

بررسی شیوع دو جهش در ژن *FLT3* در میان بیماران مبتلا به لوسمیهای حاد میلوئیدی با کاریوتایپ طبیعی در شمال شرق ایران

سعیده قضایی زیدانلو^{۱*} و نفیسه امینی^۲

^۱ ایران، بجنورد، دانشگاه کوثر بجنورد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

^۲ ایران، مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات پاتولوژی مولکولی و سرطان، بیمارستان قائم (عج)، گروه زیست‌شناسی سلولی و

مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

ارزش تشخیصی جهشها در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، در مدیریت بیماران پرخطر و به کارگیری درمان هدفمند مؤثر است. یکی از این جهشها در ژن *FLT3* گزارش شده که محققان آن را به عنوان نشانگری ارزشمند برای تشخیص AML معرفی نموده‌اند. هدف در این مطالعه، بررسی شیوع دو جهش شایع در ژن *FLT3* به عنوان یک شاخص مولکولی مؤثر و ارزشمند در تشخیص و درمان AML با کاریوتایپ طبیعی در شمال شرق ایران بود. نمونه مغز استخوان تازه از ۸۳ بیمار مبتلا به AML که هنوز درمان نشده‌اند و کاریوتایپ طبیعی داشتند، از لحاظ وجود دو نوع جهش در ژن *FLT3* با انجام PCR برای تشخیص جهش *FLT3-TKD* و *PCR-RFLP* جهت تشخیص جهش *FLT3-ITD*، مورد ارزیابی قرار گرفت. شیوع جهش در ژن *FLT3* در بیماران AML در حدود ۲۷/۷ درصد تشخیص داده شد. از کل بیماران ۱۹/۳ درصد جهش *FLT3-ITD* و ۸/۴ درصد جهش *FLT3-TKD* را نشان دادند. اغلب بیماران حاوی جهش از لحاظ تشخیص ریخت‌شناسی مطابق با طبقه بندی FAB، در زیر گروه M2 قرار داشتند. برخلاف سن و جنس، افزایش تعداد گلبول سفید در میان بیماران حامل جهشهای *FLT3* معنی دار بود. ($p < 0.05$). استفاده از جهشهای ژن *FLT3* به عنوان نشانگرهای زیستی در ترسیم تصویر واضحی از پروسه‌های پاتوفیزیولوژیک دخیل در بیماریها بسیار کارایی دارند و سبب می‌شوند تا تشخیص بیماری، پیگیری بیماران به صورت معنی داری بهبود یابد، بنابراین پزشکان تصمیمات درمانی هدفمندتری خواهند گرفت.

واژه‌های کلیدی: لوسمی میلوئیدی حاد، ژن *FLT3*، جهش *FLT3-ITD*، جهش *FLT3-TKD*، شمال شرق ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۸۶۸۴۶۶۰۹، پست الکترونیکی: Ghazaey@s@kub.ac.ir

مقدمه

بیماری AML گروه هتروژنی از بیماریهای بدخیم سلولهای پیش ساز سیستم خونساز است که قادر به بلوغ طبیعی نمی‌باشد و با افزایش تعداد میلو بلاستها و سلولهای نارس در مغز استخوان و خون محیطی همراه است. عوامل مختلفی در ایجاد AML دخیل هستند از جمله می‌توان به ژنتیک، تابش اشعه، ویروسها، بیمارهای نقص ایمنی، جهش تأثیر گذار در تکثیر

لوسمی میلوئیدی حاد (AML) یکی از شایع‌ترین سرطانها در جهان است بطوریکه بر اساس گزارش مؤسسه ملی سرطان آمریکا هر ساله بیش از ۱۳۰۰۰ نفر در آمریکا به آن مبتلا می‌شوند و بیش از ۱/۲۵ درصد مرگ ناشی از سرطان را در دنیا به خود اختصاص می‌دهد (۱۸ و ۲۶). AML دومین سرطان خون شایع (۱۸/۵ درصد) و سومین سرطان خون کشنده در ایران به شمار می‌آید (۳۵).

جهش‌های سوماتیک است که در ۲۰ تا ۲۷ درصد از بزرگسالان مبتلا به AML مشاهده شده و می‌تواند به صورت بالقوه برای درمان‌های مولکولی هدفدار لوسمی، در نظر گرفته شود و تمرکز مطالعات اخیر بر روی توسعه مهارکننده‌های FLT3 در این لوسمی می‌باشد (۵ و ۱۹).

هدف در این مطالعه، بررسی شیوع دو جهش شایع در ژن FLT3 به عنوان یک شاخص مولکولی مؤثر و ارزشمند در تشخیص و درمان بیماران AML با کاریوتایپ طبیعی و آنالیز میزان شیوع آن در بخشی از شمال شرق ایران است. همچنین مقایسه شباهتها و تفاوت‌های یافته‌های این تحقیق با گزارش‌های دیگر از سایر کشورها به منظور افزایش آگاهی پزشکان و خون‌شناسان در مورد فراوانی و ماهیت جهش منتهی به بدخیمیهای خونی است. هر چه پزشکان در زمینه نوع و میزان شیوع این اختلالات ژنتیکی که در سرطانهای مانند AML دخیل اند، آگاه‌تر باشند می‌توانند الگوی درمانی کارآمدتر و مفیدتری را برای بهبود کیفیت زندگی و طول عمر بیماران تعریف نمایند.

مواد و روشها

افراد مورد مطالعه و نمونه‌گیری - ملاحظات اخلاقی: در این مطالعه با شناسایی بیماران پس از اخذ رضایت نامه کتبی وارد مطالعه شدند. رضایت نامه شامل معرفی پژوهش، بیان مزایا و خطرات، راه حل برای جبران خطرات، روش نمونه‌گیری، دارو درمانی یا سایر خدمات، محرمانه بودن این مطالعه، پاسخگویی به پرسشها و حق انصراف در خروج از مطالعه می‌باشد. بیماران با آگاهی کامل از موارد فوق رضایت خود را به عنوان یک فرد مورد مطالعه در پژوهش اعلام کردند. کلیه اطلاعاتی که از بیمار گرفته شد و نیز نام وی محرمانه باقی ماند و نتایج تحقیقات به صورت کلی و در قالب اطلاعات گروه مورد مطالعه منتشر گردید.

و تمایز سلولی و ... اشاره کرد (۸ و ۱۴). امروزه تشخیص لوسمی حاد با روشهای مختلف بافت‌شناسی، ایمونولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی انجام می‌گیرد. روشهای بافتی و ایمونولوژیکی نمی‌تواند به عنوان وسیله‌ای برای پیش‌بینی وضعیت بیماران به کار گرفته شود. با توجه به ریسک فردی عود این بیماری، روشهای درمانی مؤثر سعی در تغییر شدت لوسمی میلوئیدی حاد دارند. تهیه کاریوتایپ از جمله پارامترهای قوی پیش‌آگهی در AML بوده اما ۳۰-۵۰ درصد از بیماران AML کاریوتایپ طبیعی داشته در نتیجه یک پیش‌آگهی متوسط دارند (۸، ۱۶ و ۲۶). از آنجا که AML با کاریوتایپ طبیعی، با توجه به جنبه‌های مولکولی این بیماری، یک بیماری ناهمگون محسوب می‌شود، تعریف نشانگرهای مولکولی مناسب برای تعیین پیش‌آگهی و برای تشخیص حداقل بیماری باقی مانده (MRD) از اهمیت زیادی برخوردار است.

ژن FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) که پروتئین تیروزین کینازی شبه FMS را کد می‌کند، از گیرنده‌های خارج سلولی پیش‌سازهای خونی و متعلق به خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی کلاس III می‌باشد (۳۰ و ۳۱). این ژن، در بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (13q12,2) قرار گرفته و در سلولهای خونساز نابالغ، جفت، گنادها و مغز بیان می‌شود (۸). این گیرنده با سایر تیروزین کینازها از قبیل c-KIT و PDGFR مشابهت دارد (۱ و ۲۹). جهشها در ژن FLT3 ابتدا در سال ۱۹۷۴ شناسایی شد و در میان بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی، بیشترین فراوانی نقص ژنتیکی را شامل می‌شوند. دو نوع جهش در ژن FLT3 در نتیجه فعال‌سازی مداوم ژن در بیماران AML مشاهده شده است که شامل، جهش شناخته شده مضاعف شدن پشت سر هم داخلی (ITD) و جهش نقطه ای در موقعیت D835 (TKD) می‌باشد. نتیجه این جهشها، باعث فعالیت مداوم و پایدار تیروزین کینازی گیرنده FLT3 بدون تحریک به وسیله لیگاند می‌شود که تکثیر مستقل از فاکتور رشد را دارند (۹، ۱۰ و ۱۳). جهش FLT3 یکی از

M1, M2, M3, M4, M5, M6 و M7 طبقه بندی شوند. لوله های حاوی نمونه تا زمان تخلیص DNA در فریزر نگهداری شدند. برای تشخیص جهش، DNA ژنومی با استفاده از فنل کلروفرم - ایزوآمیل الکل از ۲ میلی لیتر مغز استخوان تازه یا سلولهای خونی محیطی پس از جداسازی سلولهای تک هسته ای با استفاده از Ficoll، استخراج شد. غلظت DNA با سنجش نسبت A260/A280 مشخص شد و سپس با آب دوبار تقطیر در حجم یک میکروگرم در میلی لیتر رقیق شد. تکثیر قطعات بر اساس پرایمرهای طراحی شده و به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی وجود جهش به روش PCR: پرایمرهای مورد نیاز برای بررسی جهش ژنی توسط آزمایش PCR در جدول ۱ آمده است.

جمع‌آوری نمونه: نمونه مغز استخوان تازه از ۸۳ بیمار مبتلا به AML که هنوز درمان نشده و کاریوتایپ طبیعی داشتند همراه با نمونه خون ۸۰ فرد سالم از لحاظ بیماری AML که در سال ۲۰۱۸ در بیمارستان قائم (مشهد) بستری بودند به عنوان کنترل بررسی شد. گروه کنترل شامل افراد بدون سابقه پزشکی هرگونه سرطان خون بودند. قبل از شروع مطالعه شمارش گلبولهای سفید خونی انجام شد. لام‌گیری از مغز استخوان و خون محیطی انجام شد و وضعیت بیماران و گروه کنترل از لحاظ بیماری AML تأیید گردید. بررسی لامهای مغز استخوان و خون محیطی با رنگ‌آمیزی گیمسا و رنگ‌آمیزی سلولی-شیمیایی میلوپراکسیداز و تشخیص ریخت‌شناسی مطابق با طبقه بندی FAB (نسخه تجدید نظر شده) انجام شده (۷ و ۳۷) تا بیماران در یکی از هشت زیرگروه AML شامل: M0،

جدول ۱- مشخصات پرایمرها و اندازه محصول PCR (FLT3-ITD) و PCR-RFLP (FLT3-TKD) آنها

| نام | پرایمر مستقیم | پرایمر معکوس | طبیعی | جهش یافته | منبع |
|----------|--------------------------------|-------------------------------|-----------|----------------|------|
| FLT3-ITD | 5'-GCAATTTAG-GTATGAAAGCCAGC-3' | 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3' | 328 bp | 328, >328 bp | (۱۹) |
| FLT3-TKD | 5'-CCGCCAGGAACGTGCTTG-3' | 5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3' | 46, 68 bp | 114, 46, 68 bp | (۳۳) |

شناسایی آنزیم محدودالانتر Eco RV را دارا می باشد. محصول PCR توسط آنزیم محدودالانتر Eco RV برش خورده که قطعات حاصل از برش ۶۸ و ۴۶ جفت بازی هست. جهش D835 یک باند اضافی برش نخورده ۱۱۴ جفت بازی را نشان می دهد.

الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شد. محصولات PCR برای جهشها توسط الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد تشخیص داده شد. در واکنش نمونه هتروزیگوت برای جهش FLT3-ITK، قطعاتی که در PCR تولید می شود شامل قطعات ۳۲۸ جفت بازی برای ژن در حالت طبیعی و برای ژن در حالت جهش یافته محصولی با طول بیشتر از ۳۲۸ جفت باز می باشد. اندازه محصولات PCR در جدول ۱ ذکر شده است.

واکنش PCR در حجم کل ۲۰ میکرولیتر حاوی یک میکرولیتر (100 ng/μl) DNA، ده پیکو مول از هر پرایمر، ۱۰ میلی مولار از dNTP، ۲/۵ واحد Ex-Taq DNA polymerase (Takara, Japan) در بافر 10X حاوی (10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/l KCl and 1.5 mmol/l MgCl2) انجام شد. برنامه PCR در ۳۵ سیکل طبق جدول ۲ برای هر کدام از جهشها اعمال گردید.

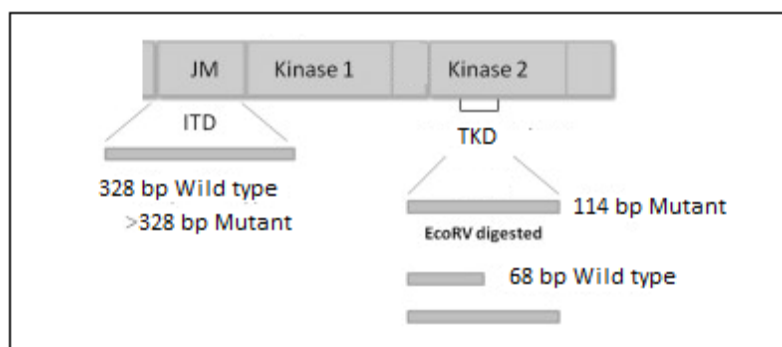
محصول PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا انجام مراحل پس از PCR نگهداری شد. بررسی پلی مورفیسم قطعات حاصل از برش آنزیم محدودالانتر (RFLP) برای شناسایی جهشهای FLT3-TKD استفاده شد. زیرا کدون D835 توالی نوکلئوتیدی GATATC است که جایگاه

جدول ۲- برنامه دمایی و زمانی برای واکنش PCR

| Mutation | Number of cycles | Time | Temperature, °C | Step |
|----------|------------------|-------|-----------------|----------------------|
| FLT3-ITD | 1 | 5min | 94 | Initial denaturation |
| | 35 | 30 s | 94 | Denaturation |
| | | 30 s | 60 | Annealing |
| | | 60s | 72 | Extension |
| | 1 | 10min | 72 | Final Extension |
| FLT3-TKD | 1 | 5min | 94 | Initial denaturation |
| | 35 | 30 s | 94 | Denaturation |
| | | 30 s | 66 | Annealing |
| | | 60s | 72 | Extension |
| | 1 | 10min | 72 | Final Extension |

۱) که با الکتروفورز ژل آگارز مشاهده شد. با توجه به اینکه با افزودن کنترل منفی ضروری است تا هضم کامل توسط Eco RV تضمین شود، در نتیجه امکان کسب نتایج مثبت کاذب در نمونه‌های بیمار از بین می‌رود. نمونه‌های حاوی آلل طبیعی و جهش یافته FLT3 در شکل ۱، نشان داده شده است.

جهش FLT3-ITD یا D835 توسط الکتروفورز محصولات تکثیر شده پس از هضم با آنزیم Eco RV تشخیص داده شد. محصولات تکثیر شده از آللهای طبیعی به وسیله Eco RV به دو باند ۶۸ و ۴۶ جفت باز برش خوردند. محصولات تکثیر شده با جهشهای D835، باند برش نخورده به اندازه ۱۱۴ جفت باز دارند (جدول ۱ و شکل



شکل ۱- شکل شماتیک بخشی از ژن FLT3 و محصولات حاصل از PCR و PCR-RFLP. Wild type: طبیعی؛ Mutant: جهش یافته؛ JM: نزدیک غشاء

نتایج

مشخصات بالینی و آزمایشگاهی همه بیماران: در این تحقیق ۸۳ بیمار مبتلا به AML تازه تشخیص داده شده شامل ۴۵ مرد (۵۴/۲ درصد) و ۳۸ زن (۴۵/۸ درصد) در محدوده سنی ۱ تا ۶۲ سال (در زمان تشخیص) وارد مطالعه شدند. نسبت جنسها در این مطالعه ۱/۲ محاسبه شد. شمارش گلبولهای سفید خونی بیماران رنج $10^3 \times 9$ تا $10^3 \times 293$ را نشان داد. یافته‌های تشخیصی بالینی و آزمایشگاهی بیماران در جدول ۳ خلاصه شده است.

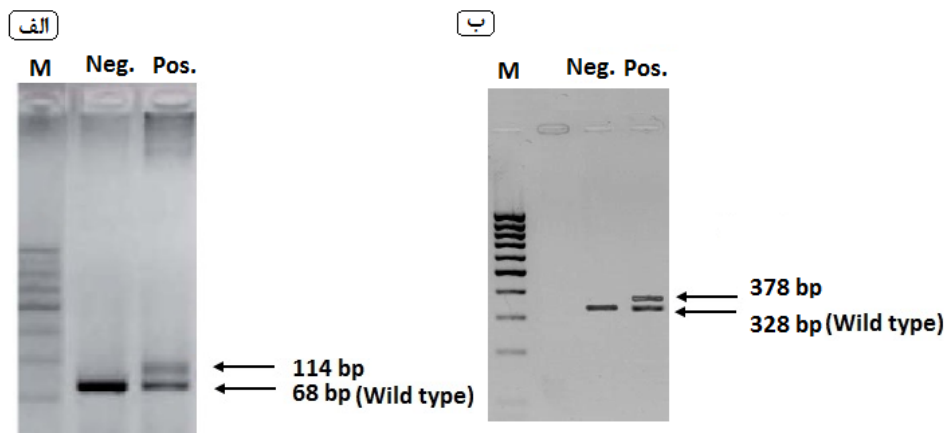
آنالیزهای آماری: کلیه داده‌ها با سه بار تکرار آزمایش و به دست آوردن مقادیر $mean \pm SD$ به دست آمد. برای مقایسه آماری داده‌ها از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده و مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) معنی‌دار تلقی شدند. رابطه آماری و معنی‌دار بودن ارتباط جهش با سن، جنس و زیرگروه M بیماران با استفاده از آنالیز t-test بررسی شد. کلیه محاسبات آماری با نرم‌افزار GaphPad Prism نسخه 5.01 انجام گرفت.

جدول ۳- مشخصات بالینی و آزمایشگاهی ۸۳ مورد AML با ۸۰ مورد کنترل مقایسه شده است

| p-Value | گروه کنترل | | گروه ML | | سن (سال) تعداد گلبول سفید (لیتر/ $\times 10^6$) |
|---------|------------|------|---------|--------|---|
| | Mean | SD | Mean | SD | |
| ۰/۷۲۵ | ۳۰/۶ | ۱۹/۲ | ۲۸/۲ | ۱۸/۶۱۶ | |
| ۰/۰۰۸ | ۶/۳۷ | ۲/۲۳ | ۷۷/۳۴ | ۷۱/۵۸ | |

FLT3-TKD ۳۰/۴ درصد به دست آمد. رابطه معناداری میان جنس و سن افراد دارای جهش و وقوع جهش FLT3 در بیماران AML یافت نشد ($p < 0.05$). به علاوه ۳۹ درصد از بیماران حاوی جهش در زیر گروه M2 قرار داشتند اما رابطه میان زیرگروه AML و وقوع جهش FLT3 در بیماران AML معنادار نبود ($p > 0.05$). بیماران دارای جهش FLT3 در زیرگروه‌های M5، M6 و M7 قرار نداشتند. مقایسه تعداد گلبول سفید در میان بیماران و گروه کنترل نشان داد که متوسط تعداد گلبول سفید در میان بیماران حاوی جهش FLT3 به صورت معنی داری بیشتر است. ($p < 0.05$).

شیوع جهش FLT3-ITD و FLT3-TDK: نتایج PCR به دست آمده برای جهش‌های FLT3-ITD و FLT3-TKD بر روی ژل آگارز ۳ درصد با کمک رنگ آمیزی با ژل رد (رنگ ایمن) مشاهده گردید (شکل ۲). هم کنترل مثبت و هم کنترل منفی در واکنش PCR به کار گرفته شد. جهش در ژن FLT3، FLT3-ITD و FLT3-TKD در ۸۳ مورد از بیماران AML بررسی شد. از میان بیماران AML تعداد ۱۲ مرد و ۱۱ زن (۲۳ نفر) جهش‌های FLT3 را نشان دادند (۲۷/۷ درصد). از این میان ۱۶ نفر (۱۹/۳ درصد) از کل بیماران جهش FLT3-ITD و ۷ نفر (۸/۴ درصد) از کل بیماران جهش FLT3-TKD را نشان دادند. در میان جهش یافته‌ها، شیوع جهش FLT3-ITD ۶۹/۶ درصد و جهش



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR مرتبط با جهش‌های FLT3-ITD/TKD (الف) محصول PCR برش خورده با آنزیم Eco RV مربوط به شناسایی جهش FLT3-TKD (ب) محصول PCR جهش FLT3-ITD. (Neg.: نمونه فاقد جهش و Pos.: نمونه جهش یافته، M: مارکر)

سایر سندرم‌های این گروه از لحاظ بیماری‌زایی، قابل تمیز بوده و می‌تواند به طور بالقوه در شناسایی عوامل دخیل در ایجاد این لوسمی مشارکت کند. توزیع خاص زیرگروه‌های AML در جمعیت‌های مختلف انسانی امکان درک بهتری از عوامل ژنتیکی و محیطی دخیل در پیدایش خود را فراهم

بحث

لوسمی حاد میلوئیدی شامل سندرم‌های متعدد و مجزا با ویژگی‌های بالینی، ریخت‌شناسی، فنوتیپی و سیتوژنتیکی خاص می‌باشد و بهترین ناهنجاری است که به خوبی از

معناداری بین سن و جنس بیماران با جهش *FLT3* مشاهده نشده است (۲).

سرطان خون *AML* اغلب با اختلالات سیتوژنتیکی و بیان ژنهای ناقص مرتبط است که در مدیریت بالینی بیماری بسیار مهم هستند. دستورالعمل‌های فعلی برای تشخیص *AML* شامل چندین نشانگر زیستی در خون محیطی می‌شود مانند جهش‌های ژن *FLT3*، *NPM1*، *CEBPA* و *KIT* و نتایج سیتوژنتیکی مانند جا به جای کروموزومی بین کروموزومهای ۱۵ و ۱۷ همچون ۸ و ۲۱ ((15;17)t، (8;21)t). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ انجام شد جا به جایی کروموزومی ۸ و ۲۱ در شمال شرق ایران گزارش شده است (۳۶). شیوع علاوه بر این، تکنیک‌های توالی‌یابی نسل جدید نشان داده است که پروفایل اپی ژنتیکی بیماران *AML* می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی عمل کند و نتایج بالینی را با وضعیت متیلاسیون *DNA* مرتبط سازد. علاوه بر این، بررسی پروتئومیک نیز به ابزار قابل توجهی در مطالعه *AML* تبدیل شده اند (۶).

در مجموع ارزیابی وضعیت جهش *FLT3* در بیماران مبتلا با کاربوتایپ طبیعی امکان شناسایی زیرمجموعه بیمارانی را که از فواید شیمی درمانی سود نمی‌برند فراهم می‌سازد. مطالعات مختلف از جمله بررسی کمالی پور و همکارانش نشان داده که استفاده از نشانگرهای زیستی برای تشخیص میزان حساسیت افراد به سرطان‌ها اهمیت دارد (۱۸) و کمک می‌کند تا تصویر واضحی از پروسه های پاتوفیزیولوژیک دخیل در آنها به دست آید و در نتیجه تشخیص بیماری، پیگیری و مانیتور کردن بیماران به صورت معنی داری بهبود خواهد یافت و در پی آن پزشکان تصمیمات درمانی هدفمند و قاطع تری خواهند گرفت. به علاوه از ایجاد مقاومت به درمان و عودهای مکرر جلوگیری به عمل می‌آید. در این مطالعه محدودیت‌هایی هم وجود دارد از جمله اینکه تعداد نمونه های مورد بررسی کم است که باعث می‌شود تا بررسی و نتیجه گیری دقیق

می‌سازد (۲۵). اگر چه کاربوتایپ به عنوان یکی از مهمترین عوامل پیش آگهی در *AML* شناخته شده است و داده های سیتوژنتیکی به طور فزاینده ای برای تفکیک بیماران در گروه‌های پیش آگهی مجزا مرتبط با روشهای درمانی مدرن سازگار با خطر، استفاده می‌شود (۲۴) اما مطالعات متعدد نشان می‌دهد که بیماران *AML* اغلب کاربوتایپ های طبیعی دارند (۳۳) و از نظر مولکولی یک گروه ناهمگن هستند که این اختلافات مولکولی احتمالاً با پیش آگهی بیماری در آنها مرتبط است. بنابراین، شناسایی نشانگرهای مولکولی جدید و اعتبار سنجی آینده نگرانه آنها در درمانی بیماری بسیار مهم است (۲۱ و ۳۲). به همین دلیل در این بررسی، میزان شیوع جهش‌های *FLT3* در بیماران *AML* با کاربوتایپ طبیعی شمال شرق ایران مورد مطالعه قرار گرفته است.

در این مطالعه کوهورت، میزان شیوع جهش *FLT3* در مجموع ۲۷/۷ درصد گزارش شد که این مقدار با سایر مطالعات در این زمینه همخوانی دارد (۲۰-۳۵ درصد) (۲۲، ۲۷ و ۳۴). جهش *FLT3-ITD* در حدود ۱۹/۳ درصد گزارش شد که مشابه گزارش‌های مطالعات قبلی بود (۱۲، ۳) و ۳۴). شیوع جهش *FLT3-TKD* در حدود ۸/۴ درصد گزارش شد که با سایر گزارش‌ها در مورد این جهش (۵-۱۰ درصد) همخوانی داشت (۲۰، ۲۳ و ۳۴). زیر گروه *M2* شایعترین زیرگروه در میان بیماران حامل جهش *FLT3* بود که این یافته در تأیید سایر گزارش‌ها در این زمینه بود (۱۲ و ۱۷) اما با یک سری از مطالعات همخوانی نداشت (۱۱ و ۱۵). شمارش گلبولهای سفید به صورت معنی داری در میان افراد حامل جهش بالاتر بود که این یافته مشابه نتایج دو مطالعه در این زمینه بود (۲۶، ۲۷ و ۳۱) اما با سایر گزارش‌های در این مورد همخوانی نداشت (۴، ۱۱ و ۲۸). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۶ بر روی بیماران *AML* شمال شرق ایران بدون در نظر گرفتن کاربوتایپ آنها انجام شد، میزان جهش *FLT3*، ۲۱ درصد (۸۱ درصد آنها *FLT3-ITD* و ۱۹ درصد آنها *FLT3-TKD*) گزارش شد و رابطه

نباشد. بنابراین مطالعات کوهورت بزرگتری با نمونه‌های بیشتر لازم است تا نتایج ارائه شده با قطعیت تأیید گردد. همچنین به دلیل اهمیت این جهش در ایجاد لوسمی، شناسایی آن در سایر بدخیمیها از جمله ALL، MDS و CML نیز توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از طرحی به شماره NO.9705301776 مصوب در دانشگاه کوثر بجنورد با شناسه اخلاق

مقاله کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

- 1- Agnès, F., Shamoon, B., Dina, C., Rosnet, O., Birnbaum, D., & Galibert, F. (1994). Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, 145(2), 283-288.
- 2- Allahyari, A., Sadeghi, M., Ayatollahi, H., Yazdi, H. N., & Tavakol, M. (2016). Frequency of FLT3 (ITD, D835) gene mutations in acute myelogenous leukemia: a report from Northeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(9), 4319-4322.
- 3- Al-Mawali, A., Gillis, D., & Lewis, I. (2013). Characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplication in the FLT3 gene. *Oman medical journal*, 28(6), 432.
- 4- Ayachi, O. S., Rezgoun, M. L., Sayitoglu, M., Altindirek, D., Erbilgin, Y., Abadi, N., & Satta, D. (2018). Prevalence and Effect Evaluation of FLT3 and NPM1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients in Eastern Algeria. *International Journal of Hematology and Oncology*, 29(2), 169-179.
- 5- Bacher, U., Haferlach, C., Kern, W., Haferlach, T., & Schnittger, S. (2008). Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(5), 2527-2537.
- 6- Bai, J., He, A., Zhang, W., Huang, C., Yang, J., Yang, Y., ... & Zhang, Y. (2013). Potential biomarkers for adult acute myeloid leukemia minimal residual disease assessment searched by serum peptidome profiling. *Proteome science*, 11(1), 39.
- 7- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*, 33(4), 451-458.
- 8- Beutler, E., COLLER, B. S., KIPPS, T. J., LICHTMAN, M. A., Seligsohn, U., & WILLIAMS, W. J. (2001). *Williams hematology*. McGraw-Hill, pp.425- 432.
- 9- Birg, F., Carbuccia, N., Rosnet, O., & Birnbaum, D. (1994). The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 13(3-4), 223-227.
- 10- Birg, F., Courcoul, M., Rosnet, O., Bardin, F., Pebusque, M. J., Marchetto, S., ... & Birnbaum, D. (1992). Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages.
- 11- Blau, O., Berenstein, R., Sindram, A., & Blau, I. W. (2013). Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 54(1), 145-152.
- 12- Cuervo-Sierra, J., Jaime-Pérez, J. C., Martínez-Hernández, R. A., García-Sepúlveda, R. D., Sánchez-Cárdenas, M., Gómez-Almaguer, D., ... & Lutz-Presno, J. (2016). Prevalence and clinical significance of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients: a multicenter study. *Archives of medical research*, 47(3), 172-179.
- 13- DeLapeyrière, O., Naquet, P., Planche, J., Marchetto, S., Rottapel, R., Gambarelli, D., ... & Birnbaum, D. (1995). Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse

- hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation*, 58(5), 351-359.
- 14- Dhar, R., Ellis, R. W., Shih, T. Y., Oroszlan, S., Shapiro, B., Maizel, J., ... & Scolnick, E. (1982). Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science*, 217(4563), 934-936.
 - 15- Gou, H., Zhou, J., Ye, Y., Hu, X., Shang, M., Zhang, J., ... & Song, X. (2016). The prevalence and clinical profiles of FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, C-KIT, DNMT3A, and CEBPA mutations in a cohort of patients with de novo acute myeloid leukemia from southwest China. *Tumor Biology*, 37(6), 7357-7370.
 - 16- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., & Thun, M. (2002). Cancer statistics, 2002. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 52(1), 23-47.
 - 17- Jeon, Y., Seo, S. W., Park, S., Park, S., Kim, S. Y., Ra, E. K., ... & Seong, M. W. (2013). Identification of two novel NPM1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Annals of laboratory medicine*, 33(1), 60-64.
 - 18- Kamalipour, S., Barzegar, A., Shokrzadeh, M., & Nikbakhsh, N. (2017). Increased Expression of CYP2E1 gene in gastric cancer may be a molecular marker for mazandaran province population. *Journal of Genetic Resources*, 3(2), 130-136.
 - 19- Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., ... & Tamura, J. (1997). Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 11(9), 1447-1452.
 - 20- Kiyoi, H., & Naoe, T. (2006). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia. In *Myeloid Leukemia* (pp. 189-197). Humana Press.
 - 21- Kottaridis, P. D., Gale, R. E., & Linch, D. C. (2003). Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 44(6), 905-913.
 - 22- Levis, M. (2013). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013?. *Hematology 2013, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2013(1), 220-226.
 - 23- Mead, A. J., Linch, D. C., Hills, R. K., Wheatley, K., Burnett, A. K., & Gale, R. E. (2007). FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 110(4), 1262-1270.
 - 24- Mrózek, K., Heinonen, K., & Bloomfield, C. D. (2001). Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 14(1), 19-47.
 - 25- Nakase, K., Bradstock, K., Sartor, M., Gottlieb, D., Byth, K., Kita, K., ... & Kamada, N. (2000). Geographic heterogeneity of cellular characteristics of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australian and Japanese adult cases. *Leukemia*, 14(1), 163-168.
 - 26- National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Acute Myeloid Leukemia. Available at: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>. Jun 14, 2010.
 - 27- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. L., Paschka, P., Roberts, N. D., ... & Gundem, G. (2016). Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23), 2209-2221.
 - 28- Rezaei, N., Arandi, N., Valibeigi, B., Haghpanah, S., Khansalar, M., & Ramzi, M. (2017). FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and nucleophosmin 1 (NPM1) in Iranian adult acute myeloid leukemia patients with normal karyotypes: mutation status and clinical and laboratory characteristics. *Turkish Journal of Hematology*, 34(4), 300.
 - 29- Rosnet, O., & Birnbaum, D. (1993). Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Critical reviews in oncogenesis*, 4(6), 595-613.
 - 30- Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tonnelle, C., Toiron, Y., ... & Birnbaum, D. (1993). Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells.
 - 31- Savvides, S. N., Boone, T., & Karplus, P. A. (2000). Flt3 ligand structure and unexpected commonalities of helical bundles and cystine knots. *Nature structural biology*, 7(6), 486-491.
 - 32- Schnittger, S., Kinkelin, U., Schoch, C., Heinecke, A., Haase, D., Haferlach, T., ... & Griesinger, F. (2000). Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia*, 14(5), 796-804.
 - 33- Yoshimoto, G., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Kinukawa, N., Takase, K., Eto, T., ... & Taniguchi, S. (2005). FLT3 mutations in normal

- karyotype acute myeloid leukemia in first complete remission treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 36(11), 977-983.
- 34- Zidanloo, S. G., & Colagar, A. H. (2014). Geographic heterogeneity of the AML1-ETO fusion gene in Iranian patients with acute myeloid leukemia. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 3(1), 7.
- 35- Zwaan, C. M., Kaspers, G. J. L., Pieters, R., Woerden, N. L. R. V., den Boer, M. L., Wünsche, R., ... & Creutzig, U. (2000). Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 96(8), 2879-2886.
- 36- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodaera, Y., Miyawaki, S., ... & Akiyama, H. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(8), 2434-2439.
- 37- Zand AM, Imani S, Sa'adati M, Borna H, Ziaei R, Honari H. Effect of age, gender, blood group on blood cancers types. *Kowsar M J* 2010;15:111-14.

Prevalence analysis of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia with normal karyotype in Northeastern Iran

Ghazaey Zidanloo S.¹ and Amini N.²

¹Dept. of Cell and Molecular Biology, Kosar University of Bojnord, Bojnord, I.R. of Iran

²Cancer Molecular Pathology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Mutations in the *FLT3* gene have already been reported in leukemia especially acute myeloid leukemia (AML). The diagnostic value of such mutations in leukemia is in the management of high-risk patients and the targeted therapy of diseases. Recently, the researchers provide this important molecular marker in diagnosis of AML patients. Our aim in this study is to analysis the prevalence of the *FLT3* gene mutations as a valuable molecular marker which could be used in the diagnosis and treatment of AML patients with normal karyotype and prevalence survey of mutation in Northeast Iran. In this study, fresh bone marrow samples from 83 patients with untreated acute myeloid leukemia which have normal karyotype were evaluated for the presence of two mutations in the *FLT3* gene by PCR and PCR-RFLP (to detect FLT3-ITD mutation). The prevalence of mutation in *FLT3* gene was 27.7% between AML patients. Of all patients, 19.3% showed FLT3-ITD mutation and 8.4% FLT3-TKD mutation. Most patients with mutations were in the M2 subgroup. Regardless of age and sex, there was a significant increase in white blood cell count among patients carrying FLT3 mutations ($p < 0.05$). The use of mutations such as FLT3-ITD and FLT3-TKD as biomarkers are highly effective in generating a more comprehensive picture of the pathophysiological processes involved in the diseases and can significantly improve disease diagnosis, follow-up and monitoring of patients, so physicians will make more targeted treatment decisions.

Key words: Acute myeloid leukemia, *FLT3* gene, FLT3-ITD mutation, FLT3-TKD mutation, Northeast Iran