Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 35, No. 1, Spring 2025 ORIGINAL ARTICLE

Epigenetic silencing of DDIT3 gene and its relationship with imatinib resistance, disease progression and smoking status among patients with chronic myeloid leukemia

Maryam Foroutanjazi[1], Mohammad Hamid[2], Mitra Salehi[3], Mehrdad Hashemi[4,5]

[1] PhD Student, Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2] Associate Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Biology Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[4] Professor, Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[5] Professor, Farhikhtegan Medical Convergence Sciences Research Center, Farhikhtegan Hospital, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]

[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

Abstract

Background: The evolution of resistance to imatinib and disease progression are multifactorial events in *CML* patients. These events are not only determined by *BCR-ABL1* dependent pathway but also are involved a number of other genetic and epigenetic aberrations including DNA methylation. We aimed to investigate the role of DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3) gene methylation in relation to respose to imatinib, *CML* progression, and also investigate the impact of the smoking on methylation level.

Materials and methods: 50 *CML* patients at different clinical stages of the disease (including 20 good response and 30 non-mutated imatinib resistant patients) and 15 health control were recruited for methylation levels evaluation of promoter *DDIT3* gene by MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melt) analysis.

Results: There was significant difference in the mean (±standard deviation) of *DDIT3* methylation percentage between two response groups (63.8±17.79 vs 47.75±14.18, P=0.002). *DDIT3* promoter hypermethylation in 51-100% level indicated a higher risk for progression to advance phase (OR= 5.75; 95% CI: 1.40-23.49; P= 0.01) and imatinib resistance (OR= 8.5; 95% CI: 1.96-36.79; P= 0.004). Importantly, smokers were associated with a higher percentage of *DDIT3* methylation (OR= 11.8; 95% CI, 2.67-52.67; P=0.001).

Conclusion: Our findings indicated that hypermethylation of *DDIT3* gene is associated with imatinib resistance, *CML* progression and smoking. Further investigations on a more number is needed to confirm of these results that could be suggest as potential biomarker of disease progression and resistance to imatinib.

Keywords: *Chronic myeloid leukemia, DDIT3, Hypermethylation, Imatinib resistance, Smoke.*

Cited as: Foroutanjazi M, Hamid M, Salehi M, Hashemi M. Epigenetic silencing of DDIT3 gene and its relationship with imatinib resistance, disease progression and smoking status among patients with chronic myeloid leukemia. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(1): **14-23.**

Correspondence to: Mohammad Hamid
Tel: *+98 9122858058*
E-mail: hamid143@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0002-4625-0713
Received: 5 Jan 2024; **Accepted:** 22 Apr 2024

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴، صفحات ۱۴ تا ۲۳

Original Article

خاموشی اپی ژنتیکی ژن *DDIT3* و ارتباط آن با مقاومت به ایماتینیب، پیشرفت بیماری و وضعیت سیگار در بین بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن

مریم فروتن جزی[۱]، محمد حمید[۲]، میترا صالحی[۳]، مهرداد هاشمی[۴،۵]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳] استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
[۴] استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری پیشرفته، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران
[۵] مرکز تحقیقات علوم همگرای پزشکی فرهیختگان، بیمارستان فرهیختگان تهران، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *مقاومت به داروی ایماتینیب و پیشرفت بیماری حوادث چند عاملی در بیماران مبتلا به CML هستند که نه تنها توسط مسیر وابسته به BCR-ABL1 تعیین می‌شوند، بلکه شامل تعدادی از تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی دیگر از جمله متیلاسیون DNA نیز می‌شوند. هدف ما بررسی نقش متیلاسیون ژن DDIT3 (DNA-Damage-Inducible Transcript 3) در رابطه با پاسخ به ایماتینیب، پیشرفت CML و همچنین بررسی تأثیر سیگار بر سطح متیلاسیون بود.*

روش بررسی: *۵۰ بیمار CML در مراحل بالینی مختلف بیماری (۲۰ بیمار پاسخ خوب و ۳۰ بیمار مقاوم به ایماتینیب غیر جهش یافته) و ۱۵ کنترل سالم برای بررسی سطح متیلاسیون ژن DDIT3 بوسیله آنالیز MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melt) مورد مطالعه قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *تفاوت قابل توجهی در میانگین درصد متیلاسیون DDIT3 بین دو گروه پاسخ دهنده و مقاوم به دارو وجود داشت (۶۳/۸ درصد در مقابل ۴۷/۷۵ درصد؛ P=۰/۰۰۲). هایپر متیلاسیون پروموترِ ژن DDIT3 در سطح ۱۰۰-۵۱ درصد خطر بیشتری برای پیشرفت به فاز پیشرفته بیماری و مقاومت به ایماتینیب نشان داد. افراد سیگاری بادرصد بالاتری از متیلاسیون ژن DDIT3 همراه بودند.*

نتیجه‌گیری: *یافته های ما نشان داد که هیپرمتیلاسیون ژن DDIT3 با مقاومت ایماتینیب، پیشرفت CML و سیگار کشیدن همراه است. تحقیقات بیشتر روی تعداد بیشتری بیمار برای تأیید این نتایج مورد نیاز است که می تواند به عنوان نشانگر زیستی بالقوه پیشرفت بیماری و مقاومت به ایماتینیب پیشنهاد شود.*

واژگان کلیدی: *لوسمی میلوئید مزمن ، DDIT3، هایپرمتیلاسیون ، مقاومت به ایماتینیب، دود سیگار.*

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (CML) نوعی سرطان میلوپرولیفراتیو است و در نتیجه جابجایی متقابل کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ ایجاد می‌شود. حاصل این ترکیب پروتئین bcr-abl1 است که دارای فعالیت تیروزین کینازی مداوم است (۱،۲). ایماتینیب (IM; Imatinib mesylate) یا Glivec داروی خط اول و استاندارد طلایی برای درمان بیماران CML است، این دارو دمین تیروزین کینازی (Tyrosin Kinase Domain) پروتئین bcr-abl1 را هدف قرار می‌دهد، همچنین فعال شدن کیناز و انتقال سیگنال را مهار می‌کند (۳). درمان با ایماتینیب به طور

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دکتر محمد حمید
(**email**: hamid143@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0002-4625-0713
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۲/۳

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

قابل توجهی بقای بیماران را در دو سوم آنها افزایش داده است (۴،۳). علیرغم موفقیت درمان با ایماتینیب، مقاومت به ایماتینیب یک مشکل بالینی قابل توجه است و تقریباً ۴۰٪ از بیماران در نهایت در درمان با آن شکست خواهند خورد (۳). مقاومت به ایماتینیب یک رویداد چند عاملی در بیماران CML است و مکانیسم‌های مختلف مقاومت به ایماتینیب از جمله مسیرهای وابسته به BCR-ABL1 و مسیرهای مستقل BCR-ABL1 توضیح داده شده‌اند (۵،۶). جهش‌های نقطه‌ای در دومین کینازی به عنوان مکانیسم وابسته به BCR-ABL1 به طور کلی یکی از دلایل مقاومت به IM هستند (۷). پیش از این، نقش جهش در دمین تیروزین کینازی ژن BCR-ABL درایجاد مقاومت به ایماتینیب درمیان بیماران ایرانی مبتلا به CML گزارش شد و نشان داده شد که جهش تنها عامل ایجاد مقاومت نیست (۸). مکانیسم‌های اپی ژنتیکی مستقل از ژن BCR-ABL1 وجود دارد که به مقاومت ایماتینیب کمک میکنند و ممکن است به عنوان عوامل بالقوه در بیماران مقاومی که جهش ندارند باشند (۹). دلایل محکمی وجود دارد که نشان می دهد پاسخ دارویی و نتایج بالینی بیماری CML به تنهایی توسط ژن BCR-ABL1 تعیین نمی‌شود، بلکه شامل تعدادی دیگر از انحرافات ژنتیکی و اپی ژنتیکی است که در تنظیم میزان بالای تکثیر و پیشگیری از آپوپتوز نقش اساسی دارند (۱۰). اهمیت اپی ژنتیک در ایجاد انواع سرطان‌های انسانی، به ویژه لوسمی‌ها، در دهه اخیر به رسمیت شناخته شده است (۱۰،۱۱). خاموشی اپی ژنتیک توسط متیلاسیون DNA در نواحی CpG پروموتر ژن‌های مختلف، رونویسی ژن را مهار می کند که منجر به کاهش بیان پروتئین می‌شود (۹). هایپر متیلاسیون چندین ژن از جمله ژن‌های سرکوبگر تومور شناسایی شده است که از طریق تأثیر بر رشد طبیعی سلول‌ها در سرطان‌زایی نقش دارند. علاوه بر این، متیلاسیون غیرطبیعی DNA با تشکیل کلون های لوسمیک مقاوم به مهارکننده های تیروزین کیناز مرتبط بوده و به عنوان علت پیشرفت CML در نظر گرفته شده است (۱۲). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که هیپرمتیلاسیون چندین ژن ممکن است در پیشرفت بیماری و ایجاد مقاومت به ایماتینیب در CML نقش داشته باشند (۱۵-۱۳). ژن DDIT3: DNA-Damage-Inducible Transcript 3)، همچنین به نام C/EBPζ (CCAAT/enhancer binding Protein zeta) یک ژن سرکوبگر تومور است در همه جا بیان شده و می‌تواند توسط آسیب به DNA ، هیپوگلیسمی, تشعشع و استرس سلولی القا شود. ۵ عضو دیگر این خانواده پروتئینی هم نقش مهمی در تکثیر سلولی و تمایز سلولهای هماتوپوئتیک دارند (۱۴) مطالعات متعددی نقش DDIT3در تنظیم رشد سلولی و تمایز را تایید کردند. افزایش بیان رونوشت DDIT3 موجب القای افزایش آپوپتوز سلول‌های میلوئیدی و مهار سلول‌ها در مرحله پیشرفت از فاز G1 به فاز S می‌شود (۱۴). در مطالعه‌ای توسط Qian و همکارانش نشان داده شده است که سطح رونوشت DDIT3 در سلولهای میلوئید کاهش بیان دارند (۱۶). در بررسی سطح متیلاسیون ژن DDIT3 در مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML; Acute myloied leulemia) هیچ متیلاسیونی مشاهده نشد (۱۷)، اما در مطالعه دیگری بر روی بیماران مبتلا به سندرم میلودیسپلاستیک، متیلاسیون غیر عادی ژن DDIT3 در ۳۱/۸درصد از بیماران آنالیز شده مشاهده شد (۱۸). از آنجایی که مطالعات کمی برای ارزیابی سطح متیلاسیون ژن DDIT3 در بیماران CML صورت گرفته است، بنابر این هدف در مطالعه حاضر ارزیابی وضعیت و نقش متیلاسیون غیر عادی پروموتر ژن DDIT3 در ارتباط باپاسخ ایماتینیب و پیشرفت بیماری بود. ما همچنین برای اولین بار همراهی دود سیگار را با سطح متیلاسیون ژن DDIT3 در بیماران CML ارزیابی کردیم.

مواد و روشها

جمعیت مورد مطالعه

نمونه خون محیطی از ۵۰ بیمار لوسمی میلوئیدی مزمن یا *CML* با *BCR-ABL1* مثبت یا Ph^+ (شامل ۲۰ نفر از بیماران پاسخگو به درمان و ۳۰ نفر مقاوم به درمان و بدون جهش) با میانگین سنی ۴۵/۲۷ سال و ۱۵ کنترل سالم شامل ۷ زن و ۸ مرد (۴۶/۷ درصد زن و ۵۳/۳ درصد مرد) با میانگین سنی ۴۶/۴۷ سال بدون سابقه ابتلا به سرطان یا هر بیماری مزمن دیگری برای آنالیز درصد متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* بوسیله متد HRM (Methylation Sensitive- High Resolution Melting) MS- انتخاب شدند. معیار کلی ورود بیماران به این مطالعه،وجود کروموزوم فیلادلفیا +Ph و ژن ترکیبی BCR-ABL و مصرف داروی ایماتینیب با حداقل دوز ۴۰۰ میلی گرم در روز بود. علاوه بر اینها شرط ورود بیماران مقاوم به درمان محرز بودن مقاومت با تشخیص پزشک هماتولوژیست- انکولوژیست و با توجه به نتایج آزمایشات مولکولی و سیتوژنتیکی بر اساس پروتکل استاندارد ELN بود. در این مطالعه به منظور حذف متغیر مداخله‌گر موثر در ایجاد مقاومت به دارو یعنی جهش‌ها در دمین کینازی،

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

بیماران مقاوم به درمان که قبلا در طی انجام آنالیز موتاسیونی فاقد جهش شناخته شده بودند، وارد مطالعه شدند. در مجموع ۳۵ نفراز بیماران در فاز مزمن (CP; Chronic phase) ۱۲ نفر در مرحله تسریع (AP; Accelerate phase) و ۳ نفر در مرحله بلاستیک (BP; Blastic phase) بودند. معیار ورود افراد کنترل به مطالعه عدم سابقه ابتلا به سرطان یا هر بیماری مزمن دیگری بود. این مطالعه توسط کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران تایید شد (کد اخلاق شماره IR.PII.REC.1397.56) و همچنین پیش از نمونه گیری رضایت نامه کتبی از بیماران جهت شرکت در مطالعه گرفته شد. بیماران برای حداقل ۱۸ ماه با ایماتینیب (دز ۸۰۰-۴۰۰ میلی گرم در روز) بعنوان اولین خط درمانی درمان شدند. مدت پیگیری بیماران بعد از درمان ایماتینیب ۴۸ ماه بود. بیماران به دو گروه مقاوم به ایماتینیب و پاسخ دهنده خوب به دارو بر اساس پاسخ سیتوژنتیکی یا مولکولی آنها مطابق با معیارهای شبکه لوسمی اروپا ۲۰۱۳ (ELN) دسته بندی شدند (۱۹). با توجه به این معیار ارزیابی بیماران مقاوم به صورت فقدان پاسخ مولکولی ماژور تا ۱۸ ماه و یا پاسخ سیتوژنتیکی کامل تا ۱۲ ماه بعد از شروع درمان تعیین شدند (۱۹). بیماران مقاوم انتخابی هیچ موتاسیونی در دمین کینازی ژن *ABL1* نداشتند، به طوری که قبلا آنالیز شدند (اطلاعات آنالیز نمایش داده نشده است). اطلاعات بالینی بیماران از نظر سن، جنس و وضعیت سیگار جمع آوری و ثبت شدند. افراداز نظر وضعیت سیگار به دو گروه سیگاری و غیر سیگاری تعریف شدند. ۱- افراد سیگاری (Smoker): افرادی که از چند نخ سیگار تا یک بسته سیگار در روز مصرف می‌کردند و یا در معرض دود سیگار بودن؛ ۲- افراد غیر سیگاری (Non smoker): افرادی که هرگز سیگار مصرف نکردند. از ۱۵فرد کنترل سالم ۶ فرد سیگاری و ۹ فرد غیرسیگاری بودند و از طرفی بیماران شامل ۲۶/۵۰ سیگاری و ۲۴/۵۰ غیر سیگاری بودند.

استخراج DNA و بی سولفیته کردن نمونه‌ها

DNA ژنومی از خون محیطی به میزان ۴ میلی لیتر از بیماران مبتلا به *CML* و افراد سالم با استفاده از روش Salting out استخراج شد (۲۰). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد و کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانو دراپ با نسبت 260/280 توسط نانودراپ (شرکت BioTek Epoch) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان غلظت مناسب با بی سولفیت سدیم با استفاده از کیت متیلاسیون DNA EZ (Zymo Reaserch ،ایالات متحده آمریکا) بر اساس پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. از کنترل DNA کاملاً متیله (۱۰۰٪) و کاملاً غیر متیله (۰٪) یونیورسال و بی سولفیت شده استفاده شد (DNA کنترل EpiTect کنترل متیله و غیر متیله شرکت کیاژن). یک سریال از رقت متفاوت متیلاسیون در نسبت‌های گرادیان (۱۰ ٪، ۲۵ ٪، ۵۰ ٪، ۷۵ ٪) تهیه و به عنوان استانداردهای کنترل DNA با سطوح مختلف متیلاسیون مورد استفاده قرار گرفت. این استانداردهای DNA در هر آزمایش تجربی برای ایجاد منحنی های استاندارد گرادیان گنجانده شد. از این منحنی‌ها برای ارزیابی درصد متیلاسیون بیماران و نمونه‌های نرمال استفاده شد. طبق پروتکل سازنده تبدیل بی سولفیت فرآیندی است که شامل مجموعه‌ای از واکنش های شیمیایی است که منجر به تبدیل سیتوزین های متیله نشده به اوراسیل می شود، در حالی که سیتوزین های متیله تغییر نمی کنند. یک اوراسیل با یک تیمین در طی PCR جایگزین می شود. وضعیت متیلاسیون DDIT3 توسط MS-HRM تجزیه و تحلیل شد.

تکنیک MS-HRM

تجزیه و تحلیل متیلاسیون پروموتر DDIT3 توسط MS-HRM

DNA تیمار شده با بی سولفیت با استفاده از یک جفت آغازگر طراحی شده برای تکثیر آلل های متیله و غیر متیله پروموتر تحت واکنش MS- HRM قرار گرفت. پرایمرهای MS-HRM با استفاده از برنامه آنلاین مت پرایمر ورژن V2.0 (www.urogene.org, chinese academyof Medical Science) طراحی شدند. طراحی پرایمر بر اساس استانداردهای پیشنهادی Wojdacz و همکاران بود (۲۱). توالی پرایمرهای طراحی شده برای پروموتر ژن *DDIT3* در مطالعه طبق جدول ۱ بود.

جدول۱. توالی پرایمرهای ژن *DDIT3*

نام ژن		توالی پرایمر 3´ ⟵ 5´
DDIT3	Forward	GTGTAGATATCGGTTGTTAAATATTG
	Reverse	GAACCCGAAAATAACTTTAAATC

پرایمرها قبل از سنتز با استفاده از ابزار Bisearch (http://bisearch.enzim.hu) بلاست شدند. تجزیه و تحلیل MS-HRM و تکثیر DNA بیسولفیت شده توسط دستگاه Step one plus real time PCR system (Applied Biosystem, USA) انجام شد. داده های HRM توسط نرم افزار High Resolution Melt Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. حجم کلی واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر بود که شامل مخلوط 5X HOT FIREPOL EvaGreen HRM (noROX) (Solis Biodyne Co, Estonia) ۲۰۰ نانومولار از هر آغازگر، ۲۰ نانوگرم DNA بی سولفیت شده و آب فاقد DNase و RNase (شرکت سینا کلون

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

ایران) برای رساندن حجم نهایی واکنش به ۱۰ میکرولیتر بود. شرایط PCR به صورت زیر تنظیم شد:

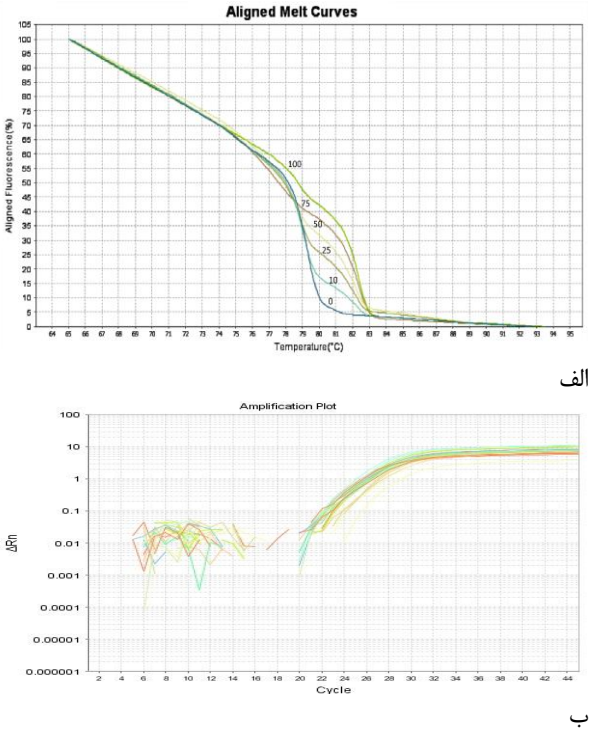
دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ دقیقه، ۴۵ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه. تکثیر PCR با تشکیل هترودوپلکس در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و سپس در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه دنبال شد. پس از این مرحله، آنالیز HRM با افزایش ۰/۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد و دما به مدت ۱۵ ثانیه با هر افزایش حفظ شد. افزایش دما از ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تأیید صحت و تکرارپذیری، هر واکنش بصورت دوپلیکیت انجام شد. در هر ران آزمایش کنترل منفی (فاقد نمونه الگو) و کنترل‌های سریالی (۰٪، ۱۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۱۰۰٪) در واکنش وارد شدند. برای ایجاد نمودار تفاوت از داده‌های MS-HRM استفاده شد. دمای اتصال پرایمرها برای به دست آوردن حداکثر غلظت ۵۰٪ تنظیم شد تا فقدان هر گونه سوگیری به سمت الگوی متیله یا غیر متیله ثابت شود. منحنی ذوب تراز شده (Aligned melt curve) با در نظر گرفتن ۰٪ به عنوان واحد فلورسنت نسبی مرجع، با استفاده از نرم افزار Step one plus HRM ایجاد شد. نمودار تکثیر پروموتر ژن در نمونه‌ها و منحنی‌های ذوب استاندارد برای تمام سطوح کنترل متیلاسیون (۰٪، ۱۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۱۰۰٪) ترسیم شد (شکل۱ الف و ب) . تجزیه و تحلیل MS-HRM بر اساس مقایسه پروفایل های ذوب نمونه‌ها با پروفایل های ذوب از DNA نمونه هایی با درصد متیلاسیون شناخته شده برای کنترل های متیلاسیون انجام شد.

رعایت اصول اخلاقی

این مطالعه با گرنت و کد شماره ۱۰۳۳ و کد اخلاقی IR.PII.REC.1397.56 به تایید انستیتو پاستور ایران رسیده است.

تحلیل آماری

مقایسه توزیع میانگین ویژگی‌های دموگرافیکی‌برای متغیرهای کیفی و کمی با استفاده از مربع کای دو، Exact Fisher test و t- test به ترتیب انجام شد. تست رگرسیون لجستیک برای ارزیابی ارتباط بین سطوح متیلاسیون پروموتر *DDIT3* و ریسک مقاومت به ایماتینیب، پیشرفت بیماری در بیماران *CML* بوسیله محاسبه OR (Odds ratio) و ۹۵٪ فاصله اطمینان بکار برده شد. همه آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ (IBM Corporation) انجام شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ >P در نظرگرفته شد.



شکل ۱. نمودار تکثیر پروموتر ژن *DDIT3* در بیماران و کنترل ها (الف). منحنی ذوب نرمالیز شده کنترلهای استاندارد (ب)

یافته‌ها

پروفایل بالینی بیماران

۵۰ بیمار *CML* (۳۰ بیمار مقاوم فاقد جهش و ۲۰ بیمار پاسخگو به دارو) و ۱۵ فرد کنترل سالم برای ارزیابی سطح متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* بررسی شدند. مقایسه میانگین سنی و جنسی و وضعیت سیگار بیماران و کنترل‌های سالم نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر سن و جنس و از نظر وضعیت سیگار بین بیماران و کنترل‌ها وجود نداشت و لذا همسان سازی بین آنها حاصل شده است (میانگین±انحراف معیار ۳/۰۱±۴۵/۲۷ برای بیماران و ۴۷/۷۴±۴۶/۱۱ برای افراد کنترل، P>۰/۰۵؛ نسبت مرد به زن در بیماران ۲۷ به ۲۳ و در افراد کنترل ۸ به ۷، P>۰/۰۵؛ تفکیک بیماران از نظر سیگار ۲۶/۵۰ سیگاری و ۲۴/۵۰ غیر سیگاری و در افراد کنترل سالم ۶/۱۵ سیگاری و ۹/۱۵ غیر سیگاری بودند، P> ۰/۰۵).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

جدول۲. ویژگی‌های بالینی بیماران

ویژگی‌های بالینی	مقاوم به ایماتینب	پاسخگو به ایماتینیب	P-value
افراد	۳۰(۶۰)**	۲۰(۴۰)	۰/۵
جنس (مرد/زن)	(۴۳/۳۳)۱۳/(۵۶/۶۷)۱۷	(۵۰)۱۰/(۵۰)۱۰	
سن (سال)	۴۳/۱۴ ±۱۴/۴۳§	۴۷/۴ ± ۱۶/۴۱	۰/۴۱
فاز بیماری			
Chronic	۱۵(۵۰)	۲۰ (۱۰۰)	۰/۰۰۰۶
Accelerate	۱۲(۴۰)	۰	۰/۰۷
Blastic crisis	۳ (۱۰)	۰	
وضعیت سیگار			
سیگاری	۲۰(۶۶/۶۷)	۶(۳۰)	۰/۰۱
غیرسیگاری	۱۰(۳۳/۳۳)	۱۴(۷۰)	
مدت زمان بررسی	۴۸±۱۶/۲۴	۴۵±۱۲/۳	۰/۴۹
میزان متیلاسیون پروموتر ژن DDIT3	۶۳/۸±۱۷/۷۹	۴۷/۷۵±۱۴/۱۸	۰/۰۰۲

* سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ است؛ ** تعداد (درصد)؛ § میانگین±انحراف معیار

جدول۳. مقایسه فراوانی درصد متیلاسیون ژن DDIT3 در بین گروه‌های سالم و بیمار و بین بیماران مقاوم و پاسخگو به ایماتینیب

سطح متیلاسیون ژن DDIT3 (%)	کنترل سالم (n=۱۵)	بیماران (n=۵۰)	P-value	مقاوم به ایماتینیب (n=۳۰)	پاسخگو (n=۲۰)	P-value
۰-۱۰	۴	۰	۰/۰۰۲**	۰	۰	۱
۲۵-۴۹	۵	۱۰	۰/۲۹	۳	۷	۰/۰۸
۵۰-۷۴	۶	۱۹	۰/۸۷	۹	۱۰	۰/۱۳
۷۵-۱۰۰	۰	۲۱	۰/۰۰۱**	۱۸	۳	۰/۰۰۲**

* سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ است

ویژگی‌های بالینی شامل سن، جنس، مدت زمان بررسی و پیگیری بیماران، فاز بیماری، وضعیت سیگار و سطح متیلاسیون بین بیماران پاسخگو و غیر پاسخگو مقایسه شدند. تفاوت معنی‌داری در مورد میانگین سن، جنس و زمان پیگیری بین دو گروه پاسخ وجود نداشت (P>۰/۰۵)، در حالی که برای فاز بیماری، وضعیت سیگار و سطح متیلاسیون بین دو گروه تفاوت معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۲، P= ۰/۰۱، P=۰/۰۰۰۶) (جدول ۲).

فراوانی سطح متیلاسیون غیر عادی ژن *DDIT3*

در این مطالعه آنالیز MS-HRM با حساسیت بالا و بدون هیچ سوگیری به سمت الگوی متیله یا غیر متیله انجام شد. در شکل ۱ ب و شکل ۲ منحنی ذوب نرمالایز شده را به صورت پیک‌های کاملا متمایز و مشخص برای تمام کنترل-های سریالی استاندارد ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد متیله و هم چنین برای کنترل‌های سریالی مذکور و نمونه بیمار S به ترتیب نشان می‌دهد. آنالیز متیلاسیون طبق جدول ۳ نشان داد که سطح متیلاسیون ژن *DDIT3* در گروه بیماران محدوده بین ۱۰۰-۲۵ درصد و در گروه کنترلهای سالم بین ۷۴-۰ درصد بود. در دسته ۱۰-۰ و ۱۰۰-۷۵ درصد تفاوت معنی‌داری در فراوانی سطح متیلاسیون ژن *DDIT3* بین بیماران و کنترل‌های سالم وجود داشت (P< ۰/۰۵). از طرفی در مقایسه بین دو گروه پاسخگو و غیر پاسخگو برای سطوح مختلف متیلاسیون در دسته ۱۰۰-۷۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که تعداد بیماران مقاوم با سطح متیلاسیون بالای ۷۴ درصد بیشتر از بیماران پاسخگو بود (P=۰/۰۰۲). هیچ کدام از بیماران درصد متیلاسیون ۲۴-۰ درصد و همچنین هیچ کدام از کنترل‌های سالم متیلاسیون ۱۰۰-۷۵ درصد را نشان ندادند (جدول ۳).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

جدول۴. ارتباط بین میزان متیلاسیون ژن DDIT3 و پاسخ به ایماتینیب و پیشرفت بیماری در میان بیماران CML

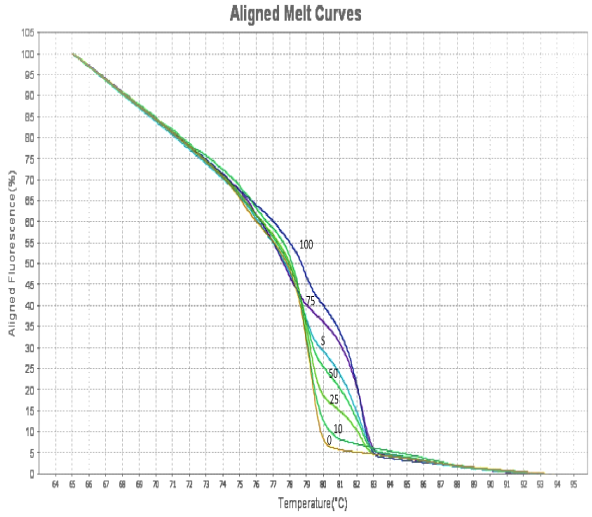
متیلاسیون ژن DDIT3 (%)	مقاوم به ایماتینیب (n=30)	بیماران پاسخگو (n=20)	سطح معنی داری	نسبت شانس	۹۵ درصد فاصله اطمینان
۵۰-۲۵	(۴۰) ۱۲**	٪۸۵(۱۷)	-	Reference	
۱۰۰-۵۱	٪۶۰(۱۸)	٪۱۵(۳)	۰/۰۰۴	۸/۵	۳۶/۷۹-۱/۹۶
متیلاسیون ژن DDIT3 (%)	فاز بلاست+فاز شتاب (n=۱۵)	فاز مزمن (n=۳۵)			
۵۰-۲۵	٪ ۲۶/۶۷(۴)	٪ ۸۰(۲۸)	-	Reference	
۱۰۰-۵۱	٪ ۷۷/۳۳(۱۱)	٪ ۲۰(۷)	۰/۰۰۱	۵/۷۵	۲۳/۴۹- ۱/۴۰

*سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ می باشد. ** تعداد (درصد)

جدول۵. ارتباط بین سیگار با میزان متیلاسیون ژن DDIT3

متیلاسیون ژن ٪DDIT3)	سیگاری (N=)۲۶	غیر سیگاری (N=)۲۴	سطح معنی داری	نسبت شانس	۹۵ ٪ فاصله اطمینان
۵۱-۱۰۰	(۶۹/۲۳) ۱۸**	٪ ۱۲/۵(۳)	۰/۰۰۱	۱۱/۸	(۵۲/۶۷-۲/۶۷)
۲۵-۵۰	٪ ۳۰/۷۷(۸)	٪ ۸۷/۵(۲۱)			

*سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵می باشد؛ ** تعداد (درصد)



شکل ۲. منحنی ذوب نرمالایزشده متیلاسیون ژن DDIT3 . منحنی کنترلهای استاندارد صفر،۱۰،۲۵، ۵۰، ۷۵ و۱۰۰ درصد و یک نمونه بیمار S با درصد متیلاسیون ۷۵-۵۰ درصد (منحنی آبی روشن)

همراهی بین سطح متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* و پاسخ به ایماتینیب

در این مطالعه سطح متیلاسیون ناحیه پروموتر ژن DDIT3 در بیماران CML محدوده بین ۱۰۰-۲۵ درصد بود و ۸۵ درصد بیماران پاسخگو به ایماتینیب دارای سطح متیلاسیون ۵۰-۲۵ درصد بودند. بنابراین جهت ارزیابی تفاوت سطح متیلاسیون بین بیماران مقاوم وبیماران پاسخ خوب، سطح متیلاسیون به دو دسته ۵۰-۲۵ و ۱۰۰-۵۱ درصد تقسیم شد. دسته ۱۰۰-۵۱ درصد به عنوان DDIT3 hypermethylated در نظر گرفته شد (۵۰ درصد بعنوان نقطه برش یا Cut off point) آنگاه درصدها مقایسه شدند. جدول ۴ نشان داد که تفاوت معنی‌داری در درصد متیلاسیون۱۰۰-۵۱ بین دو گروه مقاوم و پاسخگو به ایماتینیب وجود داشت. به عبارت دیگر هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن DDIT3 در سطح ۱۰۰-۵۱ درصد یک ریسک بالاتر(۸/۵ برابر) برای بیماران مقاوم نشان داد (OR=۸/۵، ۹۵درصد فاصله اطمینان ۳۶/۷-۱/۹۶؛ P=۰/۰۰۴) (جدول ۴).

همراهی بین سطح متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* و پیشرفت بیماری

در این مطالعه، هایپرمتیلاسیون پروموتر DDIT3 بطور معنی داری در بیماران با فاز پیشرفته بیماری بیشتر از فاز کرونیک بود (۷۷/۳۳ در مقابل ۲۰ درصد، P=۰/۰۰۱). جدول ۴ نشان می دهد که تفاوت معنی‌داری در سطح متیلاسیون ۱۰۰-۵۱ درصد بین بیماران کرونیک و پیشرفته بیماری وجود دارد، به عبارتی هایپرمتیلاسیون پروموتر DDIT3 در سطح ۱۰۰-۵۱ درصد خطر بالاتری (۵/۷۵ برابر) برای پیشرفت به فازهای تسریع و بلاستیک نشان می‌دهد (OR=۵/۷۵، ۹۵درصد فاصله اطمینان ۴۹/۲۳-۱/۴؛ P=۰/۰۰۱) (جدول ۴).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

همراهی بین هایپر متیلاسیون پروموتر ژن DDIT3 و سیگار

در این مطالعه وضعیت سیگار بین دو گروه مقاوم به ایماتینیب و گروه پاسخگو تفاوت معنی‌داری داشت و تعداد افراد سیگاری در گروه مقاوم به دارو بیشتر از گروه پاسخگو بود (جدول ۲). طبق جدول ۵ نیز همراهی معنی‌داری بین سیگار و هایپرمتیلاسیون ژن DDIT3 وجود داشت. ریسک هایپرمتیلاسیون در میان سیگاری‌ها به طور معنی‌داری ۳/۷ برابر بالاتر از گروه غیر سیگاری بود (OR=۱۱/۸، ۹۵درصد فاصله اطمینان ۵۲/۶۷-۲/۶۷؛ P=۰/۰۰۱) (جدول۵).

بحث

بیماری *CML* از نظر ژنتیکی در فاز اولیه یک بیماری هموژنوس است، اما مکانیسم ترانسفورماسیون از فاز CP به فاز BC و پاسخ به درمان هتروژنوس است (۱۰). این هتروژنیتی به حوادث مولکولی مانند مکانیسم‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی مانند موتاسیون‌های ژن *ABL1*، متیلاسیون CpGهای پروموتر ژن‌ها و تغییرات هیستونی نسبت داده می‌شود (۲۲). شواهد محکم و متعددی وجود دارد که تغییرات اپی ژنتیکی مانند DNA متیلاسیون به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم در کنترل بیان ژن، به مقاومت درمان در بیماران *CML* مربوط می‌شود که منجر به انتشار کلون‌های مقاوم لوکمیک و پیشرفت بیماری می‌شود (۱۲). در مطالعه حاضر ما همراهی متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* را با مقاومت به ایماتینیب و پیشرفت بیماری نشان دادیم و علاوه بر این همراهی دود سیگار با هایپرمتیلاسیون ژن *DDIT3* را به عنوان یک یافته جدید برای اولین بار نشان دادیم. یافته های ما نشان داد که هایپر متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* در سطح ۱۰۰-۵۱ درصد با ریسک بالاتر (۸/۵ برابر) مقاومت به ایماتینیب همراه است. به نظر می‌رسد این یافته یک روش جایگزین آنالیز موتاسیون‌های ژن *ABL1* برای ارزیابی پاسخ به درمان در بیماران *CML* فراهم می‌کند. در تنها مطالعه بررسی متیلاسیون ژن مذکور روی بیماران *CML* که توسط Wang و همکارانش صورت گرفت گزارش شد که تفاوت معنی‌داری در سطح ترانسکریپت *BCR-ABL1* بین دو گروه متیله و غیرمتیله وجود نداشت، به عبارتی تفاوتی از نظر سطح پاسخ به درمان وجود نداشت. در مطالعه Wang و همکارانش فراوانی متیلاسیون ژن *DDIT3* در ۶۶ درصد از بیماران یافت شد، در حالی که در هیچ کنترل سالمی وجود نداشت (۱۴). در تایید این یافته در مطالعه دیگری برای بررسی متیلاسیون ژن *DDIT3* توسط Lin و همکارانش روی بیماران سندرم میلودیسپلاستیک (MDS) ۳۱/۸ درصد هایپرمتیلاسیون در بیماران و هیچ متیلاسیونی در کنترل‌ها گزارش شد (۱۸). در مطالعه حاضر متیلاسیون پروموتر ژن مذکور در بیماران و کنترل‌ها گزارش شد، اما فراوانی هایپرمتیلاسیون ژن *DDIT3* (سطح ۱۰۰-۵۰ درصد) در ۸۰ درصد بیماران و ۴۰ درصد کنترل‌ها یافت شد و تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در این مطالعه بین هایپرمتیلاسیون ژن *DDIT3* با پیشرفت بیماری به فاز AP و BC ارتباط قوی و معنی‌داری وجود داشت، به طوری که هایپرمتیلاسیون ژن مذکور در میان بیماران با فازهای AP وBC در حدود ۵/۷ برابر بیشتر از بیماران با فاز مزمن بیماری بود. با توجه به این یافته مطالعه ما پیشنهاد می‌کند که متیلاسیون پروموتر ژن*DDIT3* ممکن است در فازهای مختلف تکامل بیماری اتفاق بیافتد. این یافته در دیگر مطالعات گزارش نشده است و فقط در مطالعه Wang و همکارانش هیچ همراهی بین فراوانی هایپرمتیلاسیون ژن *DDIT3* و فازهای مختلف بیماری یافت نشد (۱۴). مطالعات بیشتر روی تعداد بیشتری از بیماران برای کشف نقش متیلاسیون ژن *DDIT3* روی پیشرفت بیماری *CML* مورد نیاز است.

در مطالعه حاضر وضعیت سیگار بین بیماران مقاوم به ایماتینیب و بیماران با پاسخ خوب مقایسه شد و تفاوت معنی-داری بین دو گروه وجود داشت. ما همچنین ارتباط سطح متیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* را با سیگار برای اولین بار ارزیابی کردیم. همراهی معنی‌داری بین سیگار و هایپرمتیلاسیون ژن مذکور وجود داشت. ریسک هایپرمتیلاسیون در میان سیگاری‌ها به طور معنی‌داری بالاتر از غیر سیگاری‌ها بود. فاکتورهای محیطی مانند سیگار بسته به زمان در معرض قرار گرفتن مثلا دوره قبل از تولد یا دوره بزرگسالی می‌توانند اثرات مختلفی روی متیلاسیون DNA داشته باشند. به طور خاص دود سیگار به عنوان یک فاکتور محیطی و هشدار جدی سلامت در دنیا چه در مورد سیگاری-های کنونی و چه در دوره جنینی به عنوان یک تنظیم کننده قوی متیلاسیون DNA مطرح است. بنابراین متیلاسیون DNA رابط مکانیکی بالقوه‌ای بین سیگاری‌های کنونی و سرطان و همچنین بین جنین‌های در معرض دود سیگار و تکامل بیماریهای مزمن در بزرگسالی است (۲۳). تغییرات اپی ژنتیکی حاصله توسط دود سیگار عمدتا با غیرفعال شدن آنزیم‌هایی که این تغییرات ژنتیکی را تنظیم می‌کنند ایجاد

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]
[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

می‌شوند و موجب بیان چندین ژن التهابی می‌شوند. در واقع واکنشهای التهابی القا شده بوسیله دود سیگارممکن است موجب تغییر الگوی متیلاسیون شوند. آنزیم‌های مورد اشاره مانند *DNMT1* که در سلولهای پرولیفراتیو عرضه میشوند مسئول حفظ مادام العمر متیلاسیون DNA در طول تقسیم سلولی هستند (۲۴). به طور خلاصه نتایج این مطالعه نشان داد که هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* با مقاومت به ایماتینیب و پیشرفت بیماری مرتبط است. علاوه بر این ما نتیجه گرفتیم که هایپر متیلاسیون ژن *DDIT3* در افراد سیگاری بیشتر از افراد غیرسیگاری بود. به نظر می‌رسد که مطالعات بیشتر برای تایید نتایج این مطالعه و پیشنهاد هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن *DDIT3* بعنوان یک بیومارکر اپی‌ژنتیکی بالقوه مقاومت به درمان و پیشرفت بیماری مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

از کلیه بیماران شرکت کننده به دلیل همکاری و مساعدت در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می کنیم. این پژوهش با حمایت انستیتو پاستور ایران (شماره گرنت ۱۰۳۳) انجام شد.

REFERENCES

1. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. Haematologica 2016;101:541–58.

2. Benchikh S, Bousfiha A, El Hamouchi A, Soro SGC, Malki A, Nassereddine S. Chronic myeloid leukemia: cytogenetics and molecular biology's part in the comprehension and management of the pathology and treatment evolution. Egypt J Med Hum Genet 2022;23:1-13.

3. Rostami G, Assad D, Ghadyani F, Hamid M, Karami A, Jalaeikhoo H, et al. Influence of glutathione S-transferases (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) genetic polymorphisms and smoking on susceptibility risk of chronic myeloid leukemia and treatment response. Mol Genet Genomic Med 2019;7:e00717.

4. Adnan Awad S, Kankainen M, Ojala T, Koskenvesa P, Eldfors S, Ghimire B, et al. Mutation accumulation in cancer genes relates to nonoptimal outcome in chronic myeloid leukemia. Blood Adv 2020;4:546-59.

5. Mohammadi F, Shafiei M, Assad D, Rostami G, Hamid M, Foroughmand AM. Impact of ABCB1 Gene Polymorphisms and Smoking on the Susceptibility Risk of Chronic Myeloid Leukemia and Cytogenetic Response. Iran Biomed J 2021;25:54-61.

6. Wu W, Xu N, Zhou X, Liu L, Tan Y, Luo J, et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated gene mutations in chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to tyrosine kinase inhibitor. Onco Targets Ther 2020;13:8581-8591.

7. Ernst T, La Rosée P, Müller MC, Hochhaus A. BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2011; 25: 997–1008.

8. Rostami G, Hamid M, Yaran M, Khani M , Karimipoor M. Incidence and clinical importance of BCR-ABL1 mutations in Iranian patients with chronic myeloid leukemia on imatinib. J Hum Genet 2015; 60: 253–258.

9. Elias MH, Baba AA, Husin A, Sulong S, Hassan R, Sim GA, et al. HOXA4 gene promoter hypermethylation as an epigenetic mechanism mediating resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. Biomed Res Int 2013;2013.

10. Guru SA, Sumi MP, Mir AR, Beg MMA, Saxena A. Aberrant hydroxymethylation in promoter CpG regions of genes related to the cell cycle and apoptosis characterizes advanced chronic myeloid leukemia disease, poor imatinib respondents and poor survival. BMC Cancer 2022; 22:1-15.

11. Yang X, Wong MPM, Ng RK. Aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia and its clinical implications. Int J Mol Sci 2019;20:4576.

12. Amabile G, Di Ruscio A, Müller F, Welner RS, Yang H, Ebralidze AK, et al. Dissecting the role of aberrant DNA methylation in human leukaemia. Nat Commun 2015;6:1-10.

13. Jelinek J, Gharibyan V, Estecio MR, Kondo K, He R, Chung W, et al. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. PLoS One 2011;6:e22110.

14. Wang Y-l, Qian J, Lin J, Yao D-m, Qian Z, Zhu Z-h, et al. Methylation status of DDIT3 gene in chronic myeloid leukemia. J Exp Clin Cancer Res 2010;29:54.

15. Radin D, Hamid M, Kargar M, Jafarinia M. Hypermethylation of HOXA4 Gene Promoter and Its Potential Association with Disease Progression, Imatinib Resistance, High Sokal Score Risk, and Smoking among Chronic Myeloid Leukemia Patients. Russ J Genet 2023;59:S199-207.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]

[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]

16. Qian J, Chen Z, Lin J, Wang W, Cen J. Decreased expression of CCAAT/enhancer binding protein ζ (C/EBPζ) in patients with different myeloid diseases. Leuk Res 2005;29:1435-41.

17. Musialik E, Bujko M, Kober P, Grygorowicz MA, Libura M, Przestrzelska M, et al. Comparison of promoter DNA methylation and expression levels of genes encoding CCAAT/enhancer binding proteins in AML patients. Leuk Res 2014;38:850-6.

18. Lin J, Wang Y-l, Qian J, Yao D-m, Zhu Z-h, Qian Z, et al. Aberrant methylation of DNA-damage-inducible transcript 3 promoter is a common event in patients with myelodysplastic syndrome. Leuk Res 2010;34:991-4.

19. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European Leukemia Net recommendations for the Management of chronic myeloid leukemia. Blood 2013;122:872-884.

20. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.

21. Wojdacz TK, Borgbo T, Hansen LL. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. Epigenetics 2009; 4: 231-4.

22. Mir R, Ahmad I, Javid J, Farooq S, Yadav P, Zuberi M, et al. Epigenetic silencing of DAPK1 gene is associated with faster disease progression in India populations with Chronic Myeloid Leukemia. J Cancer Sci Ther 2013;5:144-149.

23. Lee KWK, Pauzova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. Front Genet 2013;4:132.

24. Zong D, Liu X, Li J, Ouyang R, Chen P.The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. Epigenetics Chromatin 2019;12:65

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-09-07]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1404.35.1.2.8]

[DOI: 10.61186/iau.35.1.14]