

The Relationship between FLT-3 mutation and the response to treatment in children with acute myelocytic leukemia

Dr. Othman Hamdan*
Lina mansour**

(Received 6 / 10 / 2022. Accepted 22 / 11 / 2022)

□ ABSTRACT □

Background: Acute Myelocytic Leukemia (AML) is a rare disease with annual diagnosis of new cases about (500-600) case/year in USA, and (30-45) cases according to the statistics of the university children hospital in Damascus . The surviving rates in the patients of AML are still modest in the last three decades and doesn't exceed of (30-40%).

The modification in the systems of the diagnosis and the chemotherapy and the supportive care have improved the prognosis of the patients who have acute myelocytic leukemia in the last years significantly .

However , a high rate of children don't respond to the first line treatment or they relapse , and they need to undergoing a new treatments . So the need was highlighted to discover new agents other than chemotherapy in the last years to overcome drug-related complications of resistance and toxicity . among these agents is the identification of the molecular mutations and the cytogenetic abnormalities and their diagnostic and therapeutic relevance to acute myelocytic leukemia warning FLT-3 is tumor gene of the receptors for tyrosine kinas class 3 . who interferes with the basic stages of the hematopoiesis. Such as reproduction, differentiation and survival . in the recent years , the FLT-3 mutations become important marker in the hematological malignancy , and they have a prominent and distinguished role in the acute myelocytic leukemia as these mutations have been associated with clinical prognosis , treatment , and survival in children .

We will analyze the occurrence of these mutations in patients with acute myelocytic leukemia with its differnt subtypes .and determine their prevalence rate in the AML patients , and will study their prognostic value and their relationship to response to treatment .

Methods : the study we are doing is a prospective , longitudinal, interventional , diagnostic , cohort study .

The study includes a sample size consisting of (49)patients who have been diagnosed with acute myelocytic leukemia who were referred to the university children's hospital and BASMA Association Support children with Cancer in 2019, and have a normal karyotype The patients were followed up by conducting an analysis PCR to identify the FLT-3 Mutations and then studying the prevalence of these mutations and the relationship of their presence to response to treatment .

Results :the study showed that there is no real statistically significant correlation between the presence of mutations and the response to treatment at the end of the INDUCTION stage according to the resulting probability value (P -VALUE= 0.380)

Conclusions : It is necessary to evaluate FLT-3 mutations in patients with acute myelocytic leukemia before starting treatment . and conduct other studies in order to evaluate the relationship of the presence of FLT-3 mutations with the rate of survival (os) and the event -free rate (EFS) in AML Patients , because that might enable us to formulate a better treatment plan and know the prognostic aspects in each case .

Keys words : acute myelocytic leukemia , AML , THE Response to treatment , FLT-3 mutations , karyotype , molecular mutations , tyrosine kinase inhibitors .

*Professor - Faculty of Human Medicine - Tishreen University - Lattakia - Syria

** PhD student - Faculty of Human Medicine - Tishreen University - Lattakia - Syria. linamansourzzz@tishreen.edu.sy

علاقة طفرات FLT-3 بالاستجابة للمعالجة لدى الاطفال المصابين بالابيضاض النقوي الحاد

د.عثمان حمدان*

لينا منصور**

(تاريخ الإيداع 6 / 10 / 2022. قَبْلَ للنشر في 22 / 11 / 2022)

□ ملخص □

خلفية البحث وهدفه: الابيضاض النقوي الحاد مرض نادر عند الأطفال مع تشخيص سنوي لحالات جديدة يصل الى (500-600) حالة/السنة في الولايات المتحدة الأمريكية، و(30-45)حالة/السنة وفق احصائيات مشفى الاطفال الجامعي في دمشق . وتبقى معدلات البقيا لدى مرضى الابيضاض النقوي الحاد متواضعة خلال العقود الثلاث الماضية لانتجاوز (30-40%). حسنت التعديلات في أنظمة التشخيص والعلاج الكيميائي والرعاية الداعمة ، في السنوات الأخيرة، بشكل كبير من انذار المرضى الذين يعانون من الابيضاض النقوي الحاد. AML ومع ذلك مازالت نسبة مرتفعة من الأطفال لا يستجيبون لخط العلاج الأول أو يصابون بالنكس ، ويحتاجون للخضوع لعلاج جديد. لذا تم تسليط الضوء على الحاجة لاكتشاف عوامل جديدة غير العلاج الكيميائي في السنوات الماضية للتغلب على اختلاطات الادوية المرتبطة بالمقاومة والسمية. ومن ضمن هذه العوامل ، التعرف على الطفرات الجزيئية والشذوذات الوراثية الخلوية ،وصلتها التشخيصية والعلاجية بانذار الابيضاض النقوي الحاد.

: FLT-3 جين ورمي من مستقبلات التيروزين كيناز من الصف الثالث ، class-3 يتدخل في المراحل الأساسية المكونة للدم، مثل التكاثر ، التمايز، والبقيا .

وأصبحت طفرات FLT-3 في السنوات الأخيرة ، واسماً مهماً في الخبايا الدموية ، ولها دور بارز ومميز في الابيضاض النقوي الحاد ، حيث ارتبطت هذه الطفرات مع الإنذار السريري ، والعلاج ، والبقيا لدى الأطفال . سنقوم بتحليل حدوث هذه الطفرات لدى مرضى الابيضاض النقوي الحاد بانماطه الفرعية المختلفة ، وتحديد نسبة انتشارها لدى مرضى ، AML ودراسة قيمتها الانذارية وعلاقتها بالاستجابة للمعالجة .

مواد البحث وطرقه: الدراسة التي نقوم بها هي دراسة حشدية مستقبلية ،طولانية تشخيصية، تداخلية . تتضمن الدراسة حجم عينة مؤلفة من 49 مريضاً ومريضةً ممن شُخص لهم ابيضاضاً نقوياً حاداً ممن راجعوا مستشفى الاطفال الجامعي بدمشق وجميعية بسمة التخصصية في العام 2019ولديهم نمط نووي طبيعي . تمت متابعة المرضى من خلال إجراء تحليل PCR لتحديد وجود طفرات FLT-3 ، ومن ثم دراسة مدى انتشار هذه الطفرات وعلاقتها بوجودها بالاستجابة للعلاج

النتائج: اوضحت الدراسة انه لا يوجد علاقة ارتباط حقيقية ذات دلالة إحصائية بين وجود طفرات FLT-3 وبين الاستجابة للمعالجة في نهاية مرحلة INDUCTION بحسب القيمة الاحتمالية الناتجة (P-Value=0.380)

الاستنتاج: من الضروري تقييم طفرات FLT-3 لدى المرضى المصابين بالابيضاض النقوي الحاد قبل البدء بالعلاج واجراء دراسات اخرى من اجل تقييم علاقة وجود طفرات FLT-3 مع معدل البقيا بلا مراضة ومعدل البقيا على قيد الحياة لدى الاطفال المرضى لان ذلك قد يمكننا من صياغة خطة علاج أفضل ومعرفة الجوانب الإنذارية في كل حالة.

الكلمات المفتاحية: الابيضاض النقوي الحاد، اللاستجابة للعلاج، طفرات FLT-3، النمط النووي ، الطفرات الجزيئية ، مثبطات التيروزين كيناز .

*أستاذ - كلية الطب البشري -جامعة تشرين- اللاذقية- سورية

** طالبة دكتوراه- كلية الطب البشري -جامعة تشرين- اللاذقية- سورية

مقدمة

يعتبر الابيضاض الحاد من أكثر الخباثات الدموية حدوثاً لدى الأطفال ، % 80 منه يصنف كابييضاض لمفاوي حاد، و(15-20)% يصنف كابييضاض نقوي حاد¹ ..

يصل حدوث الابيضاض النقوي الحاد لدى الرضع الى معدل (1.5) من كل 100 ألف شخص /السنة ، وينقص حدوثه حتى (0.9) / لكل 100 ألف شخص بين عمر (1-4) سنوات ، وحتى (0.4) / 100 ألف شخص بعمر (5-9) سنوات ، بعد ذلك هنالك زيادة تدريجية حتى الوصول لمرحلة البلوغ ، حيث يصل معدل الحدوث حتى (12.5) / لكل 100 ألف شخص بعمر < 65 سنة² .

يشكل الابيضاض النقوي الحاد مجموعة متخالفة HETEROGENEOUS من الاضطرابات ، التي تتميز بتحول نسيلي خبيث للخلايا الجذعية المكونة للدم او الخلايا السليفة.

الأسباب وراء حدوث الابيضاض النقوي الحاد غير معروفة ، وعادة ما يكون حدوثه لدى الأطفال بدئياً ، أما لدى البالغين والأشخاص الأكبر سناً ، فقد يسبقه حدوث MDS (متلازمة خلل التنسج النقوي) (MYELO DYSPLASIC SYNDROME) . لكن حدوث الابيضاض النقوي الحاد لدى الأطفال الذي يسبقه تطور نسيلي لامراض تكاثرية نقوية ما قبل ابيضاضية مثل MDB او JMML هو امر نادر الحدوث . كما ان الاشخاص الذين لديهم فانكوني ، او متلازمة بلوم ، فليهم خطورة متزايدة لتطوير ابيضاض نقوي حاد كخباثة ثانوية^{3,4} }

وجدت طفرات GERM LINE في عدة جينات مثل / TP53/RUNX1 /GATA2 /FLT-3/ CEBPA/ ، لدى عائلات لديهم خطورة مرتفعة غير مفسرة للإصابة بالابيضاض النقوي الحاد . وهذا يقترح وجود استعداد عائلي لتطور الابيضاض النقوي الحاد^{5,6} .

الأطفال المصابون بمتلازمة داون يتظاهرون بشكل كلاسيكي مع النمط الفرعي النوعي من الابيضاض النقوي الحاد الذي ينشأ على حساب ارومات الميغالوكاريو (ارومات النوات) ، وهو يلي بشكل أساسي اضطراب تكاثري نقوي عابر في مرحلة الوليد ، والذي يتصف بطفرات جسدية في جين GATA1 . وتكون الخلايا الابيضاضية لدى مرضى متلازمة داون عادة أكثر حساسية للعلاج الكيماوي مع معدلات بقيا مرتفعة بشكل استثنائي، لذا فان هنالك إمكانية لعلاج هؤلاء المرضى مع برتوكولات علاجية معدلة⁷ .

إضافة لذلك فان الابيضاض النقوي الحاد قد يحدث تاليا لعلاج شعاعي سابق او علاج كيماوي يحوي عوامل مؤلفة او

او الصبغي 7 أحادي الصيغة (MLL كخباثة ثانوية . والي يتميز عادة بإعادة ترتيب Epipodophyllotoxins Monosomy 7 (8,9) }

هنالك عوامل انذارية متعددة لها علاقة مباشرة بنتائج وانذار الابيضاض النقوي الحاد مثل: العمر ، والشذوذات الصبغية ، الوراثة الخلوية ، وتعدادا الكريات البيض عند التشخيص ، وحالة التعبير PERFORMANCE ، والاستجابة على المعالجة¹⁰ .

تشكل الشذوذات الصبغية وسيلة ناجحة لمسح اضطرابات ممتنوعة ، خاصة المرتبطة بالجينات السرطانية مثلا الابيضاض النقوي الحاد . والموجودات الوراثة الخلوية ، مثل نماذج الصيغة الصبغية ، شائعة لدى المرضى الأطفال من مرضى الابيضاض النقوي الحاد ، في حين الصيغة الصبغية الأحادية (MK)mono-Karyotype والصيغة الصبغية المتعددة (CK)complex Karyotype أشيع لدى المرضى الأكبر سناً¹¹

يعتمد التصنيف التشخيصي للابيضاض النقوي الحاد عند الأطفال على اتحاد (مشاركة) بين الموجودات الشكلية ، والكيميائية الخلوية ، والتنميط المناعي ، والمميزات الوراثية الخلوية و الجينات الجزيئية في الارومات الابيضاضية المشتقة من نقي العظم او من الدم المحيطي¹¹

ويتم تصنيف كل مريض ابيضاض نقوي حاد من ناحية الخطورة ضمن مجموعة فرعية ذات علاقة بالارومات الموجودة. تصنيف (FAB) السابق (التصنيف البريطاني الفرنسي الأمريكي) والمعتمد على الموجودات الشكلية، تم استبداله اليوم بتصنيف منظمة الصحة العالمية والذي يأخذ بالموجودات الشكلية والصيغة الصبغية والزيغانات الجزيئية.^{12,13}

. في حين يستخدم التنميط المناعي بشكل عام لتمييز الابيضاض النقوي الحاد عن الابيضاض اللمفاوي الحاد¹⁴.
اغلب الشذوذات الصبغية تم كشفها باجراء الصيغة الصبغية التقليدية ، واستكمالها باجراء ال FISH او Reverse-transcription (PCR) لتحديد الازفاءات المشفرة ذات الصلة بالمرض (Relevant cryptic-translocations): جينات منصهرة ، او خسارة او فقدان في مادة الصبغي¹⁵ .

مثل : t(7;12)(q36;p13) أيضا المعروف ك: HLXB9-MNX1

T(11;12)(P15;P13) والمعروف ك: NUP98-KDM5A

t(1;22)(p13;q13) والمعروف ك: RBM15-MKL1

^{16,17}

تحسنت النتائج السريرية للابيضاض النقوي الحاد لدى الأطفال بشكل هام خلال العقدين الماضيين مع تحسن في معدلات البقاء طويلة الأمد تصل الى 60%^{18,19} .

ويعود هذا التحسن الي :تكثيف أنظمة العلاج الكيميائي، وتحسين الرعاية الداعمة ، وتصنيف افضل لمجموعات الخطورة ، وإنقاذ (تدبير) افضل عند حدوث النكس.

عادة مايعتمد تصنيف مجموعات الخطورة على الشذوذات الوراثية الخلوية الموجودة في الارومات الابيضاضية ، بالمشاركة مع الاستجابة الباكرة على المعالجة الكيميائية التي يتم تحديدها : اما بحدوث الهدأة الكاملة (CR) بعد (1-2) شوط من العلاج ، او عبر مقايسة المرض المتبقي الاصغري (MRD). والذي يعتمد على اجراء التنميط الخلوي المناعي (FCM) بشكل أساسي في الابيضاض النقوي الحاد²⁰ .

يتألف العلاج من توليفة كيميائية دوائية تتضمن : الانتراسكلين مع CYTARABINE ، مع زرع خلايا جذعية في الحالات عالية الخطورة ذات الوراثة النوعية، او ذات الاستجابة البطيئة²¹.

وعلى الرغم من العلاج التقليدي يبقى نسبة (30-40 %) من مرضى الابيضاض النقوي الحاد يعانون من النكس . والانتذار سيء ومعند لدى (30%) من المرضى الناجين تقريباً في آخر التقارير المسجلة حالياً^{22,23} . و أيضا خطر الموت مرتفع بعد العلاج(5-10%) في سياق مضاعفات المرض سواء في الحالات المشخصة حديثا اوالحالات الناكسة ، او بسبب التأثيرات الجانبية على المدى البعيد للعلاج الكيماوي، مثل اعتلال العضلة القلبية المسبب بالانتراسكلين²⁴ .

لذا فان المعلومات حول الخلفية الوراثية والجزيئية هو اكثر ملائمة من اجل تحديد علاجات هدفية نوعية جديدة للابيضاض النقوي الحاد.

تم تحديد مجموعة من الشذوذات الجزيئية لدى مرضى الابيضاض النقوي الحاد، والتي لها انذار مهم لديهم ، ومن ضمنها :

طفرات جين NPM-1 : Nucleo-phosmin-1

طفرات جين FLT-3 : Fms-Like Tyrosine -kinase-1

طفرات جين CEBPA : CCAAT/enhancer-binding-protein-a²⁵.

FLT-3 : جين مستقبل تيروزين كيناز من الصف الثالث class-3 (RTK) ، يتوضع على الصبغي (13q12) . يتم التعبير عن هذا الجين على سطح 90% من خلايا ال AML الابيضاضية ، كما يوجد على سطح الخلايا البائية في الابيضاض المفاوي الحاد ، إضافة لتواجده على سطح الخلايا الطبيعية المكونة للدم ، وخلايا الدماغ والمشيمة والكبد والثيموس والعقد اللمفاوية²⁶.

تفاعل FLT-3 مع مركبه الترابطي (ITS-LIGAND) ، و يلعب دورا هاما في تكاثر الخلايا الجذعية المكونة للدم والخلايا السليفة ، وفي تمايزها وفي البقاء²⁶ .

اما طفرات FLT-3 ، فهي تقود الى تكاثر خلوي غير منتظم وحدث التحول الابيضاضي .

يعتبر جين FLT-3 أشيع جين طافر لدى مرضى AML ، حيث يتفعل لدى حوالي ثلث الحالات ، أي ما يقارب (20-30%) من المرضى ، واغلب البيانات المرجعية تشير الى ان طفرات FLT-3 تحمل إنذارا سيئاً لدى مرضى AML²⁷ .

تم تحديد نمطين من طفرات ال FLT-3 :

1- طفرة FLT-3-ITD ؛ Internal –tandem-duplication : وهي أشيع طفرات FLT-3 لدى

مرضى AML طبيعي الصيغة الصبغية ، ومرضى APL ، وكمرضى AML مع t(6;9) .

تحدث هذه الطفرة لدى حوالي 20-30% من حالات AML ، وهي طفرة في طول FLT-3، وتنتج عن تضاعف ثنائي داخلي ، او من ادخال او من كليهما²⁸ .

وجدت هذه الطفرة لدى حوالي (20-30%) من حالات الابيضاض النقوي الحاد AML وخاصة لدى المرضى ذوي النمط النووي الطبيعي، وظهرت دراسات عديدة انها عامل انذاري سلبي، ويبقى الإنذار سيئاً حتى مع المعالجة الكيميائية او زرع الخلايا الجذعية. وبينت عدة دراسات عالمية ان مرضى الابيضاض النقوي الحاد الذين يحملون طفرة لديهم معدلات شفاء منخفضة بسبب النكس. وهذا قاد لتطوير عدد من مثبطات التيروسين كيناز الجزيئية الصغيرة (TKI) ذات الفعالية المضادة لطفرة FLT-3.

أيضا تبين ان حمل الاليل (the allele burden) لطفرة (ITD) مهم ، فالمرضى الذين لديهم حمل ورمي أعلى ، لديهم انذار أسوأ²⁹.

1- طفرة FLT-3 (TKD) : point mutations of asp835(3-letter amino acid code) within the flt-3 tyrosine kinase domain

وهي النمط الثاني من طفرات FLT-3، واشيع طفرة نقطية على ثمالة حمض الاسبارتيك (aspartic) في الموقع D835 .

الطفرات النقطية في (SHIFT-TKD) تؤدي الى تفعيل (Loop to apermener-open configuration)، وهذا يقود الى إشارات مستمرة .

وجدت هذه الطفرة لدى (5-10%) من مرضى الابيضاض النقوي مع نمط نووي طبيعي AML-NK كلا الطفرتين ينتج عنها تفعيل بدئي لفعالية التيروزين كيناز في غياب المركب الترابطي³⁰ .

أجريت العديد من الدراسات حول طفرات FLT-3 لدى مرضى الابيضاض النقوي الحاد AML، واهميتها الانذارية . الا ان عدم وجود وضوح تام في دورها كواسم انذاري، يقترح اجراء دراسات إضافية، وخاصة ان مثبطات التيروزين كيناز أصبحت تستخدم كعلاج هدفي لدى مرضى AML الذين يحملون طفرات FLT-3 . إضافة لامكانية تحضير المريض لجراء زرع نقي خيفي، بهدف تحسين معدل البقاء لدى هؤلاء المرضى . الدراسات المجراة حول الأهمية الانذارية لطفرات FLT-3 ومدى انتشارها لدى البالغين من مرضى AML عديدة، لكن، هنالك نقص نسبي في الدراسات المجراة حولها لدى الأطفال، وهذا مايجعل من الأهمية اجراء دراسات إضافية حول طفرات FLT-3 لديهم، وعلاقتها بانذار المرض، والذي سيدفع لاعادة النظر بإعادة تقييم المريض، وتعديل خطط العلاج المعيارية المتبعة. خاصة وان اغلب الدراسات المرجعية العالمية لطفرات FLT-3 تشير الى هذه الطفرات هي متغير مستقل، ويعكس إنذاراً سيئاً لدى مرضى AML، خاصة الأطفال منهم .

إضافة لما سبق .هنالك دراسات عالمية أظهرت بشكل واضح ان وجود طفرات FLT-3 في ارومات AML بالمشاركة مع زيغانات جينية أخرى مثل طفرة WT-1 الجسدية. او مع t(5;11)، يرتبط مع معدلات بقيا أقل²⁸ . وتم تقييم دور هذه الطفرات كعوامل انذارية في بروتوكولات العلاج لدى الأطفال عبر تحليل ارتباط المعالجة مع تشارك حدوث هذه الزيغانات الجينية والوراثية الخلوية معاً، واهميتها السريرية في تحديد مجموعة المرضى عالي الخطورة الذين تفشل لديهم بروتوكولات العلاج الانقاذية، وخط العلاج الثاني^{31,32} .

المواد والطرائق

نوع الدراسة التي نقوم بها هي دراسة حشدية مستقبلية، طولانية تشخيصية، تداخلية . بلغ عدد الاطفال المقبولين 60 طفلاً ممن شخص لهم ابيضاض نقوي حاد _لأول مرة وغير ناكس_ ممن راجعوا مستشفى الاطفال الجامعي بدمشق او وحدة بسمة التخصصية في العام 2019 واجري لهم تحليل KARYOTYPE لتحديد النمط النووي حيث تم استبعاد جميع المرضى الذين كان لديهم نمط نووي غير طبيعي وبلغ عدد المرضى الذين يحملون نمط نووي طبيعي 49 تم اجراء تحليل PCR لديهم لتحديد وجود طفرات FLT-3 لديهم .بعدها قمنا بدراسة انتشار الطفرة وعلاقتها بالاستجابة للعلاج من خلال استخدام الأساليب الإحصائية التالية بالاعتماد على الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية النسخة 25 لتحليل البيانات حيث استخدم الاحصاء الوصفي لوصف عينة الدراسة وخصائصها ومعرفة النسب المئوية والتكرارات للمتغيرات. كما تم إجراء الإحصاء الاستدلالي كدراسة الاستقلال والارتباط عن طريق اختبار Chi-Square Independence Tests حيث يُستخدم لتقييم العلاقة بين متغيرين نوعيين (تقييم الاختلافات في النسب) حيث يمكن أن يكون المتغيران مستقلين أو مرتبطين .

النتائج

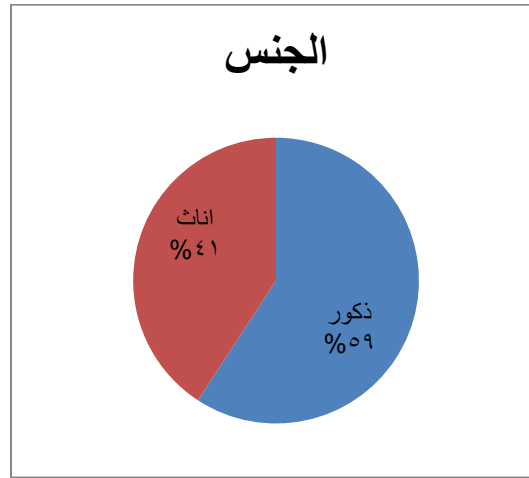
شملت عينة الدراسة 49 مريضاً ومريضةً ممن شخص لهم ابيضاض نقوي حاد مع نمط نووي طبيعي ممن راجعوا مستشفى الاطفال الجامعي بدمشق في العام 2019 وكانت نتائج الإحصاء الوصفي على النحو التالي حيث بلغ متوسط أعمار المرضى 7.77 سنة فتوزع المرضى حسب الجنس والفئات العمرية على النحو التالي كما هو موضح ضمن الجدول (1) و(2) و المخطط التالي رقم(1):

جدول (1) يبين توزع العينة بحسب العمر

العمر (بالسنوات)	العدد	متوسط	انحراف معياري	حد أدنى	حد أعلى
49	7.77	5.02	0.40	18	

جدول (2) يبين توزع العينة بحسب الجنس.

الجنس	العدد	النسبة المئوية
ذكور	29	59.2%
اناث	20	40.8%
المجموع	49	100%



مخطط (1).

حيث كانت النسبة الاعلى من المرضى هم مرضى ذكور بنسبة %59.2 (29 مريضاً) بينما بلغت نسبة الإناث ضمن الدراسة الحالية %40.8 (20 مريضة) .

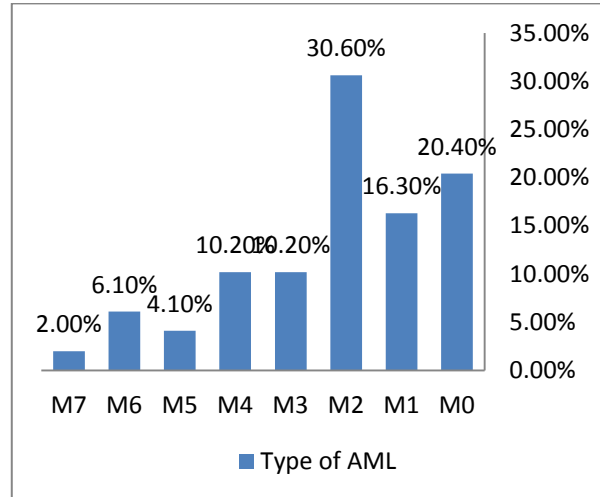
كما تبين من خلال الدراسة ان النسبة الاعلى من المرضى كان لديها النمط الفرعي M2 بنسبة %30.6 بينما توزع بقية المرضى كما هو مبين في الجدول رقم (3) والمخطط رقم (2)

جدول (3) يبين توزع العينة بحسب نوع AML.

Type of AML	العدد	النسبة المئوية
M0	10	20.4%
M1	8	16.3%
M2	15	30.6%
M3	5	10.2%

%10.2	5	M4
%4.1	2	M5
%6.1	3	M6
%2.0	1	M7
%100	49	المجموع

بينما كانت النسبة الاقل من المرضى من النمط M7 حيث بلغت نسبتهم 2%

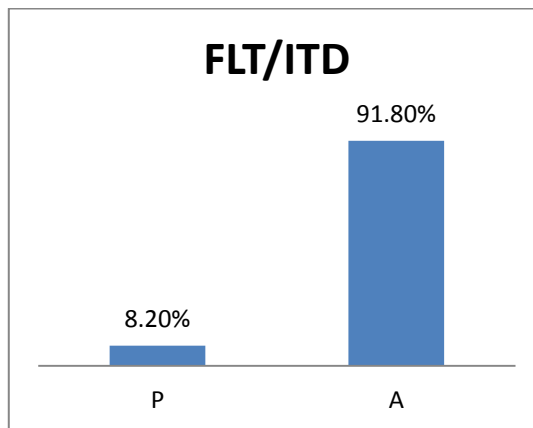


مخطط (2).

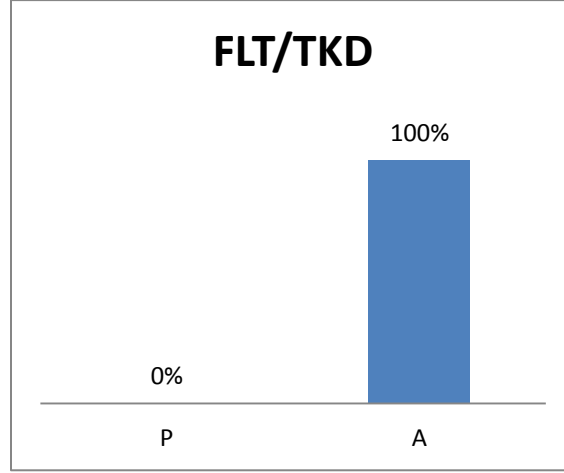
اما من حيث توزيع المرضى وفق طفرات FLT-3 فقد تبين وجود طفرة FLT-3/ITD لدى 4 مرضى فقط بنسبة 8.2% بينما لم تسجل اي حالة لديها طفرة FLT-3/TKD كما هو موضح في الجدول (4) والمخطط (3) و (4):

جدول (4) يبين توزيع العينة بحسب FLT.

FLT				
TKD		ITD		
%100	49	%91.8	45	A
%0	0	%8.2	4	P
%100	49	%100	49	المجموع



مخطط (3).

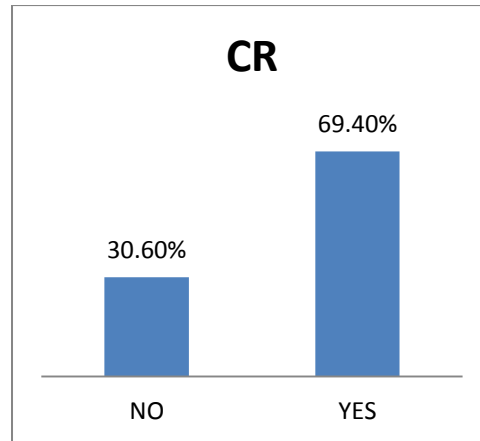


مخطط (4).

ايضا يبين الجدول التالي رقم (5) توزع المرضى حسب الاستجابة للمعالجة في نهاية مرحلة INDUCTION حيث بلغت نسبة المرضى المستجيبين للعلاج 69.4% كما هو موضح ايضا في المخطط رقم (5)

جدول (5) يبين توزع العينة بحسب CR.

النسبة المئوية	العدد	CR
69.4%	34	YES
30.6%	15	NO
100%	49	المجموع



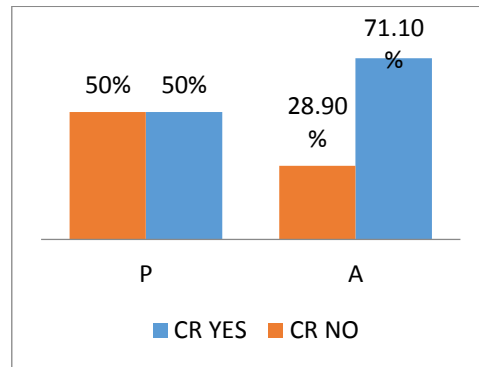
مخطط (5).

كما بينت الدراسة العلاقة ما بين المتغيرين طفرة FLT-3/ITD وما بين حدوث الهجوع التام في نهاية مرحلة ال Induction حيث يوضح الجدول رقم (6) وباستخدام اختبار كاي مربع نجد وبحسب القيمة الاحتمالية الناتجة (P-Value=0.380) والتي هي أكبر من مستوى الدلالة فانه لا توجد علاقة ما بين المتغيريين. حيث تبين ان نسبة

الاستجابة التامة كانت ادنى لدى المرضى الذين يحملون طفرة FLT-3/ITD وهذا ما هو مبين في الجدول 6 والمخطط 6

جدول (6) يبين توزيع العينة بحسب (FLT/ ITD) و (CR).

		FLT/ ITD			
P		A			
%50	2	%71.1	32	YES	CR
%50	2	%28.9	13	NO	



مخطط (6).

4. المناقشة:

الابيضاض النقوي الحاد مرض نادر عند الأطفال مع تشخيص سنوي لحالات جديدة يصل الى (500-600) حالة /السنة في الولايات المتحدة الامريكية ، و(30-45)حالة / السنة وفق احصائيات مشفى الاطفال الجامعي في دمشق . وتبقى معدلات البقيا لدى مرضى الابيضاض النقوي الحاد متواضعة خلال العقود الثلاث الماضية لاتتجاوز (30-40%).

حسنت التعديلات في أنظمة التشخيص والعلاج الكيميائي والرعاية الداعمة ، في السنوات الأخيرة، بشكل كبير من انذار المرضى الذين يعانون من الابيضاض النقوي الحاد (AML) .

ومع ذلك مازالت نسبة مرتفعة من الأطفال لايستجيبون لخط العلاج الأول أو يصابون بالنكس ، ويحتاجون للخضوع لعلاج جديد.

لذا تم تسليط الضوء على الحاجة لاكتشاف عوامل جديدة غير العلاج الكيميائي في السنوات الماضية للتغلب على اختلاطات الادوية المرتبطة بالمقاومة والسمية.

ومن ضمن هذه العوامل ، التعرف على الطفرات الجزيئية والشذوذات الوراثية الخلوية ،وصلتها التشخيصية والعلاجية بانذار الابيضاض النقوي الحاد.

ومن ضمن هذه العوامل طفرات FLT-3 التي

أصبحت في السنوات الأخيرة، واسماً مهماً في الخباثات الدموية ، ولها دور بارز ومميز في الابيضاض النقوي الحاد، حيث ارتبطت هذه الطفرات مع الإنذار السريري ، والعلاج ، والبقيا لدى الأطفال .

بعد دراسة فرضيات البحث تبين ما يلي:

- أوضحت دراستنا الحالية أن طفرة FLT-3/ITD وجدت لدى 4 مرضى من اصل 45 مريض مشخص لديهم ابيضاض نقوي حاد مع نمط نووي طبيعي بنسبة 8.2% في حين انه لم تسجل اي حالة تحمل طفرة FLT-3/TKD (0%) و هذه النتيجة متباعدة مع نتائج الدراسات العالمية فقد بينت الدراسة العالمية (الصربية) والتي شملت 113 مريض، انه تم تسجيل طفرة FLT-3/ITD بنسبة (17.7%) اما طفرة FLT-3/TKD فقد سجلت لدى 4 مرضى فقط بنسبة 3.5% وهذه النتائج لاتتوافق مع نتائجنا . ، اما في الدراسة (الاسبانية) فقد تم تسجيل طفرة ITD لدى 32 مريض من اصل 208 بنسبة (15.38%) وسجلت طفرة TKD لدى 16 حالة من اصل 208 (7.69%) حيث بينت النتائج ان المرضى الذين تم ادخالهم ضمن الدراسة تراوحت اعمارهم بين 4 اشهر و 18 سنة ، وكان متوسط الاعمار 7.77 سنة وجميعهم شخص لديهم اصابة بالابيضاض النقوي الحاد عبر اجراء بزل نقي و FCM (IMMUNOPHENOTYPIC ANALYSIS) . كان 59.2% من المرضى ذكورا في حين بلغت نسبة اصابة الاناث ب 40.8% . وكان متوسط اعمارهم 7.77 سنة ، وبالمقارنة مع الدراسة العالمية الصربية³³ فقد تراوحت الاعمار ما بين 6-18 سن مع معدل وسطي 12 سنة وهو اعلى مما كان في دراستنا وكانت نسبة الاصابة اعلى لدى الذكور .

تم تحديد نمط A ML مورفولوجيا او عبر FCM ووفقا لتصنيف FAB (French-American –British) قمنا بتصنيف المرضى ضمن 8 مجموعات فرعية.

سجل النمط M0 لدى 20.4% من المرضى ، في حين كانت نسبة النمط M1 16.3% من الاطفال المصابين ب AML ، اما M2 فقد بلغت نسبتهم 30.6% ونسبة M3 10.2% ، وسجل النمط M4 نسبة وقدرها 10.2% ، وبلغت نسبة M5 4.1% في حين كانت نسبة النمط M6 6.1% . اما النمط M7 فقد كانت نسبتهم 2% . اما في الدراسة العالمية (الصربية)³³ فقد كانت نسبة الانماط الفرعية لدى المرضى كالتالي : M0 (11%) ، M1 (13%) ، M2 (20%) ، M3 (12%) ، M4 (20%) ، M5a (15%) ، m5b (2%) ، M3 var (1%) ، M6 (2%) ، M7 (2%) .

اما في الدراسة العالمية (الصربية)³³ فقد كانت نسبة الانماط الفرعية لدى المرضى كالتالي : M0 (11%) ، M1 (13%) ، M2 (20%) ، M3 (12%) ، M4 (20%) ، M5a (15%) ، m5b (2%) ، M3 var (1%) ، M6 (2%) ، M7 (2%) .

تم تطبيق العلاج الكيماوي وفق البرتوكول المتبع في مشفى الاطفال وجمعية بسمة التخصصية . وتم دراسة الاستجابة للعلاج في نهاية مرحلة INDUCTION من خلال دراسة بزل النقي BM او من خلال اجراء MRD . اوضحت الدراسة انه تم تسجيل حدوث هجوع تام لدى 34 مريضا من اصل 49 بنسبة وصلت الى 69.4% . وقد تم اعتبار حدوث الهجوع التام عندما تكون نسبة الارومات في بزل النقي أقل من 5% او عندما تكون قيمة MRD أقل من 5%

تم دراسة العلاقة ما بين طفرات FLT-3 وما بين الاستجابة للعلاج CR ووجدنا حسب نتائج دراستنا ان الهجوع التام حدث لدي 2 من 4 مرضى الذين يحملون طفرة FLT-3/ITD (50%) بينما حدث الهجوع التام لدى 34 من اصل 45 مريض لا يحملون طفرة FLT-3 (75.55%) وبالتالي فن معدل الهجوع كان اقل لدى المرضى الحاملين للطفرة FLT-3 بالمقارنة مع المرضى الغير حاملين للطفرة ، ومن خلال استخدام اختبار كاي مربع تبين انه لا يوجد علاقة ما بين المتغيرين : طفرة FLT-3/ITD و CR حيث بلغت قيمة P=0.380 والتي هي اكبر من مستوى

الدلالة . وهذا يعني ان وجود طفرة ITD لايؤثر على الاستجابة للعلاج . وبالمقارنة مع الدراسة العالمية (الصربية)³³ فقد حدث الهجوع التام لدى 8 مرضى من اصل 24 (33.3) % والذين يحملون طفرات FLT-3 ، وكان ايضا معدل حدوث CR اقل بشكل واضح بالمقارنة مع المرضى الذين لم يكن لديهم طفرات FLT-3 (60.7% , CR 54 OF 89) . في حين ان الدراسة الاسبانية³⁴ اوضحت انه لا يوجد تأثير لطفرات FLT-3 على الاستجابة لعلاج INDUCTION وهو ما يتوافق مع نتائج دراستنا (.) .

قد يعود الاختلاف في النتائج مع الدراسة الصربية الى الاختلاف في حجم العينة المدروسة وقد يخضع أيضاً لعوامل أخرى كالموقع الجغرافي ونوع العلاج المطبق ولعوامل جينية أخرى

5.الخلاصة

إنه من المهم أن نقيم عوامل الاختطار كطفرات FLT-3 لدى مرضى الابيضاض النقوي الحاد ، رغم عدم وجود ارتباط ما بين طفرات FLT-3 وما بين الاستجابة للعلاج الا انه من المهم تقييم علاقة طفرات FLT-3 وما بين معدل البقيا دون مراضة ومعدل البقيا على قيد الحياة . وإن تقييم هذه العوامل سوف يمكننا من صياغة خطة علاج أفضل ومعرفة الجوانب الإنذارية في كل حالة.

6 . الفهارس

1-فهرس الجداول الواردة ضمن البحث:

توزع المرضى حسب العمر	الجدول (1)
توزع المرضى حسب الجنس	الجدول (2)
توزع المرضى حسب النمط الفرعي لل AML	الجدول (3)
يبين توزع العينة بحسب FLT	الجدول (4)
توزع العينة حسب CR	الجدول (5)
توزع العينة بحسب (CR) و (FLT/ ITD) ..	الجدول (6)

2-فهرس بالمخططات الواردة ضمن البحث:

توزع عينة الدراسة حسب الجنس	المخطط (1)
توزع عينة الدراسة حسب النمط الفرعي ل AML	المخطط (2)
توزع عينة الدراسة حسب طفرة FLT-3/ITD	المخطط (3)
توزع عينة الدراسة حسب طفرة FLT-3/TKD	المخطط (4)
توزع عينة الدراسة حسب الهجوع التام CR	المخطط (5)
العلاقة ما بين طفرات FLT-3 و CR	المخطط (6)

References

1. Howlader, N, N, A., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S., Kosary, F., Yu, L. (2012). Cancer statistics review; National cancer institute: Bethesda. MD. USA, 1975-2011.
2. Zwaan, C, M., Kolb, E, A., Reinhardt, D. (2015). "Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia", journal of clinical oncology, vol.(33), no. (27), pp, 2949-2962.
3. Toska, E., Roberts, S, G. (2014). "Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (WILMS TUMOUR1)", Biochemical journal, vol.(461), no. (2), pp, 15-32.
4. Huff, V. (2011). Wilms tumours : about tumour suppressor genes , an oncogene and chameleon gene", Nature reviews cancer, vol.(11), no.(2), pp, 111-121.
5. Owen, C., Fitzgibbon, J., Paschka, P. (2009). "The clinical relevance of Wilms tumour 1 (wt1) gene mutations in acute leukemia", Hematology oncology, vol.(28), no.(1), pp, 13-19.
6. Paschka, P., Marcucci, A., Ruppert, S. (2008). "Wilms tumour 1 gene mutations independently predict poor outcome in adult with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study", journal of clinical oncology , vol.(26), no.(28), pp, 4595-4602.
7. Krauth, M., Alpermann, T., Bacher, U. (2015). "WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups", Leukemia, vol.(29), no.(3), pp, 660-667.
8. Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, G. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into MRC AML 10 trial. The medical research council adult and children's leukemia Working Parties. Blood, (92), 2322-2333.
9. Balgobind, B, V., Hollink, I, H. M., Arentsen-peters, S, T, G, J, M., Zimmernann, M., Harbort, J., Beverloo, H, B. (2011). Integrative analysis of type-1 and type-2 aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia, Haematologica, (96), 1478-1487.
10. Avivi, I., Rowe, J, M. (2001). Prognostic factors in acute myeloid leukemia. Curr Opin Hematol, (12), 62-67.
11. Rockova, V., Abass, S., Wouters, R., Erpelinck, C., Beverloo, H, B., Delwel, R. (2011). Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. Blood, (118), 1069-1076.
12. Staffas, A., Kanduri, M., Hovland, R., Rosenquist, R., Ommen, H, B., Abrahamsson, J. (2011). Presence of FLT-3 ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia. Blood, (118), 5905-5913.
13. Leopold, L, H., Willemze, R. (2002). The treatment of acute myeloid leukemia in first relapse: a comprehensive review of the literature. Leuk Lymphoma, (43), 1715-1727.
14. Cappizzi, R, L. (1996). Curative chemotherapy for acute myeloid leukemia: the development of high dose ara-c from laboratory to bedside. Invest New Drugs, (14), 249-256.
15. Kaspers, G, J., Zwaan, C, M., Veerman, A, J., Rots, M, G., Pieters, R., Bucskey, P. (2010). Cellular drug resistance in acute myeloid leukemia: literature review and preliminary analysis of an ongoing collaborative study. Klin padiatrie, (211), 239-244.
16. Galmarini, C, M., Mackey, J, R., Dumontet, C. (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. Leukemia, (15), 875-890.

17. Bachas,C., Schuurhuis,GJ., Hollink, IHIM., Kwidama, ZJ., Goemans,BF., Zwaan, CM. (2010). High-frequency type1/2 mutational shifts between diagnosis and relapse are associated with outcome in pediatric AML: Implications for personalized medicine. *Blood*, (116), 2752-2758.
18. Kern,W., Haferlach,T., Schnittger,S., Ludwig,WD., Hiddemann,W., Schoch,C. (2002). Karyotype instability between diagnosis and relapse in 117 pAtients with acute myeloid leukemia: implications for resistance against therapy. *Leukemia* ,(16), 2084-2091.
19. Jan,M., Majeti,R. (2013). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene* Nature publishing group , (32), 135-140.
20. De hoon, MJL., Imoto, S., Nolan,J., Miyano,S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics* , (20), 1453-1454.
21. Cloos,J., Goemans,BF., Hess,CJ., Van Oostveen,JW., Waisfisz,Q.,Corthals,S. (2006). Stability and prognostic influence of FLT-3 mutationsin paired initial and relapsed AML samples.*Leukemia*, (20), 1217-1220.
22. Taskesen,E., Bullinger, L., Corbacioglu,A., Sanders, MA., Erpelinck,CAJ., Wouters,BJ. (2011). Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBBPA double mutant AMLAS A Distinctive disease entity.*BLOOD*, (117), 2469-2475.
- 23.Radomska, HS., Basseres,DS., Zheng,R., Zhang,P., Dayaram,T., Yamamoto.Y. (2006). Block Of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT-3 activating mutations, (203), 371-381
- 24.Helbling,D., Mueller,BU., Timchenko, NA., Hagemeyer,A., Jotterand, M., Meyer-Monard, S. (2004). The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EV11 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin , *proc natl acad sci USA*, (101), 13312-13317.
25. Scholl,S., Fricke,HJ., Saylor ,HJ., Hoffkan,K. (2009). Clinical implication of molecular genetic aberrations in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*, (135), 491-505.
26. Rosnet, O., Buhring ,JD., Marchetto,S. (1996). " Human FLT-3/FLK2 receptor tyrosine kinase in expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells ", *Leukemia*, vol.(10, no.(2), pp, 238-248.
27. kuchenbauer, F., Kern,W., Schoch,C. (2005). " Detailed analysis of FLT-3 expression level in acute myeloid leukemia", *Hematologica*, vol.(90), no.(12), pp, 1617-1625.
- 28.Thiede,C., Steudel,C., Mohr,B., Schaich,M., Schakel,U., Platz-becher,U. (2002).Analysis of FLT-3 – activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia : association with FAB subtypes and identifications of subgroups with poor prognosis.*Blood*, (99), 4326-4335.
29. Small,D. (2006). "FLT-3 mutations: biology and treatment", *Hematology/ The Education Program of the American Society of Hematology* , pp, 178-184.
- 30.Nakao, M., Yokota, S., Lwai, T. (1996). " internal tandem duplication of the FLT-3 gene found in acute myeloid leukemia ", *Leukemia*, vol. (10), no. (12), pp, 1911-1918.
31. Baer, MR., Stewart,CC., Dodge, RK., Leget,G., Sule,N., Mrozek,K. (2001). High frequency of immunophenotype changesin acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease- detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361), *Blood*, (97), 3574-3580.

32. Langebrake,C., Brinkmann,I., Teigler-Schlegel, A., Creutzig, U., Griesinger,F., Puhlmann ,U. (2005). Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom*, (63), 1-9 .
33. Natasa Colovic , Natasa Tomic , Sanja Aveic , Marija Djuric , Natasa Milic , Valdimir Bumbasirevic , Milica Colovic , Sonja Pavlovic . Importance of early detection and follow-up of FLT-3 mutations in patients with acute myeloid leukemia .*Ann Hematol* . 2007.; 86: 741-747.
34. Isabel Moreno , Guillermo Martin , Pascual Bolufer , Eva Barragam , Eva Rueda , Jose Roman , Pascual Fernandez, Pilar Leon , Armando Mena, Jose Cervera, Antonio Torres , Miguel A . Sanz. Incidence and prognostic value of FLT-3 internal tandem duplication and d835 mutations in acute myeloid leukemia . *Haematologica* 2003 ; 88 :19-24.