تحقیقی

جهش‌های ژنی NPM1 ، FLT3-(ITD) و یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی در شمال غرب ایران

دکتر زهره صناعت[۱]، دکتر کریم شمس[۲]، دکتر بابک نجاتی[۲]، دکتر علی اکبر موثق پور[۲]، دکتر ویدا ایمانی[۳]، دکتر مجید مقدس زاده*[٤]

۱- دانشیار، گروه هماتولوژی انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

۲- استادیار، گروه هماتولوژی انکولوژی، مرکزتحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۳- دستیار تخصصی بیماری‌های کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

٤- متخصص بیماری‌های داخلی، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

چکیده

زمینه و هدف : *لوسمی حاد میلوییدی یک بیماری بدخیم بافت خونساز است که با تجمع سلول‌های غیرطبیعی و تمایزنیافته به‌نام سلول‌های بلاستیک میلوئیدی در مغز استخوان و اختلال تولید سلول‌های طبیعی خونی مشخص می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین جهش ژنی FLT3 و NPM1 و یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی در شمال غرب ایران انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ٤٠ بیمار (٢٤ مرد و ١٦ زن) با قومیت آذری مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی تازه تشخیص انجام شد. جهش ژنتیکی NPM1 و FLT3-ITD به روش PCR در ٢٥ بیمار و یافته‌های فلوسیتومتری در نمونه مغز استخوان، میزان لکوسیتوز و سطح LDH ٤٠ نفر از بیماران قبل از شروع شیمی‌درمانی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها : *در ١٥ نفر (٦٠ درصد) جهش ژنی FLT3-ITD و در ٩ نفر (٣٦ درصد) جهش ژنی NPM1 مشاهده شد. در مجموع جهش ژنی NPM1+، FLT3- تنها در ٤ نفر (١٦ درصد) از بیماران دیده شد. از نظر میزان لکوسیتوز، LDH و کلاس‌های مختلف لوسمی حاد میلوییدی تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه بیماران با NPM1+ ، FLT3- و بیماران با سایر وضعیت‌های جهش ژنی وجود نداشت.*

نتیجه‌گیری : *در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی جهش ژن FLT3-ITD تقریباً سه برابر جهش ژن NPM1 بود.*

کلید واژه‌ها : *لوسمی حاد میلوییدی ، ژن NPM1 ، ژن FLT3-ITD ، لکوسیتوز*

* نویسنده مسؤول : دکتر مجید مقدس زاده ، پست الکترونیکی m_moghadaszadeh@hotmail.com

نشانی : تبریز، خیابان دانشگاه، بیمارستان امام رضا (ع)، دفتر گروه داخلی، تلفن و نمابر ٣٣٧٣٩٦٦-٠٤١١

وصول مقاله : ۹۲/٤/۸ ، اصلاح نهایی : ۹۳/۲/۱٤ ، پذیرش مقاله : ۹۳/۲/۲۷

مقدمه

لوسمی حاد میلوییدی (Acute Myeloid Leukemia: AML) یک بیماری بدخیم و مونوکلونال (تک دودمانی) بافت خونساز است که با تجمع سلول‌های غیرطبیعی و تمایز نیافته به‌نام سلول‌های بلاستیک در مغز استخوان و اختلال تولید سلول‌های طبیعی خونی مشخص می‌شود (۱). از نظر بروز هر ساله حدود یازده هزار مورد جدید در ایالات متحده آمریکا شناسایی می‌شود و منجر به حدود هشت هزار مورد مرگ در سال می گردد (۱). در کشور ایران آمار دقیقی در مورد بروز این بیماری در دست نیست. مرگ و میر این بیماری حدود نیم مورد در هر صد هزار نفر است که با افزایش سن بیمار مرگ و میر بیماری نیز افزایش می‌یابد. بیشتر موارد AML در بالغین رخ می‌دهد (۱). درباره عوامل محیطی که منجر به ایجاد AML می‌شوند؛ فقط سه مورد نقش اثبات شده‌ای دارند که شامل تماس با مقادیر بالای رادیاسیون، مواجهه طولانی مدت با بنزن و مواجهه با داروهای شیمی‌درمانی است (۲).

در نهایت دسته‌ای از جهش‌ها در سلول‌های اولیه رده خونساز که ناشی از عوامل ذکر شده و جابجایی‌های کروموزومی و در اکثر موارد به علل نامعلوم هستند؛ منجر به ایجاد سلول‌های بدخیم می‌شوند (۲). تفاوت‌هایی در پیش‌آگهی بعد از شیمی‌درمانی AML وجود دارد که بر مبنای سن و اختلالات مورفولوژیک و سیتوژنتیک است. در دو دهه اخیر عوامل مولکولی جدیدی کشف شده‌اند که باعث درک بهتر بیولوژی بیماری و ایجاد درمان‌های جدیدی به خصوص در بیماران مبتلا به AML با کاریوتایپ طبیعی (۴۰ درصد موارد) شده‌اند (۳).

جهش ژنی در FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) و NPM1 (nucleophosmin 1) از عوامل جدیدی هستند که در درمان و تعیین

پیش‌آگهی بیماران مشخص شده‌اند (۴). در حال حاضر عوامل پیش‌آگهی مولکولی نقش اساسی در بررسی بیماران مبتلا به AML دارند که شامل انتخاب بیماران برای پیوند آلوژنیک در بیماران با سیتوژنتیک نامطلوب است. سیتوژنتیک مهم‌ترین عامل پیش‌آگهی در بیماران مبتلا به AML است که به بیماران با خطر کم، متوسط و بالا تقسیم می‌شود (۵). جهش‌های NPM1 از شایع‌ترین جهش‌ها در بیماران مبتلا به AML است که بیشتر در CN-AML وجود دارند و به‌طور معمول با مورفولوژی منوسیتی و جنس مونث و فقدان تظاهر CD34 همراه هستند. جهش‌های NPM1 در فقدان جهش FLT3-ITD عامل پیش‌آگهی مطلوب هستند و همچنین در افراد با سن بیش از ۷۰ سال و کاریوتایپ طبیعی از عوامل پیش‌آگهی مطلوب هستند (۶). این مطالعه به منظور تعیین جهش ژنی FLT3 و NPM1 و یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی در استان آذربایجان شرقی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۴۰ بیمار (۲۴ مرد و ۱۶ زن) با قومیت آذری مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی مراجعه کننده به مرکز آموزشی - درمانی شهید قاضی طباطبایی تبریز طی سال‌های ۹۲-۱۳۸۹ انجام شد. بیماری افراد تازه تشخیص داده شده بود.

این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفت. از بیماران رضایت‌نامه کتبی آگاهانه شرکت در مطالعه اخذ شد.

سن، جنس و علت مراجعه بیماران ثبت گردید. بیمارانی که در آسپیراسیون مغز استخوان بلاست بیشتر از ۲۰درصد، رنگ‌آمیزی سودان مثبت و در فلوسیتومتری مارکرهای میلوییدی مثبت (بیش از ۲۰۰ درصد) داشتند؛ به‌عنوان مبتلا به AML شناخته شدند (۷). لذا بیمارانی که منع اخلاقی نداشتند و دارای کاریوتایپ طبیعی بودند؛ در مطالعه وارد شدند. بیمارانی که در مراحل تشخیصی فوت نمودند از مطالعه خارج شدند.

لوسمی حاد میلوئیدی در انواع M0 ، M1 ، M2 ، M3 ، M4، M5، M6 و M7 طبقه‌بندی شده است (۶).

قبل از شروع شیمی‌درمانی از بیماران نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و نمونه خون محیطی یا مغز استخوان گرفته شد. نمونه در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ واحد ضد انعقاد هپارین، جمع‌آوری شد. حجم نمونه‌های مغز استخوان به‌طور متوسط بین ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر بود. این نمونه‌ها در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه فرستاده شد و جهش ژنی بررسی شد. جداسازی و خالص‌سازی RNA از MNCs خون با استفاده از محلول ترایزول انجام گردید. معرف ترایزول یک معرف آماده مصرف برای جداسازی total RNA از سلول‌ها و بافت‌ها است. معرف یک محلول تک فازی از فنل و گوانیدین ایزوتیوسیانات است که باعث مهار RNase های سلولی می‌شود. اساس کار به این صورت است که محلول ترایزول موجب تشکیل کمپلکس‌های RNA با مولکول‌های گوانیدین و آب می‌شود؛ ولی از اتصال هیدروفیلیک RNA با DNA و پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند. DNA و پروتئین‌ها از فاز آبی جدا می‌شوند؛ در حالی که مولکول‌های RNA در فاز آبی باقی می‌مانند.

مقدار RNA با روش تعیین دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد. RNA استخراج شده به نسبت ۱/۵۰ رقیق شد و پس از تنظیم کردن دستگاه با DEPC water مقدار جذب نوری (۲۶۰OD) نمونه خوانده شد. بایستی OD RNA خالص شده با نسبت OD ۲۸۰/۲۶۰ بیشتر از ۱/۸ باشد. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نشان‌دهنده آلودگی با پروتئین و ترکیبات آروماتیک است.

کیفیت RNA استخراج شده توسط یک میکرولیتر از RNA و ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و باند های S۱۸ و S۲۸ مشاهده گردید.

اندازه‌گیری میزان محصولات توالی هدف در Real-Time PCR با روش پرایمرپروب انجام شد. پرایمر مورد استفاده در این مطالعه حاوی ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومیک به صورت زیر بود.

Forwared: GCA ATTTAG GTA TGA AAG CCA GC
Reverse: CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC

اندازه‌گیری میزان محصول توالی هدف (انجام کاریوتایپینگ و وجود یا عدم وجود جهش ژن NPM1 و FLT3 به دو روش اندازه‌گیری مطلق و نسبی انجام شد.

در روش اندازه‌گیری مطلق، تعداد توالی هدف موجود در یک نمونه مشخص می‌شود. برای انجام این روش نیازمند به نمونه استاندارد بودیم که میزان دقیق توالی مورد نظر در آن مشخص باشد که می‌تواند پلاسمید ژن موردنظر باشد.

در روش اندازه‌گیری نسبی، میزان بیان ژن NPM1 و FLT3 نسبت به ژن‌های ساختاری سلول ژن‌های خانه‌دار سنجیده شد. به این روش ΔCt هم می‌گویند و یا می‌توان بیان ژن مورد نظر را نسبت به Gene House Keeping در گروه درمان شده نسبت به گروه کنترل اندازه‌گیری کرد که به آن روش $\Delta\Delta Ct$ می‌گویند و براساس روابط زیر میزان بیان ژن موردنظر محاسبه می‌گردد.

نمونه‌ها برای فلوسیتومتری به آزمایشگاه مرکز آموزشی - درمانی شهید قاضی طباطبایی ارسال شد. مارکرهای فلوسیتومتری مورد بررسی شامل CD13 ، CD14، CD15 ، CD33 ، CD45 ، CD10 ، CD34 ، HLADR ، MPO، CD41 و glycophorin بودند. در نهایت پلوییدی هسته و کاریوتایپ و یافته‌های فلوسیتومتری و میزان لکوسیتوز و سطح LDH و زیرگروه این بیماران بررسی شد.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 در رایانه ثبت شد. برای مقایسه متغیرهای کمی از Student T-test و متغیرهای کیفی از Qui-square و در صورت نیاز از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف معیار، فراوانی و درصد بیان شد. سطح معنی‌داری برای همه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سنی بیماران ۱۴/۵±۳۸/۳ سال بود که در محدوده سنی ۷۴-۲۰ سال قرار داشتند. ۳۱ نفر (۷۷/۵ درصد) متاهل و ۹ نفر (۲۲/۵ درصد) مجرد بودند. تظاهر بیماری شامل احساس ضعف و خستگی در ۲۱ نفر (۵۲/۵ درصد)، خونریزی در ۱۲ نفر (۳۰ درصد)، کبودشدگی آسان و اپیستاکسی هر کدام در ۲ نفر (۵ درصد)، تب، سردرد و تشنج هر کدام در یک نفر (۲/۵ درصد) بود.

نوع لوسمی حاد میلوییدی در ۳ نفر (۷/۵ درصد) M0، ۹ نفر (۲۲/۵ درصد) M1، ۱۰ نفر (۲۵ درصد) M2، ۸ نفر (۲۰ درصد) M3، ۵ نفر (۱۲/۵ درصد) M4، ۴ نفر (۱۰ درصد) M5 و یک نفر (۲/۵ درصد) M7 بود. موردی از نوع M6 وجود نداشت.

پاسخ به درمان استاندارد در ۱۴ نفر (۳۵ درصد) از بیماران به‌دست آمد. در حالی که در ۲۶ نفر (۶۵ درصد) پاسخ کامل به درمان حاصل نشد.

به‌دلیل وجود محدودیت، انجام PCR به‌منظور تعیین جهش ژنی FLT3 و NPM1 فقط روی ۲۵ بیمار انجام گردید. ۱۵ نفر (۶۰ درصد) FLT3-ITD مثبت و ۱۰ نفر (۴۰ درصد) FLT3-ITD منفی داشتند. جهش NPM1 در ۹ نفر (۳۶ درصد) مثبت و در ۱۶ نفر (۶۴ درصد) منفی بود (جدول یک).

جدول ۱ : توصیف حالت ترکیبی وضعیت جهش ژنی FLT3-ITD و NPM1 در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی مراجعه کننده به مرکز آموزشی - درمانی شهید قاضی طباطبایی تبریز طی سال‌های ۹۲-۱۳۸۹

		جهش FLT3-ITD تعداد (درصد)	
		مثبت	منفی
جهش NPM1 تعداد (درصد)	مثبت	۵ (۲۰)	٤ (١٦)
	منفی	۱۰ (٤٠)	٦ (٢٤)

متغیرهای آزمایشگاهی بیماران بر حسب گروه‌های مورد بررسی در جدول ۲ آمده است. در فلوسیتومتری انجام شده، CD61 در هیچ‌یک از بیماران یافت نشد؛ ولی CD38 و CD45 در همه بیماران بیان گردید (جدول ۳).

TDT تنها در ۶ بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 وجود داشت. بیان HLADR در ۱۴ بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 و در ۳ بیمار با جهش ژنی +NPM1، -FLT3 دیده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود.

مارکر گلیکوفورین (GLYCO) تنها در یک بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 بیان گردید. همچنین مارکر Cympo در ۱۰ بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 وجود داشت.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، ۶۰ درصد از بیماران دارای جهش ژنی FLT3-ITD و ۳۶ درصد دارای جهش ژنی NPM1 بودند. در مجموع جهش ژنی +NPM1 با FLT3-ITD منفی تنها در ۱۶ درصد از بیماران دیده شد.

ایمانی راد و همکاران در مطالعه مشابهی جهش ژن نوکلئوفسمین (NPM1) را در لوسمی میلوبید حاد بررسی کردند و نتیجه‌گیری شد که ممکن است بتوان حداقل بیماری باقیمانده (MRD) در AML از راه تشخیص کمبود مارکرهای مولکولی قابل اطمینان پیگیری کرد (۸). یکی از این اهداف بررسی FLT3-ITD است؛ اما تنها در ۳۰ درصد از موارد AML دیده می‌شود. از آنجا که جهش‌های NPM1 طی دوره بیماری ثابت‌تر از FLT3-ITD است؛ می‌توان از آنها به عنوان یک ابزار جدید برای تعیین MRD استفاده نمود. نتایج حاصل از Real time PCR قابل توجه هستند؛ اما به مطالعات بیشتری نیاز دارد (۷).

در مطالعه Chen و همکاران جهش‌های ژن NPM1 در ۶۰-۵۰ درصد از بیماران مبتلا به AML دارای کاریوتایپ طبیعی یافت شد. همچنین جهش‌های ژن FLT3 (بیشتر از نوع ITD) به مقدار بالایی در موارد AML دارای جهش NPM1 دیده شد و هیچ همراهی بین جهش ژن NPM1 با ژن‌های P53، N-RAS و MLL گزارش نشد (۹). برخلاف مطالعه Chen و همکاران (۹)، در مطالعه ما تنها ۳۳/۳ درصد از بیماران دارای جهش ژنی NPM1، جهش ژنی FLT3-ITD را نیز داشتند. در مطالعه Braoudaki و همکاران فراوانی جهش ژنی NPM1 در ۱۰ درصد از کودکان مبتلا به AML مشاهده شد (۱۰). در مطالعه Zhu و همکاران برای طبقه‌بندی مولکولی و درمانی، بررسی جهش NPM1 و FLT3-ITD در تمام بیماران تازه تشخیص مبتلا به AML با لکوسیت بالا و CD34 منفی و کاریوتایپ طبیعی انجام شد. جهش ژن NPM1 در ۱۵ درصد از بیماران وجود داشت. میزان متوسط لکوسیت این بیماران بالا و به‌طور متوسط ۲۷۰۰۰ بود. در ۳۱/۲ درصد از بیماران زیر گروه بیماری AML-M5 تعیین شد. در صورتی که در سایر بیماران ۵/۸ درصد زیر گروه AML-M5 بودند و میزان متوسط لکوسیت‌ها پایین‌تر بود. پیش‌آگهی بدون عود در بیماران مبتلا به AML که جهش NPM1 را بدون جهش FLT3-ITD دارند؛ در مقایسه با سایر بیماران مبتلا به AML بهتر گزارش شده است (۱۱).

جدول ۲ : مقایسه متغیرهای آزمایشگاهی بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی مراجعه کننده به مرکز آموزشی – درمانی شهید قاضی طباطبایی تبریز طی سال‌های ۹۲-۱۳۸۹

	میانگین و انحراف معیار +NPM1 و -FLT3 (٤ نفر)		میانگین و انحراف معیار سایر حالات ممکن (۲۱ نفر)		p-value
		محدوده طبیعی	نتیجه	محدوده طبیعی	
WBC	۳۲۸۰۰±۳۵۵۰	۱۲۲۰-۸٦۰۰۰	۱۷۲۰۰±٤۲۸۱	٤۳۰-۲۰۰۰۰۰	۰/۵۲
RBC	۳/۰۳±۱/۰۵	۱/۹٦-٤/٤۷	۲/۹۷±۰/٦۹	۱/۹۸-٤/۵۰	۰/۸۷
Hb	۹/۷±۳	٦/٤-۱۳/۸	۸/۹±۱/۷	۵/۲-۱۱/۷	۰/٤۷
MCV	۹۲/۹±۲	۹۱/۹-۹٦	۹۵±۷/۲	۷۸-۱۱۳	۰/۵۸
PLT	۷٤۲۰۰±۷۰۹۵	۱۸۰۰۰-۱۷۵۰۰۰	۱۰٤۰۰۰±۱۹۲۸	۳٦۰۰-۸۸۲۰۰۰	۰/۷٦
Neut	۱٦۹۲±٤۵۹	٤۱۰-۵۰۲۰	۱۱۸۸±۳۹۰	۸۰-۱۸۰۰۰	۰/٦۱
Lymph	۹٤۰±٤۵۹	٤۲۰-۱۵٤۰	۲٦۲±۱٦۸	۲۹۰-۱٤۵۰	۰/۳۷
Blast	۱۸±٦	۱۱-۲٤	۳۵±۲	٤-٦۲	۰/۰۷
PT	۱٤/۷±۱/۷	۱۳-۱۷/۲	۱۷/۹±۱/۲	۱۳-۷۰	۰/٦۰
PTT	۳۲/۲±۸/۱	۲۲-٤۱	٤۵/۲±۳/۳	۲۵-۱۸۵	۰/٤٦
LDH	٦۵۷±۳۳۲	۲٤۷-۱۰۲۸	۵٦۷±۳۰۳	۱۲۹-۱۰۵۸	۰/۵۹

جدول ۳ : مقایسه یافته‌های فلوسیتومتری بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی مراجعه کننده به مرکز آموزشی – درمانی شهید قاضی طباطبایی تبریز طی سال‌های ۹۲-۱۳۸۹

نوع CD	+NPM1 و -FLT3 (٤ نفر) تعداد	سایر حالات ممکن (۲۱ نفر) تعداد	p-value
CD2	۲	۵	۰/۵٤
CD3	۱	۳	۰/۵۲
CD7	۱	٦	۰/٦۹
CD19	–	٤	۰/٤۷
CD20	۱	۱	۰/۳۰
CD22	۲	۳	۰/۱٦
CD13	۳	۱۹	۰/٤۲
CD14	۱	۳	۰/۵۲
CD15	۱	۹	۰/٤٦
CD33	۲	۲۰	۰/۰۵
CD34	۲	۸	۰/۵۳
CD38	٤	۲۱	–
CD41	–	۱	–
CD61	–	–	–
CD117	۲	۱٦	۰/۳۰
CD11b	۲	۱٤	۰/٤۵
CD45	٤	۲۱	–
CD10	–	۲	–

برخلاف مطالعه Zhu و همکاران (۱۱)، در مطالعه ما تفاوت آماری معنی‌داری از نظر زیر گروه بیماری بین بیماران مبتلا به AML که جهش NPM1 را بدون جهش FLT3-ITD داشتند و سایر بیماران وجود نداشت. شاید دلیل این مسأله را بتوان با کم بودن تعداد بیماران مطالعه ما توجیه کرد. مشابه مطالعه Zhu و همکاران (۱۱)، در مطالعه ما نیز میزان لکوسیت در گروه بیمارانی که جهش NPM1 را بدون جهش FLT3-ITD داشتند؛ ۳۵۵۰±۳۲۸۰۰ عدد و در سایر بیماران ۴۲۸۱±۱۷۲۰۰ عدد بود؛ ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مطالعه ما به‌دلیل وجود محدودیت‌هایی در مطالعه، امکان بررسی پیش‌آگهی بیماران و ارتباط آن با جهش‌های ژنی یاد شده مقدور نبود. در مطالعه Dunna و همکاران انجام شده روی ۱۲۸ بیمار با میانگین سنی ۴۵ سال، جهش FLT3-ITD در ۲۰/۳درصد و جهش NPM1 در ۱۷/۱ درصد از بیماران وجود داشت و هر دو جهش در بیماران با لکوسیت و LDH بالا و بلاست بیشتر در خون محیطی شایع‌تر بود و بیماران CR و DFS کمتری داشتند (۱۲). در مطالعه ما نیز مشابه مطالعه Dunna و همکاران (۱۲)، میزان LDH در بیماران گروه جهش ژنی مثبت NPM1 و جهش ژنی منفی FLT3 بیشتر از سایر بیماران بود و این یافته از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در مطالعه Falini و همکاران بیماران با جهش‌های ژن NPM1 گلبول‌های سفید و بلاست‌های مغز استخوان بیشتری نسبت به سایر بیماران داشتند (۱۳). در مطالعه ما برخلاف مطالعه Falini و همکاران (۱۳)، تعداد بلاست در گروه بیماران با جهش ژنی مثبت NPM1 و جهش ژنی منفی FLT3، ۶±۱۸ عدد و در سایر بیماران

۲±۳۵ عدد بود. این تفاوت را می‌توان با مراحل مختلف رژنراسیون سلول‌های مغز استخوان توجیه کرد.

در مطالعه Luo و همکاران به تفاوت نتایج فلوسیتومتری و اختلاف بیان برخی از CD ها در بیماران با جهش‌های ژنی مختلف اشاره شده است (۱۴). در مطالعه ما تفاوت آماری معنی‌داری بین بیان CD ها در بیماران با جهش NPM1 مثبت و FLT3 منفی و سایر بیماران وجود نداشت. تنها تفاوت مربوط به بیان CD33 بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود. همچنین در مطالعه ما، بیان HLADR در ۱۴ بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 و در ۳ بیمار با جهش ژنی +NPM1، -FLT3 دیده شد و این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. مارکر گلیکوفورین (GLYCO) تنها در یک بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 بیان شده بود. همچنین مارکر Cympo، در ۱۰ بیمار با وضعیت جهش ژنی غیر از +NPM1، -FLT3 وجود داشت. در مطالعه Becker و همکاران جهش ژنی NPM1 در بیماران مبتلا به AML به خصوص بیمارانی با سنی بیش از ۷۰ سال، پیش‌آگهی مطلوبی داشت و جواب به درمان‌های پیشرفته و عوامل targeting در مورد آنها در مقایسه با سایر بیماران بهتر گزارش شد (۱۵). در مطالعه حاضر به‌دلیل محدودیت‌هایی که وجود داشت؛ پیش‌آگهی بیماران مورد بررسی قرار نگرفته است.

در مطالعه Falini و همکاران (۱۶) بیماران دچار AML با جهش NPM1 و فاقد جهش FLT3-ITD پیش‌آگهی خوبی داشتند (۱۶).

پاسخ مناسب به درمان بیماران با جهش NPM1 و فاقد جهش FLT3-ITD هنوز مشخص نیست؛ اما ممکن است به‌کارگیری سیتوپلاسمی یا هسته‌ای NPM در عملکرد آن دخالت داشته باشد. NPM سلول‌های خونی را از آپوپتوز القاء شده توسط P53 در شرایط تنش سلولی حفاظت می‌کند. حدس زده می‌شود؛ NPM جهش‌یافته توانایی حفاظت را از دست داده و سلول‌ها را بیشتر در معرض تنش ژنوتوکسیک القاء شده توسط شیمی‌درمانی قرار می‌دهد (۱۳).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم امکان فراهم‌سازی حجم نمونه مناسب برای PCR به‌علل تکنیکی یا نمونه کم، لخته شدن سریع نمونه و عدم ارسال به موقع نمونه اشاره کرد.

حضور جهش‌های ژن NPM1 و FLT3 در مواردی از AML لزوم مطالعه جامع را نشان می‌دهد. مطالعات بیشتر درک ما را از زیست‌شناسی AML افزایش داده و محققان را به سوی شناخت اهداف مولکولی و طراحی داروهای درمانی جدید سوق خواهد داد. همچنین شناسایی جهش ژن NPM1 ممکن است گروه‌های متفاوت را از لحاظ پیش‌آگهی تقسیم‌بندی کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که جهش‌های ژن NPM1 (۶۰ درصد) و FLT3 (۳۶ درصد) در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوییدی مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکتر بابک نجاتی (شماره ۵/۹۱-۲/۲) برای اخذ درجه فوق تخصص بیماری‌های هماتولوژی - اونکولوژی بزرگسالان از دانشگاه علوم پزشکی تبریز بود. نویسندگان مقاله از همه افرادی که به نحوی در انجام این مطالعه سهیم بودند؛ تشکر می‌نمایند.

References

1. Kharfan-Dabaja MA, Patel SA, Osunkoya AO, Kojouri K, Kamble R, Yang J, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in acute myeloid leukemia: incidence and feasibility of immunohistochemical staining. Clin Lab Haematol. 2006 Aug;28(4):254-8.

2. Pazhakh V, Zaker F, Alimoghaddam K, Atashrazm F. Detection of nucleophosmin and FMS-like tyrosine kinase-3 gene mutations in acute myeloid leukemia. Ann Saudi Med. 2011 Jan-Feb; 31(1): 45-50.

3. Deeb G, Vaughan MM, McInnis I, Ford LA, Sait SN, Starostik P, et al. Hypoxia-inducible factor-1α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2011 May;35(5):579-84.

4. Kim HJ. Mutations in AML with a normal karyotype: NPM1 and FLT3-ITD, ready to use as a key prognosticator? Korean J Hematol. 2010 Jun;45(2):79-80.

5. Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R, Li J, Rice S, Uren A, et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. Nat Genet. 2011 May; 43(5):470-5.

6. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010; 2010:47-55.

7. Abdulsalam AH. Arbitrary criterion for the diagnosis of acute leukemia. Turk J Hematol. 2011;28(2):149-50.

8. Imanirad P, Yekta Maram L, Rostami P, Shirvani E, Imanian H, Najmabadi H. [Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia]. Genetics in the 3pd Millennum. 2009; 6(4): 1505-9. [Article in Persian]

9. Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. Arch Pathol Lab Med. 2006 Nov;130(11):1687-92.

10. Braoudaki M, Papathanassiou C, Katsibardi K, Tourkadoni N, Karamolegou K, Tzortzatou-Stathopoulou F. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol. 2010 Oct; 3:41.

11. Zhu HH, Jiang B, Lu XJ, Jiang Q, Jiang H, Bao L, et al. [The clinical characteristics of newly diagnosed acute myeloid leukemia patients with NPM1 mutation.] Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2010 May ;31(5):315-18. [Article in Chinese]

12. Dunna NR, Rajappa S, Digumarti R, Vure S, Kagita S, Damineni S, et al. Fms like tyrosine kinase (FLT3) and nucleophosmin 1 (NPM1) mutations in de novo normal karyotype

acute myeloid leukemia (AML). Asian Pac J Cancer Prev. 2010; 11(6):1811-6.

13. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica. 2007 Apr; 92(4):519-32.

14. Luo J, Qi C, Xu W, Kamel-Reid S, Brandwein J, Chang H. Cytoplasmic expression of nucleophosmin accurately predicts mutation in the nucleophosmin gene in patientswith acute myeloid leukemia and normal karyotype. Am J Clin Pathol. 2010 Jan; 133(1):34-40.

15. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2010 Feb; 28(4):596-604.

16. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinicalfeatures. Blood. 2007 Feb; 109(3): 874-85.

Original Paper

NPM1 and FLT3-(ITD) Gene mutations and laboratory findings in patients with acute myeloid leukemia in Northwest of Iran

Sanaat Z (M.D)[1], Shams K (Ph.D)[2], Nejati B (M.D)[2], Movasghpour AK (Ph.D)[2] Imani V (M.D)[3], Moghadaszadeh M (M.D)*[4]

[1]Associate Professor, Hematology Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2]Assistant Professor, Hematology Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [3]Resident in Pediatrics, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [4]Internist, Department of Internal Medicine, Imam Reza Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Abstract

Background and Objective: The acute myeloid leukemia (AML) is a malignant disease with an accumulation of the abnormal and undifferentiated blastic myeloid cell in the bone marrow, leading to abnormal hematopoiesis. This study was done to determine the NPM1 and FLT3-(ITD) mutations and laboratory findings in patients with acute myeloid leukemia.

Methods: This descriptive-analytic study was carried out on 40 (24 males, 16 females) patients with newly acute myeloid leukemia in Northwest of Iran. The mutation of NPM1 and FLT3-ITD were evaluated using PCR method in 25 patients. In all patients, the flowcytometry findings in the bone marrow, leucocytosis and the LDH levels were evaluated prior to the chemotherapy.

Results: The mutation of FLT3-ITD and NPM1 genes was detected in 15 (60%) and 9 (36%) of patients, respectively. FLT3-NPM1+ mutation was seen in 4 (16%) patients. Leukocytosis, LDH level and AML in different classes did no show any significant difference between FLT3-NPM1+ and other gene mutations.

Conclusion: The mutation of FLT3-ITD gene was nearly twice than NPM1 in acute myeloid leukemia.

Keywords: Acute myeloid leukemia, NPM1 gene, FLT3-ITD gene, Leukocytosis

---

*** Corresponding Author: Moghadaszadeh M (M.D), E-mail: m_moghadaszadeh@hotmail.com**

Received 29 Jun 2013 **Revised** 4 May 2014 **Accepted** 17 May 2014

This paper should be cited as: Sanaat Z, Shams K, Nejati B, Movasghpour AK, Imani V, Moghadaszadeh M. [NPM1 and FLT3-(ITD) Gene mutations and laboratory findings in patients with acute myeloid leukemia in Northwest of Iran]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 16(4): 80-86. [Article in Persian]