

©Borgis

*Karolina Matiakowska¹, Małgorzata Morgut-Klimkowska¹, Alicja Bartoszevska-Kubiak¹, Krystyna Soszyńska¹, Barbara Mucha¹, Katarzyna Skonieczka¹, Patryk Różycki¹, Małgorzata Całbecka², Maria Czyżewska², Grażyna Gadomska³, Olga Haus^{1, 4}

Mutacja *FLT3*-ITD i jej związek z parametrami klinicznymi i hematologicznymi u dorosłych chorych z ostrą białaczką szpikową – doniesienie wstępne

FLT3-ITD mutation and its correlations with clinical and hematological features in adult patients with acute myeloid leukemia – preliminary report

¹Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Olga Haus

²Oddział Hematologii, Specjalistyczny Szpital Miejski im. M. Kopernika w Toruniu
p.o. Ordynatora Oddziału: dr Małgorzata Całbecka

³Oddział Hematologii, Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dra Jana Biziela w Bydgoszczy
Ordynator Oddziału: dr med. Grażyna Gadomska

⁴Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Kazimierz Kuliczowski

Streszczenie

Wstęp. Gen *FLT3* koduje w komórkach progenitorowych układu krwiotwórczego receptorową kinazę tyrozynową *FLT3*, która po połączeniu z ligandem reguluje procesy proliferacji i różnicowania. W komórkach białaczkowych często obserwuje się stałą, niezależną od liganda aktywację receptora *FLT3*. Najczęściej powoduje ją wewnątrz tandemowa duplikacja (*internal tandem duplication*, ITD). Mutację *FLT3*-ITD stwierdza się u ok. 20-30% chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML). Obecność *FLT3*-ITD stanowi niezależny, niekorzystnie rokujący czynnik, pomocny w stratyfikacji chorych.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowił szpik kostny, pobrany od 73 pacjentów (32 kobiet i 41 mężczyzn), hospitalizowanych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej. Równocześnie przeprowadzono analizę molekularną i cytogenetyczną, w celu określenia obecności badanej mutacji oraz identyfikacji aberracji chromosomowych. Na podstawie kariotypu komórek pacjentów wyodrębniono trzy grupy cytogenetyczne o znaczeniu rokowniczym: dobrze, pośrednio i źle rokująca.

Wyniki. *FLT3*-ITD znaleziono u 7 chorych z pośrednim rokowaniem cytogenetycznym i u 4 z niekorzystnym. Nie stwierdzono jej obecności u chorych z dobrym rokowaniem cytogenetycznym. Analizy Kaplana-Meiera wykazały, iż znamienne większe prawdopodobieństwo przeżycia miały osoby bez *FLT3*-ITD, niezależnie od kariotypu.

Wnioski. Obecność mutacji *FLT3*-ITD kwalifikuje chorych do grupy wysokiego ryzyka, niezależnie od grupy rokowniczej, określonej na podstawie kariotypu komórek szpiku. Wpływa również negatywnie na powodzenie leczenia chorych.

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa, mutacja *FLT3*-ITD, PCR, krzywe Kaplana-Meiera

Summary

Introduction. *FLT3* gene, encoding receptor tyrosine kinase (RTK), is expressed in hematopoietic progenitor cells. After interaction of RTK with its ligand it regulates cell proliferation and differentiation. In leukemic cells ligand – independent activation is frequently observed. It is mainly caused by internal tandem duplication (ITD) of *FLT3*. *FLT3*-ITD mutation occurs in 20-30% of acute myeloid leukemia (AML) patients and is an independent, unfavorable prognostic factor, helpful in patients stratification.

Material and methods. We analyzed bone marrow cells from 73 patients with AML (32 women and 41 men). Molecular and cytogenetic analyses were done simultaneously to evaluate mutation and chromosomal aberrations. Patients were categorized according to karyotype results to good, intermediate and poor prognostic groups.

Results. *FLT3*-ITD was detected in 7 patients with intermediate and in 4 with poor cytogenetic risk. Mutation was not found in patients with favorable karyotype. Kaplan-Meier survival analysis revealed higher probability of longer overall survival in patients without *FLT3*-ITD mutation, independently of karyotype.

Conclusions. *FLT3*-ITD mutation classifies patients to poor risk group regardless of karyotype. It also negatively affects treatment results.

Key words: acute myeloid leukemia, *FLT3*-ITD mutation, PCR, Kaplan-Meier analysis

WSTĘP

Gen *FLT3*, zlokalizowany na chromosomie 13q12, zbudowany jest z 24 egzonów. Gen ten koduje receptorową kinazę tyrozynową. Receptor *FLT3* występuje w komórkach macierzystych szpiku i zbudowany jest z 4 domen: zewnątrzkomórkowej (wiążącej ligand), przezbłonowej i dwóch wewnątrzkomórkowych, o aktywności kinazowej. W warunkach fizjologicznych połączenie receptora *FLT3* z jego ligandem powoduje wzbudzenie sygnałów wewnątrzkomórkowych regulujących proliferację i różnicowanie komórek. Ekspresja genu *FLT3* zanika w miarę różnicowania komórek. W komórkach białaczkowych często obserwuje się stałą, niezależną od liganda aktywację receptora *FLT3*, prowadzącą do niekontrolowanej proliferacji komórek. Najczęściej powoduje ją wewnątrzkomórkowa duplikacja (*internal tandem duplication, FLT3-ITD*), po raz pierwszy opisana przez Nakao i wsp. (1). Jest to zwielokrotnienie liczby powtórzeń sekwencji o długości 3 do 400 par zasad (pz) w egzonie 14 lub 15. Sallmyr i wsp. wykazali, że *FLT3*-ITD może być początkiem kolejnych zmian prowadzących do niestabilności genomu. Jest to związane, między innymi ze zwiększeniem ilości reaktywnych form tlenu, co prowadzi do uszkodzeń DNA i jego nieprawidłowej naprawy (2). Mutację *FLT3*-ITD stwierdza się u ok. 20-30% chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML), w grupie cytogenetycznej o zarówno dobrym, jak i pośrednim lub złym rokowaniu. *FLT3*-ITD stanowi niezależny, niekorzystny czynnik rokowniczy, pomocny w stratyfikacji chorych, zwłaszcza w grupie o pośrednim rokowaniu cytogenetycznym, a wśród nich w grupie o prawidłowym karyotypie (NK-AML = *normal karyotype* AML). Obecność *FLT3*-ITD kojarzy się u nich z krótszym czasem trwania całkowitej remisji (CR), krótszym czasem wolnym od choroby (DFS) oraz krótszym całkowitym przeżyciem (OS). Również w grupie z korzystnymi aberracjami chromosomowymi, szczególnie t(15;17), może się pojawić *FLT3*-ITD, a jej obecność pogarsza rokowanie i jest wskazaniem do intensyfikacji leczenia.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 73 chorych, 32 kobiety i 41 mężczyzn, z rozpoznaniem AML, hospitalizowanych w

latach 2008-2010 w oddziałach hematologii Szpitala Miejskiego w Toruniu i Szpitala Uniwersyteckiego w Bydgoszczy. W momencie rozpoznania choroby byli w wieku od 24 do 85 lat (mediana 60; śr. arytm. $59,4 \pm 12,2$); kobiety w wieku 36 do 77 (mediana 59; śr. arytm. $57,1 \pm 11,2$), mężczyźni 24 do 85 (mediana 61,5; śr. arytm. $61,2 \pm 12,8$). Liczba krwinek białych (WBC) wynosiła od 0,45 do 378 G/L (mediana 22), zaś odsetek blastów w szpiku od 0,2 do 94,4% (mediana 49,2). Materiał do badań stanowił szpik kostny, z którego izolowano DNA metodą kolumnkową (Qiagen). Reakcja PCR została przeprowadzona według Kottaridis i wsp. (3). Produkty PCR były poddawane elektroforezie w 2% żelu agarozowym. Typ dziki *FLT3* (*wild type* – wt) był rozpoznawany jako prążek o wielkości 328 bp, *FLT3* z mutacją ITD jako fragment o zmiennej wielkości od 346 do 550 bp. W badanej grupie oznaczono również obecność genów fuzyjnych *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* oraz *AML1-ETO* metodą RT-PCR wg Biomed-1 (4).

Niezależnie od badań molekularnych, u 62 pacjentów określono karyotyp komórek szpiku. W tym celu prowadzono standardową hodowlę komórkową; 24-godzinna niestymulowana (bez mitogenu) i 48-godzinna stymulowana GM-CSF. Uzyskany materiał analizowano z zastosowaniem techniki prążkowej GTG oraz techniki FISH.

Prawdopodobieństwo przeżycia całkowitego (OS) i wolnego od choroby (DFS) oraz prawdopodobieństwo osiągnięcia remisji oszacowano metodą Kaplana-Meiera.

WYNIKI

W badanej grupie mutację *FLT3*-ITD wykryto u 11 chorych (15%) w wieku 37-74 lata (mediana 63), WBC 3,3-75,8 G/L i blastozą 18-88,6%. Były to 4 kobiety (wiek 37-62 lata) i 7 mężczyzn (wiek 51-74 lata). U pozostałych 62 chorych nie wykryto tej mutacji. Byli to chorzy w wieku 24-85 lat (mediana 60), WBC 0,8-378 G/L i blastozą 0,6-90%, 27 kobiet (wiek 36-76 lat) i 35 mężczyzn (wiek 24-85 lat) (tab. 1). Nie wykryto znamienych statystycznie różnic między obydwoma grupami, uwzględniając WBC ($p = 0,5$), blastozę szpiku ($p = 0,96$), wiek ($p = 0,47$) i płęć ($p = 0,66$).

Tabela 1. Dane kliniczne, cytogenetyczne i molekularne pacjentów z AML.

Lp	Numer pacjenta	Wiek przy rozpoznaniu/ płeć	WBC G/L	Blastoza szpiku %	<i>FLT3</i> - ITD	Geny fuzyjne	Kariotyp komórek szpiku	Grupa ryzyka	Czas do uzyskania remisji	Czas wolny od choroby (DFS)
1	2304	65/K	64,4	26,8	+	-	NK	IR	0	0
2	3457	62/K	24,0	78,8	+	-	NK	IR	4	3
3	3585	60/M	60,0	72,0	+	-	46,XY,dup(11) (?p14)[10]/46,XY[19]	IR	2	0
4	3876	63/M	75,8	18,0	+	-	NK	IR	0	0
5	2415	66/K	28,0	88,6	+	-	46,XX,t(1;?)(p36;?), del(2)(q?),der(7).del(9) (q21q22),der(12)[11]	PR	0	0
6	2459	70/M	3,3	19,4	+	-	46,XY,del(9)(q21q22), del(11)(q21q23)[8]	PR	4	2
7	2591	51/M	6,6	22,4	+	-	NK	IR	1	6
8	2697	74/M	36,0	71,4	+	-	NK	IR	0	0
9	2789	60/M	130,0	71,2	+	-	45,X,-Y[22]/46,XY[1]	IR	1	0
10	2869	66/M	45,6	65,2	+	-	45,XY,-7[12]/46,XY[6]	PR	0	0
11	3704	37/K	0,7	32,6	+	-	47,XX,+11[4]/ 46,XX[13]	PR	1	6
12	2255	71/M	92,0	84,4	-	-	-	bd	16	0
13	2390	64/M	145,0	90,0	-	-	NK	IR	16	0
14	2448	65/M	241,0	75,6	-	-	47,XY,+8[3]/48,XY- ,+8,+8[4]/46,XY[13]	IR'	2	0
15	2421	51/M	2,8	42,8	-	-	40-43,XY,-4, der(7)?t(7;8) or t(7;13),-8,-9,-13,-14, t(13;14) (q10;q10),-16, der(16),t(16;?)(?q24;?), t(17;?) (q25;?),der(19), der(21)t(21;?)(p11.2;?), i(22)(q10),+r(?),+r(?), +mar[cp16]	PR	15	0
16	2607	65/K	8,5	74,8	-	-	-	bd	16	0
17	2822	56/K	17,0	62,0	-	CBFB- MYH11	46,XX,inv(16)(p13q22)	GR	1	1
18	2882	49/K	132,0	46,4	-	-	NK	IR	5	11
19	2952	74/K	3,3	36,8	-	-	-	bd	1	0
20	3030	61/M	13,4	64,0	-	-	45,XY,-7[18]/46,XY[2]	PR	1	12
21	3113	50/M	1,5	12,8	-	-	NK	IR	12	1
22	3120	44/K	1,6	40,0	-	-	NK	IR	6	7
23	3136	64/K	16,6	42,0	-	-	NK	IR	13	5
24	3152	75/K	48,0	71,6	-	-	47,XX,+8[9]/46,XX[16]	IR	12	0
25	3154	76/M	3,0	22,4	-	-	-	bd	3	0
26	3158	60/K	3,0	25,6	-	-	46,XX,t(17;17) (q25;q12)[16]/ 47,XX,t(17;17) (q25;q12),+8[6]	IR	10	0
27	3160	65/K	3,0	37,2	-	-	-	bd	9	1
28	3205	31/M	20,0	46,4	-	-	NK	IR	8	12
29	3244	38/M	5,4	50,0	-	-	NK	IR	1	1
30	3246	56/K	176,0	86,0	-	-	NK	IR	6	6
31	3279	68/M	2,5	48,4	-	-	NK	IR	6	0
32	3395	77/M	16,0	83,6	-	-	NK	IR	3	0
33	3412	60/K	2,5	28,0	-	-	48,XX,+8,+8[7]/ 46,XX[5]	IR'	2	3
34	3423	65/K	3,0	26,0	-	-	NK	IR	1	1
35	3459	57/K	2,4	18,0	-	-	NK	IR	1	0
36	3529	53/M	45,0	92,8	-	-	-	bd	0	0
37	3675	54/M	378,0	91,2	-	-	47,XY,+21[21]/ 46,XY[1]	IR	1	0
38	3689	51/K	85,0	94,4	-	-	46,XX,t(11;17) (q23;q25)[25]	PR	1	3
39	3761	56/K	1,1	86,9	-	-	47,X,inv(X)(p11.2q22),+8[18]	IR	2	2

Tabela 1. Dane kliniczne, cytogenetyczne i molekularne pacjentów z AML. Ciąg dalszy.

Lp	Numer pacjenta	Wiek przy rozpoznaniu/ płeć	WBC G/L	Blastoza szpiku %	FLT3- ITD	Geny fuzyjne	Kariotyp komórek szpiku	Grupa ryzyka	Czas do uzyskania remisji	Czas wolny od choroby (DFS)
40	3908	76/M	2,8	13,2	-	-	46,XY,del(7)(q21)[2]/ del(7) (q21),-21,+mar[10]/ 47,XY,der(3),del(7) (q21),-21,+2×mar[1]/ 46,XY[2]	PR	13	4
41	3930	63/M	1,8	46,0	-	CBFB- MYH11	46,XY,inv(16) (p13q22)[3]/ 92,XXYY, inv(16)(p13q22)×2[2]/ 46,XY[1]	GR	3	10
42	3966	61/M	2,1	60,4	-	-	-	bd	5	0
43	3971	36/K	79,8	84,0	-	-	-	bd	1	0
44	3960	63/K	4,9	34,0	-	-	46,XX,t(3;14)(q21;q32),del(11) (q23)[15]/ 46,XX,t(3;14) (q21;q32),add(7)(q22), del(11)(q23)[5]	PR	5	0
45	2243	69/M	70,0	30,8	-	-	NK	IR	12	0
46	2384	50/K	28,3	1,4	-	-	NK	IR	1	19
47	2396	70/K	11,4	10,4	-	-	47,XX,+13[15]	PR	1	0
48	2397	60/M	52,8	68,2	-	-	45,XY,-7[10]/46,XY[2]	PR	3	0
49	2430	49/K	67,5	71,8	-	-	46,XX,t(9;11) (p13~p22;q23)[10]	IR	2	0
50	2548	59/K	68,5	93,0	-	-	NK	IR	10	8
51	2656	52/K	40,0	83,4	-	-	47,XX,+13[6]/ 46,XX,-11,+13[1]/ 45,XY,-11,+13,-18[4]/ 46,XX,+13,-21[13]/ 46,XX[4]	PR	20	14
52	2777	55/M	0,8	0,2	-	-	-	bd	1	1
53	2790	85/M	154,0	-	-	-	-	bd	1	0
54	2836	44/M	3,6	26,0	-	-	46,XY,i(11)(q10)[1]/ 47,XY,i(11)(q10), +mar[3]/46,XY[5]	PR	11	2
55	2874	49/K	35,0	5,2	-	-	NK	IR	15	12
56	3049	47/M	23,0	81,4	-	-	46,XY,t(6;11)(q27;q23)[20]	PR	15	8
57	3060	74/M	49,0	21,2	-	-	47,XY,+8[14]	IR	3	0
58	3110	24/M	6,0	66,0	-	-	45,XY,-7[11]/ 44,XY,-7,-18[3]	PR	15	0
59	3193	76/M	200,0	53,8	-	-	46,XY,del(7)(q22q32)[10]	PR	1	0
60	3228	70/M	82,0	86,0	-	-	NK	IR	12	0
61	3268	70/M	2,7	10,8	-	PML- RARA	46,XY, t(15;17)(q22;q21)[20]	GR	12	5
62	3349	49/M	8,0	25,6	-	AML1- ETO	45,X,-Y, t(8;21)(q22;q22)[10]	GR	2	1
63	3448	39/K	49,0	7,0	-	-	NK	IR	8	1
64	3476	60/M	211,0	80,0	-	-	46,XY, t(11;13)(q21;q22)[24]	IR	5	0
65	3485	36/K	45,4	66,0	-	-	47,XX,+8[20]	IR	9	6
66	3609	52/M	30,0	54,0	-	-	46,XY, t(3;3)(q21;q26)[20]	PR	7	4
67	3664	59/M	150,0	74,8	-	-	NK	IR	6	11
68	3685	77/M	16,8	62,4	-	-	47,XY,+21[15]	IR	1	0
69	3694	60/M	22,0	62,4	-	-	NK	IR	6	1
70	3766	64/M	2,1	18,0	-	-	NK	IR	3	8
71	3916	62/M	2,0	9,0	-	-	-	bd	2	4
72	3962	76/K	2,5	35,2	-	-	NK	IR	2	0
73	3973	73/M	90,0	0,6	-	-	NK	IR	1	0

-- brak badanej zmiany; + - obecność badanej zmiany; NK - kariotyp prawidłowy; PR - niekorzystne rokowanie; IR - pośrednie rokowanie; GR - dobre rokowanie; * - tetrasomia chromosomu 8 pogarsza rokowanie, bd - brak danych; w nawiasie [] umieszczono liczbę metafaz, w których występuje zapisana aberracja chromosomowa

Na podstawie wyniku badania cytogenetycznego komórek szpiku 62 chorych zakwalifikowano do różnych grup rokowniczych: 4 do grupy o korzystnym rokowaniu (GR), 39, w tym 28 z kariotypem prawidłowym (NK), do grupy o pośrednim rokowaniu (IR), 19 do grupy o złym rokowaniu (PR). *FLT3*-ITD znaleziono u 7 chorych z pośrednim rokowaniem cytogenetycznym i u 4 z niekorzystnym. Nie stwierdzono jej obecności u chorych z dobrym rokowaniem cytogenetycznym.

Całkowitą remisję (CR) choroby w grupie *FLT3*-ITD(+) uzyskało zaledwie 4 chorych (36%), zaś w grupie bez mutacji 32 chorych (48%) ($p = 0,5$). Mediana czasu do osiągnięcia CR u chorych z mutacją wynosiła 1,5 miesiąca, a u chorych bez *FLT3*-ITD 1 miesiąc ($p = 0,5$). U wszystkich pacjentów z CR doszło do wznowy choroby. Średni czas wolny od choroby (DFS) u chorych z grupy *FLT3*-ITD(+) wynosił 3 miesiące (1-6 miesięcy), zaś u chorych bez mutacji średni czas DFS wynosił 6 miesięcy (1-19).

9 z 11 (82%) chorych *FLT3*-ITD(+) zmarło, a mediana ich czasu przeżycia wyniosła 3 (1-13) miesiące. Natomiast w grupie chorych bez mutacji zmarło 28 z 62 (45%) chorych, z medianą czasu przeżycia 5,5 (1-15) miesiąca. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w odsetku osób zmarłych z grupy *FLT3*-ITD vs *FLT3*wt ($p = 0,025$). Przyczyną śmierci pacjentów z reguły była choroba podstawowa, czyli ostra białaczka szpikowa, jej wznowa lub progresja, gdy tej wznowy nie osiągnięto. Powodem śmierci był też wstrząs septyczny (po transplantacji szpiku) (7 pacjentów), zapalenie bądź grzybica płuc (5 pacjentów), krwotok (2 pacjentów). U 7 z 37 zmarłych nie rozpoczęto leczenia z powodu szybkiego zgonu lub złego stanu ogólnego, który nie pozwalał na rozpoczęcie chemioterapii.

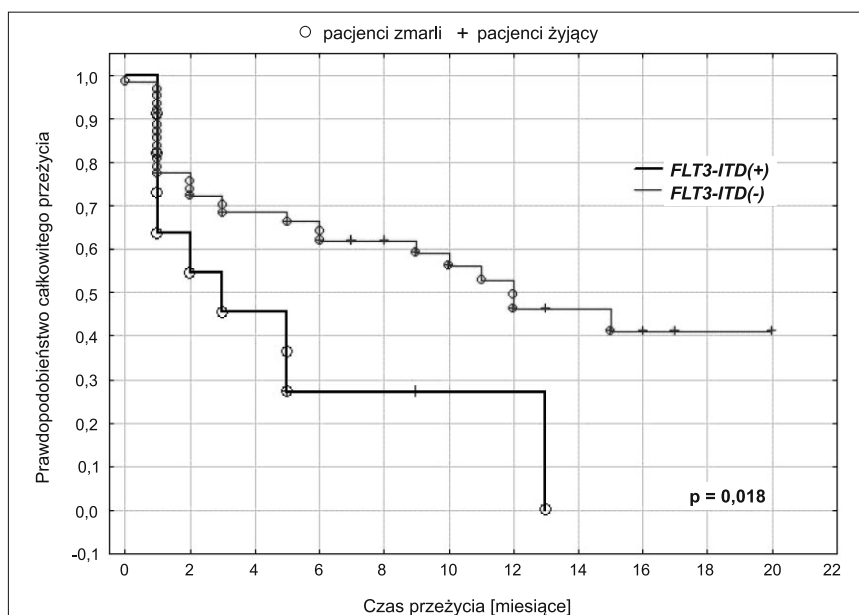
Analiza Kapłana-Meiera wykazała, iż znamienne większe ($p = 0,018$) prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (OS) miały osoby bez *FLT3*-ITD (ryc. 1).

Wśród tych osób 59% miało szansę przeżycia 6 miesięcy, zaś wśród osób z *FLT3*-ITD tylko 27%. 50% osób z grupy *FLT3*-ITD(-) przeżyło 12 miesięcy, natomiast 50% grupy z *FLT3*-ITD(+) przeżyło 3 miesiące (ryc. 1). Krzywe Kapłana-Meiera nie wykazały istotnego statystycznie wpływu obecności *FLT3*-ITD na osiągnięcie CR ($p = 0,095$) oraz na czas jej trwania ($p = 0,054$) (ryc. 2), aczkolwiek w odniesieniu do pierwszego parametru zaznaczał się trend do wolniejszego osiągnięcia remisji u chorych *FLT3*-ITD(+), a w odniesieniu do czasu trwania remisji różnica między grupami *FLT3*-ITD i *FLT3*wt była na granicy istotności statystycznej.

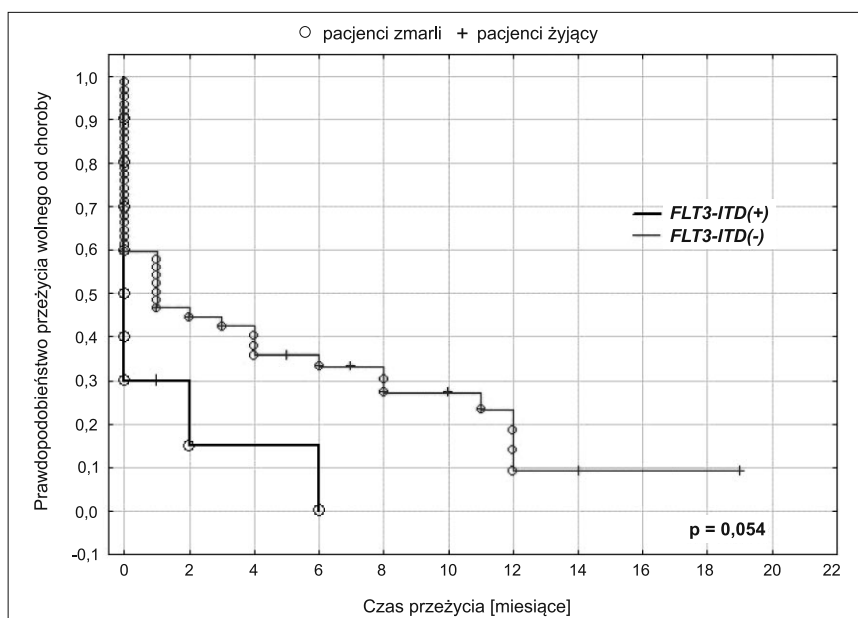
DYSKUSJA

Wewnątrzrandemowa duplikacja (ITD) w genie *FLT3* jest obserwowana u około 25% chorych z rozpoznaniem AML. Schnittger i wsp. wykazali ją u 23% chorych z AML, Kottaridis i wsp. u 27%, a Schlenk i wsp. u 31% (5-7). W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach w grupie chorych z AML *FLT3*-ITD obecna była zaledwie u 15%. Podobną częstość występowania określono w innej polskiej grupie badanych, gdzie mutację *FLT3*-ITD miało zaledwie 12,5% chorych (8). Te niskie, w porównaniu z badaniami w innych populacjach, odsetki chorych z AML z *FLT3*-ITD mogą być wynikiem badania stosunkowo mało liczebnych grup chorych (73 i 80), lecz mogą również odzwierciedlać zróżnicowaną geograficzną lub międzypopulacyjną dystrybucję mutacji.

Stirewalt i wsp. wykazali związek obecności *FLT3*-ITD ze znaczną leukocytozą i blastozą, czego nie zaobserwowano w badaniach własnych, w których mutację tę znaleziono nawet u chorych z niską liczbą białych krwinek (0,7 G/L) (mediana 40,8) (9). Wiek również nie okazał się czynnikiem predysponującym do pojawienia się *FLT3*-ITD. Mediana wieku chorych z *FLT3*-ITD wynosiła 63, a mediana wieku chorych bez mutacji 60 lat.



Ryc. 1. Krzywe Kapłana-Meiera przedstawiające prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (OS) pacjentów z mutacją oraz bez mutacji *FLT3*-ITD.



Ryc. 2. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od choroby (DFS) pacjentów z mutacją oraz bez mutacji FLT3-ITD.

W grupie chorych powyżej 60. roku życia stwierdzenie obecności FLT3-ITD nie wpływa na zakwalifikowanie do grupy źle rokującej, gdyż już sam wiek ≥ 60 jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym.

FLT3-ITD występuje głównie u osób z prawidłowym kariotypem, jednak zaobserwowano ją również u osób z aberracjami chromosomowymi. Spośród chorych z genem fuzyjnym DEK-CAN aż u 90% zaobserwowano FLT3-ITD, a spośród chorych z MLL-PTD u 33% (10).

U niektórych chorych z AML obserwuje się podwyższoną ekspresję genów BAALC, EVI1, ERG i MN1, związaną z niekorzystnym przebiegiem choroby. Wysoka ekspresja ERG związana jest z gorszym osiągnięciem CR, krótszym czasem wolnym od zdarzeń (EFS) oraz krótszym OS. Metzeler i wsp. przeprowadzili badania, w których obok ekspresji ERG oceniali też obecność FLT3-ITD. Wśród osób z wysoką ekspresją ERG oraz z FLT3-ITD zaledwie 5% osiągnęło 5-letni czas przeżycia, natomiast w grupie z niską ekspresją i bez FLT3-ITD – 44% chorych (11). Przedstawione wyniki świadczą, iż wysoka ekspresja genu ERG, jak i duplikacja ITD genu FLT3 są ważnymi czynnikami rokowniczymi, kwalifikującymi chorych do grupy wysokiego ryzyka, a ich obecność stanowi ważny element stratyfikacji chorych.

W niniejszych badaniach, w grupie dobrze rokującej, czyli u chorych z genami fuzyjnymi AML1-ETO, PML-RARA lub CBFβ-MYH11, nie wykazano obecności FLT3-ITD. Mogło to wynikać z niewielkiej liczebności tej grupy (4 chorych). Według danych literaturowych w podobnie nielicznych grupach tylko w niewielu badaniach znaleziono FLT3-ITD. Z wyżej wymienionych genów fuzyjnych FLT3-ITD najczęściej występuje wraz z PML-RARA [w ok. 38% AML PML-RARA(+)], znacznie rzadziej z AML1-ETO [w 4,2% AML AML1-ETO(+)] i z CBFβ-MYH11 [w 3,2% AML CBFβ-MYH11(+)] (12, 13). Mimo obecności genów fuzyjnych związanych z do-

brym rokowaniem, sumaryczne rokowanie u takich chorych jest zależne od obecności FLT3-ITD, a więc niekorzystne.

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań oceniających znaczenie diagnostyczne i prognostyczne dobrze rokujących mutacji genów NPM1 oraz CEBPA, jak też mutacji genowych pogarszających rokowanie, np. DNMT3. Schlenk i in. wykazali, iż obecność mutacji NPM1 bądź CEBPA, bez równoczesnej obecności FLT3-ITD, związana jest z dużym prawdopodobieństwem osiągnięcia CR (7). W tej grupie 4-letni OS osiągało 60% chorych. Natomiast u pacjentów NPM1(-) i FLT3-ITD(+) 4-letni OS osiągnęło zaledwie 24% chorych. Obecność FLT3-ITD stwierdzano częściej u chorych NPM1(+) niż u chorych CEBPA(+). Współistnienie silnego, niekorzystnego czynnika, jakim jest FLT3-ITD z jedną z korzystnie rokujących mutacji, NPM1 lub CEBPA, powodowało łącznie kwalifikację chorych do grupy złego rokowania.

Mutacje genu DNMT3 mają niekorzystne znaczenie rokownicze, prowadzą do skrócenia czasu przeżycia (12,3-miesiące DNMT3mut vs. 41,1 miesiące DNMT3wt). FLT3-ITD występuje u ok. 41% pacjentów z tymi mutacjami. Jednoczesna obecność dwóch niekorzystnie rokujących mutacji skutkuje istotnie krótszym OS niż u pacjentów, u których obecna jest tylko jedna z nich (14).

Należy zauważyć, iż diagnostykę związaną z FLT3-ITD można rozszerzyć określając rozmiar duplikacji ITD oraz stosunek ilościowy FLT3-ITD do FLT3wt. Badania przeprowadzone przez Stirewalta i wsp. wskazują na pogarszanie się rokowania w miarę wzrostu liczby powtórzeń, czyli wydłużania zduplikowanej sekwencji (9). Odsetek osób, które osiągnęły całkowitą remisję, w grupie osób z długością ITD powyżej 40 par zasad (pz) wyniósł zaledwie 35%, zaś z krótszymi

niż 40pz fragmentami – 67%, natomiast odsetek osób z 5-letnim OS w tych grupach wyniósł odpowiednio 13 i 26%. Stosunek ilościowy cząsteczek *FLT3*-ITD do *FLT3*wt również ma istotne znaczenie. W pracy Thiede i wsp. stosunek ilościowy allele zmutowanego do allele dzikiego wahał się od 0,03 do 32,56. Pacjenci, u których wyniósł on powyżej 0,78 mieli zdecydowanie krótszy OS i DFS (15).

Autorzy wszystkich cytowanych badań wskazują na jednoznacznie negatywne znaczenie prognostyczne

obecności *FLT3*-ITD w AML. Także w badaniach własnych krzywe Kaplana-Meiera potwierdziły mniejsze prawdopodobieństwo przeżycia osób z *FLT3*-ITD w porównaniu z grupą chorych bez tej duplikacji.

WNIOSKI

FLT3-ITD jest niezależnym czynnikiem rokowniczym. Niezależnie od kariotypu komórek, jego obecność kwalifikuje chorych do grupy wysokiego ryzyka. Mutacja ta wpływa na czas przeżycia chorych.

PIŚMIENNICTWO

1. Nakao M, Yokota S, Iwai T et al.: Internal tandem duplication of the *FLT3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-1918.
2. Sallmyr A, Fan J, Datta K et al.: Internal tandem duplication of *FLT3* (*FLT3*/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* 2008; 111: 3173-3182.
3. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE et al.: Studies of *FLT3* mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of *FLT3* mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with *FLT3* inhibitors. *Blood* 2002; 100: 2393-2398.
4. Van Dongen JJM, Macintyre E A, Gabert J A et al.: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-1928.
5. Schnittger S, Schoch C, Dugas M et al.: Analysis of *FLT3* length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.
6. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME et al.: The presence of a *FLT3* internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-1759.
7. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J et al.: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-1918.
8. Mały E, Przyborska M, Nowak T et al.: *FLT3* internal tandem duplication and *FLT3-D835* mutation in 80 AML patients categorized into cytogenetic risk groups. *Post Hig Med Dośw* 2010; 64: 466-470.
9. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S et al.: Size of *FLT3* internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-3726.
10. Libura M, Haus O, Skotnicki AB: Mechanizmy genetyczne i markery molekularne transformacji nowotworowej w ostrej białaczkę szpikowej u dorosłych: związek z klinicznym przebiegiem choroby. [W:] Witt M, Szczepański T, Dawidowska M: Hematologia molekularna, patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2009, 39-55.
11. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T et al.: ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5031-5038.
12. Callens C, Chevret S, Cayuela JM et al.: Prognostic implication of *FLT3* and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. *Leukemia* 2005; 19: 1153-1160.
13. Care RS, Valk PJ, Goodeve A C et al.: Incidence and prognosis of *c-KIT* and *FLT3* mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121:775-777.
14. Ley TJ, Ding L, Walter M J et al.: *DNMT3* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2424-2433.
15. Thiede C, Steudel C, Mohr B et al.: Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99: 4326-4335. Per inciliquat.

otrzymano/received: 26.10.2012
zaakceptowano/accepted: 09.01.2013

Adres/address:
*Karolina Matiakowska
Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel.: +48 (52) 585-38-56
e-mail: k.matiakowska@cm.umk.pl