

تأثیر موتاسیون های FLT3 بر ویژگی های کلینیکی و پاسخ به درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد

شهربانو رستمی^۱، سعید آبرون^۲، مهرداد نوروزی نیا^۳، اردشیر قوام زاده^۴، کامران علی مقدم^۵

چکیده

سابقه و هدف

موتاسیون های FLT3 با پیامد ضعیفی در بیماران مبتلا به لوسمی میلو بلاستیک حاد (APL) همراه هستند. هدف این مطالعه، بررسی فراوانی و تأثیر موتاسیون های FLT3 بر روی ویژگی های کلینیکی و پاسخ به درمان در بیماران APL درمان شده با آرسنیک تری اکساید (As_2O_3) بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه گذشته نگر، نمونه خون ۱۱۵ بیمار APL درمان نشده جمع آوری و DNA ژنومی به روش نمک اشباع استخراج شد. موتاسیون های FLT3-ITD و FLT3-D835 با روش PCR و RFLP بررسی شد. آزمون من ویتنی و کای دو و نیز SPSS ۱۸ برای تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد.

یافته ها

موتاسیون های FLT3-ITD و FLT3-D835 به ترتیب در ۱۶٪ (۱۴٪) و ۱۳٪ (۱۱٪) بیمار، شناسایی شد. در ۲ بیمار هر دو موتاسیون وجود داشت بنابراین فراوانی کلی موتاسیون های FLT3، ۲۳٪ (۵٪) به دست آمد. در بیماران دارای موتاسیون FLT3-ITD، شمارش گلبول های سفید بالاتر ($p=0/005$) و ایزوفرم bcr3 شایع تر بود ($p=0/04$). ارتباط معناداری بین موتاسیون FLT3-D835 و هیچ کدام از ویژگی های کلینیکی بیماران شناسایی نشد. از نظر پاسخ به درمان، تفاوت معناداری بین بیماران دارای موتاسیون های FLT3 و فاقد آن وجود نداشت.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، القای بهبود کلینیکی کامل با As_2O_3 ، ممکن است ارتباطی با وضعیت موتاسیون های FLT3 نداشته باشد بنابراین As_2O_3 می تواند به ویژه به عنوان درمان انتخابی اول در بیماران APL دارای موتاسیون های FLT3 مطرح باشد. هر چند مطالعه های بیشتر بر روی گروه بزرگتری از بیماران برای تایید این نتایج ضروری است.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتی حاد، ژن ها، پروتئین انسانی FLT3، PML/RAR α

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۳

۱- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۲- PhD خون شناسی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۳- PhD ژنتیک پزشکی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۴- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - ایران

۵- مؤلف مسؤول: فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۱۱۴

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute Promyelocytic Leukemia = APL)، زیر گروه خاصی از لوسمی‌های میلوئیدی حاد است که جابه‌جایی کروموزومی (۲۱-۱۲ (q۲۲;q۱۵) t مشخصه بارز آن می‌باشد (۱).

این جابه‌جایی کروموزومی منجر به الحاق ژن PML بر روی کروموزوم ۱۵ به ژن RARA بر روی کروموزوم ۱۷ شده و ژن‌های الحاقی PML/RARA بر روی کروموزوم ۱۵ و RARA/PML بر روی کروموزوم ۱۷ تشکیل می‌شود (۲).

فیوژن ایجاد شده باعث اختلال در عملکرد RARA در تمایز گرانولوسیتی می‌شود، هم چنین چون PML بخشی از اجسام هسته‌ای است، PML/RARA باعث اختلال در اجسام هسته‌ای می‌شود و به این ترتیب اثرات سرکوب‌گر رشدی PML از بین می‌رود. مطالعه‌های سلولی و مولکولی انجام شده، اطلاعات زیادی در مورد اساس پاتوبیولوژی این بیماری فراهم نموده است به طوری که در دهه اخیر، APL به عنوان یک بیماری قابل درمان شناخته می‌شود (۳). چندین فاکتور پیش از درمان به عنوان فاکتورهای پیش آگهی در بیماران APL مطرح شده‌اند (۴). از بین این فاکتورها، شمارش گلبول‌های سفید، دارای بیشترین تاثیر در پیامد بیماران است (۵-۸). همین طور در بعضی مطالعه‌ها، بیان پایین PML/RARA در زمان شروع بیماری با پیامد ضعیف‌تر بیماران همراه بوده است اگر چه در مورد آن اتفاق نظر وجود ندارد (۹-۱۱).

از جمله فاکتورهای پیش آگهی دیگری که بیشتر در زیرگروه‌های لوسمی میلو بلاستیک حاد (AML) به غیر از APL مورد بررسی قرار گرفته، تغییرات ژنتیکی مولکولی است. این تغییرات از این نظر مورد توجه واقع شده که در حدود ۵۰ درصد از بیماران AML در بررسی سائتوژنتیک، دارای کاریوتایپ نرمال می‌باشند در حالی که تغییرات مختلف در سطح مولکولی در این بیماران قابل شناسایی است. یکی از مهم‌ترین این تغییرات مربوط به ژن FLT3 می‌باشد (۱۲، ۱۳).

ژن FLT3 بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (13q12) قرار گرفته و حاوی ۲۴ اگزون است. FLT3 به صورت

همیشگی در پیش‌سازهای هماتوپوئیک در مغز استخوان بیان می‌شود (۱۴). اتصال FLT3 به لیگاند FLT3(FL) باعث دیمریزاسیون رسپتور، اتوفسفوریلاسیون و به دنبال آن فسفوریلاسیون سوبستراهای سیتوپلاسمی درگیر در مسیرهای سیگنال‌دهی شده که در نهایت باعث پرولیفراسیون و تمایز سلول‌های نابالغ هماتوپوئیک می‌شود (۱۴). تاکنون دو نوع مختلف از موتاسیون‌های FLT3 در بیماران AML شناسایی شده است: موتاسیون‌های ITD در ناحیه مجاور غشا و موتاسیون‌های نقطه‌ای در ریشه آسپاراتات ۸۳۵ (Asp835 or D835) در ناحیه کینازی (۱۵). در سیستم‌های تجربی، هر دو نوع موتاسیون باعث فعال شدن مداوم فعالیت تیروزین کینازی FLT3 می‌شوند. موتاسیون‌های FLT3-ITD در اگزون ۱۴ و ۱۵ (قبلاً اگزون‌های ۱۱ و ۱۲ خوانده می‌شد) ژن FLT3 انسانی واقع شده‌اند. این اگزون‌ها، دومین مجاور غشای FLT3 را کد می‌کنند. این تغییرات باعث القای فعال شدن مداوم پروتئین شده و در اثر آن مولکول‌های سیگنالینگ پایین دست مانند STATs، RAS و MAP کینازها فعال می‌شوند. موتاسیون کدون ۸۳۵، باعث القای تغییرات فضایی در لوپ A می‌شود که در نتیجه آن پاکت کاتالیتیک باز شده و فعالیت کینازی به صورت مداوم فعال می‌شود (۱۳).

با وجودی که ارزش پیش آگهی موتاسیون‌های FLT3-ITD در بیماران AML دارای سائتوژنتیک نرمال به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است، در مورد اهمیت آن در بیماران APL اختلاف نظر وجود دارد. تعداد محدودی مطالعه در این زمینه انجام شده که به دلیل حجم کم نمونه، بررسی دقیق اثر این موتاسیون‌ها در پیامد بیماران مشکل است. هدف این پژوهش علاوه بر تعیین فراوانی موتاسیون‌های FLT3-ITD و FLT3-D835 بیماران APL، مقایسه بیماران دارا یا فاقد این موتاسیون‌ها از نظر ویژگی‌های کلینیکی و الگوی پاسخ به درمان بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت گذشته‌نگر و بر روی ۱۱۵ بیمار مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد که درمان القایی آرسنیک

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده و اندازه ناحیه تکثیری برای جهش های FLT3

آغازگرهای مربوط به جهش ITD		اندازه قطعه تکثیری
ITD-F	5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3'	۳۲۹ bp
ITD-R	5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3'	
آغازگرهای مربوط به جهش D835		
D835-F	5'-CCAGGAACGTGCTTGTCA-3'	۱۹۵ bp
D835-R	5'-TCAAAAATGCACCACAGTGAG-3'	

هسته ای به روش استاندارد نمک اشباع انجام شد. برای شناسایی موتاسیون های FLT3، از واکنش زنجیره ای پلیمراز مالتیپلکس (Multiplex-PCR) استفاده شد (جدول ۱). به این ترتیب که آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر هر دو نوع موتاسیون ITD و D835 به صورت هم زمان در واکنش استفاده شد (جدول ۲). کلیه مواد مورد نیاز برای PCR از شرکت سیناژن و آغازگرها از شرکت MWG آلمان تهیه شدند.

جدول ۲: مقادیر و غلظت های استفاده شده در تهیه میکس

محلول ها	غلظت اولیه	یک نمونه	غلظت نهایی
Buffer	۱۰ x	۵ µL	۱ x
MgCl ₂	۵۰ mM	۱/۵ µL	۱/۵ mM
Primer-ITD-F	۱۰ µM	۱ µL	۰/۲ µM
Primer-ITD-R	۱۰ µM	۱ µL	۰/۲ µM
D835-F	۱۰ µM	۱ µL	۰/۲ µM
D835-R	۱۰ µM	۱ µL	۰/۲ µM
dNTP	۱۰ µM	۱ µL	۲۰۰ µM
Taq Polymerase	۵ U/µl	۰/۲ µL	۱ Unit
dH ₂ O		۳۶/۳ µL	
جمع		۴۸	

پس از تهیه میکس با مقادیر ذکر شده در جدول ۲، به اندازه ۴۸ µL از میکس آماده شده در میکروتیوب های ۰/۵ میلی لیتری تقسیم شد، سپس DNA بیماران اضافه شده به طوری که حجم نهایی واکنش به ۵۰ میکرو لیتر رسید. برای کنترل منفی به جای DNA بیماران، dH₂O اضافه شد. از نمونه بیمارانی که به روش تعیین توالی (Sequencing) در آن ها، وجود موتاسیون های FLT3-ITD و FLT3-D835

تری اکساید (As₂O₃) دریافت کرده و به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی مراجعه کرده بودند، صورت گرفت. تشخیص بیماران بر اساس طبقه بندی FAB (French-American-British) بود و برای تایید تشخیص، آزمایش RT-PCR جهت شناسایی فیوژن PML/RARA در کلیه بیماران انجام شد. اطلاعات و یافته های آزمایشگاهی بیماران از پرونده پزشکی آن ها استخراج شد. محدوده سنی بیماران ۱۰ تا ۷۱ سال و میانگین سنی آن ها ۳۱ سال بود. از این تعداد، ۵۳ نفر را مرد و ۶۲ نفر را زن تشکیل می دادند.

در این مطالعه از تعاریف زیر استفاده شده است:

بهبودی کامل هماتولوژیکی: بلاست کمتر از ۵ درصد در مغز استخوان، شمارش نوتروفیل بالای $10^9 \times 1/5$ در لیتر، شمارش پلاکت بالای $10^9 \times 100$ در لیتر و عدم وجود شواهدی دال بر لوسمی در سایر نقاط بدن. ایزوفرم PML/RARA: در جابه جایی کروموزومی (15;17) t منطقه شکست در ژن RARA بر روی کروموزوم ۱۷ در اینترون ۲ و در قطعه ای از DNA به طول ۱۵ Kb قرار دارد. در مقابل سه ناحیه از ژن PML در این جابه جایی درگیر است و باعث ایجاد سه ایزوفرم مختلف می شود شامل: ایزوفرم bcr1 (یا ایزوفرم Long) که اینترون ۶ ژن PML درگیر است، ایزوفرم bcr3 (یا ایزوفرم Short) با درگیری اینترون ۳ ژن PML و ایزوفرم bcr2 (یا ایزوفرم Variant) که اگزون ۶ ژن PML درگیر است (۱۶). ایزوفرم بیماران این مطالعه به روش RT-PCR که در مطالعه های قبلی ذکر شده مشخص شد (۱۵).

جداسازی سلول های تک هسته ای بلافاصله بعد از خون گیری و با استفاده از روش سانتریفوژ گرادیان غلظت صورت گرفت. استخراج DNA ژنومی از سلول های تک

جدول ۴: تهیه میکس برای انجام هضم آنزیمی

مواد مورد نیاز برای انجام یک واکنش	
۱۰ µL	محصول PCR
۲ µL	بافر 10 X digestion
۱ µL (۲۰ U)	Fast Digest® EcoRV (Fermentase)
۷ µL	آب مقطر دیونیزه
۲۰ µL	مجموع

کلیه آزمایش‌ها با استفاده از SPSS ۱۸ آنالیز شد. برای بررسی تفاوت در میانگین متغیرهای سن، شمارش گلبول‌های سفید و مدت زمان درمان برای رسیدن به بهبودی کامل هماتولوژیکی در بیماران دارا و فاقد موتاسیون‌های FLT3، آزمایش Mann-Whitney U test به کار برده شد. از آزمون‌های فیشر و کای دو برای آنالیز فراوانی استفاده شد.

یافته‌ها

در ۱۵ بیمار مطالعه شده، FLT3-ITD در ۱۶ نفر (۱۴ درصد) و FLT3-D835 در ۱۳ نفر (۱۱ درصد) از بیماران شناسایی شد. از آنجایی که در دو نفر از بیماران هر دو موتاسیون به صورت هم زمان شناسایی شد، فراوانی کلی موتاسیون‌های FLT3 در بیماران ۲۳/۵ درصد به دست آمد. ۶ نفر از بیماران دارای موتاسیون FLT3-ITD مرد و ۱۰ نفر زن بودند. همین طور از ۱۳ بیمار دارای موتاسیون FLT3-D835، ۶ نفر زن و ۷ نفر مرد بودند. ارتباط معناداری بین جنس بیماران و موتاسیون‌های FLT3 یافت نشد (جدول ۵). شمارش WBC در رنج ۷۴۰۰-۳۰۰ (میانگین ۶۰۰۰ در میکرولیتر) بود. متوسط شمارش WBC در بیماران فاقد موتاسیون D835 برابر با ۵۳۰۰ و در بیماران دارای این موتاسیون ۷۸۰۰ به دست آمد که این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود. در بیماران دارای موتاسیون FLT3-ITD، متوسط شمارش WBC ۱۶۰۰۰ و در بیماران فاقد این موتاسیون ۴۰۰۰ به دست آمد که این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ($p=0/005$). از ۱۱۵ بیمار مورد مطالعه، ۴ نفر دارای ایزوفرم واریانت (Variant) بودند. به دلیل تعداد کم و مشابه سایر

تایید شده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (جدول ۳).

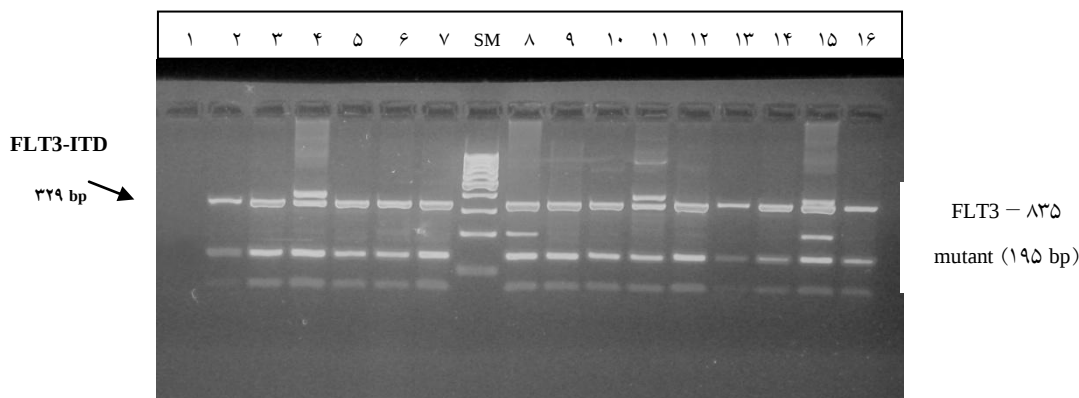
جدول ۳: برنامه PCR برای تکثیر هر دو موتاسیون FLT3-ITD و FLT3-D835

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۴ (دقیقه)	۱
واسرشت	۹۴	۴۵ (ثانیه)	۳۵
اتصال آغازگرها	۵۹	۴۵ (ثانیه)	۳۵
ساخت	۷۲	۴۵ (ثانیه)	۳۵
ساخت نهایی	۷۲	۶ (دقیقه)	۱

پس از PCR، اندازه قطعه تکثیری برای FLT3-ITD در بیماران فاقد موتاسیون ۳۲۹bp بود. در صورتی که بیماری دارای موتاسیون بود، محصولی با اندازه بزرگ‌تر از ۳۲۹ bp نیز مشاهده می‌شد، اندازه این باند در بیماران مختلف متفاوت بود. اندازه ناحیه تکثیری برای FLT3-D835، ۱۹۵bp بود.

از آنجایی که موتاسیون FLT3-D835 به صورت جهش نقطه‌ای می‌باشد، با PCR قابل شناسایی نیست. به این منظور از RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) برای شناسایی این موتاسیون استفاده شد. بنابراین محصول PCR به منظور شناسایی موتاسیون FLT3-D835، تحت هضم آنزیمی قرار گرفت (جدول ۴). به این صورت که پس از تهیه میکس، لوله‌ها ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز گردید.

در قطعه تکثیر شده، جایگاه اثری برای آنزیم EcoRV وجود دارد که در اثر موتاسیون این جایگاه، برش از بین می‌رود. بنابراین پس از واکنش RFLP در صورتی که بیمار فاقد این موتاسیون بود محصول PCR شکسته شده و دو قطعه ۶۵bp و ۱۳۰bp ایجاد می‌شد. در صورتی که بیمار به صورت هتروزیگوت دارای موتاسیون بود، هر ۳ قطعه ۱۹۵bp، ۱۳۰bp و ۶۵bp نیز در وی وجود داشت. در صورتی که به صورت هموزیگوت دارای موتاسیون بود، تنها قطعه ۱۹۵bp بعد از هضم آنزیمی مشاهده می‌شد.



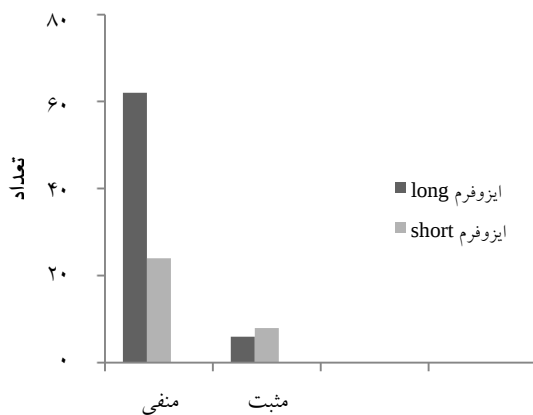
شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR برای جهش‌های FLT3 بر روی ژل آگاروز ۳ درصد. ستون SM مربوط به سایز مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۱ کنترل منفی PCR (فاقد DNA)، ستون‌های ۴ و ۱۱، DNA تکثیر شده از بیمار دارای موتاسیون FLT3-ITD و فاقد موتاسیون FLT3-D835. ستون ۸، DNA تکثیر شده از بیمار دارای موتاسیون FLT3-D835 و فاقد موتاسیون‌های FLT3-ITD. ستون‌های ۱۵ و ۱۶ به ترتیب کنترل مثبت (نمونه DNA بیمار دارای هر دو موتاسیون FLT3-D835 و FLT3-ITD) و کنترل منفی موتاسیون‌ها (فرد نرمال)، بقیه ستون‌ها مربوط به بیمارانی است که فاقد هر دو موتاسیون هستند.

جدول ۵: ویژگی‌های بیماران با توجه به وضعیت موتاسیون‌های FLT3

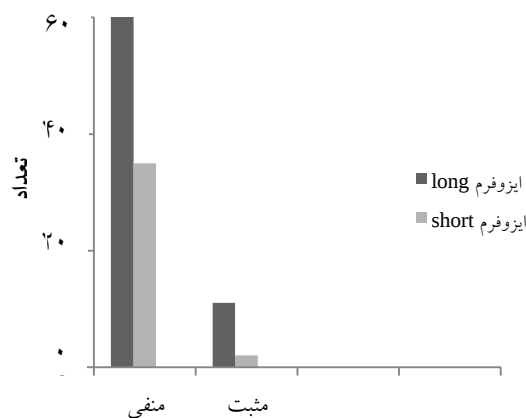
p ITD	p D835	کل بیماران (۱۱۵)	FLT3-ITD+ ۱۶ نفر	FLT3-ITD- ۹۹ نفر	FLT3-D835+ ۱۳ نفر	FLT3-D835- ۱۰۲ نفر	
۰/۹	۰/۱	۳۲/۵ ± ۱۳	۳۱ ± ۱۲	۳۱/۵ ± ۱۳	۳۷ ± ۱۴	۳۱ ± ۱۲/۷	سن: میانگین ± انحراف معیار (SD)
۰/۶	۰/۶	۵۳/۶۲	۶/۱۰	۴۷/۵۲	۷/۶	۴۶/۵۶	جنس زن/مرد
۰/۰۴	۰/۲	۶۸/۳۲	۷/۹	۷۱/۲۸	۱۱/۲	۶۷/۳۵	PML/RARA L/S ایزوفرم
۰/۰۰۵	۰/۱	۶۰۰۰ ± ۱۰۰۰۰	۱۶۰۰۰ ± ۱۸۰۰۰	۴۰۰۰ ± ۷۰۰۰	۷۸۰۰ ± ۹۰۰۰	۵۳۰۰ ± ۱۰۰۰۰	میانگین گلبول‌های سفید ± انحراف معیار (SD)

FLT3-ITD، ۷ نفر دارای ایزوفرم Long و ۹ نفر دارای ایزوفرم Short فیوژن PML/RARA بودند (p=۰/۰۲).
۱۲ نفر از بیماران فاقد موتاسیون FLT3-D835 و ۲ نفر از بیماران دارای موتاسیون FLT3-D835 در حین درمان فوت کردند که این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود. همین طور ۱۰ نفر از بیماران فاقد موتاسیون FLT3-ITD و ۴ نفر از بیماران دارای موتاسیون FLT3-ITD در حین درمان فوت کردند.

مطالعه‌هایی که بر روی بیماران APL انجام شده، در تحلیل‌های آماری، این بیماران جزو گروه بیماران دارای فرم Long مورد آنالیز قرار گرفتند. به این ترتیب ۶۸ درصد بیماران (۷۸ نفر) دارای فرم Long ایزوفرم PML/RARA و ۳۲ درصد (۳۷ نفر) از بیماران دارای ایزوفرم Short بودند. از ۱۳ بیمار دارای موتاسیون FLT3-D835، ۱۱ نفر دارای ایزوفرم Long یا Variable و ۲ نفر دارای ایزوفرم Short فیوژن PML/RARA بودند. از ۱۶ بیمار دارای موتاسیون



موتاسیون ITD



موتاسیون D835

نمودار ۱: ارتباط بین ایزوفرم PML/RARA و موتاسیونهای FLT3. الف: ارتباط ایزوفرم PML/RARA و موتاسیون ITD. ب: ارتباط ایزوفرم PML/RARA و موتاسیون D835

مختلف، متفاوت گزارش شده است به طوری که بیشترین فراوانی ITD در استرالیا، آلمان و ایتالیا و ۳۸-۳۷ درصد گزارش شده در حالی که کمترین فراوانی در کره و ۱۲ درصد گزارش شده است (۲۱-۱۷). در مطالعه‌ای که با همکاری چند مرکز اروپایی و بر روی ۱۱۹ بیمار APL انجام شد، FLT3-ITD در ۳۸ درصد از بیماران شناسایی شد. بیشترین و کمترین فراوانی D835 در هنگ‌کنگ و اسپانیا با فراوانی به ترتیب ۲۳ درصد و ۲ درصد گزارش شده است (۲۲).

شمارش بالای لوکوسیت‌ها از فاکتورهای پیش‌آگهی تایید شده در بیماران APL است و در این مطالعه نیز ارتباط معناداری بین موتاسیون FLT3-ITD و شمارش بالای لوکوسیت‌ها وجود داشت ($p=0/005$). همین طور بین ایزوفرم کوتاه فیوژن PML/RARA و موتاسیون FLT3-ITD ارتباط وجود داشت ($p=0/02$). در مطالعه نوگورا و همکارانش نیز این ارتباط مشاهده شده بود (۱۹).

یک بررسی متا آنالیزی توسط بتین‌جانه بر روی نتایج ۱۱ مطالعه و در مجموع ۱۰۶۳ بیمار به منظور جمع‌بندی نتایج مطالعه‌های مستقل انجام شده است. در این مطالعه فراوانی FLT3/ITD و FLT3/D835 به ترتیب ۳۸-۱۲ درصد و ۲۰-۲ درصد به دست آمد. بر اساس این مطالعه، موتاسیون FLT3-ITD با شمارش بالای WBC در زمان

طول مدت درمان برای القای رمیسیون کامل، ۶۳-۲۵ روز (میانگین 33 ± 7 روز) بود. میانگین مدت زمان درمان برای القای رمیسیون کامل در بیماران دارای موتاسیونهای FLT3-D835 و FLT3-ITD، $33/5 \pm 7$ روز و در بیماران فاقد موتاسیونهای FLT3، این زمان 33 ± 7 روز به دست آمد.

بحث

از جهش‌های FLT3 می‌توان به عنوان یک تومور مارکر مناسب جهت تعیین پیش‌آگهی، تعیین میزان بقا، تعیین عود بیماری، نحوه پاسخ به درمان و تعیین بیماری باقی‌مانده جزئی (MRD) استفاده کرد. اکثریت اطلاعات گذشته به این نکته دلالت دارد که جهش‌های FLT3 یک متغیر مستقل می‌باشد و با پیش‌آگهی ضعیفی در بیماران AML همراه است. در مطالعه حاضر فراوانی موتاسیون ITD و D835 در ۱۱۵ بیمار APL که تحت درمان با داروی As_2O_3 قرار گرفته بودند به ترتیب ۱۴ و ۱۱ درصد به دست آمد. از آن جایی که در دو نفر از بیماران، هر دو موتاسیون به صورت هم زمان شناسایی شد، فراوانی موتاسیونهای FLT3 در بیماران ۲۳/۵ درصد به دست آمد. هیچ کدام از موتاسیون‌ها به صورت هموزیگوت در بیماران شناسایی نشد. فراوانی موتاسیونهای FLT3 در بیماران APL در مطالعه‌های

تشخیص همراه است که نتیجه مطالعه حاضر نیز با آن همخوانی دارد (۲۳).

در مورد تاثیر موتاسیون FLT3-ITD در به دست آوردن بهبودی کلینیکی در بیمارانی که تحت درمان با ATRA به علاوه شیمی درمانی قرار گرفته‌اند، اتفاق نظر وجود ندارد. در حالی که در برخی مطالعه‌ها وجود این موتاسیون تاثیری در به دست آوردن بهبودی کامل نداشته است (۲۵، ۲۴، ۲۰). مطالعه‌ای یو که بر روی ۸۲ بیمار APL انجام شده، با میزان پایین‌تر بهبودی کامل همراه بوده است این در حالی است که مطالعه کینز در ۲۱ بیمار دقیقاً نتیجه عکس نشان داده به طوری که کل ۸ بیمار دارای موتاسیون FLT3-ITD، بهبودی کلینیکی کامل پیدا کردند در حالی که ۵۳ درصد از بیماران فاقد موتاسیون، بهبودی کلینیکی کامل پیدا نمودند (۲۱، ۱۷).

بر خلاف برخی مطالعه‌ها که بین FLT3-D835 و شمارش بالای WBC همراهی وجود داشته، در مطالعه حاضر ارتباطی بین هیچ کدام از ویژگی‌های بیماران در زمان بیماری و موتاسیون FLT3-D835 یافت نشد (۲۶). همین طور هیچ کدام از موتاسیون‌های FLT3-ITD و FLT3-D835 تاثیری در مرگ زود هنگام یا سرعت به دست آوردن بهبودی کامل هماتولوژی نداشتند. در مطالعه گیل و همکارانش بر روی ۱۳۴ بیمار APL، ۸۸ درصد از بیماران فاقد موتاسیون FLT3-D835 بهبودی کامل هماتولوژی پیدا کردند در حالی که بیماران دارای موتاسیون، ۶۶ درصد بهبودی کامل هماتولوژی پیدا نمودند (۲۴) ($p=0/04$).

نتایج مطالعه‌هایی که تا کنون بر روی تاثیر وجود موتاسیون‌های FLT3 در بیماران APL انجام شده به جز

یک مورد، همگی بر روی بیمارانی بوده که تحت درمان با ATRA و شیمی‌درمانی قرار گرفته بودند. تنها مطالعه‌ای که تاثیر وجود این موتاسیون‌ها را در ۹۸ بیمار تحت درمان با آرسنیک بررسی کرده، نشان‌دهنده همراهی این موتاسیون‌ها با فرم کوتاه ایزوفرم PML/RARA بوده است ($p=0/012$). وجود موتاسیون‌ها مشابه مطالعه حاضر تاثیری در به دست آوردن بهبودی کامل هماتولوژی نداشته است (۲۷).

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر نتایج امیدوار کننده‌ای از درمان بیماران APL با ATRA (All Trans Retinoic Acid) و شیمی درمانی و همین طور As_2O_3 به دست آمده است بنابراین شناسایی بیماران در خطر بالا به منظور ایجاد تغییراتی در دستورالعمل درمانی آن‌ها حایز اهمیت است. نتایج برخی از مطالعه‌هایی که در مورد تاثیر موتاسیون‌های FLT3 بر روی بیماران APL درمان شده با ATRA و شیمی‌درمانی انجام شده، نشان‌دهنده میزان بالاتر مرگ در طی درمان القایی و همین طور تمایل به بقای کمتر در بیماران دارای این موتاسیون‌ها است (۲۶، ۲۳). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و تنها مطالعه دیگری که توسط ماتیو و همکارانش بر روی بیماران APL انجام شده، به نظر می‌رسد آرسنیک تری اکساید حداقل می‌تواند به عنوان درمان انتخابی در بیماران دارای موتاسیون‌های FLT3 مطرح باشد (۲۷). البته مطالعه‌های بیشتر با حجم نمونه بالاتر برای تایید این مساله ضروری است.

References :

- 1- Biondi A, Rambaldi A, Alcalay M, Alcalay M, Pandolfi PP, Lo Coco F, Diverio D, et al. RAR-alpha gene rearrangements as a genetic marker for diagnosis and monitoring in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1991; 77(7): 1418-22.
- 2- Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 1977; 1(8010): 549-50.
- 3- Jeddi R, Ghédira H, Menif S, Ben Neji H, Ben Amor R, Kacem K, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with PETHEMA LPA 99 protocol: a Tunisian single center experience. *Hematology* 2010; 15(4): 204-9.
- 4- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev* 2003; 17(2): 71-97.
- 5- Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood* 1999; 93(12): 4131-43.

- 6- Asou N, Adachi K, Tamura J, Kanamaru A, Kageyama S, Hiraoka A, *et al.* Analysis of prognostic factors in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 1998; 16(1): 78-85.
- 7- Adès L, Sanz MA, Chevret S, Montesinos P, Chevallier P, Raffoux E, *et al.* Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood* 2008; 111(3): 1078-84.
- 8- Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T, *et al.* Definition of relapse risk and role of nonanthracyclin drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 2000; 96(4): 1247-53.
- 9- Chillón MC, Santamaría C, García-Sanz R, Balanzategui A, María Eugenia S, Alcoceba M, *et al.* Long FLT3 internal tandem duplications and reduced PML-RAR α expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 2010; 95(5): 745-51.
- 10- Schnittger S, Weissner M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003; 102(8): 2746-55.
- 11- Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, *et al.* Quantitative realtimeRT-PCR analysis of PML-RAR α mRNA in acute promyelocytic leukemia : assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood* 2003; 101(7): 2521-8.
- 12- Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetic in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; (14)1: 19-47.
- 13- Kim YK, Kim HN, Lee SR, Ahn JS, Yang DH, Lee JJ, *et al.* Prognostic significance of nucleophosmin mutations and FLT3 internal tandem duplication in adult patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Korean J Hematol* 2010; 45(1): 36-45.
- 14- Wodnar-Filipowicz A. Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News Physiol Sci* 2003; 18: 247-51.
- 15- Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH, Rostami S, Jahani M, Hosseini R, *et al.* Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide without ATRA and/or chemotherapy. *Ann Oncol* 2006; 17(1): 131-4.
- 16- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13(12): 1901-1928.
- 17- Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzingler I, Sperr W, Le T, *et al.* Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J* 2002; 3(6): 283-9.
- 18- Kuchenbauer F, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukaemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 130(2): 196-202.
- 19- Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, *et al.* Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia* 2002; 16(11): 2185-9.
- 20- Yoo SJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Lee KH, Chi HS. Inferior prognostic outcome in acute promyelocytic leukemia with alterations of FLT3 gene. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(9): 1788-93.
- 21- Au WY, Fung A, Chim CS, Lie AK, Liang R, Ma ES. FLT-3 aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. *Br J Haematol* 2004; 125(4): 463-9.
- 22- Chillón MC, Fernández C, García-Sanz R, Balanzategui A, Ramos F, Fernández-Calvo J, *et al.* FLT3-activating mutations are associated with poor prognostic features in AML at diagnosis but they are not an independent prognostic factor. *Hematol J* 2004; 5(3): 239-46.
- 23- Beitinjaneh A, Jang S, Roukoz H, Majhail NS. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review. *Leuk Res* 2010; 34(7): 831-6.
- 24- Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, *et al.* Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005; 106(12): 3768-76.
- 25- Callens C, Chevret S, Cayuela JM, Cassinat B, Raffoux E, de Botton S, *et al.* Prognostic implication of FLT3 and Ras genemutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. *Leukemia* 2005; 19(7): 1153-60.
- 26- Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122(4): 523-38.
- 27- Mathews V, Thomas M, Srivastava VM, George B, Srivastava A, Chandy M. Impact of FLT3 mutations and secondary cytogenetic changes on the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with a single agent arsenic trioxide regimen. *Haematologica* 2007; 92(7): 994-5.

Original Article

Impact of FLT-3 mutations on clinical features and response to the therapy in acute promyelocytic leukemia patients

Rostami S.¹, Abroun S.¹, Noruzinia M.¹, Ghavamzadeh A.², Ali Moghaddam K.²

¹Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

FLT3 mutations are associated with poor outcome in acute myeloblastic leukemia (AML) patients. Only limited information is available about effects of FLT3 mutation on Acute Promyelocytic Leukemia (APL). We investigated the prevalence and impact of FLT3 mutations on the clinical characteristics and the response to treatment in APL patients treated with arsenic trioxide (As₂O₃).

Materials and Methods

Blood samples were collected from 115 untreated APL patients and genomic DNA was extracted by the salting-out method. FLT3-ITD and FLT3-D835 mutations were investigated by PCR-RFLP. Mann-Whitney U test and Chi-square were used for data analysis.

Results

FLT3-ITD and FLT3-D835 mutations were detected in 16 (14%) and 13 (11%) of the patients, respectively. Both mutations were identified in two patients, so overall frequency of FLT3 mutations was estimated to be 23.5%. Patients positive for FLT3-ITD mutation had a higher rate of white cell counts ($p=0.005$) and more frequent bcr3 type of PML/RARA fusion ($p=0.04$). We have not found any significant association between FLT3-D835 mutation and the clinical characteristics of patients. Between the group with FLT3 Mutations and the group without, there was no significant difference in response to therapy.

Conclusions

Complete remission induction with As₂O₃ may be independent of FLT3 mutation status, so As₂O₃ may be the first choice of APL especially in patients with FLT3 mutations. However, further studies on a large group of patients are necessary to confirm our findings.

Key words: Promyelocytic Leukemia, Acute, Genes, FLT3 protein, human, PML-RARalpha
Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 8(4): 242-250

Received: 19 Jun 2011

Accepted: 4 Sep 2011

Correspondence: Alimoghaddam K., MD. Hematologist and Oncologist. Associate Professor of Hematology, Oncology, and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Ave.
P.O.Box: 14114, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902662; Fax: (+9821) 88004140
E-mail: alimgh@ams.ac.ir