تأثيرات العلاج الكيميائي في حدوث التشوهات الكروموسومية والطفرات الجينية لدى مرضى سرطان ابيضاض الدم الحاد AMLفي محافظة كربلاء

م.م ياسمين خضير خلف
كلية التربية / جامعة كربلاء

ا.د علي حمود السعدي
كلية العلوم / جامعة بابل

ا.د حيدر كامل زيدان
كلية العلوم / جامعة بابل

*بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

الخلاصة :

درست التشوهات الكروموسومية والطفرات الجينية الناتجة من تأثيرات العـلاج الكيميائي لـ (30) من الذكور والاناث مريضا وقـــورنوا بـ (15) شخصا من الاصحاء مظهريا وتم اجراء الاختبارات الوراثية الخلوية والبيولوجية الجزيئية للمرضى بعد العلاج الكيميائي ,حيث اظهرت النتائج وجود زيادة معنويـــــــــة ($p < 0.01$)في النسبة المئوية للكروموسوم الحلقي ,التقاء النهايات الكروموسومية, إشكال كروموسومية شاذة , نقصان المجموعة الكروموسومية وفرط المجموعة الكروموسومية مقارنة بعينة السيطرة,في حين كانت نسبة التشوهات لدى الإناث اقل من الـذكور بصـــورة عامة وكانت النتائج معنوية ($p < 0.05$) للكروموسوم الحلقي , وكروموسومات مجزأة, أشكال كروموسومية شاذة, نقصان المجموعة الكروموسومية وفرط المجموعة الكرموسومية مقارنة بالعينة القياسية وحددت الدراسة الجين الطافر FLT3 وجين الـ MLL لدى المرضى بعد العلاج .

Summary :

Chromosomal abnormalities and gene mutation result from chemotherapy studied for (30) patiant compared with (15) from apparently healthy pepole .cytogenetic and molecular biology testes preformed for patiant after chemotherapy .in general resultes showed significant increased ($P< 0.01$) for the percentage of ring chromosome , end to end associations, bizarre configuration, ploidy reduction and hyperdiploidy comperd with control,while approperat of chromosomal abnormalites in femal decreas more than in male ,resultes was significant ($p< 0.05$) in ring chromosome, fragmented chromosomes, Bizarre configuration, ploidy reduction and hyperdiploidy compared with control. The study showed mutant gene FLT3 and MLL in patients after chemotherapy .

المقدمة :

العلاج الكيميائي (chemotherapy) وهو علاج بأستخدام ادوية خاصة تعرف بالعقاقير الكيميائية المضادة للسرطان والتي تقوم بالقضاء على الخلايا السرطانية وتدميرها اذ يقوم بتقويض العمليات الحيوية داخل هذه الخلايا وتأتي مقدرة هذا العلاج على معالجة الاورام المنتقلة والمنتشرة ، بينما يقتصر العلاج الاشعاعي او العمل الجراحي على معالجة الاورام المنحصرة بمواضع محددة وتعود فاعليته الى ان الخلايا السرطانية اكثر حساسية واشد تأثرا بالكيميائيات من الخلايا الطبيعية وبطبيعة الحال فمضاعفاته واثاره مقبولة مقارنة بالمرض نفسه اضافة الى المردود العلاجي بدرجة كبيرة ، وقد يسمى العلاج الكيميائي علاجا جهازيا (systemic) نظرا لانتقال العقاقير الكيميائية عبر الدورة الدموية الى كل اجزاء الجسم ومقدرتها على تدمير الخلايا السرطانية وقد يتم استخدامه قبل المباشرة بالجراحة بالنسبة للاورام الصلبة تحفيزا لها وبغية تسهيلها ويعرف ذلك بالعلاج الكيميائي المبدئي المساعد(neoadjuvant)و قد يستخدم العلاج الكيميائي بعد الجراحات او استئصال الاورام بهدف القضاء على خلايا ورمية غير مميزة قد تكون متبقية بما يـعرف بالعلاج الكيـــميائي المضـــاف (adjuvant) [1] .

تختلف طريقة استخدام ادوية العلاج الكيميائي فمنها عن طريق الفم على هيئة أقراص أو كبسولات او سوائل وعلى الأغلب فهي تحقن بالجسم بطرق مختلفة مثل الحقن بالوريد والحقن بالعضل والحقن موضعيا تحت الجلد او الحقن في الشريان الرئيس وان كان الحقن الوريدي هو الطريقة الأكثر شيوعا.

تتكون البرامج العلاجية عادة من دورات متكررة تفصل بينها فترات نقاهة ويتلقى المريض خلال كل دورة توليفة مشتركة من الادوية الكيميائية المختلفة او الاقتصار على عقار واحد حسب نوع الورم والمخطط العلاجي المتبع ، استخدام العلاج الكيميائي لفترات زمنية طويلة لتخفيض اعداد الخلايا السرطانية بالتدريج الى الحد الذي يتمكن فيه النظام المناعي مـن

السيطرة على اي نمو سرطاني اضافة الى اعطاء فترة للخلايا لتتعافى من مفعول العقاقير الكيميائية ،اذ ان لهذه العقاقير تأثيرات على الخلايا والاعضاء الطبيعية سريعة النمو مثل خلايا النخاع العظمي ،خلايا وانسجة الجهاز الهضمي اضافة الى بعض الاعضاء الحيوية مثل الكبد والكليتين [2] .

يؤدي استخدام العلاج الى نشوء عدد من المضاعفات الجانبية والتي تتفاوت في الشدة والنوعية من شخص لأخر ومن عقار لأخر ومن دورة علاجية الى اخرى حسب نوع وجرعة العقار المستخدم وتفاعل الجسم حياله , وهذه التأثيرات متعددة منها انخفاض اعداد خلايا الدم , تساقط الشعر الموقت ,الاعياء , الغثيان وغيرها , لكن في بعض خلايا سرطان ابيضاض الدم الحاد توجد تغيرات بالمورثات تجعلها مقاومة للعلاج الكيميائي بصفة خاصة وتظهر هذه التغيرات بمورث المقاومة الدوائية المضاعفة multiple drug resistaance(MDR) وتنتج من تجمع الدواء داخل الخلايا بالكم اللازم للقضاء عليها ولذلك تتم معالجتها بأستخدام جرعات عالية من العلاج الكيميائي خلال فترة قصيرة .

هناك عارض اخر عند حالات اللوكيميا والاورام الليمفاوية يعرف بمتلازمة انحلال الورم Tumor lysis syndrom وتعتبر احد التأثيرات الجانبية للعلاج الكيمياوي وينتج عن هذا الانحلال السريع للخلايا اللوكيمية والليمفاوية انطلاق بعض المعادن بالدورة الدموية يظهر ذلك بأرتفاع معدلات البوتاسيوم والفوسفات وحامض البوليك وانخفاض معدلات البوتاسيوم مما يؤثر على الكليتين والقلب والجهاز العصبي [3] .

المواد وطرائق العمل Materials and Method

تم إتباع طريقة [4] لتحضير المواد والمحاليل الكيمياوية .

طرائق العمل Methods

تم اخذ العينات من المرضى المصابين بأبيضاض الدم الحاد Acute mylioed leukemia(AML) لـ (30) مريضا بعد العلاج الكيميائي ومقارنتها بـ (15) فردا من الأصحاء لغرض إجراء الفحوصات الوراثية الخلوية والجزيئية .

جمع عينات الدم Blood collection

سحب (5) مل من الدم الوريدي لعينة مؤلفة من (30) فرداً بعد العلاج الكيميائي بالإضافة إلى (15) فرد من الأصحاء لإجراء الاختبارات أعلاه وتم استخدام طريقة Short term culture و بواسطة محقنة نبيذة مغطاة من الداخل بمادة الهيبارين سحب (3) مل إذ تم رجها بشكل خفيف لمنع تخثر الدم , ثم نقلت بوساطة صندوق مبرد إلى مختبرات جامعة كربلاء – قسم علوم الحياة بوقت لا يتعدى ألـ (24) ساعة لإجراء الاختبارات الوراثية الخلوية والجزيئية .

زرع الخلايا Cell culture

اخذ (5 – 7) قطرات من الدم وأضيف إلى أنابيب الزرع المحضرة مسبقاً والمحتوية على (5) مل من الوسط الزرعي RPMI 1640 والمحتوية على (0.1) مل من محفز النمو(PHA) Pytohematoaglotinin ثم خلطت جيداً بعد ذلك و حضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 71 ساعة , إذ وضعت بشكل مائل وتم رجها بهدوء كل 24 ساعة . بعد ذلك أضيف (0.5) مل من الكولجسين لكل أنبوبة من أنابيب الزرع ثم أعيدت إلى الحاضنة مع التحريك 3 – 4 مرات خلال هذه الفترة لإكمال مدة الحضن إلى 72 ساعة.

حصاد الخلايا Harvesting

1. أخرجت الأنابيب من الحاضنة بعد اكتمال مدة الحضن ووضعت في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge)بسرعة 1500 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق .
2. أزيل الرائق (Supernatant)بواسطة ماصة باستور(Pasteur pipette) وترك الراسب(Pellet)الحاوي على الخلايا مع القليل من الوسط الزرعي في قعر الأنبوب .
3. رج الراسب جيدا باستخدام الخلاط الكهربائي ثم أضيف 10 مل من محلول KCL الواطئ الشد بتركيز (0.075) مولاري وبدرجة (37) م° تدريجيا قطرة قطرة مع التحريك والرج المستمر ووضعت الأنابيب في الحمام المائي لمدة 20 دقيقة بدرجة 37 م° .

التثبيت Fixation

1- نقلت أنابيب الاختبار الى جهاز الطرد المركزي بسرعة (1500) دورة / دقيقة ولمدة (10) دقائق ثم أزيل ورج الراسب بواسطة الخلاط الكهربائي بعد ذلك واضيف لكل انبوبة (5) مل من المثبت المحضر انيا والمكون من الميثانول المطلق وحامض الخليك الثلجي بنسبة 3:1.

2- نقلت الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة (1500) دورة / دقيقة ولمدة (10) دقائق ثم ازيل الرائق وحفظت الخلايا بعدها في الثلاجة بدرجة 4م بعد اضافة 5 مل من المثبت .

تحضير الشرائح الزجاجية Slide preparation

1- تم تحضير الشرائح الزجاجية وذلك بمسك الشريحة الزجاجية بالماء البارد المثلج بوضع مائل بزاوية (45) يقطر عليها من (2-3) قطرات من الخلايا بوضع عمودي ومن ارتفاع بحدود (60) سم .

2- صبغت الشرائح الزجاجية آنيا بصبغة كمزا وتركت لمدة (2-2.5) دقيقة وبعدها تم غسلها بمحلول سورنسن ثم تركت لتجف .

استخلاص الـــ DNA: DNA extraction

تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب الطقم Kitمن شركة promega.

تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction

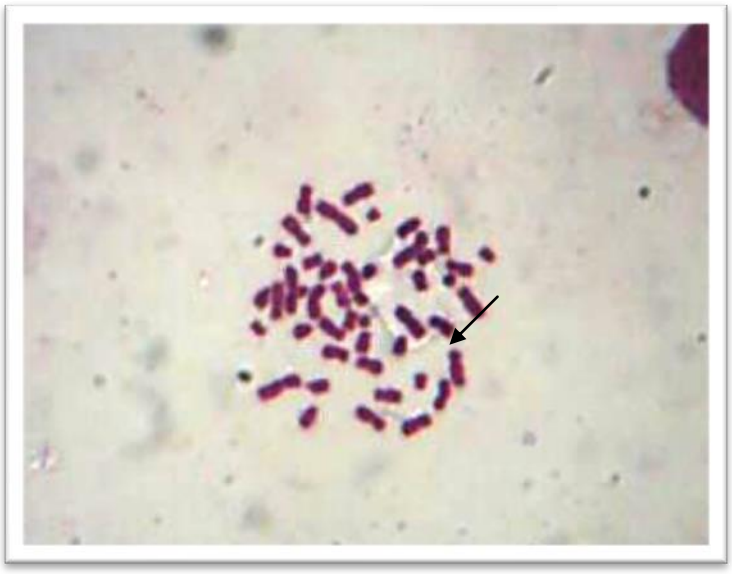
تم تحضير محاليل الـ Stock Solution ومحلول العمل Working solution حسب شركة Alpha DNA وكالتالي : أضيف 12.5 µl من green master mix لكل أنبوبة ابندروف خاصة بجهاز الـ PCR وأضيف لها 1.5 µl من كل F-primer و R-primer من محلول العمل أضيف لها 4.5µl من كل من عينة DNA ,ونقلت الأنابيب إلى جهاز الـ PCR والذي تم على شكل 30 دورة تبدأ الدورة الأولى لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 94 م والـ extention tempreture لمدة خمس دقائق ودرجة حرارة FlT3 66 م , MLL 71 م لمدة 2 دقيقة والدورة النهائية لمدة دقيقة بدرجة 94 درجة مئوية .

ترحيل DNA على هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

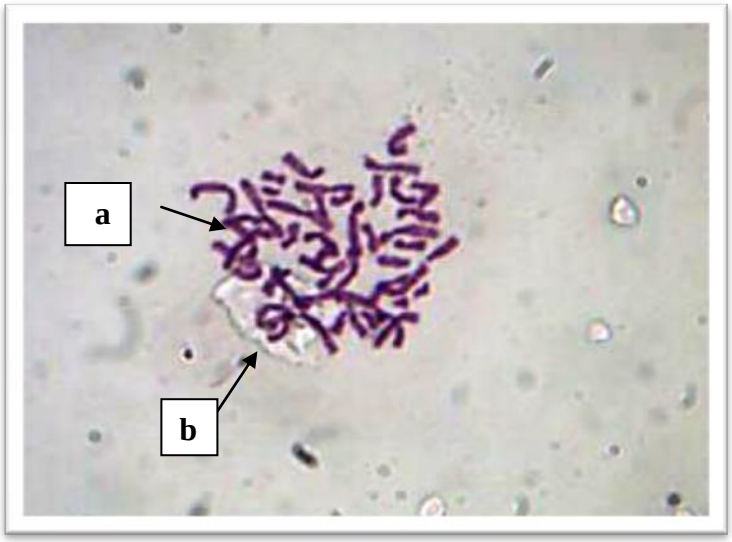
اتبعت طريقة [5] لترحيل DNA المستخلص من الدم على هلام الاكاروز.

النتائج والمناقشة Results and Dissection

تعمل معظم الأدوية الكيميائية على تدمير الخلايا السرطانية بالتأثير في الـ DNA من خلال عرقلة تضاعفه او تفتيته وبالتالي إعاقة تسلسل دورة حياة الخلية في مراحلها المختلفة ولكن هذه الأدوية تعمل في الوقت نفسه على التأثير في الخلايا الطبيعية , اذ يختلف كل عقار في طريقة عمله والمرحلة التي يتدخل ويؤثر في دورة حياة الخلية [6]. وقد أظهرت النتائج الموضحة في جدول (1) وجود زيادة معنوية ($p < 0.01$)في النسبة المئوية للكروموسوم الحلقي (14.70) (شكل1-b) التقاء النهايات الكروموسومية (4.94) (شكل a-1) , أشكال كروموسومية شاذة (47.11) (شكل 2) , نقصان المجموعة الكروموسومية (13.23) (شكل 3) وفرط المجموعة الكروموسومية (19.52) (شكل 4) مقارنة بعينة السيطرة (0.0) . وتتطابق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة[7] حيث ازدادت نسبة حدوث التشوهات الكروموسومية المختلفة لدى المرضى بعد العلاج الكيميائي بأستخدام عقار الـ Doxorubicin والـ vin blastin كما موضح في (جدول 1) والأشكال (b-1), (a -1), (2), (3) (4), (5), (6) وتتطابق نتائج الدراسة الحالية (شكل 6) مع دراسة [8] . إن بعض الأدوية الكيميائية تعمل على منع الخلايا من الانقسام عن طريق التأثير في خيوط المغزل Spindal Fibers منها عقار الـ vincristine والـ vinblastine وتتطابق نتائج الدراسة الحالية شكل (4 أ-ب) مع دراسة [9] التي بينت حدوث تغيرات كروموسومية لبعض المرضى بعد العلاج الكيميائي ومنها (p23;q23) (9;11) t ,(5q) del-5- بالاضافة إلى ظهور تشوهات كروموسومية وأشكال كروموسومية شاذة.



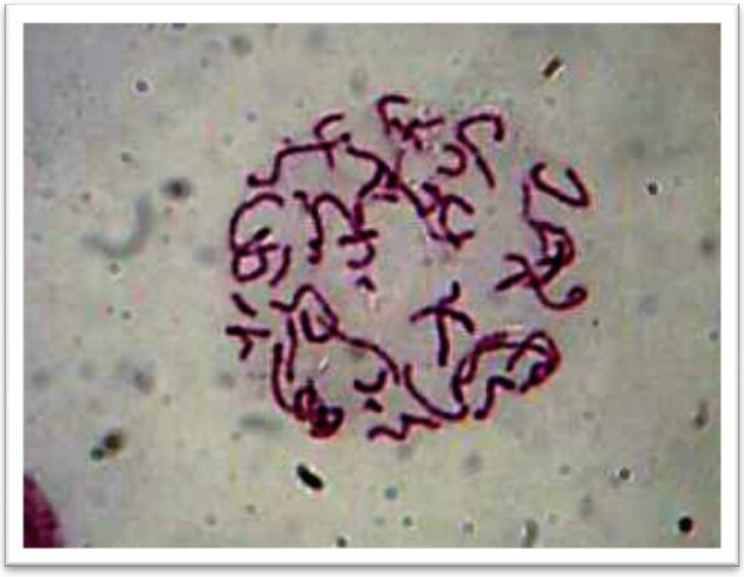
- أ-



- ب-

شكل (1) اشكال كروموسومية شاذة لكروموسومات الطور الاستوائي (Metaphase) لخلايا الدم اللمفاوية لمرضى بعد العلاج الكيميائي .
أ- التقاء النهايات الكروموسومية .
ب – (a) التصاقات كروموسومية , (b) كروموسوم حلقي .
(1600 X، صبغة جمزا)

- أ –



- ب-

شكل (2) اشكال كروموسومية شاذة لكروموسومات الطور الاستوائي (Metaphase) لخلايا الدم اللمفاوية لمرضى بعد العلاج الكيميائي .

أ- تكثف غير تام مع تطاول كروموسومي.

ب –تكثف بسيط جداً مؤدياً إلى تكوين أشكال كروموسومية خيطية غير منتظمة.

(1600 X، صبغة جمزا)

شكل (3) قلة المجموعة الكروموسومية لخلايا الدم اللمفاوية لأحد المرضى بعد العلاج الكيميائي .
(1600 X، صبغة جمزا)

شكل (4) تكثف شديد مع قصر كروموسومي وفرط المجموعة الكروموسومية لخلايا الدم اللمفاوية لاحد المرضى بعد العلاج الكيميائي .
(1600 X، صبغة جمزا)

شكل (5) كروموسومات متجزأة خلال الطور الاستوائي لخلايا الدم اللمفاوية لأحدى المريضات بعد العلاج الكيميائي .
(1600 X، صبغة جمزا)

شكل (6) التصاق سنتروميري للكروموسومات المتناظرة في الطور الاستوائي (Metaphase) لخلايا الدم اللمفاوية لمرضى بعد العلاج الكيميائي .
(1600 X، صبغة جمزا)

جدول (1) النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية لدى الذكور ,الاناث بعد العلاج الكيميائي مقارنة بالعينة القياسية

الفئة	العدد	كروموسوم حلقي ring chromosome	التقاء النهايات الكروموسومية End to end association	اشكال كروموسومية شاذة Bizarre configuration	نقصان المجموعة الكروموسومية Ploidy reduction	فرط المجموعة الكروموسومية Hyperdiploidy	تحلل كروموسومي
العينة القياسية	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
الذكور	17	14.70** ±1.81	4.94** ±1.47	47.11** ±1.66	13.23** ±4.23	19.52** ±4.18	0.0
الاناث	13	2.61* ±1.07	0.0	8.76** ±2.49	8.38 ±3.56	11.76* ±3.34	1.15* ±0.37

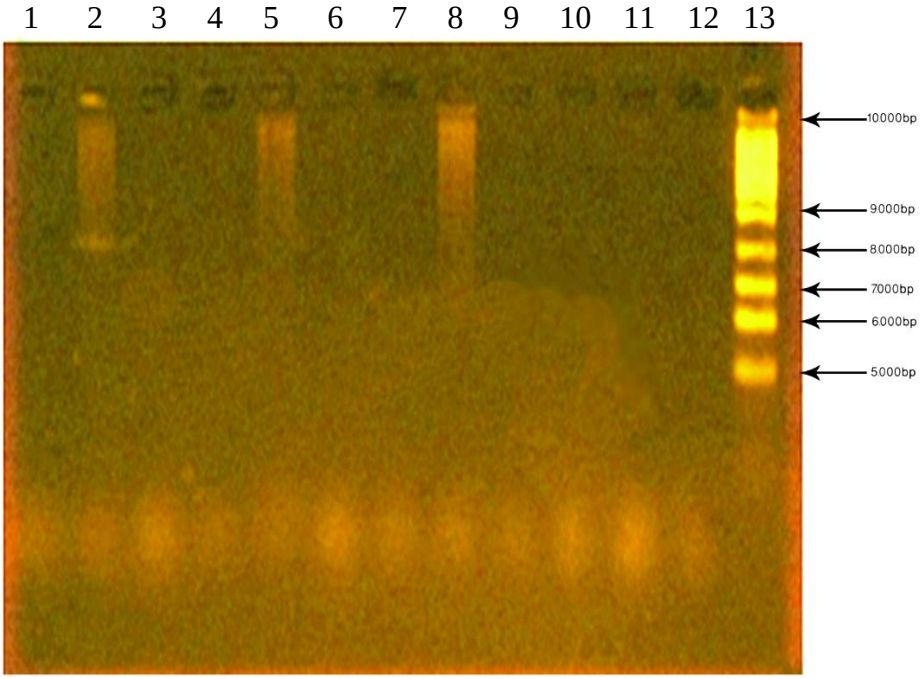
المعدل ± الخطأ القياسي
$p<0.05$ *
$p<0.01$**

استخدام عناصر الالكلة alkylating agents مثل عقار الـ cyclophosphamide الذي يتداخل مع عمليات الانقسام ويعمل على احداث تغيرات كروموسومية مختلفة مثل حذف في الذراع القصير لكروموسوم 7 del(7q)/ 7 – في 26% من المرضى بالإضافة إلى تأثير هذا العقار في الـ DNA لعمله على تفتيت هيكلية الحامض النووي في كل مراحل دورة حياة الخلية [10]. وكانت نسبة التشوهات لدى الإناث اقل من الذكور بصورة عامة وكانت معنوية ($p < 0.05$) للكروموسوم الحلقي (2.61) , وكروموسومات مجزأة (1.15) (شكل 5) مقارنة بالعينة القياسية , إشكال كروموسومية شاذة (8.76) (شكل 2) , نقصان المجموعة الكروموسومية (8.38) وفرط المجموعة الكرموسومية (11.76) مقارنة بالعينة القياسية . وتتوافق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة [11] في حدوث ارتفاع معنوي بنسبة التشوهات الكروموسومية وخاصة الإشكال الكروموسومية الشاذة والكروموسومات الحلقية بعد العلاج الكيميائي باستخدام عقارات كيميائية مختلفة. وربما يعود سبب حصول هذه التشوهات إلى كون العقار الكيميائي كأي مادة سامة تعمل باليات مختلفة التأثير في المادة الوراثية واحد اهم هذه الميكانيكيات إنتاج الجذور الحرة Free radical في الدم تعمل على أكسدة الـ DNA وإحداث الكسور الكروموسومية .وتم تحديد جين الـ FLT3 الطافر في مرضى اللوكيميا قبل وبعد العلاج الكيميائي ممن لديهم تغيرات كروموسومية ومن ليس لديهم وأظهرت نتائج الدراسة الحالية شكل (7) حدوث طفرة لثلاث مرضى فقط , مجال رقم (5) مريض لوكيميا ليس لديه تغيرات كروموسومية بعد العلاج الكيميائي , مجال رقم (2) مريض لوكيميا لديه تغير في الهيأة الكروموسومية 45,XY , t (9:22) بعد العلاج الكيميائي ومجال رقم (8) مريض لوكيميا لديه تغير في الهيأة الكروموسومية 45,XY, (-1) , del (1) قبل العلاج الكيميائي والحجم الجزيئي لكل هذه الطفرات كان 10.000 bp زوج قاعدي. يلعب جين الـFLT3 دورا مهما في انقسام وتمايز الخلايا الجذعية (stem cell) ومن اكثر الطفرات شيوعا لجين الـ FLT3 هي المضاعفات المترادفة الداخلية (FLT3 / ITD) فقد حددت بعض الدراسات الطفرات التي تحدث لهذا الجين و التي تعتبر من العوامل التشخيصية الاولية للاصابة بسرطان ابيضاض الدم الحاد Acute mylioed leukemia AML[12].وفي دراسة [13] تبين ان مستويات تعبير جين الـ FLT3 تختلف بأختلاف انواع اللوكيميا لدى الكبار وزيادة تعبير جين الـ FLT3 كما ان وجود FLT3/ ITD يعتبر من العلامات السريرية المهمة للاصابة باللوكيميا الحادة AML .وبينت الدراسة الحالية شكل (7) المجال (2) حدوث طفرة لجين FLT3 مع تغيرات كروموسومية غير طبيعية وهذا يتطابق مع دراسة [14] والتي بينت امكانية حدوث الطفرات لجين الـ FLT3 بعد العلاج الكيميائي لعدد من المرضى بأستخدام عقاري الـ Cytarabineوالـ Daunorubicin التي تكون ذات سمية عالية تعمل على احداث طفرة في جين الـFLT3. ويعتبر الـFLT3 من المفاتيح الجزيئية والتي تلعب دورا مهما في أمراضية الـ AML [15] . كما وتطابقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة[16] والتي أجريت على 113عينة أخذت من نخاع العظم حيث وجد أن 17.7 % لديهم طفرة ITD / FLT3 بعد العلاج الكيميائي وبقية المرضى ان لديهم طفرة قبل العلاج الكيميائي أيضا وهذا يتطابق أيضا مع دراسة [17] التي أشارت إلى حدوث طفرة لجين FLT3 بعد العلاج الكيميائي .وتتطابق نتائج الدراسة الحالية شكل (7) المجال (5) والمجال (8) مع دراسة [18] والتي اجريت على 80عينة مأخوذة من نخاع العظم حيث وجد ان 14.28 % من المرضى لديهم طفرة في جين FLT3 / ITD مع هيأة كروموسومية طبيعية 20 % من المرضى لديهم طفرة في جين الـ FLT3 / ITD مع هيأة كروموسومية معقدة complex karyotype وفي دراسة [19]والتي شخصت طفرات في عدد من الجينات مثل MLL, NPM1, FLT3 وCEBPA في الـ AML وخصوصا في المرضى الذين يكون لديهم هيأة كروموسومية طبيعية. يعتبر حدوث طفرة في جين

الـFLT3 اكثر ترددا عن غيره من الجينات. وأظهرت دراسة [20]أن أكثر من 35 % من المصابين بالـ AML تظهر لديهم طفرات في جين FLT3 .و أظهرت نتائج الدراسة الحالية تحديد الجين الطافر الـ MLL لخمس من النساء ويلاحظ من الشكل (8) تحديد رقم (5) مريض لوكيميا ليس لديه تغيرات كروموسومية بعد العلاج الكيميائي ولديه ايضا طفرة في جين FLT3 , مجال رقم (6) , (7) مريض لوكيميا ليس لديه تغيرات كروموسومية قبل العلاج الكيميائي , مجال رقم (9) مريض لوكيميا ليس لديه تغيرات كروموسومية قبل العلاج الكيميائي ومجال رقم (8) مريض لوكيميا تغير في الهيأة الكروموسومية (1) del , (1-) , 45,XY قبل العلاج الكيميائي وفي نفس الوقت لديه طفرة في جين الـ FLT3 والحجم الجزيئي للحزمة في عينة رقم (8) هو 10.000 bp زوج قاعدي بينما بلغ الحجم الجزيئي لكل من المجالات (5) ,(6) ,(7) ,(9) 8.000bp زوج قاعدي .

ان الطفرات التي تحدث في جين (Mixed linage leukemia (MLL تعد من اول التداخلات الجزئية التي تحدث لمرضى الـ AML وتشكل نسبة 10 % من مجموع الطفرات التي تحدث لمرضى اللوكيميا الحادة [21]. وتتفق نتائج الدراسة الحالية (شكل 8) المجـــال (6),(7) (9) (10) مع دراســـة [22] التي اظهرت حدوث اختلالات في جين الـMLL لعدد من مرضى اللوكيميا على الرغم من وجود هيأة كروموسومية طبيعية.واظـــهرت دراســـــة [23] ان البروتينات التي يشفر لها جين MLL تلعب دورا مهما في احداث اللوكيميا وخاصة AML واللوكيميا اللمفاوية (acute lymphocytic leukemia (ALL .واتفقت نتـــائج الدراسة الحالية (شكل 4-11) المجال (5) مـــع دراســـة [24] والتي اجريت على 61 مريضا بـ الـAML 27 مريضا يعالجون اشعاعيا ,34 مريضا يعالجون كيميائيا اظهرت النتائج حدوث انتقالات لجين MLL في كلا المجموعتين وحدوث مضاعفات لهذا الجين على الرغم من ان المرضى لديهم هيأة كروموسومية طبيعية وبينت دراسة [25] حدوث انتقالات جينية لـMLL نتيجة العلاج بأستخدام عقارات كيميائية مختلفة كلا حسب نوعه وحسب الجرعة المعطــــاة.واظـــهرت الـــدراسة الحـــالية (شكل 8) المجال 8 حدوث طفرة لجين MLL اضافة الى حدوث طفرة لجين FLT3 مع هيأة كروموسومية غير طبيعية حيث من الممكن ان تحفيز البروتين المنتج من جين الـMLL يحفز مجموعة المستقبلات لجين الـ FLT3 وتعملان عـــلى احداث الاصابة باللوكيمــــيا [26] .وتتطابق نتائج الدراسة الحاليـــة مـــع دراســـة [27] ممكن ان يحدث تداخل بين جين MLL وجين FLT3 عن طريق البروتينات التي يشفر لها كل جين مثل بروتين MLL-ENL والذي يعتبر احد الانواع الاخرى من منتجات جين MLL والتي تحفز جين الـFLT3 .واظهرت دراسة [28]ان نسبة 30 % الى 40 % من المرضى والذي تكون لديهم طفرة MLL-PTD تكون لديهم طفرة FLT3.ITD بينما من النادر وجود طفرة في جين NPM1 اوCEBPA مع MLL-PTD .

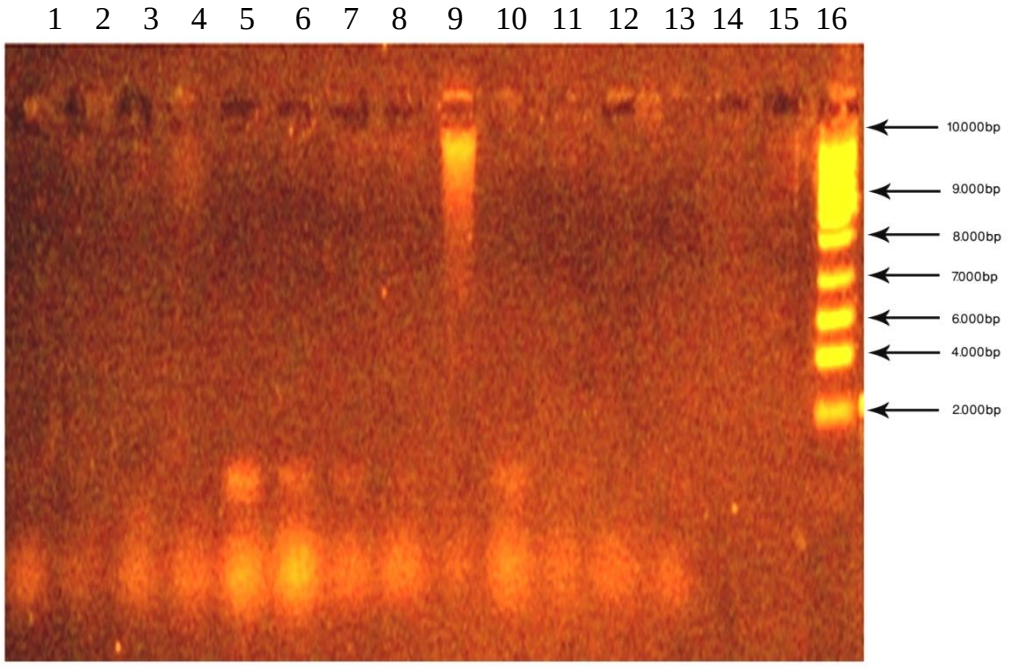
وتحدث طفرات في جين MLL او جين FLT3 او الاثنين معا لدى بعض المرضى على الرغم من وجود تغيرات كروموسومية منها (t(15;17), t(8;21)(q22;q22او تكون لديهم هيأة كروموسومية معقدة lcaryotype comlex (t(3;3)(q21,q26 (in(3) (q21 q26 اوتغيرات عددية -5 او 7 – [29]. ويعتبر جين الـ MLL من اكثر الجينات التي تحدث لها انتقالات وتؤثر بمدى واسع في احداث اللوكيميا الحادة الـ AML [30].



شكل (7) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لجين FLT3 لمرضى AML .

- **المجال (1,3,4) مرضى لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية بعد العلاج الكيميائي .**
- **المجال (2) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية غير طبيعية (45,XY,t(9:22 ويلاحظ حدوث طفرة لجين FLT3بعد العلاج الكيميائي .**
- **المجال (5) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية وحدوث طفرة لجين FLT3قبل العلاج الكيميائي .**

- المجال (8) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية غير طبيعية 45,XY,(-1) ,del (1) ويلاحظ حدوث طفرة لجين FLT3 قبل العلاج الكيميائي .
- المجال (6,7,9,10,11) مرضى لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية قبل العلاج الكيميائي .
- المجال (12) عينة السيطرة .
- المجال (13) DNA Ladar .



شكل (8) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لجين MLL لمرضى AML .

- المجال (1,2,3,4) مرضى لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية بعد العلاج الكيميائي .
- المجال (5) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية وحدوث طفرة لجين MLL بعد العلاج الكيميائي .
- المجال (6) , (7) مرضى لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية وحدوث طفرة لجين MLL قبل العلاج الكيميائي .
- المجال (8) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية غير طبيعية 45,XY,(-1) ,del (1) ويلاحظ حدوث طفرة لجين MLL قبل العلاج الكيميائي .
- المجال (9,10) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية قبل العلاج الكيميائي .
- المجال (11,12,13) مريض لوكيميا مع هيأة كروموسومية طبيعية بعد العلاج الكيميائي .
- المجال (14,15) عينة السيطرة .
- المجال (16) DNA Ladar .

المصـــــادر :

1- **Wilkes,GM;Ingwersen,K.and Barton,B.(2006).**Oncology drug handbook . Bartlett publisheres .5 th ed :50-100.

2- **Eyre,HJ;Lange,DP.andMorris,LB.(2007).**Cancer chemotherapy .American Cancer society .***35***(10) : 422-427.

3- **Bethesda,M D.(2006).** Childhood acute myeloid leukemia .National cancer Institute . 9:25-39.

4- **Cowell, H.B. (1982) .** Types of Chromosomal Changes in human and animal. Carcinog. Mutagen. 22:8 – 51.

5- **Prifer, V**.(1984). Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. In : Advanced molecular genetics. Springerverlage, Berline , 26-37.

6- **Amadori,S.; Suciu,S. and Stasi,R.(2005).**Ozogamicin as a single treatment for Frial patients 61 years of age and older with acute myeloid leukemia . Leukemia .,***19***:1763-1773.
7- **Lucy,G.and Michelle,M.(2007).**Therapy related AML :clinical and Morphological features . Blood .***27***:71-75.
8- **Appelbaum,F. and Pearce,S.(2006) .**Hematopoietic cell transplantation in First complete remission versus early replace .Res.Clin .Hematol.***19***: 333-339.
9- **Buccisono,F.;Maurillo,L.andGattei,V.(2006).**The kinetics of reduction of Minimal residual disease impacts on duration of response and survival Of patients with acute myeloid leukemia .leukemia .***20***:25-27.
10- **Estey, E.; Thall, F. and Cortes,J.(2007).**Comparision of idorubicin fludarabine And , topotecan based regimens in teretment of newly diagnosed acute Myeloid leukemia . Blood .***98***:3575-3583.
11- **Grimwade,D.;Hills,R.and Moorman,V.(2010).**Refinement of cytogenetic Classifiction in acute myeloid leukemia :determination of prognostic Significance of rare recurring chromosomal abnormalities.Blood .***116***: 354-365.
12- **Nahla ,M.and Thoraya,M.(2010).**Internal tandem duplication of FLT3 Gene in egyption adult with acute myeloid and acute lymphoplastic leukemia J AS.***6***(9):344-350.
13- **Hong,P.;Guang,S.;Fan,G.;Jian,K.andYang,Z.(2007).**Fms like tyrosin kinase(FLT) 3 and FLT3 internal tandem duplication in different types of Adult leukemia : analysis of 147 patients .Blood.***49***:650-659.
14- **Levis ,M. and Small,D.(2005).**FLT3 tyrosine kinase inhibitors .Int J Hematol . ***82***:100-107 .
15- **Shinichiro,T.(2011).**Dowenstream molecular pathway of FLT3 in the Pathogenesis of acute myeloid leukemia :biology and therapeutic Implications . Hematology and Oncology .***15***:1-23.
16- **Natasa ,C.;Sanja,A.;Marija,D.;Vladimir,B.andMilica,C.(2007).**Important of Early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute Myeloid leukemia . Ann.Hematol.***86***:741-747.
17- **Beitinjaneh,A.;Jang,S.;Roukoz,H.andMajhail,N.(2010):**Prognostic Significance of FLT3 internal tandom duplication and tyrosine kinase Domain mutations in acute leukemia .Leuk.Res.***34***:831-836.
18- **Ewa,M.;Marta,P.;Tomasz,N.;Jerzy,N.and Danuta,J.(2010).**FLT3 internal tandem duplication and FLT3-D835 mutation in 80 AML patients categorized in to cytogenetic risk group .Hig Med Dow.***64***:466-470.
19- **Gregory,T.;Wald,D.;Chen,Y.;Xiong,Y.and Tse,W.(2009).**Molecular Prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal Cytogenetics . J Hematol .Oncol. ***2***:23-27.
20- **Thomas ,K.;Daniel,B.,Lipka,C.and Thomas,F.(2010).**FLT3 as therapeutic target in AML :still challenging after all these years .Blood .***116***(24): 1-19.
21- **Bloomfield ,C.;Mrozek,K.andCaligiuri,M.(2006).**Cancer and leukemia group B leukemia correlative science commit-tee :major accomplishments And futurs directions . Clin cancer Res.***12***:364-367.
22- **Cerveria ,N.;Correia ,C.and Bizarro,S.(2006).**SEPT2 is a new fusion partner Of MLL in acute myeliod leukemia with t(2;11) (q37;q23) oncogene. ***25***: 6147-6152.
23- **Matthew ,C.;Lee,N.;Tatiana,R.;Garrett,M.andThomos,L.(2008):**Aberrant Chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed - Lineage leukemia. genedev. ***22***:3403-3408.
24- **Sergiy,V.;Karin,B.;Klaus,R.;Vladimir,G.and Bebeshko,D.(2005).**MLL Gene alterations in radiation –associated acute myeloid leukemia . Oncology .***27***(1):71-75.

25- **Mrozek,k;Marcucci,G;Paschka,P.and Whitman,SP. (2007).** clinical relevance of Mutations and gene –expression changes in adult acute myeloid Leukemia with normal cytogenetics .Blood .***109*** : 43-48.

26- **Ayton,P. and Cleary ,M.(2005).**Molecular mechanism of leukemia genesis Mediared by MLL fusion protenis .oncogene .***20***:5695-5707.

27- **Ryoichi,O.;Hideaki,N.;Katsutoshi,O.;Hidetoshi,K.and Tomohiko,T. (2005).** Dimerization of MLL fusion protiens and FLT3 activation synergize To induce multiple –lineage leukemogenesis. oncology .***115***(4):919-929.

28- **Dohner ,K.;Schlenk,R.andHabdank,M.(2005):**Mutant Nucleophosmin (NPM1) Predicts favorable prognosis in younger adults with acute Myeloied leukemia and normal cytogenetics –interaction with other Gene mutations .Blood .***106*** :3740-3746.

29- **Mrozek,K.and Clara,D.(2006):**Chromosome aberrations gene and expression changes and prognosis in adult myeloid leukemia. Hematology . ***27***:169-177.

30- **Thirman,M.;Gill,H.;Burnett,R.and Ziemin,V.(2007):**Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemia with 11q23 chromosomal translocations .New Engl.J.Med.***329***:909-914.