد. ***یافته‌ها:*** سندرم کاستمن و نوتروپنی دوره‌ای به‌ترتیب برای سه و ۱۸ بیمار مطرح شد. یک یا دو موتاسیون در ۱۸ مورد (۸۵/۷٪) از کل بیماران مشاهده شد. همه بیماران SCN موتاسیون در ژن ELA2 داشتند، که سه بیمار (۱۶/۷٪) مبتلا به نوتروپنی CN فاقد موتاسیون این ژن بودند. فراوان‌ترین موتاسیون به‌ترتیب در اگزونهای چهار و دو بود. هفت بیمار در دو اگزون ژن موتاسیون داشتند. ۱۶ مورد متفاوت از ۱۸ موتاسیون شناسایی شد. متوسط سن بیماران ۱۷/۶±۱۳/۴ ماه بود. ۶۱/۹٪ از بیماران با هم نسبت فامیلی داشتند. در ۲۱ بیمار، متوسط میزان مطلق نوتروفیل خون محیطی (ANC) ۴۹۱/۴±۸۳۰/۵ در هر mm^3 بود. به‌طور متوسط هر بیمار ۱/۶±۲/۲ بار بستری شده است. بیماران CN به‌طور معنی‌داری میزان مطلق نوتروفیل بیشتری نسبت به گروه SCN داشتند، میزان ANC بین بیماران با و بدون موتاسیون اختلاف معنی‌داری نداشت. همه بیماران گروه SCN دارای دو یا بیش از دو عارضه عفونی بودند. عوارض عفونی بین دو گروه با و بدون موتاسیون و همچنین CN یا SCN اختلاف معنی‌دار نداشت. ***نتیجه‌گیری:*** موتاسیون ژن ELA2 نقش قابل توجه در پاتوژنز اختلالات CN و SCN دارد. اختلال CN بیش از آنچه قبلا تصور می‌شد تنوع ژنوتیپی دارد. ارتباط معنی‌داری بین وجود موتاسیون و شیوع تظاهرات بالینی بیماران نوتروپنی CN و یا SCN وجود ندارد.

کلمات کلیدی: نوتروپنی مزمن شدید، نوتروپنی دوره‌ای، موتاسیون الاستاز II.

مقدمه

نوتروپنی مزمن شدید گروهی ناهمگون از بیماری‌های نادر هماتولوژیک را در بر می‌گیرد که با کاهش نوتروفیل در گردش همراه با تب‌های راجعه، میالژی، زخم‌های دهانی، ژنژیویت، و عفونت‌های شدید مشخص می‌شود. از بین این دسته بیماری‌ها، نوتروپنی دوره‌ای Cyclic Neutropenia (CN) و نوتروپنی مادرزادی شدید Severe Congenital Neutropenia (SCN) یا سندرم کاستمن (Kostman syndrome) اختلالات وراثتی اتوزومال هستند.[۱-۳] هرچند شناسایی فاکتورهای سلولی و مولکولی که در گرانولوپویزیس دخیل هستند، ارتقا یافته، مکانیسم‌های پاتوژنتیک این اختلالات نامشخص است. نوتروپنی دوره‌ای به‌عنوان یک اختلال مجزا در سال ۱۹۱۰ با نوتروپنی، تب و زخم‌های دهانی راجعه با دوره‌های منظم توصیف شد. CN با سیکل ۲۱ روزه نوتروپنی شدید ($/L ۱۰^۹ \times ۰/۵ >$) و پیک شمارش ۲۰۰۰ /μL نوتروفیل در گردش مشخص می‌شود. از آنجایی‌که تعداد مونوسیت‌ها، رتیکولوسیت‌ها، پلاکت و لنفوسیت‌ها به‌طور دوره‌ای همزمان با نوتروفیل‌های خون نوسان دارد، این بیماری را گاهی هماتوپویزیس دوره‌ای یا سیکلی می‌نامند. تشخیص نوتروپنی دوره‌ای بر اساس اندازه‌گیری‌های متوالی برای شمارش

مطلق نوتروفیل در یک دوره چند هفته‌ای است.[۳و۴] SCN به‌طور تیپیک با شمارش نوتروفیل شدیدا" پایین خون محیطی (L/ $۱۰^۹$ × ۰/۵>)، توقف بلوغ پیش‌سازهای میلوئید در مرحله پره میلوسیت- میلوئید و عفونت‌های راجعه مشخص می‌شود. اشکال کلاسیک SCN و CN به‌آسانی قابل افتراق هستند ولی در برخی موارد یک‌سری از فنوتیپ‌ها تشخیص بالینی را دشوار می‌سازند.[۲] شدت نوتروپنی در SCN می‌تواند متغیر باشد و بیماران ممکن است سوابق بالینی و ویژگی‌های هماتولوژیک متفاوت داشته باشند، به‌طوری‌که نوسان دوره‌ای تعداد نوتروفیل‌ها نیز در این اختلال گزارش شده است.[۵] دسترسی به فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت (G-CSF) نوترکیب تاثیر بسیار چشمگیری بر روند درمان و پیش‌آگهی نوتروپنی دوره‌ای و مادرزادی داشته است. هرچند G-CSF باعث افزایش نوتروفیل‌ها، کاهش دوره‌های نوتروپنی و بهبود تظاهرات بالینی همراه می‌شود، عوارضی همچون ترومبوسیتوپنی، واسکولیت، استئوپروزیس و ریسک پیدایش لوسمی محتمل است.[۶و۷] بنابراین مطالعاتی برای شناسایی مکانیسم این اختلالات صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۹ موتاسیون ژن الاستاز II (ELA2) در بیماران مبتلا به نوتروپنی دوره‌ای به‌عنوان فرضیه‌ای برای پاتوژنز این اختلال مطرح شد.[۸] در مطالعه‌ای دیگری در سال ۲۰۰۰، ۱۸ موتاسیون متفاوت در ژن ELA2 بیماران مبتلا به SCN و CN نشان داده شد.[۳] در یک مطالعه گسترده‌تر بر روی ۸۱ مورد SCN و CN علاوه بر ۳۰ موتاسیون قبلی ژن ELA2، ۱۷ مورد جدید گزارش شد.[۲] در ایران بیماران مبتلا به نوتروپنی که به بخش‌های مختلف مراجعه می‌کنند، در اکثر مواقع تشخیص دقیقی برای آنها مطرح نمی‌شود، هزینه‌های درمان با G-CSF بالاست و پی‌گیری مناسب بیماران انجام نمی‌شود، از این رو مطالعه حاضر به بررسی آنالیز موتاسیون ژن ELA2 در موارد نوتروپنی مادرزادی شدید و دوره‌ای بر اساس معیارهای SCNIR می‌پردازد.[۹] همچنین تظاهرات بالینی و هماتولوژیک بیماران توصیف شده است.

روش بررسی

۲۱ بیمار مبتلا به نوتروپنی مزمن شدید، (CN یا SCN) در بخش ایمونولوژی مرکز طبی کودکان بر اساس معیارهای SCNIR انتخاب شدند. نمونه‌های خون بیماران برای آنالیز ژن ELA2 به مرکز مهندسی ژنتیک ارسال گردید. این بررسی از اسفند ۱۳۸۲ تا مرداد ۱۳۸۴ صورت گرفت. از همه بیماران و یا والدین آنها رضایت‌نامه کتبی بر اساس بیانیه هلسینکی و کمیته اخلاق تحقیقات پزشکی دانشگاه تهران گرفته شد. همه هزینه‌های این مطالعه بر عهده مجریان طرح بوده است و بیماران هیچگونه بار اضافی مادی و معنوی متحمل نشدند. کرایتریای ورود یا تشخیص نوتروپنی مادرزادی شدید بر اساس: وجود حداقل سه شمارش نوتروفیل مطلق کمتر از ۵۰۰/μL در فاصله حداقل سه ماه پس از تولد، یک طرح مشخص از تب‌های مکرر، ژنژیویت مزمن و عفونت در فواصل غیرمنظم و آسپیره مغز استخوان با توقف بلوغ در مرحله پرومیلوسیت یا میلوسیت بوده است. کرایتریای تشخیص نوتروپنی دوره‌ای علاوه بر موارد مذکور، شامل مشاهده شمارش سریال برای چهار تا شش هفته همراه با نوسانات به فواصل تقریبی ۲۱ روزه در نظر گرفته شد. کرایتریای خروج از مطالعه شامل: علائمی از اختلال در سلول‌های لنفوسیتی T یا B، شواهدی دال بر نوتروپنی اتوایمیون، نارسایی پانکراس و مطرح شدن سندرم Shwachman-Diamond، و سابقه تشنج، هیپوگلیسمی و بیماری ذخیره‌ای گلیکوژن نوع Ib بود. بیماران دارای این کرایتریا توسط یک هماتولوژیست مشاوره شدند و لام اسمیر آسپیراسیون مغز استخوان مجددا" مورد بررسی قرار گرفت. سپس در صورت تائید تشخیص یک نمونه پنج میلی‌لیتر خون محیطی از هر بیمار تهیه و در لوله حاوی EDTA به پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ارسال شد. متغیرهای مورد بررسی شامل سابقه ازدواج فامیلی، ترسیم شجره‌نامه، سن زمان تشخیص نوتروپنی، تظاهرات عفونی و غیر عفونی، سابقه بستری، و داده‌های هماتولوژیک، آسپیره مغز استخوان و نتیجه آنالیز ژن ELA2 در چک لیست مربوط به هر بیمار ثبت گردید. وجود موتاسیون در ژن ELA2 با دو روش RT-PCR در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برای ارزیابی ژن‌های نسخه‌برداری شده و Automated capillary sequencing در انگستان برای وجود و محل موتاسیون ژن آنالیز شده است. مراحل روش RT-PCR عبارت‌است از: جدا کردن لنفوسیت، به‌صورتی‌که به خون حاوی EDTA، polymorphoprep (PMP) (نروژ Axis-shield poc As, oslo) اضافه و سانتریفوژ شد و سپس لایه ابری شکل لنفوسیت برداشته شد. استخراج RNA با کیت Roche آلمان، به‌صورتی‌که لنفوسیت‌های جدا شده را با PBS و lysis buffer مخلوط نموده و سانتریفوژ نمودیم. سپس ته‌نشین حاصله از فیلتر با آنزیم DNase1 آلمان (Roche) و بافر

آن در حرارت ^{oc} ۲۵- ۱۵ مخلوط شد. دو مرحله بافر wash اضافه و سانتریفوژ گردید. ته‌نشین حاصله از فیلتر با بافر elution سانتریفوژ و سپس فیلتر شد. فاز پایین فیلتر به‌عنوان محلول حاوی RNA جدا شد. RNA روی ژل ۱٪ به‌وسیله کیت Roche مشاهده گردید و با افزودن Primer oligo dt و بافر reaction، ریبونوکلئاز و M-Mulv reverse transcriptase و سرد و گرم کردن متوالی cDNA (آلمان فرمنتاز) تهیه گردید. متعاقباً با ماشین PCR (Techncn آمریکا) بر روی cDNA PCR به‌عمل آمد. طراحی پرایمر برای ژن ELA2 به‌گونه‌ای بود که هر اگزون آن جداگانه تکثیر شود. سپس هر قطعه تکثیر یافته برای بررسی جهش‌ها با روش ACS (بیوسیستم، آمریکا) به خارج از کشور ارسال گردید. داده های بالینی، هماتولوژیک و آنالیز ژن ELA2 جمع‌آوری شده از پرسش نامه‌ها در فایل اطلاعات نرم افزار آماری SPSS ویراست ۱۱/۵ ثبت شد. داده‌ها با استفاده از جداول و نمودار توصیف شدند. مقادیر داده‌های کمّی با میانگین ± انحراف معیار (SD) و داده‌های کیفی با میزان فراوانی (شیوع) به‌صورت نسبی و مطلق گزارش گردید. متغیرهای کیفی با تست χ^2 و Fisher's exact و داده‌های کمّی با student t-test مقایسه شدند. $p<0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

توالی اگزون ژن الاستاز ۲ (ELA2 exon) در ۲۱ بیمار غیر منتسب مبتلا به نوتروپنی مزمن شدید، با تقسیم‌بندی کلاسیک از انواع نوتروپنی دوره‌ای (CN) و نوتروپنی شدید مادرزادی یا سندرم کاستمن (SCN) آنالیز شد. بر اساس کرایتریا برای سه بیمار (دو مونث و یک مذکر) تشخیص سندرم کاستمن و برای ۱۸ بیمار نوتروپنی دوره‌ای گذاشته شد. بر خلاف SCN، فراوانی جنس مذکر مبتلا به نوتروپنی در گروه CN بیشتر از جنس مونث بود (ده در برابر هشت نفر). میانگین سنی بیماران (دامنه) ۹/۳±۸/۳ (۹ ماه تا ۲۸ سال) بود.

جدول-۱: خصوصیات دموگرافیک، بالینی و آنالیز ژن ELA2 بیماران مبتلا به نوتروپنی شدید مزمن

مورد	جنس	سن (سال)	نوع توتروپنی	ANC/mm^3	سن تظاهر بیماری (ماه)	محل موتاسیون	تغییر نوکلئوتید
۱	مونث	۵	SCN	۳۵۰	۲۴	Exon1 Exon4	GT splice AGCTGN
۲	مذکر	۱	SCN	۴۵۰	۱	Exon2	delG,addA
۳	مونث	۳	SCN	۱۵۰	۱۲	Exon2 Exon4	delG,addG,addT G-A
۴	مذکر	۹	CN	۱۲۰۰	۱	Exon5	CG
۵	مذکر	۶	CN	۷۰۰	۴	Exon4 Exon5	addG addG
۶	مذکر	۱	CN	۱۵۰	۲۴	Exon3 Exon4	
۷	مذکر	۱۲	CN	۶۸۰	۴	Exon3	delT
۸	مونث	۷	CN	۸۲۰	۱۲	Exon2	delC
۹	مونث	۲	CN	۲۰۰۰	۱۵	Exon4	addT
۱۰	مونث	۱۳	CN	۱۲۰۰	۸۴	Exon2 Exon3	addA C-G
۱۱	مونث	۲۲	CN	۱۸۰	۱۸	Exon2	
۱۲	مذکر	۲	CN	۹۰۰	۴	Exon4	addT
۱۳	مذکر	۲۵	CN	۷۵۰	۱۲	No mutation	
۱۴	مذکر	۴	CN	۱۲۰۰	۲	Exon2 Exon4	G-A delG,addC,addG
۱۵	مونث	۵/۵	CN	۱۸۰	۱۸	Exon5	
۱۶	مذکر	۲۱	CN	۱۳۰۰	۱۲	Exon1 Exon4	G-A addT
۱۷	مذکر	۱۳	CN	۹۰۰	۶	Exon2	
۱۸	مونث	۶	CN	۱۰۰۰	۷	No mutation	
۱۹	مذکر	۹	CN	۱۲۰۰	۶	No mutation	
۲۰	مونث	۰/۷۵	CN	۱۳۰۰	۴	Exon5	
۲۱	مونث	۲۸	CN	۰	۱۲	Exon5	

CN = Cyclic Neutropenia SCN = Severe Congenital Neutropenia ANC = Absolute Neutrophil Count

جدول-۲: فراوانی عفونت‌ها و سایر عوارض غیر عفونی بر حسب وجود موتاسیون ژن ELA2

شیوع عفونت‌ها (٪)	دارای موتاسیون	بدون موتاسیون	P value*
همه عفونت‌ها	(٪۹۴/۴)۱۷	(٪۱۰۰)۳	NS
آبسه ریه	(٪۵/۶)۱	۰	NS
عفونت پوست	(٪۵۵/۶)۱۰	(٪۱۰۰)۳	NS
زخم های دهانی	(٪۷۷/۸)۱۴	(٪۶۶/۷)۲	NS
پنومونی	(٪۵۵/۶)۱۰	(٪۶۶/۷)۲	NS
اسهال	(٪۳۳/۳)۶	(٪۳۳/۳)۱	NS
ژنژیویت	(٪۵۵/۶)۱۰	(٪۳۳/۳)۱	NS
آبسه/ زخم پرینه	(٪۱۶/۷)۳	۰	NS
عفونت دستگاه ادراری	(٪۵/۶)۱	۰	NS
آبسه گردن/ حلق	(٪۲۷/۸)۵	(٪۳۳/۳)۱	NS
اوتیت	(٪۲۲/۲)۴	(٪۱۰۰)۳	*۰/۰۲۶
اومفالیت	(٪۵/۶)۱	۰	NS
سینوزیت	(٪۱۱/۱)۲	(٪۳۳/۳)۱	NS
مننژیت	(٪۵/۶)۱	۰	NS
استوماتیت	(٪۱۱/۱)۲	(٪۳۳/۳)۱	NS
سلولیت اوربیت	(٪۵/۶)۱	۰	NS
تب راجعه	(٪۱۱/۱)۲	۰	NS
FTT	(٪۵/۶)۱	۰	NS
آبسه کبد	(٪۵/۶)۱	۰	NS
آرتریت	(٪۵/۶)۱	۰	NS

* Fisher's Exact test

جدول-۳: فراوانی محل موتاسیون ژن ELA2 بر حسب ژنوتیپ ELA2 (SCN یا CN)

محل موتاسیون ژن الاستاز ۲ (ELA2)	تقسیم‌بندی کلاسیک نوتروپنی		کل
	SCN	CN	
بدون موتاسیون	۰	۳	۳
اگزون ۲	۱	۳	۴
اگزون ۳	۰	۱	۱
اگزون ۴	۰	۲	۲
اگزون ۵	۰	۴	۴
اگزون ۱ / اگزون ۴	۱	۱	۲
اگزون ۲ / اگزون ۳	۰	۱	۱
اگزون ۲ / اگزون ۴	۱	۱	۲
اگزون ۳ / اگزون ۴	۰	۱	۱
اگزون ۴ / اگزون ۵	۰	۱	۱
کل	۳	۱۸	۲۱

SCN = Severe Congenital Neutropenia CN = Cyclic Neutropenia

متوسط سن کل بیماران در زمان مراجعه ۱۳/۴±۱۷/۶ ماه (یک ماه تا هفت سال)، در گروه SCN ۱۲/۳±۱۱/۵ ماه (یک ماه تا ۲۴ ماه) و در گروه CN ۱۳/۶±۱۸/۷ ماه (یک ماه تا هفت سال) بود (p>۰/۰۵). در کل والدین ۶۱/۹٪ از بیماران با هم نسبت فامیلی داشتند و این میزان بین دو گروه CN و SCN مشابه بود (به‌ترتیب ۶۱/۱٪ در برابر ۶۶/۷٪، p>۰/۰۵). در ۲۱ بیمار، متوسط میزان مطلق نوتروفیل خون محیطی (ANC) ۸۳۰/۵±۴۹۱/۴ (۱۵۰ تا ۲۰۰۰) در هر mm^3 بود. در آنالیز اسمیر مغز استخوان، هر سه بیمار گروه SCN در مرحله پرومیلوسیت دچار توقف بلوغ بودند. بیماران گروه CN به‌ترتیب در هفت مورد (۳۸/۸٪) و دو مورد (۱۱/۱٪) دچار توقف بلوغ در مرحله میلوسیت و پرومیلوسیت بودند. همچنین آنالیز اسمیر یک بیمار طبیعی و یک بیمار دیگر هیپوپلاستیک گزارش شد. برای چهار بیمار آنالیز مغز استخوان انجام نشد و اطلاعات مربوط به سه بیمار دیگر در دسترس نبود. خصوصیات بالینی و دموگرافیک بیماران در جدول ۱ آورده شده است. به‌طور متوسط هر بیمار ۲/۲±۱/۶ بار (بدون سابقه بستری تا شش بار) بستری شده است. ۱۴ بیمار(۶۶/۷٪) بدون سابقه بستری یا کمتر از سه بار داشتند. تعداد دفعات بستری در گروه CN کمتر از SCN بود ولی اختلاف معنی‌داری نداشت (به‌ترتیب ۲/۱±۱/۶ در برابر ۳±۱ بار، p>۰/۰۵). بیماران دارای موتاسیون و بدون موتاسیون به‌ترتیب به‌طور متوسط ۲/۴±۱/۶ و ۱/۳±۱/۲ بار سابقه بستری قبلی داشتند (p>۰/۰۵). بیماران با تشخیص CN به‌طور معنی‌داری میزان مطلق نوتروفیل در گردش بیشتری نسبت به گروه SCN داشتند (به‌ترتیب ۹۲۱/۲±۴۷۴/۹ در برابر ۳۱۶/۷±۱۵۲/۷ در هر mm^3، p<۰/۰۰۳). در حالی‌که میزان ANC بین بیماران با و بدون موتاسیون ژن ELA2 اختلاف معنی‌داری نداشت (به‌ترتیب ۸۰۳/۵±۵۲۴/۶ در برابر ۹۸۳/۳±۲۲۵/۵ در هر mm^3، p>۰/۰۵). همه بیماران گروه SCN دارای دو یا بیش از دو عارضه عفونی بودند. یکی از بیماران گروه CN سابقه ابتلا به عارضه عفونی و بستری در بیمارستان نداشت، هرچند دچار زخم‌های مکرر دهانی و ژنژیویت و موتاسیون ژن ELA2 در اگزون‌های چهار و پنج بود. عارضه عفونی اوتیت مدیا در همه بیماران بدون موتاسیون ژن ELA2 و در ۲۲/۲٪ بیماران دارای موتاسیون مشاهده شد (p=۰/۰۲۶، Fisher's Exact test). شیوع انواع عوارض عفونی و غیرعفونی در بیماران با و بدون موتاسیون ژن ELA2 در جدول ۲ آورده شده است. یک یا دو موتاسیون در ۱۸ مورد (۸۵/۷٪) از کل بیماران مشاهده شد. همه بیماران SCN دارای موتاسیون در ژن ELA2 بودند. درحالی‌که سه بیمار (۱۶/۷٪) مبتلا به نوتروپنی CN فاقد موتاسیون این ژن بودند. فراوان‌ترین موتاسیون به‌ترتیب در اگزون‌های چهار و دو (هشت مورد و هفت مورد) به دست آمد. هفت بیمار (۰/۳۳٪) در دو اگزون ژن موتاسیون داشتند. ۱۶ مورد متفاوت از ۱۸ موتاسیون شناسایی شد. (جدول ۳)

بحث

در مطالعه حاضر ویژگی‌های بالینی، هماتولوژیک و آنالیز ژن ELA2 در ۲۱ بیمار غیر منتسب مبتلا به نوتروپنی مزمن شدید (CN یا SCN) توصیف شده است. وجود یک یا دو موتاسیون در ۸۵/۷٪ از کل بیماران نوتروپنی مشاهده شد. به‌طوری‌که همه بیماران با تشخیص SCN و۸۳/۳٪ بیماران مبتلا به نوتروپنی CN دارای موتاسیون در ژن ELA2 بودند. فراوان‌ترین موتاسیون به‌ترتیب در اگزون‌های چهار و دو (هشت و هفت مورد) به‌دست آمد. ۳۳٪ از بیماران در دو اگزون ژن موتاسیون داشتند. ۱۶ مورد (۸۸/۹٪) متفاوت از ۱۸ موتاسیون شناسایی شد. موارد SCN در اگزون‌های ۱، ۲ و ۴ موتاسیون داشتند درحالی‌که در بیماران با تشخیص CN در همه اگزون‌ها یک تا پنج موتاسیون یافت شد. همراهی و یا نقش اتیولوژیک موتاسیون ژن ELA2 در بیماران مبتلا به نوتروپنی مزمن شدید از اواخر دهه ۱۹۹۰ مطرح شده است. در نخستین بررسی از ۱۳ خانواده‌ای که حداقل یکی از اعضای آنها به‌طور مشخص تظاهرات بالینی نوتروپنی و دوره ۲۱ روزه نوسان نوتروفیل‌های خون را داشت و یک مورد اسپورادیک، با استفاده از آنالیز نمونه DNA به روش PCR تقویت شده، نقص ژنتیکی در همه موارد اختلال CN بر روی کروموزوم ۱۹p۱۳/۳ مشاهده شد. این لوکوس حاوی ژن‌های مربوط به چندین پروتئاز نوتروفیلی از جمله azurcidin، proteinase3 و ELA2 می‌باشد. الاستاز نوتروفیل به‌عنوان یک پروتئاز با ۲۱۸ اسید آمینه توسط سلول‌های پیش‌ساز $CD\ ۳۴^+$ در طی مراحل ابتدایی تولید گرانول‌های نوتروفیل سنتز می‌شود. توالی ژن‌ها نشان داد که همه خانواده‌های مبتلا به CN در ژن ELA2 موتاسیون داشتند. در مجموع هفت مورد متفاوت موتاسیون به‌صورت جایگزینی باز منفرد یا نقطه‌ای تعیین شد. موتاسیون‌های یکسان در چندین خانواده یافت شد. موتاسیون‌ها عمدتا" در اگزون چهار یا پنج، یا در محل اتصال اگزون چهار یا

انترون چهار روی داد.[۸و۱۰] در مطالعه بعدی موتاسیون ژن ELA2 در ۲۵ بیمار با تشخیص نوتروپنی مادرزادی شدید (SCN)، چهار بیمار با CN سه بیمار با تشخیص سندرم Shwachman-Diamond بررسی شد. از ۲۵ بیمار با تشخیص SCN، ۲۲ نفر (۸۸٪) و همه بیماران CN موتاسیون ژن ELA2 داشتند. موارد سندرم Shwachman-Diamond فاقد موتاسیون ژن ELA2 بودند. به‌علاوه از ۲۳۰ مورد کروموزوم کنترل از افراد طبیعی تنها یک مورد تغییر توالی کدگذاری در ژن ELA2 مشاهده شده بود که این امر احتمالاً" ناشی از پلی‌مورفیسم ژنی بوده است. ۱۸ موتاسیون هتروزیگوت متفاوت از ژن ELA2 گزارش شده است. در موارد SCN موتاسیون‌ها در اگزون‌های دو تا پنج و همچنین اینترون سه و چهار رخ داده بود. موتاسیون این ژن در موارد CN در اینترون چهار و یا اگزون چهار یافت شده بود. از طرف دیگر هتروزیگوت بودن موتاسیون‌ها دال بر وراثت اتوزومال غالب در موارد SCN بوده است. هرچند در زمانی‌که برای نخستین بار سندرم کاستمن توصیف شد، وراثت اتوزومال مغلوب برای آن در نظر گرفته شده است. تنوع موتاسیون در موارد SCN اساساً" بیش از بیماران مبتلا به CN مشاهده شده است. این نتایج با مطالعه قبلی همخوانی داشت به‌طوری‌که در موارد CN موتاسیون‌ها غالباً" در اینترون چهار و یا محل اتصال اگزون چهار و پنج روی داده‌اند. این یافته‌ها نقش مهمی را برای موتاسیون‌های ژن ELA2 به‌عنوان عامل نوتروپنی‌های مزمن شدید پیشنهاد کرد.[۳] در مطالعه دیگری موتاسیون ژن ELA2 در نوع SCN با وراثت مغلوب، غالب و اسپورادیک از ۱۸ بیمار بررسی شده است. در سه بیمار با وراثت اتوزومال مغلوب هیچ موتاسیون ژن ELA2 مشاهده نشده بود. همچنین در پنج بیمار از سه خانواده با وراثت اتوزومال غالب تنها یک مورد موتاسیون ژن ELA2 گزارش شد. درحالی‌که هفت موتاسیون جایگزینی هتروژن در هشت بیمار از ده مورد اسپورادیک SCN یافت شده بود. این موتاسیون‌ها در همه اگزون‌ها به‌جز اگزون یک رخ داده است. این یافته‌ها با نتایج مطالعه قبلی دال بر اینکه در همه موارد SCN با وراثت اتوزومال غالب، موتاسیون ژن ELA2 مشاهده نشده مطابقت دارد.[۳و۱۱] در یک مطالعه گسترده‌تر از ۸۱ بیمار مبتلا به نوتروپنی مزمن شدید، موتاسیون ژن ELA2 بررسی شده است.[۲] در این مطالعه بر خلاف یافته‌های قبلی فراوانی موتاسیون ژن ELA2 در هر دو گروه CN (۴۴/۴٪) و SCN (۳۵/۲٪) به‌طور قابل توجهی کمتر گزارش شده است. در عین حال از ۳۱ مورد موتاسیون مشاهده شده، ۱۷ مورد جدید بوده است. همچنین دو سوم افراد دارای موتاسیون اشکال اسپورادیک بودند و موارد خانوادگی با وراثت اتوزومال غالب همخوانی داشت. از بین خویشاوندان افراد دارای موتاسیون، همه آنها که حامل ژن موتانت بودند، در بررسی‌های بالینی مبتلا به SCN یا CN بودند، درحالی‌که هیچکدام از خویشاوندان با یافته‌های بالینی طبیعی موتاسیون ژن ELA2 را نداشتند. ۲۲ مورد (۷۱٪) از ۳۱ موتاسیون ژن ELA2 متفاوت بود. از ۱۹ موتاسیون ژن ELA2 در ناحیه اگزون‌های دو تا پنج، ۱۵ مورد موتاسیون missense با جایگزینی اسید آمینه در ساختار پروتئینی آنزیم بود. همچنین برای نخستین بار بیان غیر طبیعی ژن ELA2 در ناحیه اگزون یک به همراه اختلال SCN، و در موارد اختلال CN به‌همراه موتاسیون در ناحیه اگزون سه مشاهده شده است. در این مطالعه اخیر تنوع ژنوتیپ و موتاسیون ژن ELA2 بیش از مطالعات قبلی بیان شده است، به‌طوری‌که ۴۴٪ بیماران مبتلا به CN موتاسیون داشتند. در واقع به‌نظر می‌رسد موارد CN بیش از آنچه تصور می‌شد، هتروژن هستند. به‌علاوه همه بیماران CN بدون موتاسیون ژن ELA2 اشکال اسپورادیک با تغییرپذیری بیشتر در نوسان تعداد نوتروفیل داشتند. تنها مشخصه افتراق آنها از موارد کلاسیک CN فقدان موتاسیون ژن ELA2 بود. آنالیز فنوتیپ خویشاوندان و افراد حامل موتاسیون‌های مشابه نشان داد که بروز نوتروپنی در موارد CN و یا SCN ممکن است هموژن یا متغیر بوده و بر اساس نوع موتاسیون، مکانیسم‌های پاتوژنیک متفاوت مطرح است.[۲] در مطالعه ما نتایج به‌دست آمده از آنالیز ژن ELA2 با برخی از یافته‌های قبلی همخوانی داشت. هر سه بیمار با تشخیص SCN دارای موتاسیون ژن ELA2 بودند، درحالی‌که در گزارشات قبلی از ۳۵٪ تا ۹۰٪ موارد SCN موتاسیون داشته‌اند. به‌نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از هتروژن بودن ژنوتیپ SCN باشد. هرچند حجم نمونه کم موارد SCN، ممکن است این قضاوت را مخدوش کند. در موارد CN اکثر موتاسیون‌ها در اگزون‌های دو و چهار مشاهده شد. این یافته با گزارشات پیشین مطابقت دارد. به‌غیر از مطالعه اخیر[۲] فراوانی موتاسیون ژن ELA2 در همه یا اکثر بیماران مبتلا به CN مشاهده شده است. در بررسی ما نیز ۸۳٪ بیماران با تشخیص CN دارای موتاسیون بودند. در گزارشات قبلی بیماران مبتلا به SCN در همه اگزون‌های دو تا پنج موتاسیون داشته‌اند.[۳و۸و۱۰و۱۱] همچنین موتاسیون ژن در اگزون یک نیز اخیراً"

نشان داده شد.[۲] در مطالعه حاضر یک مورد SCN و یک مورد CN با موتاسیون ژن در ناحیه اگزون یک یافت شده است. موتاسیون ژن در اگزون یک در بیماران با تشخیص CN در حد جستجوی ما تاکنون گزارش نشده است. در مطالعات قبلی از بیماران مبتلا به نوتروپنی مزمن شدید به‌همراه موتاسیون ژن، موتاسیون چندین ژن به‌طور همزمان گزارش نشده بود. در مطالعه ما دو بیمار با تشخیص SCN و پنج بیمار با تشخیص CN موتاسیون همزمان ژن در دو ناحیه اگزون داشتند، که از این تعداد به‌غیر یک مورد موتاسیون ژن در ناحیه چهار به‌همراه یک اگزون دیگر رخ داده است. در حد جستجوی ما وجود موتاسیون‌های همزمان چند اگزون از ژن ELA2 در بیماران مبتلا به CN یا SCN گزارش نشده است. در مطالعات قبلی میزان تنوع موتاسیون‌های ژن ELA2 در موارد SCN بیش از CN گزارش شده است، درحالی‌که در مطالعه حاضر بیماران مبتلا به CN نیز از تنوع ژنوتیپی قابل‌توجهی برخوردار بودند. متوسط سن کل بیماران در زمان مراجعه ۱۷/۶±۱۳/۴ ماه (یک ماه تا هفت سال) بود و ۱۵ بیمار (۷۱٪) در زمان مراجعه یک یا کمتر از یک سال سن داشتند. در بیماران با CN تظاهرات بالینی دال بر نوتروپنی غالبا" در طی سال نخست پس از تولد روی می‌دهد.[۷و۱۱] به‌طوری‌که اولین مورد نوتروپنی دوره‌ای در ۱۹۱۰ در یک کودک پسر ۳/۵ ماهه با تب‌های مکرر و نوتروپنی شدید گزارش شد.[۴] در یک بررسی دیگر از شش کودک با تشخیص سندرم کاستمن همگی در زمان تشخیص سن کمتر از شش ماه داشتند.[۱۲] در مطالعه حاضر سن زمان مراجعه بین دو گروه CN، SCN و همچنین بین بیماران با و بدون موتاسیون ژن ELA2 از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار نداشت. در عین حال در یک مطالعه وجود موتاسیون ژن ELA2 با میانه سن زمان تشخیص ارتباط داشته است. همچنین برای ۹۵٪ از بیماران با ژنوتیپ موتاسیون در مقایسه با ۵۷٪ موارد بدون موتاسیون قبل از ۱۸ ماهگی تشخیص SCN گذاشته شده بود. همچنین هرچند در گروه CN بیماران با موتاسیون در سنین پایین‌تر تشخیص داده شده بودند، این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود و در ۵۰٪ موارد با موتاسیون پیش از ۱۸ ماهگی این اختلال مطرح شده بود.[۲] در کل والدین ۶۱/۹٪ از بیماران با هم نسبت فامیلی داشتند و این میزان بین دو گروه CN و SCN مشابه بود. فراوانی قابل توجه ازدواج فامیلی در بین والدین بیماران مبتلا به نوتروپنی CN و SCN می‌تواند مطرح‌کننده اشکال وراثتی این نوع اختلالات باشد. هرچند در این مطالعه خویشاوندان بیماران با یا بدون موتاسیون از نظر داشتن ژن ELA2 با موتاسیون بررسی نشده‌اند. در گزارش اولیه در ۱۹۵۶ بیماری کاستمن به‌عنوان یک شکل SCN با وراثت اتوزومال مغلوب مشخص شده بود. در عین حال در بررسی‌های بعدی با مطرح شدن نقش موتاسیون ژن ELA2 در این اختلال سایر اشکال اتوزومال غالب و نیز اسپورادیک شناسایی شده‌اند. به‌علاوه در مطالعه دیگری با بررسی اشکال اختلال SCN با طرح وراثتی غالب، مغلوب و اسپورادیک نشان داده شد که بیماران مبتلا به سندرم کاستمن با فرم اتوزومال مغلوب هیچ موتاسیون ژن ELA2 نداشتند. این شواهد دال بر این بود که موتاسیون ژن ELA2 با سندرم کاستمن با وراثت اتوزومال مغلوب ارتباط نداشته است.[۱۱] طرح وراثت اتوزومال غالب در دهه ۱۹۵۰ برای نخستین بار برای اختلال CN مطرح شد. در مطالعات بعدی انواع اسپورادیک CN نیز شناسایی شده است.[۳-۱] نتایج به‌دست آمده در مطالعه ما از نظر فراوانی سابقه ازدواج فامیلی والدین افراد مبتلا بر وجود اشکال اسپورادیک علاوه بر انواع وراثتی چه از نوع غالب و یا مغلوب دلالت دارد که این مساله با یافته‌های قبلی همخوانی دارد. در ۲۱ بیمار نوتروپنیک، متوسط میزان مطلق نوتروفیل خون محیطی (ANC) ۸۳۰/۵±۴۹۱/۴ (۱۵۰ تا ۲۰۰۰) در هر mm^3 بود. بیماران با تشخیص CN به‌طور معنی‌داری میزان مطلق نوتروفیل در گردش بیشتری نسبت به گروه SCN داشتند (به‌ترتیب ۹۲۱/۲±۴۷۴/۹ در برابر ۳۱۶/۷±۱۵۲/۷ در هر mm^3، $p<0/003$)، درحالی‌که میزان ANC بین بیماران با و بدون موتاسیون ژن ELA2 اختلاف معنی‌داری نداشت. برخی از یافته‌های قبلی دلالت می‌کند که میزان نوتروفیل با موتاسیون ژن ELA2 در بیماران نوتروپنی مزمن شدید ارتباط داشته است. در یک مطالعه ANC به‌طور معنی‌داری در گروه مبتلا به SCN به‌همراه موتاسیون ELA2 از بیماران بدون موتاسیون کمتر بود، درحالی‌که این اختلاف در گروه CN از لحاظ آماری معنی‌دار گزارش نشده است. همچنین مقایسه بین دو گروه SCN و CN از نظر ANC صورت نگرفته بود.[۲] در آنالیز اسمیر مغز استخوان، هر سه بیمار گروه SCN در مرحله پرومیلوسیت دچار توقف بلوغ بودند. بیماران گروه CN به‌ترتیب در هفت مورد (۳۸/۸٪) و دو مورد (۱۱/۱٪) دچار توقف بلوغ در مرحله میلوسیت و پرومیلوسیت بودند. همچنین آنالیز اسمیر یک بیمار طبیعی و یک بیمار دیگر هیپوپلاستیک گزارش شد. در یک

مطالعه آنالیز اسمیر مغز استخوان نشان داد که توقف بلوغ مشخص درمرحله پرومیلوسیت- میلوسیت در همه بیماران با ژنوتیپ موتاسیون در گروه SCN و همچنین کاهش قابل توجه در میزان درصد پیش‌سازهای رده میلوئید و نوتروفیل وجود داشته است. از طرف دیگر دو سوم بیماران با ژنوتیپ بدون موتاسیون در گروه SCN تمایز مشابه‌ای در رده میلوئید داشتند. در بین بیماران مبتلا به CN اختلافی بین دو ژنوتیپ با و بدون موتاسیون از نظر فراوانی میزان تمایز رده میلوئید در اسمیر مغز استخوان گزارش نشده است.[۲] همه بیماران گروه SCN دارای دو یا بیش از دو عارضه عفونی بودند. یکی از بیماران گروه CN سابقه ابتلا به عارضه عفونی و بستری در بیمارستان نداشت، هرچند دچار زخم‌های مکرر دهانی و ژنژیویت و موتاسیون ژن ELA2 در اگزون‌های چهار و پنج بود. شایع‌ترین عارضه ناشی از نوتروپنی زخم‌های دهانی بود. فراوانی تظاهرات عفونی و غیرعفونی در بین بیماران با و بدون موتاسیون عمدتا" تفاوت معنی‌داری نداشت، اوتیت با شیوع بیشتری در بین بیماران بدون موتاسیون روی داد. مقایسه شیوع عفونت‌ها و تظاهرات غیرعفونی بین دو گروه CN و SCN اختلاف معنی‌دار نشان نداد، در عین حال به‌نظر می‌رسد امفالیت شیوع بیشتری در بین بیماران مبتلا به SCN داشته باشد. حجم نمونه کم گروه SCN در مقایسه با موارد CN قضاوت را در مورد ارتباط فراوانی عوارض مزمن ناشی از نوتروپنی با نوع اختلال و ژنوتیپ بیماری دشوار می‌سازد. به‌طور متوسط هر بیمار ۱/۶±۲/۲ بار (بدون سابقه بستری تا شش‌بار) بستری شده است. تعداد دفعات بستری در گروه CN کمتر از SCN بود ولی اختلاف معنی‌داری نداشت. بیماران دارای موتاسیون و بدون موتاسیون به‌ترتیب به‌طور متوسط ۱/۶±۲/۴ و ۱/۲±۱/۳ بار سابقه بستری قبلی داشتند (p>۰/۰۵). در یک مطالعه شیوع عفونت‌های باکتریایی، عمدتا" سلولیت و پنومونی به‌طور قابل‌توجهی در بیماران مبتلا به SCN به‌همراه موتاسیون ژن ELA2 بیش از بیماران بدون موتاسیون بوده است و عفونت‌های راجعه در بیماران با موتاسیون بیشتر روی داده بود. هرچند در گروه CN عفونت‌ها به‌ندرت روی داده بود، در بیماران با موتاسیون از شیوع بالاتری برخوردار بود. ژنژیویت به‌عنوان یک عارضه مزمن نوتروپنی در همه بیماران مشاهده شده است و در گروه SCN با موتاسیون ژن ELA2 ارتباط داشته است.[۲] تنوع بروز نوتروپنی به‌طور واضح با محل یا ماهیت موتاسیون توصیف نشده است. در بیماران مبتلا به SCN موتاسیون‌ها در سرتاسر توالی ژن ELA2 پراکنده بوده و منجر به تغییرات الاستاز نوتروفیل، پرودومین‌ها، و ناحیه پروموتور می‌شوند. برعکس موتاسیون‌های همراه با CN اغلب در اگزون‌های ۲، ۳ و ۴ قرار گرفته‌اند. تغییرات مولکولی متفاوت احتمالا" عملکردهای متفاوتی بر پروتئین الاستاز اعمال می‌کنند، که امکان دارد در فنوتیپ بالینی بیماری نقش داشته باشد. برخی یافته‌های قبلی دال بر این است که فنوتیپ مشابه می‌تواند با مکانیسم‌های پاتوژنیک متفاوتی روی دهد. هرچند در مطالعات اخیر ارتباط موتاسیون ژن ELA2 با CN و SCN نشان داده شده است، پاتوژنیسیته این موتاسیون‌ها نامشخص مانده است و به‌نظر می‌رسد بیان الاستاز جهش یافته به‌تنهایی برای ایجاد نوتروپنی مزمن شدید دوره‌ای یا مادرزادی کافی نباشد. بروز متغیر نوتروپنی و تظاهرات بالینی آن را می‌توان با ترکیبی از چندین فاکتور ژنتیک شامل الاستاز نوتروفیلی یا وجود موتاسیون در سایر فاکتورهای ژنتیکی توضیح داد. از طرف دیگر ذکر شده با دو مکانیسم ممکن است تغییرات ژنتیکی SCN بر پاتوژنز نوتروپنی به‌طور مستقل از الاستاز تاثیرگذار باشد، این تغییرات بر ژن‌های دیگر لوکوس تاثیر داشته باشد یا موتاسیون ژن ELA2 عناصر تنظیم‌کننده برای بیان ژن‌های مجاور را دچار اختلال نماید.[۱۴و۱۳و۲] مطالعه حاضر برای نخستین بار در ایران ویژگی‌های بالینی، آزمایشگاهی و آنالیز ژنوتیپ بیماران مبتلا به نوتروپنی با تشخیص CN یا SCN را گزارش کرده است. از آنجایی‌که نقش وراثتی قوی برای CN و SCN مطرح می‌باشد و ازدواج فامیلی در کشور ما رواج دارد، گسترش این مطالعات می‌تواند در درمان، تشخیص و درک بهتر مکانیسم پاتوژنز این اختلالات نقش قابل‌توجهی داشته باشد. حجم نمونه بیماران مبتلا به نوتروپنی مادرزادی شدید در مقایسه با گروه نوتروپنی دوره‌ای کم بود. داده‌های مربوط به چند مشخصه بالینی، آنالیزهای مغز استخوان و تغییرات پروتئین ایجاد شده در دسترس نبود. ایجاد پایگاه اطلاعاتی در مورد بیماری‌های مزمن و با شیوع کمتر از جمله CN و SCN جمع‌آوری داده‌های لازم برای بررسی‌های آینده را دقیق‌تر می‌سازد. تاثیر رژیم‌های درمانی متداول بر میزان نوتروفیل‌های خون می‌تواند جنبه دیگری در بررسی‌های بعدی باشد. ارزیابی خویشاوندان بیماران از نظر موتاسیون ژن ELA2 یا اختلالات نوتروپنیک قابل بررسی می‌باشد. از طرف دیگر در صورت فراهم کردن امکانات لازم در ایران جهت آزمایشات تعیین

توالی ژن ELA2 یا سایر ژن‌های دخیل با استفاده از روش PCR هزینه‌های تشخیص و درمان بیماران کاهش خواهد یافت. آنالیز مولکولی ژن ELA2 به‌صورت غربالگری نقش بسزایی در شناسایی بیماران با ریسک عفونت‌های باکتریایی شدید و راجعه دارد. به‌نظر می‌رسد موتاسیون ژن ELA2 نقش قابل‌توجه در روند پاتوژنز اختلالات CN و SCN داشته باشد. اختلال CN بیش از آنچه قبلا″ تصور می‌شد تنوع ژنوتیپی دارد. درصد زیادی از بیماران CN و SCN سابقه ازدواج فامیلی در والدین داشته که مطرح‌کننده اشکال وراثتی این اختلالات است. بیماران CN به‌طور معنی‌داری ANC کمتر از بیماران SCN داشتند. امکان دارد ژن ELA2 در چند اگزون دارای موتاسیون باشد. ارتباط معنی‌داری بین وجود موتاسیون و شیوع تظاهرات بالینی بیماران نوتروپنی CN و یا SCN وجود ندارد.

References

1. Aprikyan AA, Liles WC, Rodger E, Jonas M, Chi EY, Dale DC. Impaired survival of bone marrow hematopoietic progenitor cells in cyclic neutropenia. *Blood* 2001; 97: 147-53.
2. Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, Cassinat B, Rodrigues-Lima F, Beaufils S, et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood* 2004; 103: 4119-25.
3. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood* 2000; 96: 2317-22.
4. Dale DC, Bolyard AA, Aprikyan A. Cyclic neutropenia. *Semin Hematol* 2002; 39: 89-94.
5. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Cyclical neutropenia and other periodic hematological disorders: a review of mechanisms and mathematical models. *Blood* 1998; 92: 2629-40.
6. Hammond WP 4th, Price TH, Souza LM, Dale DC. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1989; 320: 1306-11.
7. Zeidler C, Welte K. Kostmann syndrome and severe congenital neutropenia. *Semin Hematol* 2002; 39: 82-8.
8. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet* 1999;23:433-6.
9. Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol* 2003; 72: 82-93.
10. Dale DC, Liles WC, Garwicz D, Aprikyan AG. Clinical implications of mutations of neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23: 208-10.
11. Ancliff PJ, Gale RE, Liesner R, Hann IM, Linch DC. Mutations in the ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with the familial form of the disease. *Blood* 2001; 98: 2645-50.
12. Carlsson G, Fasth A. Infantile genetic agranulocytosis, morbus Kostmann: presentation of six cases from the original "Kostmann family" and a review. *Acta Paediatr* 2001; 90: 757-64.
13. Grenda DS, Johnson SE, Mayer JR. et al. Mice expressing a neutrophil elastase mutation derived from patients with severe congenital neutropenia have normal granulopoiesis. *Blood* 2002; 100: 3221-8.
14. Germeshausen M, Schulze H, Ballmaier M, Zeidler C, Welte K. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase (ELA2) are not sufficient to cause the phenotype of congenital neutropenia. *Br J Haematol* 2001; 115: 222-4.

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 7, Oct 2007: 1-10

Relationship between ELA2 gene mutations, clinical and laboratory parameters in severe congenital and cyclic neutropenia

Farhoodi A. [1]
Ahangari Gh. [2]
Chavoshzadeh Z. [*3]
Ramyar A. [4]
Movahedi M. [1]
Ghareghozlou M. [1]
Fazlolahi M. [1]
Heydarzadeh M. [1]
Bemanian M H. [1]
Mansori M. [3]
Zandieh F.[1]

1- Asthma and Allergy research center, Tehran University of Medical Sciences
2- Department of Molecular Medicine, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology
3- Department of Asthma and Allergy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
4- Department of Pediatric Hematology, Tehran University of Medical Sciences

* Corresponding author: Tehran, Shariati Ave., Mofid Children Hospital
Tel: +98-21-44090318
email:
Zahra_chavoshzadeh@yahoo.com

Abstract

***Background*:** Mutations of ELA2, the gene encoding neutrophil elastase (NE) are known to be associated with cyclic neutropenia (CN) and severe congenital neutropenia (SCN). However, high variability of these mutations has been reported. This study was designed to describe the analysis of the ELA2 gene, clinical manifestations and demographic characteristics in patients with CN and SCN.

***Methods*:** A series of 21 patients with CN or SCN were selected, based on SCINR criteria, from the immunology ward of the Pediatric Medicine Center, Tehran, Iran, from March 2004 to August 2005. The ELA2 gene, isolated from blood samples, was analyzed using RT-PCR and automated capillary sequencing. Informed consent was obtained under the tenets of the Helsinki Declaration and the Ethical Committee of the Tehran University of Medical Sciences.

***Results*:** Kostmann's syndrome and CN was diagnosed in three and 18 patients respectively. Of all the patients, one or two mutations were found in 18 cases (85.7%), including all three patients with SCN and 15 of the patients with CN. Exons two and four had the most mutations (eight and seven cases, respectively). Seven patients had double mutations in two distinct exons. Overall, 16 different mutations were found. At the time of presentation, the mean age of patients was 13.4 ±17.6 months, ranging from one month to seven years. Overall, 61.9% of patients had consanguineous parents. The mean absolute neutrophil count was 830.5 ±419.4 (150-2000)/mm^3. On average, each patient had been admitted to the hospital 2.2 ±1.6 times. The neutrophil counts of the SCN patients were significantly higher than those of the CN patients. However, there was no significant difference in the neutrophil counts between patients with mutations and those without mutations. All patients with SCN had two or more infectious complications, although the prevalence of infectious or non-infectious complications did not correlate with ELA2 mutations or the neutropenic disorders.

***Conclusion*:** Mutations in ELA2 appear to play an important role in the phatogenetic mechanisms of CN and SCN. Patients with CN had significantly higher neutrophil counts than SCN patients with CN. Although it possible for the gene encoding neutrophil elastase to have more than one mutation in distinct exons, we found no association between the mutations in ELA2 and their complications in CN and SCN patients.

Keywords: Severe chronic neutropenia, congenital neutropenia, neutrophil elastase, ELA2, mutation, kostmann's syndrome, cyclic neutropenia.