



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

**تقصي علاقة البروتين المندمج BCR-ABL بتطور وشدة  
الابيضاض النقوي المزمن  
باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق**

**Investigation of BCR-ABL fusion protein  
association with Chronic Myeloid Leukemia  
progression and severity using flow cytometry**

أطروحة قدّمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبريّ

إعداد: ريم كيلاني

إشراف: أ. د. فوزة منعم

العام (1436 هـ / 2015 م)

استغرق هذا البحث مدة زمنية من 2012/09/29 إلى 2015/09/09.  
تم إنجاز هذا البحث في كلية الصيدلة – جامعة دمشق، ومستشفى الأسد الجامعي بدمشق.  
جمعت العينات من مستشفى الأسد الجامعي بدمشق.  
أجريت المقاييسات في مخبر مستشفى الأسد الجامعي بدمشق.

تاريخ مناقشة الرسالة : 2015/09/09.

أعضاء لجنة الحكم:

برئاسة : أ. د. فوزة منعم.

الفاحص الأول : أ. د. سهام سليمان.

الفاحص الثاني : م. د. مجد الجمالي.

## الإهداء

بجوار أفئدتهم... يخجل الوقت أن يطول..  
وبحضور أرواحهم... يتسامى الفرح أوكسجيناً للروح...  
وبلقائهم... تُجدد النفس نفسها، وتُشحن بالهمة...  
بهم.. ومعهم.. ولهم.. ينبض النبض بالحبّ...  
إنهم نبض القلب... وقائدي الدّرب...

### عائلتي...

كلُّ الإجلال والاحترام والمحبة لها... بذلت الغالي والنفيس وكانت لي خير عون...

أمي

أبي

أخي

شمعتي حياتي... منى ورؤى...

## الشُّكر Acknowledgement

🌈 بدءاً أشكره **تعالى** ربُّ السموات السبع والأرضين أن وفقني لما أنا فيه، و**لرسوله** مني أفضل الصلوات والتسليم.

🌈 كلُّ الشُّكر والامتنان للأستاذة القديرة والمربية الفاضلة الأستاذة الدكتورة **فوزة منعم** لتفضلها بالإشراف على هذا البحث، وعلى ما بذلته من وقت وجهد، ولم تبخل بتوجيهاتها ونصائحها ووقتها من أجل إنجاز هذا العمل.. فلك مني كل الحب والتقدير.

🌈 الشُّكر الجزيل للأستاذة الدكتورة **سهام سليمان** لتفضلها في المشاركة في تحكيم هذا البحث وإغنائه بملاحظاتها القيمة.

🌈 كلُّ الشُّكر للدكتور **مجد الجمالي** لتفضّله في المشاركة لجنة الحكم، ومساهمته في تقييم هذا البحث وإنجاحه.

🌈 الشكر الجزيل لأسرة كلية الصيدلة مُمثلة بعميدها الأستاذ الدكتور **عبد الحكيم نتوف** ، ونائبه للشؤون العلمية الإدارية الدكتور **مصطفى العموري**، والدكتورة **جمانة الصالح**.

🌈 أتوجّه بالشكر الفائق لجميع أساتذتي في قسم الكيمياء الحيوية السريرية والأحياء الدقيقة، وإلى رئاسة القسم ممثلاً بالدكتور **مروان البحتري**.

🌈 كلُّ الشُّكر إلى إدارة مستشفى الأسد الجامعي بدمشق مُمثلة بالسيد المدير العام الأستاذ الدكتور **محمد الأحمد**.

🌈 أتوجّه بخالص الشكر إلى مخبر مستشفى الأسد الجامعي بدمشق مُمثلاً برئيسة قسم المخبر الأستاذة الدكتورة **فوزة منعم**.

🌈 والشكر موصولاً لكل من الدكتورة ربيعة النحاس، والدكتور سامر محمود لما قدّماه من مساعدة في إنجاز بعض خطوات هذا العمل.

🌈 بفيض من الحب والتقدير، أتقدم بأرق عبارات الشكر والامتنان إلى الصديقة الغالية الدكتورة وفاء الحبال التي لم تبخل بنصائحها وعونها ووقتها، فكانت نعم السند خلال السنوات الماضية.... مهما قلت لن أوفيك حقك... جزاك الله خيراً.

🌈 خالص الشكر للكادر التقني في مخبر مستشفى الأسد الجامعي بدمشق، وخاصة في وحدتي البيولوجيا الجزيئية، والوراثة الخلوية، وأخص بالذكر: السيدة سوسن الداموني، والسيد أيمن اهليل، والسيد أحمد فاطمة...

🌈 عميق المحبة والعرفان لرفيقات الدرب... من جمعتني بصحبتهن أصفى الذكريات، زرعوا في دربي التفاؤل، وشاركوني أفراحي وأحزاني، وقدّموا لي الدعم والمساندة... سلاف، نور، وداد، عهد.

# لمحة موجزة عن حياة الباحث Curriculum Vitae

الاسم : ريم محمد كيلاني

مكان وتاريخ الولادة: دمشق 1979

الجنسية: عربية سورية

العنوان: دمشق – الشّام الجديدة (مشروع دمر) – جزيرة 10/أ.

البريد الإلكتروني: r\_kelani@hotmail.com

المراحل الدراسية:

**1990:** شهادة التعليم الابتدائية – مدرسة عمر بن الخطاب.

**1993:** شهادة الدراسة الإعدادية العامة – إعدادية ساطع الحصري.

**1997:** شهادة الدراسة الثانوية العامة (الفرع العلمي) – ثانوية ساطع الحصري.

**2002:** إجازة في الصيدلة والكيمياء الصيدلانية بمرتبة جيد جداً، وبمعدّل 73.561 % - كلية

الصيدلة – جامعة دمشق.

**2008 وحتى هذا التاريخ:** طالبة دراسات عليا في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة –

كلية الصيدلة – جامعة دمشق.

# تصريح

الاسم الكامل: ريم محمد كيلاني

مكان وتاريخ الولادة: دمشق 1979

عنوان البحث باللغة العربية: تقصي علاقة البروتين المندمج BCR-ABL بتطور وشدة الابيضاض النقوي المزمن باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق.

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أخرى أو أي معهدٍ تعليميٍّ داخل أو خارج القطر.

لم يتم قبض أي مبلغٍ ماديٍّ أو مكافأةٍ عينيةٍ سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعملٍ يمسُّ جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.

أتعهد بأي لم أقل إلا الحقيقة ولم أخف شيئاً تحت طائلة المعاقبة القانونية، وعليه أوقع.

توقيع الباحث

التاريخ

ريم كيلاني

# قائمة المحتويات Tables of content

## Contents

8.....	قائمة المحتويات
13.....	قائمة الأشكال
16.....	قائمة الجداول
17.....	قائمة الاختصارات
20.....	تمهيد
22.....	المقدمة النظرية <b>Introduction</b>
23.....	1. الالبيضاض النقوي المزمن (CML) Chronic Myelogenous leukemia
23.....	2. المرادفات
23.....	3. لمحة تاريخية
24.....	4. الوبائيات Epidemiology
24.....	5. السببّيات Etiology
24.....	6. الخصائص السريريّة Clinical characteristics
26.....	7. مرضيات ابيضاض الدم النقوي المزمن Pathology of CML
26.....	7.1 صبغي فيلادلفيا The Ph chromosome
30.....	7.2 البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein
33.....	7.3 سبل الإشارة للبروتين BCR-ABL protein
	8. الخلايا الجذعية الالبيضاضية في الالبيضاض النقوي المزمن
35.....	Leukemic Stem Cells (LSC) in chronic myeloid leukemia
	الصفات الوظيفية للخلايا الجذعية الالبيضاضية في الالبيضاض النقوي المزمن
35.....	Functional characteristic of leukemic stem cells in CML
36.....	9. الأطوار السريرية للالبيضاض النقوي المزمن Clinical phases of CML
36.....	9.1 الطور المزمن (CP) Chronic phase
37.....	9.2 الطور الاشتدادي (AP) Accelerated phase
37.....	9.3 الطور الأرومي (BP) Blastic phase



38.....	10. تشخيص الابيضاض النقوي المزمن Diagnosis of CML
38.....	10.1.1. المورفولوجيا Morphology
38.....	10.1.1.1. الطور المزمن (CP) Chronic phase
39.....	10.1.1.2. الطور الاشدادي (AP) Accelerated phase
40.....	10.1.1.3. طور الأرومات (BP) Blast phase
41.....	10.2. النمط الظاهري المناعي Immunophenotype
42.....	10.3. التحاليل الوراثية الخلوية (تحليل الصبغيات) Cytogenetic analysis
42.....	10.3.1. التتميط النووي karyotyping
	10.3.2. التهجين الموضعي المتألق
45.....	(FISH) fluorescence in situ hybridization
	10.4. تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي بالانتساخ العكسي Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
46.....	(qRT-PCR)
48....	11. المعالجات الحالية للابيضاض النقوي المزمن Current treatment of CML
48.....	11.1. الانترفيرون ألفا (INF-α) Interferon alpha
49.....	11.2. مثبطات التيروسين كيناز (TKIs) Tyrosine kinase inhibitors
50.....	11.2.1. آلية عمل الإيماتينيب Imatinib mechanism of action
51.....	11.2.2. مقاومة الإيماتينيب Imatinib resistance
	11.3. زرع الخلايا الجذعية المولدة للدم
52.....	Hematopoietic stem cells transplantation
52...	12. مراقبة مرضى الابيضاض النقوي المزمن Monitoring patient with CML
52.....	12.1. الاستجابة الدموية (HR) Hematologic response
53.....	12.2. الاستجابة الصبغية (CR) Cytogenetic response
54.....	12.3. الاستجابة الجزيئية (MR) Molecular response
55.....	13. القياس الخلوي بالتدفق Flow cytometry
55.....	13.1. تعريف القياس الخلوي بالتدفق:
55.....	13.2. مبدأ القياس الخلوي بالتدفق:
56.....	13.3. مكونات جهاز القياس الخلوي بالتدفق:

57	.....	13.4. التبيوب (التطويق) Gating
58	....	13.5. مصفوفة الخرزات العادة للكريات (CBA) Cytometric Bead Array
60	.....	الدراسة العملية
61	.....	هدف البحث
61	.....	المشكلة العلمية ودوافع البحث
61	.....	هدف البحث
62	.....	<b>Materials and Methods</b> المواد والطرق
63	.....	1. تصميم البحث Study design
63	.....	2. مجموعة الدراسة Study population
64	.....	3. استبيان المريض Patient's Questionnaire
64	.....	4. الموافقة المستنيرة Informed consent
65	.....	5. الدراسة الإحصائية Statistical analysis
66	.....	6. المواد Materials
66	.....	6.1. الأدوات المستخدمة
68	.....	6.2. الكواشف Reagents
69	.....	6.3. التجهيزات (الأجهزة المستخدمة) Equipments
69	.....	6.4. البرمجيات الحاسوبية Computational software
69	.....	6.5. البرامج الإحصائية Statistical programs
70	.....	7. الطرق Methods
70	.....	7.1. تعطيل متممة مصل جنين البقر FBS
70	.....	7.2. تحضير محلول الغسل
70	.....	7.3. عزل الكريات البيضاء الحاوية على البروتين المدروس
70	.....	7.3.1. طريقة الكريات البيضاء WBC method
70	.....	7.3.2. طريقة خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة PBMC method
72	.....	7.4. اكتشاف البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein detection
73	.....	<b>Results</b> النتائج
74	.....	1. توزع أفراد العينة المدروسة حسب الجنس والعمر

2. توزع أفراد العينة المدروسة حسب توفّر أحد شَرطيّ المشاركة في الدّراسة ..... 74
3. قيم البروتين المندمج BCR-ABL protein باستخدام طريقة تحريره من الكريات البيضاء (WBC) لدى عدد من مرضى CML وعدد من الأفراد الأصحاء ..... 75
4. حساب القيمة الحدية لاختبار الخزرات المناعي بالتدفق الخلوي للبروتين المندمج BCR-ABL protein المحرّر من خلايا الدّم المحيطي وحيدة النواة PBMCs ..... 76
5. قيم البروتين المندمج BCR-ABL protein المحرّر من خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة PBMCs لمرضى CML ..... 77
6. دراسة الاستقلالية independence بين إيجابية وسلبية البروتين المندمج BCR-ABL protein ووجود المنتسخات t(9;22) mRNA باستخدام اختبار كاي مربع Chi square ( $X^2$ ) ..... 78
7. دراسة الارتباط correlation بين مستويات البروتين المندمج BCR-ABL protein ومستويات t(9;22) mRNA باستخدام اختبار Spearman test ..... 79
8. دراسة الاستقلالية independence بين إيجابية وسلبية البروتين المندمج BCR-ABL protein ووجود صبغي فيلادلفيا باستخدام اختبار كاي مربع  $X^2$  ..... 79
9. دراسة الارتباط correlation بين مستويات البروتين المندمج BCR-ABL protein ومستويات صبغي فيلادلفيا باستخدام اختبار Spearman test ..... 80
10. مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفّر لديهم نتيجة t(9;22) mRNA تعكس استجابتهم الجزيئية للمعالجة... 80
11. مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفّر لديهم نتيجة لصبغي فيلادلفيا تعكس استجابتهم الصبغية للمعالجة ..... 82
- 12... اختبار الخزرات المناعي لقياس البروتين المندمج BCR-ABL protein بتقنية القياس الخلوي بالتدفق في مجموعات المرضى مختلفي الاستجابة الجزيئية للمعالجة ..... 83
13. توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein الموجود لدى أفراد الدّراسة المعالجين بمثبطات التيروسين كيناز حسب استجابتهم الجزيئية t(9;22) mRNA والصبغية (صبغي فيلادلفيا) وغير المعالجين ..... 85
14. مقاييس المضبوطية التشخيصية Diagnostic accuracy measures لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein بتقنية القياس الخلوي بالتدفق مقارنة بنتائج الاختبارات الجزيئية t(9;22) mRNA ..... 89
15. مقاييس المضبوطية التشخيصية Diagnostic accuracy measures لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein بتقنية القياس الخلوي بالتدفق مقارنة بنتائج الاختبارات الصبغية (صبغي فيلادلفيا) ..... 91

93.....	<b>Discussion</b> المناقشة
97.....	<b>Conclusions</b> الاستنتاجات
98.....	<b>Recommendations &amp; Sugessions</b> التوصيات والمقترحات
99.....	<b>Summary</b> الخلاصة
100 .....	الملخص باللغة العربية
102 .....	Abstract
103 .....	<b>Refferences</b> المراجع
108.....	جدول المصطلحات
115.....	<b>Appendices</b> الملاحق
116.....	<b>الملحق (1)</b> استمارة استبيان المريض
118.....	<b>الملحق (2)</b> استمارة الموافقة المستنيرة
119.....	<b>الملحق (3)</b> جدول يمثل نتائج مرضى CML المشاركين في الدراسة
122.....	<b>الملحق (5)</b> موافقة النشر في مجلة التشخيص المخبري
	<b>الملحق (4)</b> النص الكامل للورقة العلمية التي نشرت في مجلة
123.....	International Journal of Laboratory Hematology

## قائمة الأشكال List of Figures

- الشكل (1): تشكُّل صبغي فيلادلفيا Ph chromosome ..... 27
- الشكل (2): الإزفاء t(9;22)(q34;q11) عند مرضى CML ..... 29
- الشكل (3): بنية البروتين ABL ..... 31
- الشكل (4): الميادين الوظيفية في البروتينات p145<sup>ABL</sup> ، p160<sup>BCR</sup> ..... 33
- الشكل (5): الفعاليات الجزيئية التي تؤدي إلى التعبير عن النمط الظاهري للابيضاض النقوي المزمن ..... 34
- الشكل (6): التنميط النووي karyotype لخزعة نقي عظم لمرضى CML ..... 43
- الشكل (7): استخدام تقنية FISH في اكتشاف الجين المندمج BCR-ABL في خلايا الطور البيني لدى مريض CML ..... 45
- الشكل (8): آلية عمل البروتين BCR-ABL protein وتثبيطه بفعل الإيماتينيب Imatinib ..... 51
- الشكل (9): مبدأ اكتشاف معقد ضد-مستضد باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق flow cytometry ..... 56
- الشكل (10): رسم تمثيلي لمكونات جهاز قياس التدفق الخلوي ..... 57
- الشكل (11): مبدأ نظام مصفوفة الخزرات العادة للكريات ..... 59
- الشكل (12): CPT<sup>TM</sup> Cell Preparation Tubes ..... 67
- الشكل (13): مخطط انسيابي يوضح المراحل الأساسية للعمل على عتيدة BCR-ABL Protein kit ..... 71

- الشكل (14):** تبويب gating جمهرة خرزات الالتقاط والمنسج histogram الدال على البروتين BCR-ABL protein ..... 72
- الشكل (15):** توزع المرضى المشاركين في الدراسة حسب الجنس ..... 74
- الشكل (16):** توزع مرضى الدراسة حسب توفر نتيجة تحري صبغي فيلادلفيا لديهم ..... 75
- الشكل (17):** متوسط قيم شدة التآلق MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein عند كل من مرضى CML والأفراد الأصحاء بعد تحريره من الكريات البيضاء WBC ..... 76
- الشكل (18):** توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى مجموعات الدراسة ..... 78
- الشكل (19):** مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفر لديهم نتيجة mRNA t(9;22) تعكس استجابتهم الجزيئية للمعالجة ..... 81
- الشكل (20):** مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفر لديهم نتيجة لصبغي فيلادلفيا تعكس استجابتهم الصبغية للمعالجة ..... 83
- الشكل (21):** منسجات اختبار الخرزات المناعي لقياس البروتين المندمج BCR-ABL protein ممثلة لقيم MFI لدى مرضى مختلفي الاستجابة الجزيئية بعد معالجتهم بمثبطات التيروسين كيناز، ومريض لم يتلق العلاج بعد، وفرداً سليماً ..... 84
- الشكل (22):** مقاييس المضبوطة التشخيصية لاختبار الخرزات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein مقارنة بنتائج الاختبارات الجزيئية t(9;22) mRNA ..... 89
- الشكل (23):** منحنى ROC لاختبار الخرزات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein ..... 90
- الشكل (24):** مقاييس المضبوطة التشخيصية لاختبار الخرزات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein مقارنة بنتائج الاختبارات الصبغية ..... 91

الشكل (25): منحنى ROC لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج  
92..... BCR-ABL protein

## قائمة الجداول List of Tables

**جدول (1):** توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بطريقة اختبار الخرزات المناعي لدى مرضى CML الذين لم يتلقوا العلاج بعد (naïve) (n=12)، حسب التشخيص الجزيئي (t(9;22)mRNA) أو الصبغي (صبغي فيلادلفيا) ..... 86

**جدول (2):** توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بطريقة اختبار الخرزات المناعي لدى مرضى CML\* (n=37) معالجين بمثبطات التيروسين كيناز حسب تباين استجابتهم الجزيئية (t(9;22)mRNA) أو الصبغية (صبغي فيلادلفيا) للمعالجة ..... 87



## Abbreviations list قائمة الاختصارات

μ-bcr: micro breakpoint cluster region

ABL: Abelson non-receptor tyrosine kinase gene

ALL: Acute lymphoblastic leukemia

AML: Acute myeloid leukemia

AP: Accelerated phase

BC: Blast crisis

BCR: Breakpoint cluster region

BM: bone marrow

BP: Blast phase

CCR: Complete cytogenetic response

cDNA: complementary deoxyriboNucleic Acid

CHR: Complete hematologic response

CML: Chronic myeloid leukemia

CMR: Complete molecular response

CP: Chronic phase

CPT: cell preparation tubes

CR: Cytogenetic response

EMSO: European society for medical oncology

FAB: French – American – British

FBS: Fetal bovin serum

FISH: Fluorescence in situ hybridization

FP: False positive

HR: Hematologic response

HSC: Hematopoietic stem cells

i(17)q: Isochromosome 17

LSC: Leukemic stem cell

m: Mean

M-bcr: major breakpoint cluster region

m-bcr: minor breakpoint cluster region

MCR: Major cytogenetic response

mCR: minor cytogenetic response

MFI: Median fluorescence intensity

MMR: Major molecular response

mMR: minor molecular response

MPAL: Mixed phenotype acute leukemia

MR: Molecular response

MRD: Minimal residual disease

mRNA: Messenger ribonucleic acid

NP: False negative

NPV: Negative predictive value

PB: Peripheral blood

PBMNs: Peripheral blood mononuclear cells

PDGF-R : Platelet derived growth factor receptor

Ph: Philadelphia

PPV: Positive predictive value

qRT-PCR: Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SCT: Stem cell transplantation

SD: Standard deviation

SH: SRC homology

SRC family kinases: Sarcoma-family kinases

STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5

TKIs: Tyrosine Kinase Inhibitors

TN: True negative

TP: True positive

WBC: White blood cell

WHO: World Health Organization

## تمهيد

ابيضاض الدم النقوي المزمن (Chronic Myelogenous Leukemia (CML مرض نسيلي ينشأ على مستوى الخلايا الجذعية المولدة للدم hematopoietic Stem Cells (HSC)، يتميز بنمو متزايد غير منتظم للخلايا النقوية في نقي العظام، وتراكم هذه الخلايا في الدم. غالباً ما يترافق المرض مع إزفاء صبغي يدعى صبغي فيلادلفيا Philadelphia chromosome (Ph)، والذي ينتج عن إزفاء متبادل بين الصبغيين 9 و 22 يرمز له t(9;22)(q34;q11)، يؤدي إلى تشكيل الجين المندمج *BCR-ABL fusion gene*، الذي يولّد المنتسخات المندمجة *BCR-ABL transcripts*، والتي تتم ترجمتها إلى البروتين المندمج *BCR-ABL fusion protein*، وهو من حيث البنية إنزيم التيروسين كيناز الفعّال بنويماً *active tyrosine kinase*، ويؤدي إلى استحالة خبيثة حيث أنّه قادر على تغيير خواص التصاق الخلايا وتكاثرها واستماتتها.

تُستخدم مثبطات التيروسين كيناز النوعية tyrosine kinase inhibitors (TKIs) حالياً لعلاج CML، والتي تثبط نشاط البروتين الورمي *BCR-ABL protein*. تُتابع استجابة المريض للعلاج بتحري وحساب نسبة النسائل الخلوية الحاوية على صبغي فيلادلفيا إلى النسائل الخلوية الطبيعية في الدم، وذلك إما بدراسة الصبغيات باستخدام تقنيات الوراثة الخلوية (karyotyping, FISH)، أو على مستوى الرنا المرسال mRNA باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية (Reverse Transcription PCR).

يعتمد تشخيص المرض على ترافق الصورة السريرية والدموية ووجود الإزفاء الصبغي (صبغي فيلادلفيا)، ويتم تشخيص وجود الزيج *BCR-ABL* حالياً إما بكشف الجين *BCR-ABL gene* باستخدام التّتميط النّوويّ karyotyping، أو التّهجين الموضعي المتألق (FISH) fluorescence in situ hybridization، أو بكشف الرنا المرسال mRNA لتحري منتسخات هذا الجين الشاذ بواسطة تقنيات تفاعل البوليميراز التسلسلي بالانتساخ العكسي

reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) باستخدام  
مشرّعات تكشف أكثر المواقع شيوعاً لحصول الإزفاءات.

على الرّغم من الموثوقيّة العالية لجميع التّقنيّات المذكورة، تبقى مشكلة كشف المنتج النهائيّ (البروتين المندمج BCR-ABL protein) المسؤول عن ظهور المرض واستدامته قائمةً، مما يجعلّ تقصي وجود علاقة بين كميات البروتين المندمج BCR-ABL وتطور المرض، وشدته، ومدى استجابة مرضى الأبيضاض النقوي المزمن للعلاج أمراً مهماً. ولما كانت تقنية التدفق الخلوي flow cytometry من التّقنيات المتطورة الحديثة القادرة على كشف البروتينات، فقد أوحت لنا بإمكانية استخدامها لكشف هذا البروتين.

المقدّمة النّظريّة

Introduction

**1. الابيضاض النقوي المزمن (CML) Chronic Myelogenous leukemia** الابيضاض النقوي المزمن تنشؤ neoplasm تكاثري نقوي myeloproliferative قد يكون مصدره خلية جذعية متعددة القدرات pluripotent شاذة في نقي العظم، ويترافق مع الجين المندمج *BCR-ABL1* الذي يتوضع على صبغي فيلادلفيا Philadelphia chromosome (Ph) (1). اضطراب نسيلي خبيث ومميت يصيب الخلايا الجذعية المولدة للدم hematopoietic stem cells، يتميز بوجود صبغي فيلادلفيا Philadelphia chromosome (Ph)، ويشكل 15%-20% من ابيضاضات الدم عند البالغين (2، 3). يتميز مسار المرض بأنه يمرّ بثلاثة أطوار: الطور المزمن (CP) chronic phase يستمر من ثلاث إلى خمس سنوات، يتبعه الطور الاشتدادي (AP) accelerated phase، ثم طور الأرومات blast phase (نوبة الأرومات blast crises) النهائي قصير الأمد (4-6).

## 2. المرادفات

ابيضاض المحببات المزمن (1) Chronic granulocytic leukemia (1).

الابيضاض النخاعي المزمن Chronic myeloid leukemia (1) (1).

## 3. لمحة تاريخية

تم اكتشاف المرض لأول مرة عام 1845 (6). وكان من أولى الأمراض الأكثر فهماً من جهة الشذوذات الصبغية والآليات الجزيئية الضالعة فيها، حيث يعتبر أول الأمراض البشرية المكتشفة التي يرتبط فيها وجود شذوذ في التنميط النووي karyotype بمرض خبيث، وهذا ما اكتشفه العالمان نويل Nowell وهانغفورد Hungerford عام 1960، وأطلقا عليه اسم صبغي فيلادلفيا (7، 8). بين راولي Rowley فيما بعد في عام 1973 أنّ صبغي فيلادلفيا، السمة المميزة للـ CML، ينتج عن إزفاء متبادل متوازن balanced reciprocal translocation بين الذراعين الطويلين للصبغيين التاسع والثاني والعشرين والذي يرمز له *t(9;22) (6, 9-11)*، ويؤدي إلى اندماج الجين *Abelson non-receptor tyrosine kinase gene (ABL)* الموجود على الذراع الطويل للصبغي التاسع، مع الجين *(BCR) Breakpoint Cluster Region gene* الموجود على الذراع الطويل للصبغي

22 ، فيتشكل الجين المندمج الورمي *BCR-ABL oncogene* ، الذي يُشفر للبروتين المندمج الورمي *BCR-ABL oncoprotein* (9، 12، 13)، والذي يعتبر تيروسين كيناز مُنشَّط بنويباً، يُفعل سبل متعددة لتنبيغ الإشارة داخل الخلية، مما يقود في النهاية إلى التصاقٍ شاذٍ للخلايا، ويعزّز تكاثرها، ويثبط الاستماتة فيها (14-17).

#### 4. الوبانيات **Epidemiology**

يبلغ معدل وقوع CML عالمياً بين 1.0 و 2.0 من كل 100,000 شخص سنوياً (1، 18)، ويمثل 14% - 20% من حالات الابيضاض عند البالغين (2، 18). قد يحدث في أي عمر ولكن يبلغ متوسط عمر المرضى عند تجلي presentation المرض من 50 إلى 70 عاماً، نصفهم أكبر من 60 عاماً (19)، ويزداد معدل وقوعه مع التقدّم بالعمر وهو ما يعتبر إنذاراً سيئاً للمرض (20).

#### 5. السببيات **Etiology**

عموماً، يبقى سبب الإصابة بالمرض غير واضح تماماً، ولكن يعتقد أن التّعرض لجرعة عالية من الإشعاع المؤين ionizing radiation أحد العوامل السببية etiologic factor له (21).

#### 6. الخصائص السريرية **Clinical characteristics**

يتم تشخيص معظم المرضى المصابين بالـ CML في الطور المزمن (CP)، وغالباً ما يبدأ بشكل مخاتل insidious onset (1، 22)، ويستمر لعدة سنوات، ويتميز بتراكم الخلايا الطلائع (السلف) precursors والخلايا الناضجة في نقي العظم والدم المحيطي (22). يكون 20-40% من المرضى لا عرضيين، وغالباً ما يتم كشف المرض من خلال تعداد الكريات البيضاء غير السوي abnormal الذي يُجرى كجزء من الفحوص الروتينية (19).

تضمّ الأعراض الشائعة عند تجلي المرض: التعب والقهم anorexia، وخسارة الوزن، التعرق الليلي، وفقر الدم، ويعتبر الطّحل splenomegaly الشّدوذ الأكثر شيوعاً عند المرضى ويلاحظ عند نصف المرضى عند إجراء الفحص البدني physical examination (1).



الموجودات المخبرية الرئيسية عند المرضى في CP هي كثرة العدلات neutrophilia مع زيحان ليسار في العد التفرقي، وكثرة الأسسات basophilia، ويُظهر فحص نقي العظم غلبة نخاعية وزيحان ليسار مع شذوذات في النواءات megakaryocytic (5).

يتحوّل أغلب المرضى في CP بدون مداخلة علاجية شافية دائمة إلى الطور الاشتدادي (AP) بعد ثلاث إلى خمس سنوات من بدء المرض، ويتظاهر بزيادة في عدد الخلايا النّقية غير النّاضجة في نقي العظم والدّم المحيطي (22)، بالإضافة إلى ظهور تغيّرات صبغية جديدة إضافة إلى صبغي فيلادلفيا. يتظاهر الطور الاشتدادي غالباً على شكل حمى غير مفسرة، ألم عظمي، خسارة وزن، وفقدان عام في العافية، ولكن تبقى الموجودات المخبرية مبهمة vague (4).

بعد فترة قصيرة تمتد من ثلاثة أشهر إلى 18 شهراً يتحول المرض إلى نوبة الأرومات التي تُعرّف بوجود 30% أو أكثر من الخلايا الأرومية في الدّم المحيطي أو نقي العظم، أو بوجود رشائح infiltrates خارج النّخاع extramedullary لهذه الخلايا، تنتمي هذه الأرومات في ثلثي الحالات إلى الخط النقي myeloid lineage بنمط ظاهري phenotype مشابه لذلك الملاحظ في ابيضاض الدم النقي الحاد (AML) acute myeloblastic leukemia، بينما تملك الأرومات في ثلث الحالات الأخرى نمط ظاهري مشابه لذلك الملاحظ في ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (ALL) acute lymphoblastic leukemia (4، 22).

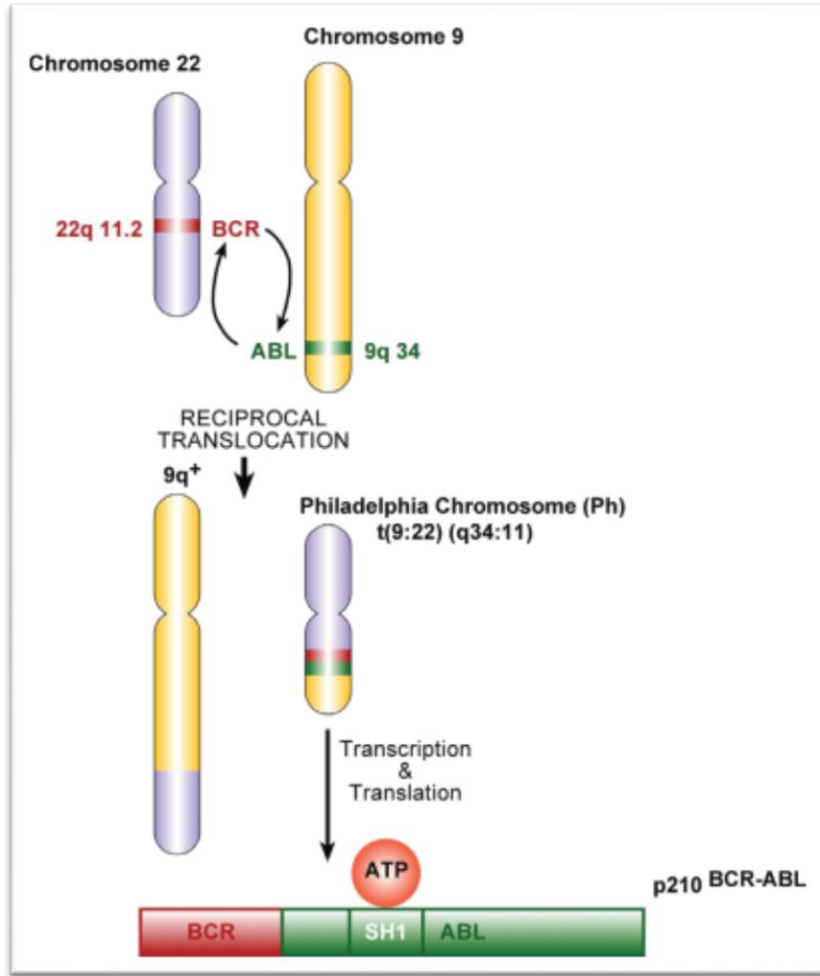
يكون المريض في أزمة الأرومات مقاوم بشدة للمعالجة، ويحدث الموت عادة نتيجة اختلالات العدوى، وفقر الدم الوخيم severe، والنزوف نتيجة قلة الصفيحات الحاد. يبلغ متوسط بقيا المريض الذي يتلقى معالجة كيميائية chemotherapy في طور الأرومات من أربعة إلى ستة أشهر في حالة استحالة الأرومات النقية، و12 شهراً في حالة استحالة الأرومات اللمفاوية (4).

## 7. مرضيات ابيضاض الدم النقوي المزمن Pathology of CML

### 7.1 صبغى فيلادلفيا *The Ph chromosome*

تم تقديم الدليل الرئيسي على مرضيات pathogenesis الـ CML عام 1960 من خلال اكتشاف نويل Nowell وهانغرفورد Hungerford لصبغى فيلادلفيا Philadelphia chromosome (Ph) وترافقه مع المرض (7). فيما بعد وضّح رولي Rowley وزملاؤه باستخدام تآلق الكيناكرين quinacrine fluorescence والاستشرط بغيمازا Giemsa banding أن صبغى فيلادلفيا ينتج عن إزفاء متبادل reciprocal translocation بين الذراعين الطويلين للصبغيين التاسع و22، والذي يرمز له (t(9;22)(q34;q11) (23)، وبذلك يبدو صبغى فيلادلفيا (والذي يرمز له أيضاً بـ 22q-) أقصر نوعاً ما من مقابله الطبيعي (24)، كما يبدو الذراع الطويل للصبغى 9 (9q+) أطول نوعاً ما من الصبغى 9 الطبيعي (19). وقد وجدت هذه السمة المميزة (صبغى فيلادلفيا) عند أكثر من 95% من مرضى CML، كما وجدت عند 4% من الأطفال و25%-30% من البالغين المصابين بالـ ALL، وعند 2% من المرضى المشخصين حديثاً بابيضاض الدم النقوي الحاد (4، 25).

عند حدوث الإزفاء (t(9;22)(q34;q11) تضاف قطعة من الطرف 3' من جين Abelson non-receptor tyrosine kinase gene (*ABL*) الموجود على الذراع الطويل للصبغى التاسع في الموقع q34 (9q34)، إلى القسم 5' من الجين breakpoint cluster region gene (*BCR*) الموجود على الذراع الطويل للصبغى 22 في الموقع q11 (22q11)، مما يؤدي إلى تشكيل الجين المندمج *BCR-ABL fusion* gene الذي يُنتسخ إلى الرنا المرسال *BCR-ABL messenger RNA* (المشكل 1) (26).



**الشكل (1):** تتشكل صبغتي فيلادلفيا *Ph chromosome*. ينتج صبغتي فيلادلفيا عن الزفاء  $t(9;22)$  مما يؤدي إلى تشكل الجين المندمج *BCR-ABL fusion gene* الذي يترجم إلى البروتين المندمج *p210 BCR-ABL* المسؤول عن النمط الظاهري للابيضاض النقوي المزمن *CML*. [مقتبس من (26)].

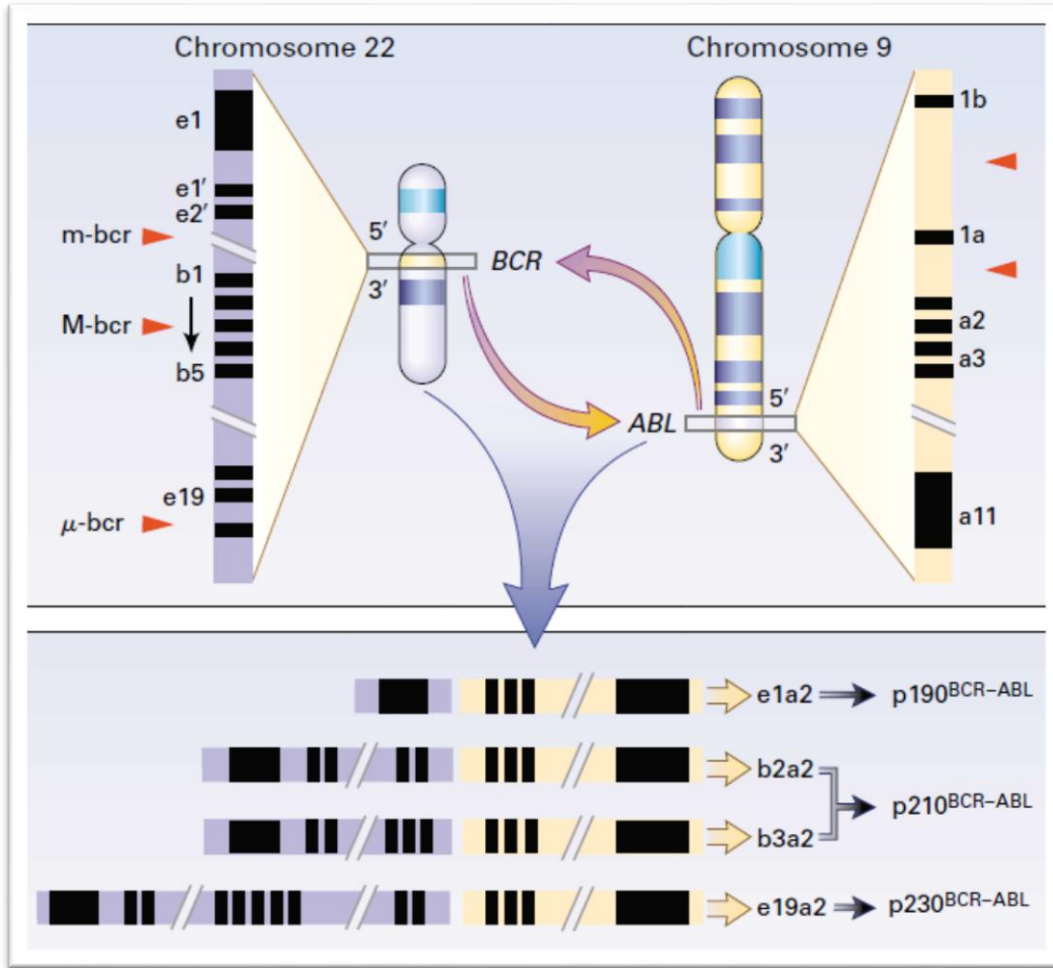
يحتوي جين *ABL* 11 إكسون، يملك الإكسون الأول شكلين مختلفين variants هما 1a و 1b، وهو يُرمز (يُشفّر) لتيروسين كيناز ubiquitously expressed non-receptor tyrosine kinase ذو وزن جزيئي 145 كيلو دالتون (kD)، يُرمز له  $p145^{ABL}$  (17). ينتج الشكلان الأسيويان isoforms للبروتين *ABL* (1a و 1b) عن التضفير البديل alternative splicing للإكسون الأول. قد تقع نقطة الكسر breakpoint في جين *ABL*

في منطقة تمتد على طول 300 كيلوأساس kilobases (kb)، وغالباً ما تكون قبل الإكسون الثاني، وينتج عن الإزفاء تجاوز الإكسونات (من الإكسون الثاني حتى الإكسون 11) من جين *ABL* مع الطرف 5' من الجين *BCR* (4).

تقع منطقة الكسر الكبرى major breakpoint cluster region (M-bcr) من جين *BCR* على الصبغي 22 بين الأكسونين 12 و16 (والذي يشار إليه ب1 إلى b5) ويمتد على طول 5.8 kb. وعند حدوث الإزفاء تتكون المنتسخت transcripts المندمجة e13a2 (b2a2) و e14a2 (b3a2)، والتي يترجم كل منها إلى البروتين الخيمر chimeric protein ذو الوزن الجزيئي 210 kD والذي يرمز له  $p210^{BCR-ABL}$  (الشكل 2)، ويوجد أحد نمطي المنتسختات b2a2 أو b3a2 في الخلايا الالبيضاوية عند 95% من مرضى CML إيجابية الجين المندمج *BCR-ABL* (17).

يؤدي الكسر في منطقة الكسر الصغرى (m-bcr) minor breakpoint cluster region إلى المنتسختات المندمجة e1a2 والتي تترجم إلى البروتين ذو الوزن الجزيئي 190 kD، ويرمز له  $p190^{BCR-ABL}$  (الشكل 2)، ويعتبر هذا البروتين نادراً عند مرضى الـ CML ويُشاهد بشكل أساسي عند مرضى الـ ALL إيجابي صبغي فيلادلفيا (4، 5).

يؤدي الكسر في منطقة الكسر المكروية (μ-bcr) micro breakpoint cluster region إلى إنتاج منتسختات مدمجة أخرى (e19a2) والتي تترجم إلى بروتين ذو وزن جزيئي 230 kD يرمز له  $p230^{BCR-ABL}$  (الشكل 2)، ويترافق هذا النمط من البروتين مع بعض حالات نوع نادر من ابيضاض العدلات النقوي المزمن إيجابي صبغي فيلادلفيا Ph-positive chronic neutrophilic leukemia (17).



**الشكل (2): الإزفاء (9;22)(q34;q11) عند مرضى CML.** يعتبر صبغي فيلادلفيا صبغي 22 قصير ينتج عن إزفاء للقطعة من الطرف 3' من جين ABL على الصبغي التاسع إلى الطرف 5' من جين BCR على الصبغي 22. في معظم الحالات يقع موقع الكسر (مشار إليها بالسهم) في جين ABL على النهاية 5' (باتجاه القسم المركزي (centromere) للإكسون الثاني. بينما عرف العديد من مواقع الكسر على طول الجين BCR على الصبغي 22، وبالاعتماد على نقطة الكسر الضالعة في الإزفاء تندمج قطع مختلفة الحجم من جين BCR مع المتواليات 3' من الجين ABL، وهذا يؤدي إلى انتساخ جزيئات رنا مرسال (e1a2)، (e19a2، b3a2، b2a2) بأطوال مختلفة تترجم إلى منتجات بروتينية خيميرية (p190) chimeric (p230، p210) ذات أوزان جزيئية مختلفة.

**m-bcr** : منطقة عنقود الكسر الصغرى minor breakpoint cluster region

**M-bcr** : منطقة عنقود الكسر الكبرى major breakpoint cluster region

**μ-bcr** : منطقة عنقود الكسر المكروية micro breakpoint cluster region [مقتبس من (4)].

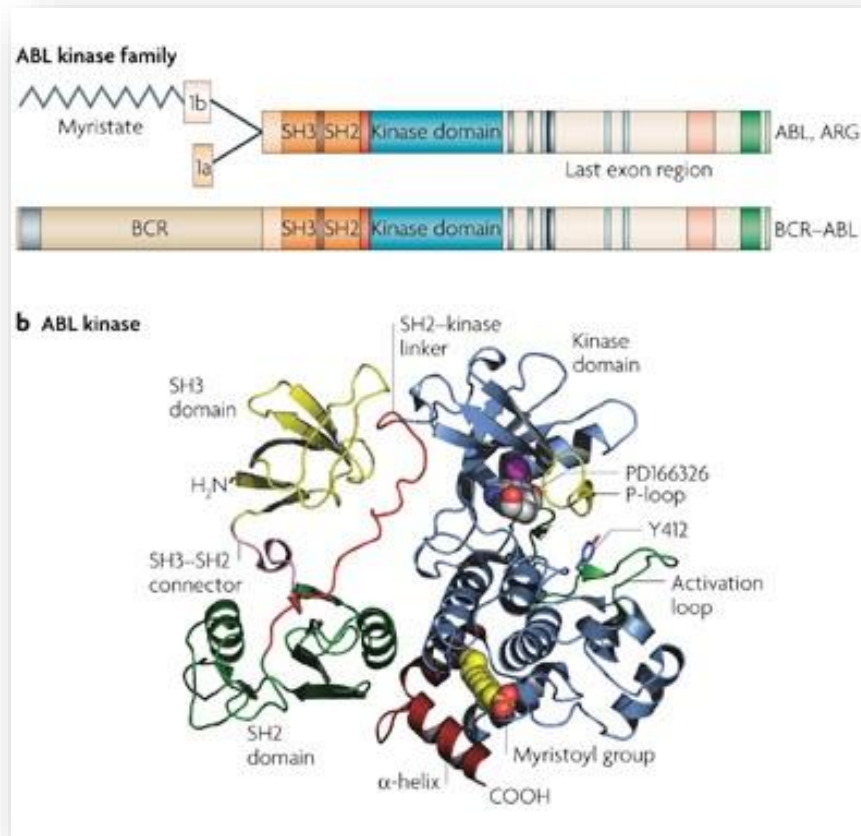
## 7.2 البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein

تكمُن الإمكانية المحدثة للابيضاض للبروتين BCR-ABL<sup>p210</sup> في أن التيروسين كيناز – الذي يكون ذا نشاطٍ منظمٍ بشكلٍ طبيعي في البروتين ABL – يصبح مُنشطاً بنويماً في البروتين المندمج الورمي (23). تعتبر البروتينات ABL كينازات التيروسين لا مُستقبليّة، تنتقل بين النواة والسينوبلازما، ولها أدوار هامة في تنبُّغ الإشارة وتنظيم نمو الخلية (9، 27). هناك شكلان إسيويان للبروتين ABL هما الشكل الإسيوي 1a والشكل الإسيوي 1b ينتجان عن التضفير البديل، حيث يُعبّر عن الشكل الإسيوي 1b بمستويات عالية في الخلايا السليفة progenitor المكوّنة للدم hematopoietic، ويكون حاملاً لجذر ميريستات myristoylated على ثمالة الغليسين الثانية في المطراف النتروجيني N-terminal (27)، وإن فقدان جذر الميريستات في البروتين ABL يعزز بشكل كبير نشاطه كتيروزين كيناز (28).

يوجد نُزلاً بعد downstream مقر الميريستات وعلى المطراف النتروجيني N-terminal للبروتين ABL ثلاثة مجالات Src homology domains هي (SH1، SH2، و SH3) (27):

- ✓ يعتبر المجال SH1 مسؤولاً عن نشاط التيروسين كيناز لهذا البروتين،
- ✓ بينما يُنظّم المجالان SH2 و SH3 هذا النشاط:
- يملك SH3 تأثيراً تنظيمياً سلبياً على وظيفة التيروسين كيناز، وإن خبن deletion الـ SH3 أو حدوث طفرة فيه يزيد من نشاط التيروسين كيناز للـ ABL ،
- أما العيوب في الكمال الوظيفي للمجال SH2 فينقص من ارتباط الفوسفوتيروزين phosphotyrosine binding ويقلّل القدرة المحولة transforming capacities للـ ABL (23).

تحمل النهاية الكربونية C-terminal للـ ABL على ميدان رابط للدنا DNA-binding domain ، وإشارات توضع نووية nuclear localization signals، ومقر ارتباط للأكتين binding site for actin (الشكل 3) (17).



الشكل (3): بنية البروتين ABL [ مقتبس من (70) ].

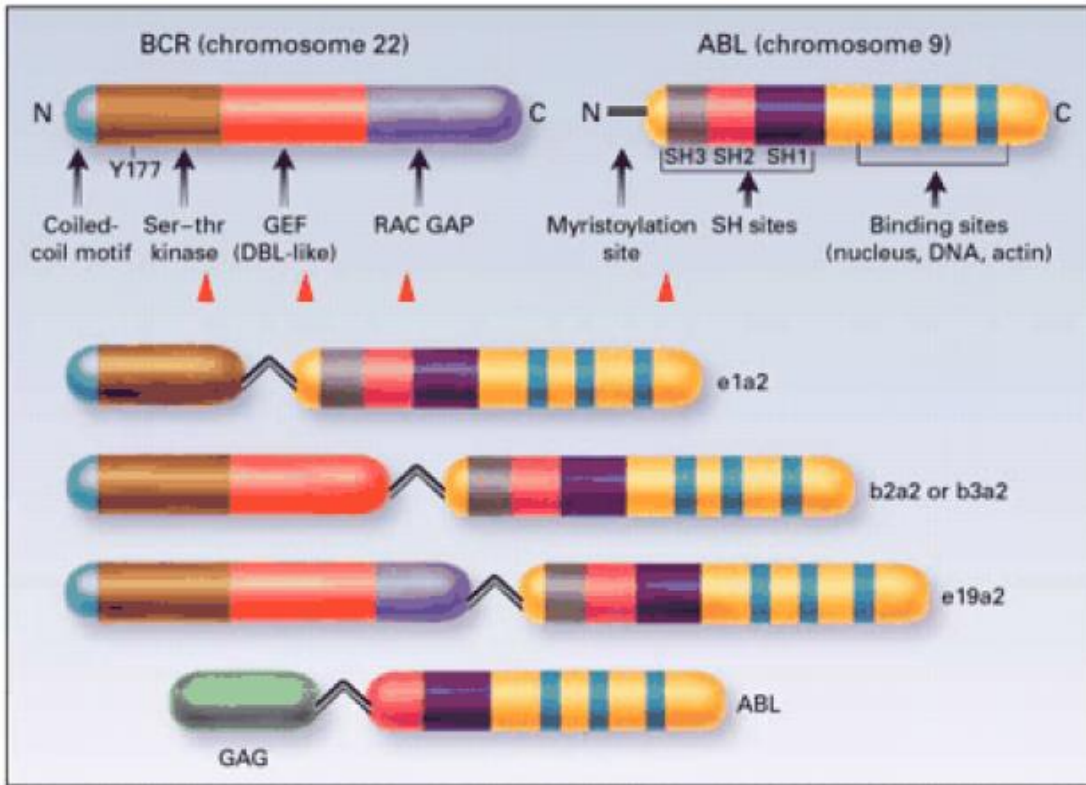
عند حدوث الإزفاء المتبادل t(9;22) يُفقد الجزء من بروتين ABL المسؤول عن تنظيم ميدان SH1 (domain) ، حيث يؤدي إضافة متواليات BCR إلى تفعيل بنيوي لفعالية التيروسين كيناز لهذا الميدان (26). ويعتبر تمزيق (انفتاح) disruption البروتين ABL باندماج جيني مسؤولاً عن نشاط التيروسين كيناز المتزايد up-regulated tyrosine kinase activity (4، 23).

ينتج نشاط التيروسين كيناز غير المضبوط للبروتين BCR-ABL عن عدة عوامل:

1. تجاوز juxtaposition المتواليات الغريبة من جين ال-BCR (29)،

2. يعزز الشكل الحلزوني المتحلزن coiled-coil motif الموجود على المطراف النتروجيني للـ BCR مثنوية dimerization البروتين المندمج BCR-ABL، ويزيد نشاط التيروسين كيناز له، ويُمكن من ارتباط F-actin بالـ ABL (29، 30)،
3. كما ينشّط ميدان كيناز السيرين-ثريونين serine-threonine kinase الموجود على البروتين BCR سبل الإشارة المتواسطة بالـ BCR-ABL تيروزين كيناز (29)،
4. كما يحوي البروتين BCR مقرات رابطة للـ SH2 مندمجة مع الـ ABL والتي تضيف متوالية حموض أمينية كبيرة إلى قطعة SH2 للـ ABL (الشكل 4) (29).
5. ويتداخل الـ BCR مع الميدان المنظم للكيناز في SH2 و SH3 والذي بدوره يتسبب في جعل البروتين ABL نشيط بنيوياً كإنزيم تيروزين الفوسفوكيناز (29).





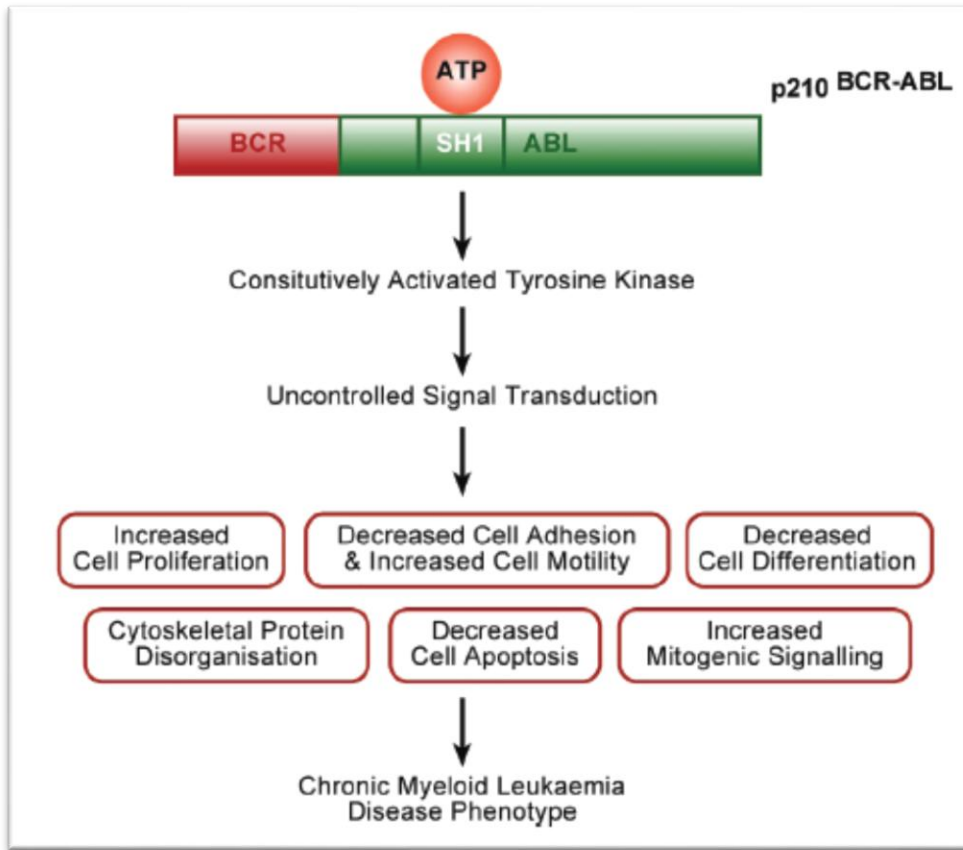
**الشكل (4):** الميادين الوظيفية في البروتينات  $p210^{BCR-ABL}$ ،  $p145^{ABL}$ ،  $p160^{BCR}$  يظهر الشكل الميادين الوظيفية الهامة لمنتجات الجينات  $ABL$  و  $BCR$  بالإضافة إلى المنتجات البروتينية المندمجة ( $p230^{BCR-ABL}$ ،  $p210^{BCR-ABL}$ ،  $p190^{BCR-ABL}$ ). تمت الإشارة إلى نقاط الكسر بأسهم. **N:** متوالية الحموض الأمينية في المطراف النتروجيني، **C:** متوالية الحموض الأمينية في النهاية الكربونية، **Ser-thr:** سيرين-ثيرونين، **GPD:** ثنائي فوسفات الغوانوزين. [مقتبس من (4)].

### 7.3 سبل الإشارة للبروتين $BCR-ABL$ protein

يملك البروتين  $BCR-ABL$  protein عدة ركائز، فيفعل عدد من سبل تنبيغ الإشارة السيتوبلاسمية والنوية عن طريق تفعيل بروتينات إشعارية signaling proteins مثل  $p21RAS$ ، lipid kinase PI3k، فوسفاتاز التيروسين tyrosine phosphatases، MAPK (عائلة mitogen-activated protein kinase)، والعوامل المحوِّلة والمفعلة للانتساخ (STATs) transducer and activator of transcription.

phenotype للابيضاض النقي المزمن CML، ولكن باختصار يؤدي نشاط الكيناز غير المضبوط للبروتين BCR-ABL إلى:

- (1) تكاثر خلوي غير منظم،
- (2) نقص التصاق الخلايا الابيضاضية إلى سدى stroma نقي العظم،
- (3) تثبيط الاستماتة apoptosis (26)، الشكل (5).



الشكل (5): الفعاليات الجزيئية التي تؤدي إلى التعبير عن النمط الظاهري للابيضاض النقي المزمن. [مقتبس من (26)].

## 8. الخلايا الجذعية الابيضاضية في الابيضاض النقوي المزمن

### **Leukemic Stem Cells (LSC) in chronic myeloid leukemia**

تؤكد مجموعة من الأدلة المتزايدة وجود جمهرة من الخلايا الجذعية الهادئة quiescent في نقي العظم لدى مرضى CML، وذلك بشكل مشابه لتكوّن الدم الطبيعي، ويُعتقد أن مثل هذه الخلايا الجذعية الابيضاضية (LSC) Leukemic Stem Cells هي المسؤولة عن تقدّم المرض، فهي التي تعطي الخلايا السلف progenitor الابيضاضية، والتي تعطي بدورها الخلايا الناضجة. تعبّر الخلايا LSC كما الخلايا الجذعية المولدة للدم الطبيعية عن مستويات عالية من CD34 (CD34+)، وتفتقر إلى واسمات markers سطح الخلية (CD38)، أو CD71، أو CD45RA)، لكنها تحمل صبغي فيلادلفيا (الجين BCR-ABL) الذي لا يوجد في نظيرتها الطبيعية، وتستطيع أن تخرج من الطور G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> من تلقاء نفسها لتدخل في الحالة التكاثرية (31). وعلى الرغم من هيمنة الخلايا الجذعية المولدة للدم الابيضاضية (BCR-ABL+, CD34+)، تبقى جمهرة متبقية من الخلايا الجذعية الطبيعية (BCR-ABL+, CD34+) في نقي العظم مريض الـ CML، وهي المسؤولة عن التعافي بعد معالجة ناجحة بمثبطات التيروسين كيناز Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) (8).

### **الصفات الوظيفية للخلايا الجذعية الابيضاضية في الابيضاض النقوي المزمن**

#### **Functional characteristic of leukemic stem cells in CML**

(1) **التكاثر Proliferation:** يُنظّم البروتين BCR-ABL تكاثر الخلايا الجذعية والخلايا السليفة الابيضاضية، حيث يفعل التيروسين كيناز عدداً من سبل تنبيغ الأشارة وهذا ما يؤدي إلى تضخيم الحالة التكاثرية (32).

(2) **تثبيط الاستماتة Inhibition of apoptosis:** تكتسب الخلايا الجذعية الابيضاضية القدرة على البقاء طويلة الأمد long-term survival من خلال إلغاء القوانين التنظيمية للاستماتة، ويعتبر البروتين BCR-ABL المسؤول عن حصر blocking الاستماتة عند الإصابة بالـ CML (8).

**3) خصائص الالتصاق المتغيرة Altered adhesion properties:** ينقص التصاق الخلايا السلف بخلايا سدى نقي العظم bone marrow stroma والمطرس خارج الخوي extracellular matrix لدى مرضى CML. ومن الجدير ذكره أن الالتصاق ينظم تكاثر الخلايا بشكل سلبي، فلا تخضع الخلايا الابيضاضية لتأثير هذا التنظيم بفضل خصائص التصاقها المتغيرة (8).

**4) التجدد الذاتي self-renewal:** يلعب إلغاء القوانين التنظيمية للتجدد الذاتي دوراً هاماً في تطور المرض، وذلك بتفعيل العديد من سبل الإشارة غير السوية التي تدعم هذا التجدد الذاتي في الخلايا الجذعية المولدة للدم الابيضاضية (9، 33).

## 9. الأطوار السريرية للابيضاض النقوي المزمن Clinical phases of CML

يمكن تقسيم الابيضاض النقوي المزمن إلى ثلاثة أطوار: الطور المزمن chronic phase (CP)، يليه الطور الاشتدادي accelerated phase (AP)، وأخيراً الطور الأرومي blastic phase (BP)، قد يتداخل الطوران الاشتدادي والأرومي معاً ويعتبران سوية الطور المتقدم advanced phase. يبلغ متوسط الفترة بدءاً من CP إلى BP من ثلاث إلى خمس سنوات، ويمكن تقسيم هذه الفترة إلى: الطور المزمن الذي يستمر، في حال المعالجة، من سنتين إلى خمس سنوات؛ الطور الاشتدادي ويستمر حتى عام كامل؛ وأخيراً الطور الأرومي الذي يستمر 3-6 أشهر. وقد يتجلى المرض في أي من هذه الأطوار الثلاثة (2، 34).

### 9.1 الطور المزمن Chronic phase (CP)

يمكن تعريف الطور المزمن بالموجودات التالية في الدم المحيطي أو نقي العظم:

- أقل من 5% من الأرومات،
- أقل من 20% من الأسُسات،
- أقل من 30% من الأرومات والخلايا سليفة النقوية promyelocyte،
- وجود صبغي فيلادلفيا [الإزفاء t(9;22)] في الخلايا المستحيلة (35).

## 9.2. الطور الاشتدادي (AP) Accelerated phase

يمكن تعريف الطور الاشتدادي بوجود:

- $\leq 5\%$  من الأرومات في الدم المحيطي أو نقي العظم،
- $\leq 20\%$  من الأسُسات (القعدات) في الدم المحيطي،
- الصفيحات  $< 10^{12}$  / ليتر أو أقل،
- هناك دليل على وجود تطوّر نسيلي clonal evolution وطَحَلٍ متَرَقٍ progressive splenomegaly.
- كما يبدأ المرضى في هذا الطور بعدم تحقيق الاستجابة للمعالجة (35، 36).

يُعرّف التحول النسيجي بأنه ظهور شذوذات صبغية بالإضافة لصبغي فيلادلفيا، وهو يظهر عند 50% - 80% من هؤلاء المرضى، ويشمل ذلك ظهور صبغي فيلادلفيا آخر، تتلث الصبغي 8 trisomy 8، 17q isochromosome الذي يؤدي إلى خبن الجين الكابح للورم p53 (2).

## 9.3. الطور الأرومي (BP) Blastic phase

على الرغم من أن الجين *BCR-ABL* تلعب دوراً هاماً في إمراضية الطور المزمن للـ *CML*، وتكاثر الخلايا في الطور الحاد يتطلب استمرار التعبير عنه، إلا أن الأحداث الجزيئية التي تقود إلى الطور الأرومي غير مفهومة تماماً حتى الآن (30). ويُعرف الطور الأرومي حسب منظمة الصحة العالمية WHO (1) بوجود:

- نسبة أعلى من الأرومات في كل من الدم المحيطي ونقي العظم ( $\leq 20\%$ )،
- تكاثر للأرومات خارج نخاعي extramedullary blast proliferation،
- وجود بؤر كبيرة أو عناقيد من الأرومات في خزعة نقي العظم (34، 37).
- الجانب الأكثر أهمية في هذا الطور استحالة المرض إلى ابيضاض حاد، وينبغي معالجته على هذا الأساس، حيث يستحيل 60%-70% من المرضى إلى ابيضاض نقوي، بينما يستحيل 20%-30% منهم إلى نوبة أرومات لمفاوية وينبغي معالجتهم كمرضى ALL (2).

## 10. تشخيص الابيضاض النقوي المزمن Diagnosis of CML

### 10.1 .المورفولوجيا Morphology

#### 10.1.1 .الطور المزمن (CP) Chronic phase

يتم تشخيص CP بناء على تصنيف منظمة الصحة العالمية WHO (1) بالاعتماد على أي من المعالم التالية:

#### في الدم المحيطي PB:

- ◆ كثرة الكريات البيض leukocytosis ( $12-1000 \times 10^9/L$ ) على حساب العدلات neutrophils في مختلف مراحل النضج، مع انحراف ملحوظ نحو اليسار في العد التفرقي (1، 19).
- ◆ لا يلاحظ خلل تنسج dysplasia واضح (1).
- ◆ غالباً ما تمثل الأرومات Blasts أقل من 2% من WBC (1).
- ◆ يلاحظ دائماً كثرة الأسُسات المطلق absolute basophilia، ومن الشائع وجود كثرة اليوزينات المطلق absolute eosinophilia (1، 19).
- ◆ قد يحدث كثرة العدد المطلق للوحيدات absolute monocytosis، ولكن تبقى نسبة الوحيدات أقل من 3% (1).
- ◆ غالباً ما يكون تعداد الصفيحات طبيعياً، لكنه قد يكون مرتفعاً أو منخفضاً (36)، حيث يتراوح تعداد الصفيحات من الطبيعي إلى أكثر من  $1000 \times 10^9/L$ ، ولكن من غير الشائع حدوث قلة الصفيحات thrombocytopenia (1).
- ◆ يلاحظ فقر دم خفيف بشكل شائع (36)،
- ◆ في الطور المزمن CP تنقص الفوسفاتاز القلوية في العدلات neutrophil alkaline phosphatase (1).

## في نقي العظم BM

- ◆ يكون نقي العظم مفرط الخلوية hypercellular نتيجة تكاثر المحببات مع طراز نضج maturation pattern مشابه لذاك المُشاهد في الدم المحيطي.
- ◆ قد تكون اليوزينات بارزة.
- ◆ غالباً ما تمثّل الأرومات أقل من 5% من خلايا النقي، أما إذا ارتفعت إلى 10% أو أكثر فقد يشير ذلك إلى تقدّم progression المرض.
- ◆ تختلف طلائع الكريات الحمر، ولكن غالباً ما ينقص عدد وحجم جزر سلسلة الكريات الحمر.
- ◆ تكون النّوّاء megakaryocytes عند المرضى المصابين بالـ CML أصغر من الحالة الطبيعية، وذات نوى ناقصة التفصص hypolobated (نوّاء قزّمة). وعلى الرغم من أنها تكون طبيعية العدد أو ناقصة بشكل طفيف، فإن 40-50% من المرضى يعانون من تكاثر زائد للنوّاء.
- ◆ تُظهر الخزعة الأولية تليفاً معتدلاً عند 30% من الحالات، والذي ينتج عن زيادة عدد النّوّاء (1).

### 10.1.2 . الطور الاشتدادي (AP) Accelerated phase

## في الدم المحيطي PB

- يتم تشخيص AP بناء على تصنيف منظمة الصحة العالمية WHO (1) بالاعتماد على أي من المعالم التالية:
1. زيادة تعداد الكريات البيضاء المستديمة ( $10 \times 10^9/L <$ )، و/أو زيادة أو استدامة persistent الطّحلّ splenomegaly غير المستجيب للعلاج unresponsive.
  2. كثرة الصفيحات ( $1000 \times 10^9/L <$ ) thrombocytosis غير المضبوطة بالمعالجة.
  3. قلة الصفيحات المستديمة غير المرتبطة بالمعالجة.
  4. حدوث تطور وراثي خلوي (صبغي) نسيلي clonal cytogenetic evolution.
  5. ارتفاع نسبة الأسّات basophile إلى 20% أو أكثر في الدم المحيطي.

6. ارتفاع نسبة الأرومات النخوية myeloblasts إلى 10-19% في الدم المحيطي أو نقي العظم.

تترافق البنود 1-4 مع تقدم المرض من CP إلى AP، بينما غالباً ما تشاهد المعايير 5-6 في حال التحوّل من AP إلى الطور الأرومي BP (1).

### في نقي العظم:

1. يُلاحظ أن نقي العظم في الطور الاشتدادي يكون مفرط الخلوية hypercellular مع وجود خلل في التنسج النخاعي myelodysplasia.
2. زيادة في أرومات السلسلة النخاعية.
3. وجود عناقيد ضخمة من نواءات صغيرة شاذة مترافقة مع تليف في نقي العظم (1).

### 10.1.3 . طور الأرومات (BP) Blast phase

يتم تشخيص BP حسب معايير منظمة الصحة العالمية WHO (1) عند وجود أحد المعايير التالية:

1. ارتفاع نسبة الأرومات إلى 20% أو أكثر من الكريات البيض في الدم المحيطي، أو من الخلايا المنوّاة في نقي العظم.
2. وجود تكاثر أرومي خارج النخاع extramedullary، غالباً ما تتوضع في الجلد أو العقد اللمفية أو الطحال أو العظم أو الجملة العصبية المركزية، وقد تنتمي إلى السلالة lineage النخاعية myeloid أو اللمفاوية lymphoid؛ فتكون في 70% من الحالات نخاعية وقد تضم أرومات العدلات، أو اليوزينات، أو الأسُسات، أو الوحيدات، أو النواءات، أو أرومات سلسلة الكريات الحمر أو أي مزيج منها، بينما تكون في 20-30% من الحالات أرومات لمفاوية (1).



## 10.2 . النمط الظاهري المناعي Immunophenotype

- لا تملك دراسة النمط الظاهري المناعي دوراً هاماً في تشخيص CML، لكنها تستخدم بشكل متزايد في تمييز الطور الأرومي BP (38، 39).
- عند الإصابة بالـ CML يتم التعبير عن المستضدات النخاعية CD34، CD13، CD11c، CD45 وشكله الإسيوي CD45RO، بينما لا يتم التعبير عن المستضد CD45RA وهذا ما يساعد على تفريقه عن الأبيضاخ النقي الحاد acute myeloid leukemia (AML). كما أن الخلايا الأبيضاخية تعبر عن HLA-DR في حالة CML وهذا ما يجعل تفريقها عن الخلايا السلف precursors الطبيعية في نقي العظم ممكناً (39).
- يظهر الدور الهام للتنميط المناعي في حالة CML عند الوصول إلى الطور الأرومي BP الحاد لما لذلك من اعتبارات علاجية، فمعظم حالات الطور الأرومي تظهر على شكل أبيضاض نقوي حاد AML وتملك النمط الظاهري النموذجي له، وهناك حالات أخرى من BP تظهر على شكل أبيضاض لمفاوي حاد بالخلايا البائية B-ALL وتعبر عن المستضد CD10 المميز للخلايا البائية السلف B-precursor (40).
- تحدث معظم حالات الأزمة الأرومية للمفاوية lymphoblastic BP في طليعة اللمفاويات البائية B، ولكن قد تحدث في طليعة اللمفاويات التائية T في بعض الحالات. ويتم التعبير في أزمة الأرومات للمفاوية بشكل مشترك عن واحد أو أكثر من المستضدات النخاعية على سطح الأرومات للمفاوية في أغلب الحالات (1).
- تحقق 25% من حالات BP معايير الأبيضاخ الحاد مختلط النمط الظاهري (MPAL) mixed phenotype acute leukaemia (1).
- في الطور الأرومي BP، تختلف فعالية البيروكسيداز النخاعية myeloperoxidase في الأرومات، فقد تكون هذه الفعالية قوية أو ضعيفة أو لا تملك أي فعالية، ولكن تعبر هذه الأرومات عن مستضدات تترافق مع تمايز المحببات أو الوحيدات أو النواء و/أو سلسلة الكريات الحمر، وفي أغلب الحالات ستعبر الأرومات النخاعية أيضاً عن مستضدات لمفاوية (1).

### 10.3 التحاليل الوراثية الخلوية (تحليل الصبغيات) Cytogenetic analysis

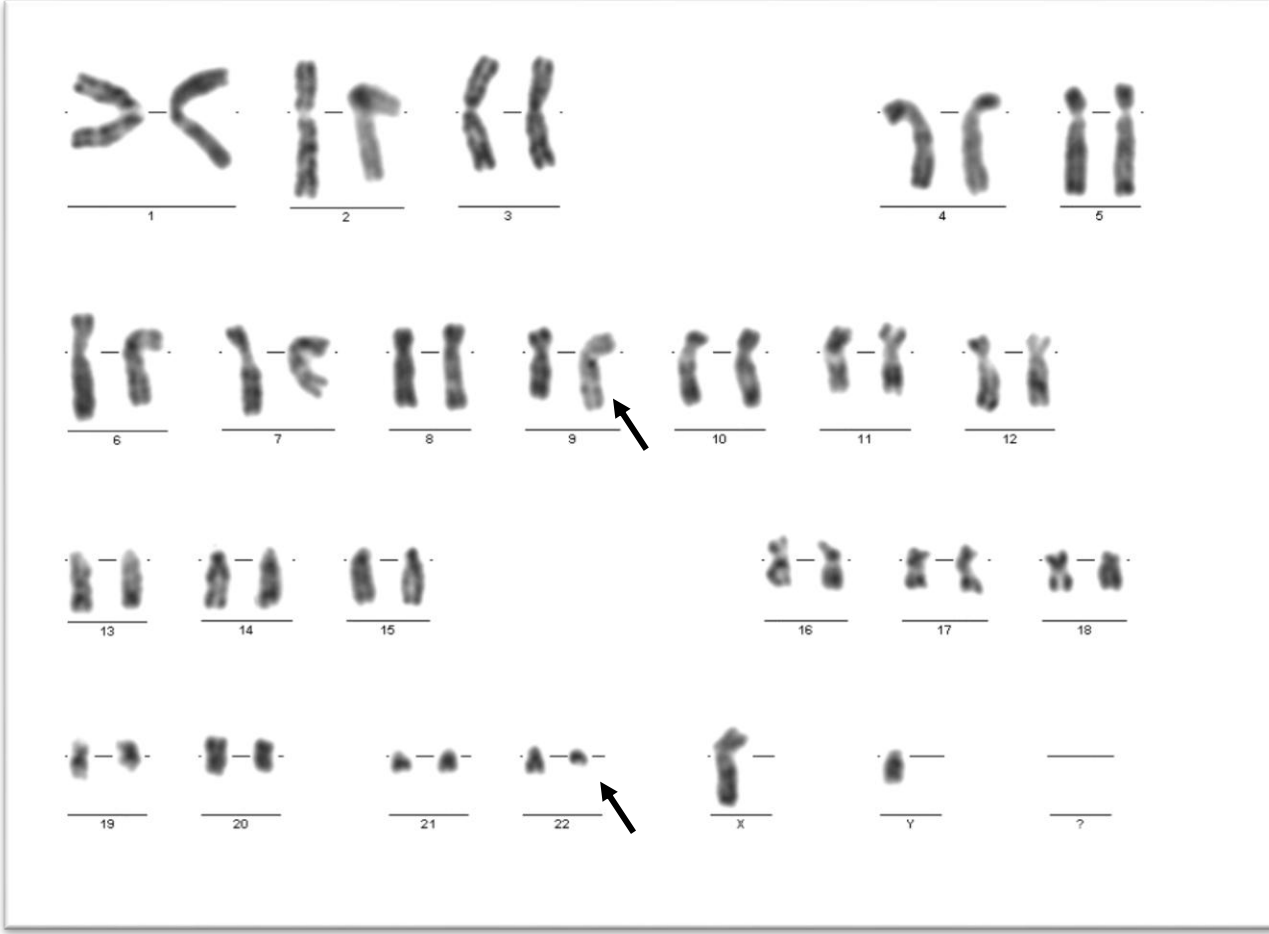
يعتبر الجين المندمج *BCR-ABL* السمة المميزة لـ *CML*، ويعتمد التشخيص الجازم للمرض على:

❖ تقنيات الوراثة الخلوية *Cytogenetic techniques*، بنوعها التنميط النووي *karyotyping* والتّهجين الموضعي المتألق *fluorescence in situ hybridization (FISH)*، التي تكشف الشذوذ *BCR-ABL* على المستوى الصبغي فتُظهر وجود صبغي فيلادلفيا (16)،

❖ الاختبارات الجزيئية لاستعراف الشذوذ الجيني النوعي بكشف المنتسخات *BCR-ABL* عن طريق تفاعل البوليميراز السلسلي بالناسخة العكسية (RT-PCR) *reverse transcriptase polymerase chain reaction* التي تكشف المرض على مستوى الرنا المرسال mRNA (16).

#### 10.3.1 التنميط النووي *karyotyping*

يُجرى التنميط النووي بالاستشراف *G* بغيما *G-banding karyotyping* على خزعة نقي العظم، لدراسة الصبغيات، حيث تزرع الخلايا المأخوذة من الخزعة لمدة 1-3 أيام، مما يسمح لبعضها بالدخول في الطور التالي *metaphase* في الانقسام الفتيلي *mitosis*، حيث تكون الصبغيات مكثفة *condensed*. وهنا يتم تلوين الخلايا ويتم استعراف الصبغيات بناء على الأشرطة *bands* الفاتحة والداكنة الناتجة عن التلوين، حيث يتم تمييز الصبغيات الطبيعية حسب حجمها ونمط تلوونها، بالإضافة إلى الشذوذات الحاصلة عليها، الشكل (6) (29).



**الشكل (6): الترميط النووي karyotype لخزعة نقي عظم لمريض CML.**  
يدل السهم السفلي على صبغي فيلادلفيا Ph الذي يبدو أقصر نوعاً ما من مقابله الطبيعي، ويدل السهم العلوي على الصبغي 9 الذي يبدو ذراعه الطويل أطول نوعاً ما من مقابله الطبيعي.  
مقتبس من ملفات مخبر الوراثة الخلوية، مستشفى الأسد الجامعي.

لإجراء الترميط النووي يُدرس عادة 25 – 30 خلية في الطور التالي metaphase، ويتم التحري عن صبغي فيلادلفيا فيها. يوجد صبغي فيلادلفيا عند حوالي 95% من مرضى الـ CML عند التشخيص، وتحمل الحالات الأخرى إزفاءات مقنعة يمكن كشفها بطرق أخرى مثل التّهجين الموضعي المتألق fluorescence in situ hybridization (FISH) أو تفاعل البوليميراز السلسلي بالانتساخ العكسي reverse transcription polymerase chain reaction الذي يكشف الجين المندمج BCR-ABL (4).

## مساوي الطريقة

1. نتيجةً للعدد المحدود من الخلايا الذي يتم دراسته، لذا فإن حساسية هذه الطريقة منخفضة نسبياً، حيث تُقدّر حساسية التتميط النووي في اكتشاف المرض المتبقي residual disease بعد المعالجة بخلية ابيضاضية واحدة على الأقل من كل 3-4% من الخلايا التي تحمل صبغي فيلادلفيا، ولكن مقدرته على التقدير الكمي يجعله اختباراً مفيداً لمراقبة الاستجابات العلاجية، ومع ذلك فإن دقة هذا التحديد الكمي ضعيفة وخاصة عندما تُشكّل الخلايا ايجابية صبغي فيلادلفيا Ph+ cells أقل من 10% من إجمالي الخلايا (29).
2. وعلاوة على هذا، يعتبر التتميط النووي طريقةً باضعةً، حيث يتطلب خلايا في طور الانقسام لاختبار صبغيات الطور التالي، وتعد عينة نقي العظم العينة الأفضل لإجرائه كونها تحوي عدد أكبر من الخلايا المتكاثرة من الدم (29).

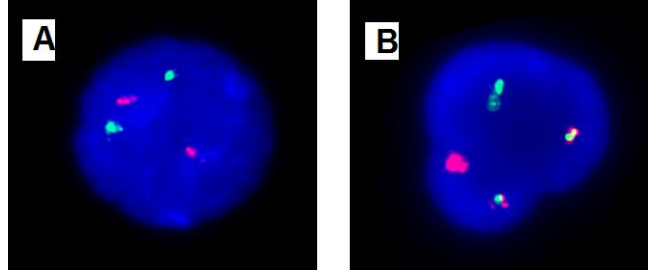
## مزايا الطريقة

1. يتميز التتميط النووي بقدرته على إعطاء نتيجة كمية وذلك بحساب نسبة الخلايا الحاملة لصبغي فيلادلفيا إلى الخلايا الطبيعية، لذا يمكن استخدامه في تشخيص CML ومراقبة الاستجابة للمعالجة (29).
2. كما يُمكن التتميط النووي من اكتشاف الشذوذات الصبغية الإضافية التي قد تحدث أحياناً عند تقدّم المرض، مثل تثلث الصبغي الثامن trisomy 8، صبغي متساوي الأذرع 17 Isochromosome [i(17)q]، صبغي فيلادلفيا إضافي، وتثلث الصبغي 19 (trisomy 19)، بالإضافة إلى شذوذات صبغية أقل شيوعاً تتضمن -7، -17، +17، +21، -Y، (q26.2;q22)t(3;21)(41).

على الرغم من حساسية هذه الطريقة المنخفضة في اكتشاف المرض الأدنى المتبقي، يعتبر التتميط النووي الطريقة المعيارية لمراقبة مرضى CML، وهي قادرة على كشف شذوذات التتميط النووي بالإضافة إلى صبغي فيلادلفيا والتي قد تنشأ أثناء تقدّم المرض (4).

### 10.3.2. التهجين الموضعي المتألق (FISH) fluorescence in situ hybridization

يُجرى اختبار FISH بشكل نموذجي عن طريق التهجين المشترك co-hybridization لمسبارين لكل من الجينين *BCR* و *ABL* إلى صبغيات الطور التالي المتمسخة *denatured metaphase chromosomes* أو نوى الطور البيني *interphase nuclei*، وتعتمد هذه الطريقة على إمكانية طاق وحيد *single strand* من الدنا DNA على التهجين من دنا متمم *complementary DNA* له (42). الطريقة التقليدية منه عبارة عن تقنية ثنائية اللون تستخدم مسباراً نوعياً لمتواليه محددة من الجين *BCR* ويرتبط مع واسم ذو تألق أخضر، ومسبار آخر يرتبط نوعياً مع متواليه محددة من الجين *ABL* ومرتبط مع واسم ذو تألق أحمر اللون. في حال وجود الإزفاء، سيكون المسباران قريبين من بعضهما بحيث يندمج لوناهما معطيان لوناً أصفر، الشكل (7) (29).



الشكل (7): استخدام تقنية FISH في اكتشاف الجين المندمج *BCR-ABL* في خلايا الطور البيني.  
**A** : خلية طبيعية، تظهر فيها إشارتان حمراء اللون وإشارتان خضراء اللون تدلان على موقع الجينات *BCR* و *ABL* الطبيعية؛  
**B** : خلية غير طبيعية، يظهر الجين المندمج *BCR-ABL* عبر اندماج اللونين الأحمر والأخضر لذلك تظهر على شكل تألق أصفر اللون.  
مقتبس من ملفات مخبر الوراثة الخلوية، مستشفى الأسد الجامعي.

يعتبر FISH مناسباً للتشخيص وفي حالة النكس *relapse*، حيث يوجد عدد كبير من الخلايا الابيضاضية الحاملة للزيج *aberration* نتيجةً لحساسية الاختبار المنخفضة نسبياً، والتي تقدر بخلية خبيثة واحدة على الأقل من كل مئة خلية طبيعية. يمكن استخدام عينة دم محيطي أو عينة

نقي عظم لإجراء هذا الاختبار من أجل تشخيص CML، ولكن ليس لاكتشاف المرض المتبقي الأصغري (MRD) minimal residual disease التالي للمعالجة (43).

#### مساوي الطريقة

قد يحدث تراكم عشوائي عرضي للمسبارين المتألقين في نوى الطور البيني الطبيعية يؤدي إلى نتائج إيجابية كاذبة. يصل تواتر مثل هذه الحالات إلى 5-10% مما يجعل التقدير الكمي الأقل من 10% غير موثوق (42).

#### مزايا الطريقة:

- 1) يكشف FISH حوالي 95% من حالات CML بالإضافة إلى ما يقارب 5% من الحالات التي تحمل إزفاءات مقنعة والتي لا تكشف بالتنميط النووي،
- 2) كما يكشف الحالات النادرة التي تحمل نقاط كسر مختلفة تقع خارج المناطق التي تغطيها المشارع المستخدمة في تفاعل PCR (29).
- 3) نستطيع باستخدام اختبار FISH تلافياً أحد أكبر مساوئ اختبار التنميط النووي وهي العينة المستخدمة، حيث يحتاج اختبار التنميط النووي عينة نقي عظم للحصول على خلايا في الطور التالي metaphases، بينما يمكن لإجراء اختبار FISH استخدام خلايا في الطور التالي أو البيني interphase لذلك يمكن استخدام عينة دم محيطي (42).

#### 10.4 . تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي بالانتساخ العكسي

#### **Quantitative reverse transcription polymerase chain (qRT-PCR) reaction**

تستخدم تقنيات البيولوجيا الجزيئية في تشخيص CML ومراقبة الاستجابة للمعالجة (44)، حيث تؤدي المعالجات المستخدمة حالياً إلى استجابة صبغية تامة complete cytogenetic response (CCR)، ولكن تبقى نسبة صغيرة من جمهرة الخلايا الخبيثة بمستويات منخفضة جداً تسبب النكس للمريض، وتكون التقنيات المعتمدة على الوراثة الخلوية cytogenetics قاصرة عن كشفها. يطلق على جمهرة الخلايا الورمية هذه والتي لا يمكن كشفها سوى بالطرق

الجزئية اسم المرض المتبقي الأصغري (MRD) minimal residual disease (45). وينبغي لمثل هذه الطرق أن تملك عدداً من الشروط لاستخدامها في هذا المجال:

- تملك حساسية تقدر بخلية ورمية/  $10^4-10^5$  خلية طبيعية،
- يمكن تطبيقها لدى كل المرضى،
- تقدّم معلومات كميّة عن المَعلم المُستهدف،
- يمكن توحيد نتائجها بين المخابر،
- سريعة، غير مكلفة، نوعية للمرض (45).

تتطلب مراقبة مرضى الـ CML المعالجين بمثبطات التيروسين كيناز TKIs – والتي تؤدي إلى انخفاض ملحوظ في العبء السرطاني – طريقةً عالية الحساسية، وهذا ما تقدّمه تقنيات تفاعل البوليميراز السلسلي PCR، والتي إمّا أن تستهدف الجين المندمج الورمي *BCR-ABL oncogene*، أو الرنا المرسال الورمي *onco-mRNA* (46)، وتستخدم لذلك تقنية Nested PCR، وتفاعل PCR اللحظي الكمي quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (42).

غالباً ما يستخدم تفاعل qRT-PCR لمراقبة المرض المتبقي الأصغري لدى المرضى الذين حققوا استجابة صبغية تامة CCR عند إجراء التنميط النووي أو FISH، ويمكن إجراء qRT-PCR على عينة دم محيطي أو نقي عظم على حدٍ سواء، وهذا ما سهّل متابعة مرضى CML المعالجين بمثبطات التيروسين كيناز. ويسمح تفاعل الـ PCR اللحظي بتضخيم وكشف الدنا DNA أو الدنا المتمم cDNA الهدف في وقتٍ واحدٍ، وتسوّى normalize العينة بمقابل شاهد داخلي internal control، غالباً ما يكون جين أحادي النسخة، وقد يستعمل لذلك الجين ABL أو الجين G6PD. يتم رسم منحنى معياري باستخدام سلسلة تمديدات لخط خلوي إيجابي الجين *BCR-ABL*، ويُحسب المرض المتبقي الأصغري باستخدام هذا المنحنى (42).

## 11. المعالجات الحالية للابيضاض النقوي المزمن Current treatment of CML

يبدأ الابيضاض النقوي المزمن بالطور المزمن CP بطيء التنامي indolent الذي يستمر عدة سنوات ويتميز بزيادة تعداد الكريات البيضاء والطحل، ثم يتقدم المرض إلى الطور الاشتدادي AP ويليه الطور الأرومي BP النهائي حيث يستحيل إلى الابيضاض النقوي الحاد AML (في 85% من الحالات)، أو الابيضاض اللمفاوي الحاد ALL (في 10-15% من الحالات)، ويؤدي تطوّر المرض هذا – دون علاج فعّالٍ – إلى الموت لامحالة. وتهدف معالجة CML إلى استئصال النسيلة الابيضاضية من نقي العظم أو المحافظة على الطور المزمن وهدأة remission مستديمة بأقل قدرٍ ممكنٍ من السمية العلاجية (47).

قديمًا كان يتم تشجيع طحال مريض CML كخيار علاجي أساسي، حيث أن ذلك يخفف من حدة الأعراض على الرغم من أنه لا يطيل الحياة. بعد ذلك تم تقديم busulfan كعلاج يزيد من بقيا المريض، على الرغم من سميته العالية للخلايا السليفة progenerator المولدة للدم (47). فيما بعد أصبحت المعالجة الكيميائية الخيار المعياري للمعالجة (باستخدام hydroxyurea و cytosine arabinoside) ذات السمية الأقل من busulfan والقادر على كبح تكاثر الخلايا وتخفيض العبء السرطاني، لكنها قاصرة عن إحداث تدميرٍ نوعيٍّ للخلايا الابيضاضية وتحقيق الاستجابة الصبغية، ولذلك كان المريض يتطوّر إلى الطور الاشتدادي والأرومي (47، 48).

### 11.1. الانترفيرون ألفا $(INF-\alpha)$ :

عضو من عائلة البروتينات السكرية، له خواص مضادة للفيروسات antiviral ومضادة للتكاثر antiproliferative. تبين في أوائل الثمانينات أنه عامل فعال لعلاج CML، وأصبح خياراً لمعالجة مرضى CML في الطور المزمن، فيزيد البقيا survival لديهم (29). ويعتبر الانترفيرون ألفا الدواء الأول القادر على إطالة الطور المزمن لمضى CML وإعاقه تطوره إلى الطور الاشتدادي (8). يعتبر  $IFN\alpha$  منبهاً غير نوعيٍّ للجهاز المناعي حيث يُنظّم فعالية



الخلايا التائية T-cell فيؤدي إلى تحقيق استجابة دموية تامة complete hematologic response لدى 80% من المرضى، واستجابة صبغية تامة complete cytogenetic response لدى 5-33% منهم بمتوسط بقيا survival 89 شهراً (49). ولكن، ولسوء الحظ فإن العديد من المرضى لايتحملون INF- $\alpha$  بشكل جيد، مما يؤدي إلى إنقاص جرعة المعالجة أو إيقافها (8، 49).

### آلية عمل الانترفيرون ألفا

- يملك INF- $\alpha$  سميّة نوعيّة للنسائل الخلوية الالبيضاضية.
- يُثبّط الخلايا السليفة النخاعية الالبيضاضية، بينما يُحافظ على الخلايا السلف النخاعية الطبيعية.
- يُعزّز التنظيم المناعي عبر تفعيل الخلايا التغصنية dendritic، والخلايا القاتلة الطبيعية natural killer، والخلايا التائية السامة للخلايا cytotoxic T cells، والقادرة جميعها على توليد استجابة مضادة للورم (8).

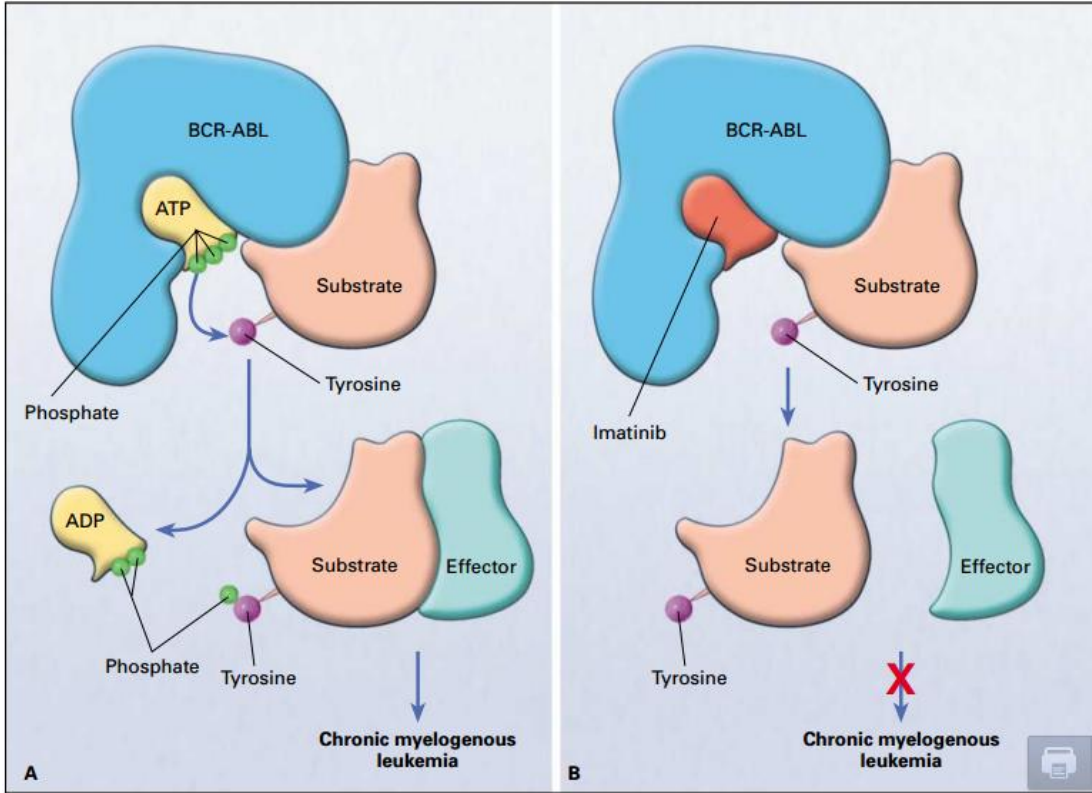
## 11.2 . مثبطات التيروسين كيناز (TKIs) Tyrosine kinase inhibitors

توجّه الاهتمام إلى البروتين BCR-ABL protein كهدفٍ أساسيٍّ للمعالجة بعد التعرف على نشاط التيروسين كيناز الذي يملكه هذا البروتين والذي يلعب دوراً رئيسياً في أمراض الـ CML، لذلك، في عام 1996 قام Buchdunger وزملاؤه باصطناع العديد من المركبات التي تثبّط نشاط مستقبل عامل النمو المشتق من الصفائح platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) ونشاط الـ ABL كيناز، وهذا ما قاد فيما بعد إلى اصطناع أدوية صغيرة الجزيئة مصمّمة لتتداخل بفعالية التيروسين كيناز للبروتين BCR-ABL protein، وكان أولها المركّب STI571، الذي يدعى أيضاً إيماتينيب ميزيلات imatinib Mesylate (Gleevec®، Novartis Pharmaceuticals) الذي يتثبّط انتقائياً نشاط التيروسين كيناز للبروتين ABL، بما في ذلك ذلك الذي يملكه البروتين BCR-ABL protein (8، 50).

يحدث الإيماتينيب استجابة دموية hematologic response سريعة لدى جميع مرضى الطور المزمن من الـ CML الحاملين لصبغي فيلادلفيا تقريباً، ولدى 50% من أولئك في الطور الاشتدادي AP، ونسبة أقل من المرضى في الطور الأرومي. كما أنه يحقق استجابة صبغية كبرى major cytogenetic response (MCR) عند أكثر من 50% من المرضى الذين بدؤوا العلاج في مرحلة متأخرة من الطور المزمن، ولدى أكثر من 80% من المرضى الذين تلقوا هذه المعالجة كخيار أول، معظمهم حققوا استجابة صبغية تامة (51)، ويؤدي الاستعمال السريري لمثبطات التيروسين كيناز إلى تحسُّن إنذار prognosis المرض، ومعدّل الاستجابة، وبقاء survival المرضى الذين يعانون من الـ CML بشكلٍ عامٍ مقارنةً باستراتيجيات المعالجة السابقة (52).

### **11.2.1 آلية عمل الإيماتينيب Imatinib mechanism of action**

يتم التعبير عن البروتين BCR-ABL protein بمستويات عالية في الخلايا الالبضاضية، وتكمن قدرته على إحداث CML في نشاط التيروسين كيناز لميدان SH1 فيه والمسؤول عن الاستحالة المكوّنة للورم. يقوم التيروسين كيناز بنقل الفوسفات من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات adenosine triphosphate (ATP) إلى أحماض أمينية نوعية في الركازة البروتينية، وتؤدي فسفرة هذه البروتينات إلى تنشيط سبل التنبيغ الأحادية التي تلعب دوراً هاماً في العديد من العمليات البيولوجية بما فيها نمو الخلايا، وتمايزها، وموتها. يُحاكي الإيماتينيب الـ ATP، فيقوم بالارتباط بالموقع الرابط للـ ATP في ميدان SH1 في البروتين BCR-ABL protein، فيثبط نشاطه كتيروزين كيناز، الشكل (8) (53-55).



الشكل (8): آلية عمل البروتين *BCR-ABL protein* وتثبيته بفعل الإيماتينيب *Imatinib*.  
**A**: يرتبط جزيء *ATP* بالبروتين *BCR-ABL protein*، فيُنشّط الركازة عن طريق فسفرة أحد ثمالات التيروسين فيها، وهذا ما يؤدي إلى تنشيط جزيئات مستفعدة تالية، فيعطي النمط الظاهري للـ *CML*.  
**B**: يحتل الإيماتينيب الموقع الرابط للـ *ATP* في البروتين *BCR-ABL protein* فيمنع فسفرة الركازة. مقتبس من (53).

### 11.2.2 مقاومة الإيماتينيب *Imatinib resistance*

قد تتطور مقاومة للإيماتينيب ناتجة عن عدة آليات:

- ◆ آليات معتمدة على البروتين *BCR-ABL* (Bcr-Abl-dependent mechanisms)، أكثرها شيوعاً تلك الناتجة عن طفرات نقطية في ميدان الـ *ABL* كيناز *Abl kinase* domain.

◆ آليات غير معتمدة على البروتين BCR-ABL (Bcr-Abl-independent mechanisms)، تضم التنشيط البنيوي لجزيئات إشارة لاحقة، والتي قد تؤدي إلى تنشيط سبل الإشارة على الرغم من تثبيط البروتين BCR-ABL (56).

### 11.3 . زرع الخلايا الجذعية المولدة للدم *Hematopoietic stem cells transplantation*

يعتبر زرع الخلايا الجذعية الخيفي (SCT) Allogeneic stem cell transplantation إجراءً علاجياً يُقدّم إمكانيةً لشفاء مرضى الـ CML، حيث يصل معدّل البقاء للمرضى الأصغر من 50 عاماً والذين تلقوا الزرع خلال أقل من سنة واحدة من تشخيص إصابتهم بالمرض، إلى 70%. ولكن يبقى تطبيق مثل هذا العلاج محدوداً بإيجاد متبرع موافق نسيجياً للمريض، بالإضافة إلى أن ثلث المرضى هم أكبر من 60 سنة حيث يكون زرع الخلايا الجذعية لديهم غير مجدٍ بسبب الخطورة العالية لحدوث وفيات ناجمة عن المعالجة (56).

### 12 . مراقبة مرضى الابيضاض النقوي المزمن *Monitoring patient with CML*

عند التشخيص يُقدّر بأن حمل الخلايا الابيضاضية لدى المريض يكون  $10^{12}$ ، ولتقدير مدى استجابة المريض للمعالجة يتم تحديد عدد الأرومات و الأسّسات في عينة الدم (2).

#### 12.1 . الاستجابة الدموية *(HR) Hematologic response*

يحقق المريض استجابة دموية للمعالجة في حال:

- ✓ عدم وجود خلايا أرومية (أو وجودها بأعداد قليلة جداً) في الدم،
- ✓ عودة تعداد الدم إلى حدوده الطبيعية (2).
- ✓ ويعتبر أنه حقق استجابة دموية تامة *complete hematologic response* (CHR) في حال الموجودات التالية:

- $10 \times 10^9/L > WBC$
- عدم وجود محبيبات غير ناضجة.
- نسبة الأسُسات أقل من 5%.
- تعداد الصفيحات  $> 450 \times 10^9/L$ .
- عدم وجود أي علامة للطَّحَل (splenomegaly) (57).

تملك الاستجابة الدموية التامة حدوداً للكشف تقدر بـ  $10^{11}$  أو أكثر من الخلايا الالبيضاوية في الجسم (2).

## 12.2 . الاستجابة الصبغية (CR) Cytogenetic response

المستوى الثاني لتقدير الاستجابة هي الناحية الصبغية باستخدام التنميط النووي أو FISH، وذلك بتحديد عدد الخلايا التي تحمل صبغي فيلادلفيا Ph+ cells، حيث يُعبّر الانخفاض في الخلايا الالبيضاوية المُلاحظ باستخدام هذه الاختبارات عن مدى الاستجابة الصبغية:

- ✓ تكون الاستجابة الصبغية تامة (CCR) complete في حال عدم القدرة على كشف أي خلية حاملة لصبغي فيلادلفيا باستخدام تقنية التنميط النووي، أو في حال كانت نسبة النوى الحاملة للزيج BCR-ABL (BCR-ABL+ nuclei) أقل من 1% باستخدام تقنية FISH.
- ✓ تكون الاستجابة الصبغية كبرى (MCR) Major في حال انخفاض نسبة خلايا الطور التالي التي تحمل صبغي فيلادلفيا (Ph+ metaphases) إلى 1% - 34% بعد المعالجة.
- ✓ تكون الاستجابة الصبغية صغرى (mCR) minor في حال انخفاض نسبة Ph+ metaphases إلى 34% - 95% بعد المعالجة (2، 57).
- ✓ عدم وجود استجابة صبغية في حال كانت نسبة Ph+ metaphases أكثر من 95% بعد المعالجة (57).

### 12.3 . الاستجابة الجزيئية (MR) Molecular response

يعتبر هذا التقييم الأكثر حساسية، حيث أنه يعتمد على تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي quantitative PCR، ويُشار إلى نتيجة هذا التقييم بالاستجابة الجزيئية والتي يُعبّر عنها كانخفاض 10 أضعاف 10 fold (لوغاريتمي) للخلايا الابيضاضية، ويعتبر هذا التقييم حالياً الحد الأخير للكشف تقريباً  $10^5$  من الخلايا الابيضاضية، ويعبّر مدى الانخفاض في نسبة المنتسخات *BCR-ABL* بالنسبة لجين *housekeeping gene* عن مدى الاستجابة الجزيئية:

- ✓ استجابة جزيئية تامة (CMR) complete: في حال عدم القدرة على كشف أي من هذه المنتسخات (57).
- ✓ استجابة جزيئية كبرى (MMR) Major: في حال كانت نسبة هذه المنتسخات  $\geq 0.1\%$ .
- ✓ استجابة جزيئية صغرى (mMR) minor: في حال كانت نسبة هذه المنتسخات أكثر من  $0.1\%$  (37، 57).

## 13. القياس الخلوي بالتدفق Flow cytometry

### 13.1. تعريف القياس الخلوي بالتدفق:

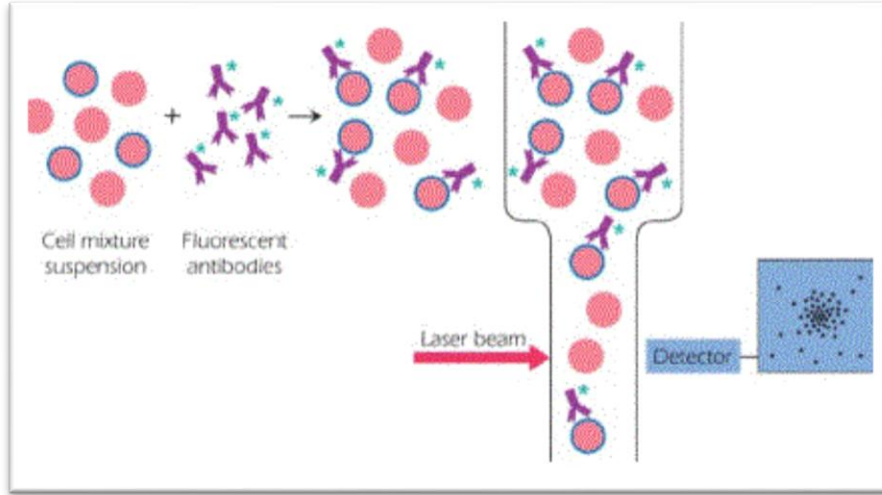
القياس الخلوي بالتدفق هو تقنية لعد وفحص الجسيمات المجهرية، مثل الخلايا والصبغيات، وذلك عن طريق تعليقها وإجبارها على المرور في مجرى سائل بشكل ملف وحيد single file (الواحدة تلو الأخرى) ثم تمريرها في جهاز تحرّ الكتروني وذلك لقياس خواصها الفيزيائية أو الكيميائية (58).

### 13.2. مبدأ القياس الخلوي بالتدفق:

يعتمد جهاز القياس الخلوي بالتدفق على عدة مبادئ:

1. تشتت الضوء light scattering.
  2. إثارة الضوء light excitation وإصدار تآلق emission of fluorocense.
- وذلك من أجل الحصول على عدة معالم نوعية عن الجسيمات والخلايا ( التي يتراوح قطرها بين 0,5 مك - 40 مك) (58، 59).

يتم ذلك عن طريق إدخال (تركيز) الخلايا أو الجسيمات بشكل هيدروديناميكي في سائل ندعوه سائل الغمد sheath fluid. ويتم توجيه حزمة من الضوء (غالباً ما يكون ليزر) ذو طول موجة واحد في مجرى هذا السائل المركز هيدروديناميكياً، فعندما تعترض الخلايا أو الجسيمات المصدر الضوئي فإنها تشتت الضوء، كما يقوم الضوء بإثارة الملونات المتألقة إلى حالة طاقة أعلى وتحرر هذه الطاقة على شكل فوتونات ضوئية لها خواص طيفية نوعية فريدة لكل ملون من الملونات المتألقة المختلفة، الشكل (9) (59).



الشكل (9): مبدأ اكتشاف معقد ضد-مستضد باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق  
*flow cytometry*. [مقتبس من (71)].

ثم يتم تصويب عدد من أجهزة الكشف على النقطة التي يمر فيها المجرى عبر حزمة الضوء:

1. جهاز في صف واحد مع حزمة الضوء (لقياس التشتت المباشر FSC).
2. عدة أجهزة معاملة لحزمة الضوء (لقياس التشتت الجانبي SSC).
3. جهاز أو أكثر لكشف التألق .

يمكن اشتقاق أنماط مختلفة من المعلومات حول البنية الفيزيائية والكيميائية لكل جسيم عن طريق تحليل التغيرات الضوئية في كل جهاز كشف (59).

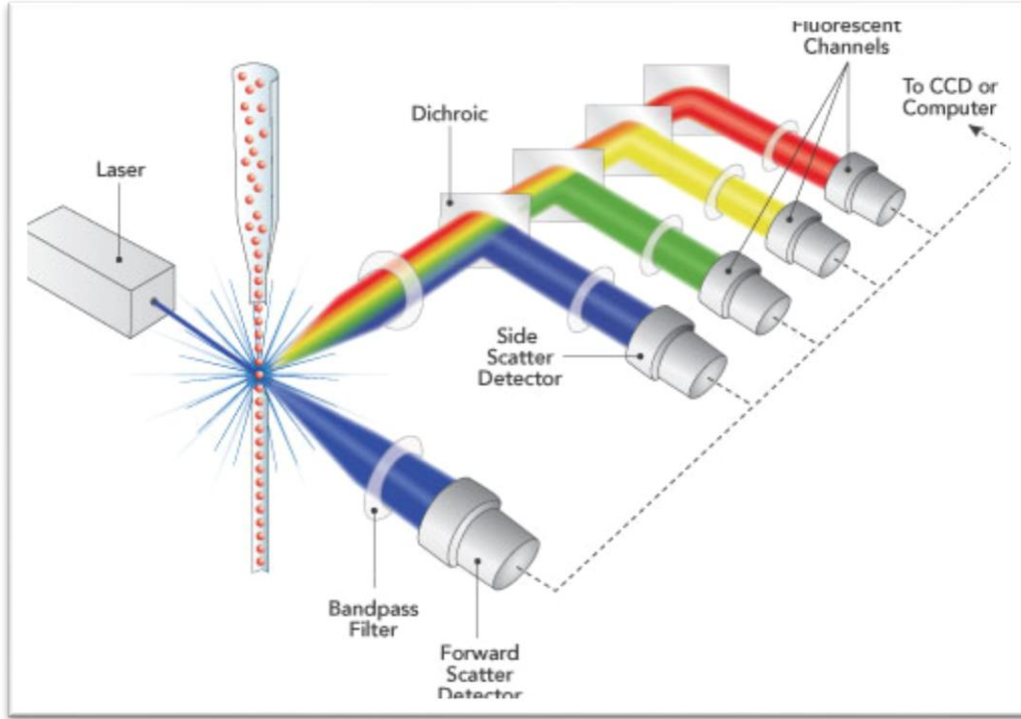
### 13.3 مكونات جهاز القياس الخلوي بالتدفق:

يتألف جهاز القياس الخلوي بالتدفق بشكلٍ أساسي من:

1. منبع ضوئي (الليزر).
2. حجرة التدفق.
3. مكونات بصرية لتركيز الضوء على أجهزة الكشف.
4. إلكترونيات لتضخيم ومعالجة الإشارة الناتجة.



5. الحاسوب، الشكل (10) (59).



الشكل (10): رسم تمثيلي لمكونات جهاز قياس التدفق الخلوي. [ مقتبس من (72) ].

### 13.4 .التبويب (التطويق) Gating

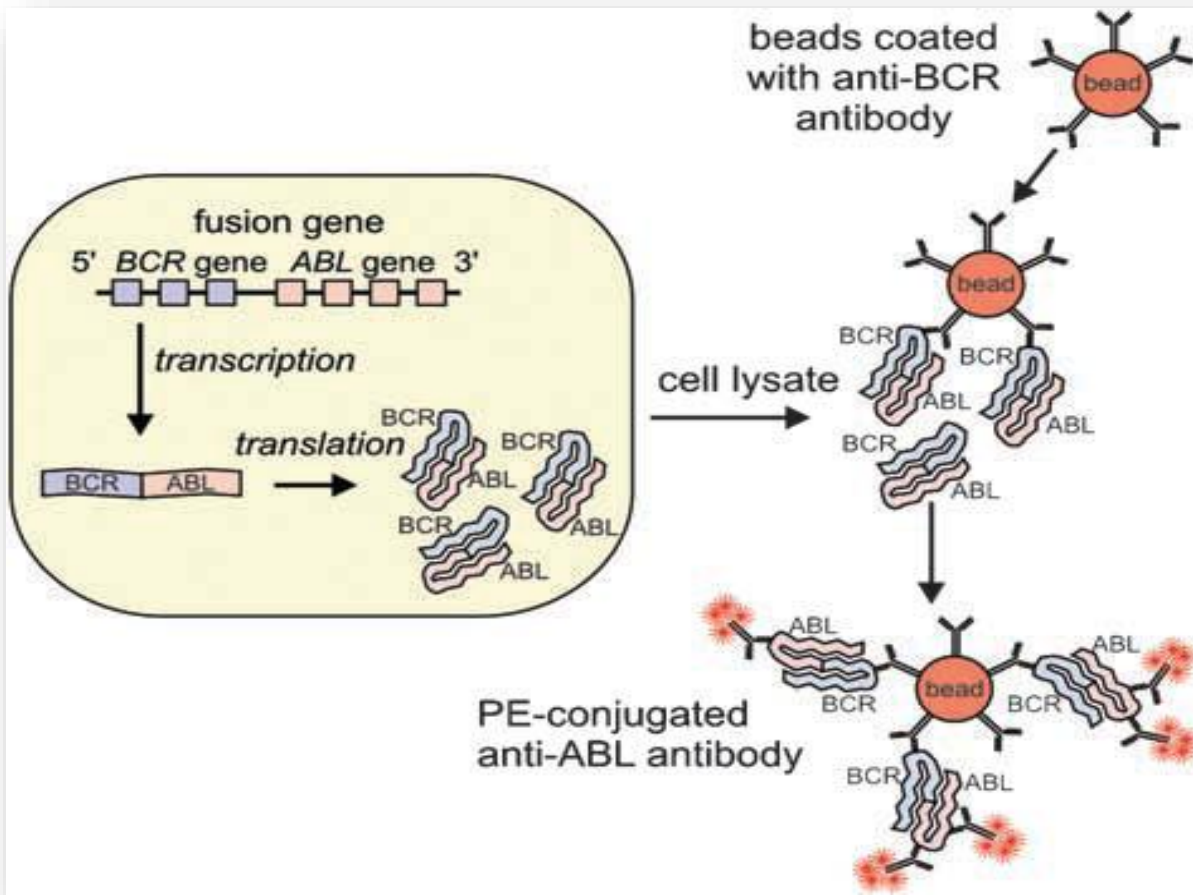
هو تحديد منطقة على المخطط البياني وذلك برسم مستطيل أو شكل بيضوي حول جمهرة من الخلايا من أجل دراستها بشكل أكبر، وبالتالي أي خلايا خارج هذا القسم سيتجاهله الحاسب. ثم تتم قياس شدة إشارة التآلق في هذا القسم لتحديد عدد الخلايا الإيجابية والخلايا السلبية، فإذا كانت الخلية في هذه المنطقة فإنه سيتم إظهار خواصها، وهذا ما يؤدي إلى اختيار الخلايا .(59) cell selection.

## 13.5 . مصفوفة الخرزات العادة للكريات

### (CBA) Cytometric Bead Array

تكشف تكنولوجيا نظام مصفوفة (منظومة) الخرزات العادة للكريات BD™ Cytometric Bead Array (CBA) المغللة بأضداد نوعية للبروتين المندمج BCR-ABL protein هذا البروتين في عينات الدم المحيطي، وتسمح هذه التكنولوجيا بتمييز الجزيئات بالاعتماد على صفاتها كالحجم والتألق، حيث أن طريقة هذا النظام تعتمد على تقارن حليلة coupling analyte، أو مجموعة من الحلائل analytes مع خرزات معلومة الحجم والتألق، مما يجعل اكتشافها ممكناً باستخدام جهاز التدفق الخلوي flow cytometry (60).

تُغلل خرزات الالتقاط capture beads بأضداد نوعية لقسم مصان conserved part من البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein، بينما يكون الكاشف المكتشف detector reagent، وهو الفيكويريترين phycoerythrin (PE)، مقترناً مع أضداد نوعية لقسم آخر من البروتين. تحضن خرزات الالتقاط والكاشف مع العينة المجهزة processed sample، فإذا احتوت على البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein يتشكل المعقد الشطيري sandwich complex الذي يُدرس باستخدام جهاز التدفق الخلوي لاستعراف الجسيمات particles identification التي تحمل صفات كل من الخرزات والمكشاف، (الشكل 11) (16، 60).



الشكل (11): مبدأ نظام مصفوفة الخرزات العادية للكريات  
 .(CBA) BD™ Cytometric Bead Array  
 مقتبس من (16).

## الدّراسة العمليّة

## هدف البحث

### المشكلة العلمية ودوافع البحث

مازال تشخيص ومراقبة الابيضاض النقوي المزمن CML يعتمد على طرق الوراثة الخلوية التي تكشفه على المستوى الصبغي (تقنية الترميط النووي karyotype)، أو على المستوى الجيني (تقنية FISH)، وطرق البيولوجيا الجزيئية التي تكشفه على مستوى الرنا المرسال mRNA (تقنية qRT-PCR). ولما كان التعبير عن هذا الخلل الجيني وما ينتج عنه من نسخ لا يكتمل إلا بإنتاج البروتين الضالع بإحداث المرض وتطوره وشدته، فإنه من الأحرى البحث عن طريقة لكشف ومعايرة هذا البروتين الورمي BCR-ABL oncoprotein بطريقة موثوقة وسهلة.

### هدف البحث

هدفت دراستنا إلى تقصي البروتين المندمج BCR-ABL protein عند مرضى الابيضاض النقوي المزمن CML بطريقة القياس الخلوي بالتدفق flow cytometry التي تمت مقاربتها من قبل عدة باحثين، لتقييمها من أجل تشخيص ومراقبة هؤلاء المرضى، وإلى البحث عن علاقة ممكنة بين كميات هذا البروتين المندمج وتطور المرض، وشدته، ومدى استجابة هؤلاء المرضى للعلاج، وذلك بمقايسة هذا البروتين المندمج بمقايسة نصف كمية باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق.

المواد والطرق

Materials and Methods

## 1. تصميم البحث Study design

دراسة استباقية مقطعية مُستهدفة prospective targeted cross sectional study لمجموعة من مرضى CML ينتمون إلى فئتين؛ إحداهما تلقت المعالجة بمثبطات التيروسين كيناز، والثانية لم تتلقَ أي علاج. وقد روعي في المرضى المعالجين استجابتهم للعلاج سواء كانت استجابة تامة complete response، أم استجابة كبرى major response، أم استجابة صغرى minor response، أو نكس relapse.

## 2. مجموعة الدراسة Study population

تضمّنت الدراسة 49 مريضاً يعانون من الابيضاض النقوي المزمن CML ممّن أرسلوا إلى قسم المخبر في مستشفى الأسد الجامعيّ بدمشق في الفترة الواقعة بين شهري شباط 2013 وأذار 2014، وذلك لاكتشاف t(9;22) mRNA detect لديهم باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي بالانتساخ العكسي qRT-PCR و/أو اكتشاف صبغي فيلادلفيا باستخدام التحاليل الصبغية (الوراثية الخلوية) cytogenetic analysis، بعد أن تمّ تشخيصهم مسبقاً من قبل اختصاصيّ الدّمويّات Hematologist بالاعتماد على المعايير المورفولوجية morphological والكيميائية الخلوية cytochemical والمناعية immunological، بناءً على التّعليمات الإرشادية الفرنسية الأمريكية البريطانية French-American-British (FAB)، والتّعليمات الإرشادية لمنظمة الصّحة العالميّة World Health Organization (WHO) (36)، واعتبرت الشّروط السّابقة معياراً لإدخال المرضى في مجموعات الدراسة. كما شملت الدراسة أيضاً عشرين فرداً سليماً سلبياً صبغي فيلادلفيا (- Ph)، تمّ إدراجهم في البحث لتحديد حدود الكشف التحليلية detection limits والقيمة الحديّة cut-off value.

فُسِّم مرضى الدراسة إلى فئتين:

- فئة المرضى قبل تلقي العلاج (n=12).
- فئة المرضى الذين يتلقون المعالجة بمثبطات التيروسين كيناز (n=37)، والذين قُسموا حسب الدليل الإرشادي للمجتمع الأوروبي لعلم الأورام الطبي European Society for Medical Oncology (EMSO) (35) إلى الفئات التالية:

- مرضى معالجين ذوي استجابة صبغية تامة CCR (n=6).
- مرضى معالجين ذوي استجابة صبغية كبرى MCR (n=3).
- مرضى معالجين ذوي استجابة صبغية صغرى mCR (n=1).
- مرضى ناكسين صبغياً (ارتفاع في نسبة الخلايا الحاملة لصبغي فيلادلفيا (Ph+) بعد الوصول إلى CCR) (n=1).
- مرضى معالجين ذوي استجابة جزيئية تامة CMR (n=15).
- مرضى معالجين ذوي استجابة جزيئية كبرى MMR (n=10).
- مرضى معالجين ذوي استجابة جزيئية صغرى mMR (n=7).
- مرضى ناكسين جزيئياً (ارتفاع في نسبة المنتسخات BCR-ABL بعد الوصول إلى CMR) (n=3).

### 3. استبيان المريض Patient's Questionnaire

تم تصميم استمارة استبيان خاصة بالدراسة اشتملت على بيانات المرضى وتاريخهم الصحيّ ونتائج الاستقصاءات السريرية والمخبرية (ملحق 1).

### 4. الموافقة المستنيرة Informed consent

تم جمع العينات من جميع الأفراد المشاركين في الدراسة بعد الحصول على توقيعهم على استمارة الموافقة المستنيرة (الملحق 2).



## 5. الدراسة الإحصائية Statistical analysis

- ❖ استخدم معامل الارتباط Spearman's Rho لدراسة علاقة الارتباط correlation بين قيم MFI الخاصة بالبروتين المندمج BCR-ABL protein والنتائج الوراثية الخلوية/qRT-PCR كميًا.
- ❖ استخدم اختبار كاي مربع Chi-square لدراسة الاستقلالية independence بين إيجابية وسلبية البروتين المندمج BCR-ABL protein والنتائج الوراثية الخلوية-/qRT-PCR كميًا.
- ❖ كما استخدم اختبار Kruskal-Wallis H لمقارنة قيم MFI بين مجموعات المرضى المختلفة.
- ❖ استخدمت مجموعة من العلاقات الرياضيّة من أجل تقدير قدرة اختبار الخزرات المناعي بالتدفق الخلوي للبروتين المندمج BCR-ABL protein على تشخيص الابيضاض النقوي المزمن CML بمقارنتها مع النتائج الوراثية الخلوية أو البيولوجية الجزيئية (qRT-PCR) للحصول على قيم الحساسية Sensitivity، والنوعية Specificity، والقيمة التنبؤية الإيجابية Positive Prediction Value (PPV)، والقيمة التنبؤية السلبية Negative Prediction Value (NPV).

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100 \quad \text{Specificity} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

$$\text{PPV} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100 \quad \text{NPV} = \frac{TN}{TN+FN} \times 100$$

حيث:

TP: (True positives) المرضى المصابون بالمرض والذي دلّ الاختبار المعياري على إصابتهم بالمرض (إيجابية حقيقية).

TN: (True negatives) الأشخاص غير المصابين بالمرض والذي دلّ الاختبار المعياري على عدم إصابتهم بالمرض (سلبية حقيقية).

FP: (False positives) الأشخاص غير المصابين بالمرض (تبعاً للاختبار الذهبي) والذي دلّ الاختبار المطبق في الدراسة على إصابتهم بالمرض (إيجابية كاذبة).

FN: (False negatives) المرضى المصابون بالمرض (تبعاً للاختبار الذهبي) والذي دلّ الاختبار المطبق في الدراسة على عدم إصابتهم بالمرض (سلبية كاذبة).

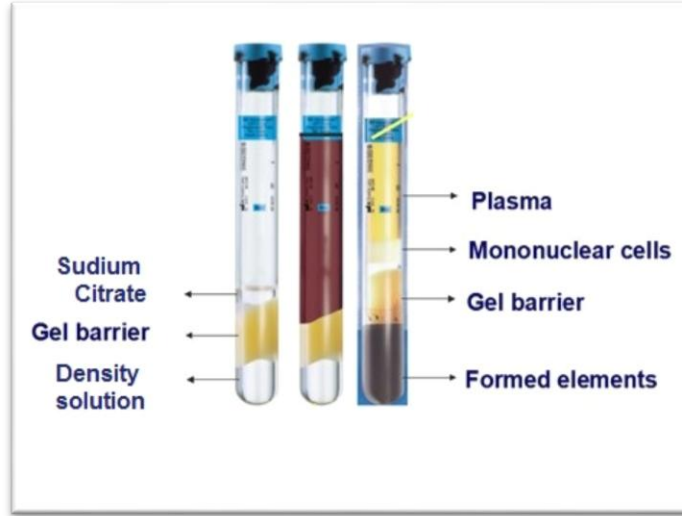
كما استخدم أيضاً البرنامج (MedCalc Software bvba, Belgium) الموجود على الموقع الإلكتروني [http://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) للتأكد من هذه القيم.

- ❖ لتقييم القيمة التشخيصية diagnostic value لاختبار البروتين BCR-ABL protein، رُسم منحنى Receiver Operating Characteristic curve (ROC)، وقُدّرت المساحة تحت المنحنى Area Under the Curve (AUC)، حيث تزداد القيمة التشخيصية للطريقة كلما كانت AUC أكبر ومقاربة للواحد.
- ❖ اعتبرت قيمة  $p\text{-value} < 0.05$  ذات دلالة إحصائية هامة عندما يكون مستوى الثقة 95% (CIs) 95% Confidence Intervals.

## 6. المواد Materials

### 6.1 الأدوات المستخدمة

1. أنابيب BD Vacutainer CPT cell preparation tubes، cat # 362782، صنع شركة BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA، الشكل (12).



### الشكل (12): CPT™ Cell Preparation Tubes

تحتوي هذه الأنابيب على محلول سترات الصوديوم كمضاد للتخثر، ووسط فاصل للخلايا مؤلف من طبقة من الجل وسائل رقيق الكثافة (محلول FICOLL™ Hypaque™ solution). يعتمد الفصل على الكثافة المنخفضة نسبياً للخلايا وحيدة النواة في الدم لفصلها عن باقي مكونات الدم، والذي يحصل خلال التثقيب حيث تتحرك طبقة الجل لتشكل حاجزاً يفصل طبقة الخلايا وحيدة النواة والبلازما في الأعلى عن باقي مكونات الدم الأكثر كثافة. [مقتبس من (74)].

2. أنابيب لجمع الدم معقمة، مُرَدَّدة بمضاد تخثر K<sub>2</sub>EDTA حجم 3 مل، cat # 367856، صنع شركة BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA.
3. أنابيب تثقيب مخروطية ذات غطاء لولبي سعة 50 مل، cat # 352070، صنع شركة BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA.
4. أنابيب مخروطية مكروية Eppendorf tubes سعة 1.5 مل صنع شركة (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).
5. رؤوس ممصات بلاستيكية tips قياس (100 µl, 1000 µl).
6. ممصات pipettes، متغيرة الحجم adjustable-volume، بقياسات مختلفة صنع شركة (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

7. أنابيب بولي ستيرين (قياس 12 x 75 - ملم) مناسبة للعمل على جهاز التدفق الخلوي (BD Falcon™ 12 x 75-mm polystyrene tubes)، cat # 352070، صنع شركة BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA.

## **6.2 الكواشف Reagents**

1. عتيدة BCR-ABL Protein Kit، cat # 643939، صنع شركة BD Biosciences, San Jose, CA, USA.
2. كاشف BD™ Lysate Treatment Reagent، cat # 560309، صنع شركة BD Biosciences, USA.
3. دائرة BD Pharmingen™ Cell Lysis Buffer، cat # 559759، صنع شركة BD Biosciences, USA.
4. دائرة BD Cytometric Bead Array (CBA) Wash Buffer، cat # 560105، صنع شركة BD Biosciences, USA.
5. محلول حال للكريات الحمر BD Pharm Lyse™ lysing buffer، cat # 555899، صنع شركة BD Biosciences, USA.
6. إيثانول مطلق 99.7 - 100% Ethanol صنع شركة VWR International Ltd, England.
7. وقاء فوسفاتي (PBS) phosphate buffered saline ذي درجة الباهاء pH=7.4 صنع شركة (EUROIMMUNE AG, Luebeck, Germany).
8. مصل جنين البقر (FBS) fetal bovine serum، cat # 01-015AM، صنع شركة Cytogen, Germany.

### **6.3. التجهيزات (الأجهزة المستخدمة) Equipments**

1. جهاز التّدفق الخلوي flow cytometer نموذج FACSCalibur صنع شركة (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).
2. عدّاد إلكتروني للخلايا Automated cell counter ماركة Cell-Dyn 3500 صنع شركة Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA.
3. مثقلة مبرّدة Centrifuge 5810R مجهّزة بكوب متأرجح swinging-bucket وتسع أنابيب قياس 50 مل، صنع شركة (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).
4. مثقلة مكروية مبرّدة Centrifuge 5804R صنع شركة (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).
5. رّجّاجة Reciprocating shaker، ماركة Stuart، رقم الموديل SSL3، صنع شركة Bibby Scientific, Staffordshire, UK.
6. حمّام مائي waterbath ماركة memmert، رقم الموديل W270، صنع شركة Memmert الألمانية.
7. مجمدة -80°س (GFL, Burgwedel, Germany).

### **6.4. البرمجيات الحاسوبية Computational software**

- ❖ BD CellQuest™ Pro software صنع شركة (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### **6.5. البرامج الإحصائية Statistical programs**

- 1 IBM SPSS Statistics 22.0 (International Business Machines Crop., New York, USA).
- 2 Microsoft Excel 2007

## 7. الطرق Methods

### 7.1 تعطيل متممة مصّل جنين البقر FBS

تمّ تعطيل متممة مصّل جنين البقر حراريّاً بوضعها في حمام مائي بدرجة 56°س مدة 30 دقيقة. قُسم المحلول المعطّل حراريّاً إلى قسامات بحجم 1 مل وحفظت في المجمدة في الدرجة -20°س لحين الاستخدام.

### 7.2 تحضير محلول الغسل

يحضر طازجاً عند كل قياس، وذلك بإضافة مصّل جنين البقر معطّل المتممة حراريّاً إلى الوقاء الفوسفاتي PBS بنسبة 5% (حسب تعليمات الشركة الصانعة لعنتيدة قياس البروتين).

### 7.3 عزل الكريات البيضاء الحاوية على البروتين المدروس

تمّ اتباع طريقتين لعزل الكريات البيضاء لاختيار الطريقة الأمثل للحصول على البروتين BCR-ABL protein المتحرّر:

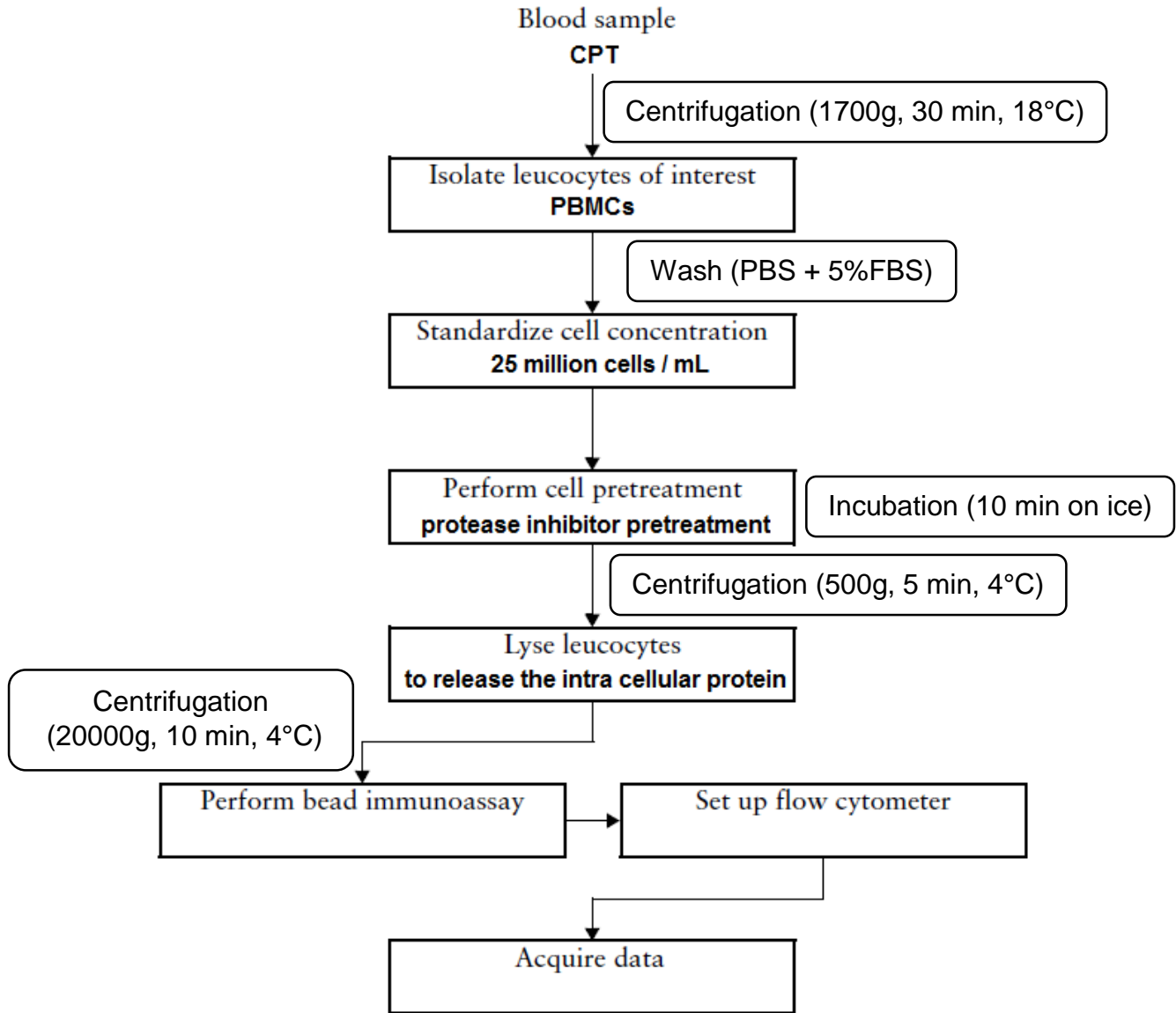
#### 7.3.1 طريقة الكريات البيضاء WBC method

سُحب 3 مل من الدم المحيطي في أنبوب يحوي EDTA كمضاد للتخثر، وأتبع تعليمات الشركة الصانعة لعزل الكريات البيضاء، وبعد تحرير releasing البروتين BCR-ABL protein الموجود داخل هذه الكريات حُفظت الحلالات الخلوية بالدرجة -80°م لحين إجراء التحليل.

#### 7.3.2 طريقة خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة PBMC method

نُبذت عينات الدم المحيطي المسحوبة على أنابيب CPT مباشرة لعزل خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) حسب تعليمات الشركة الصانعة (1700 g, 30 min, 18 °C)، وبعد تحرير releasing البروتين BCR-ABL protein الموجود داخل هذه الخلايا، حسب تعليمات الشركة الصانعة، حُفظت الحلالات الخلوية في الدرجة -80°س حتى وقت إجراء التحليل، الشكل (13).

وتتم اعتماد هذه الطريقة لإتمام الكشف كطريقة معتمدة في الدراسة.

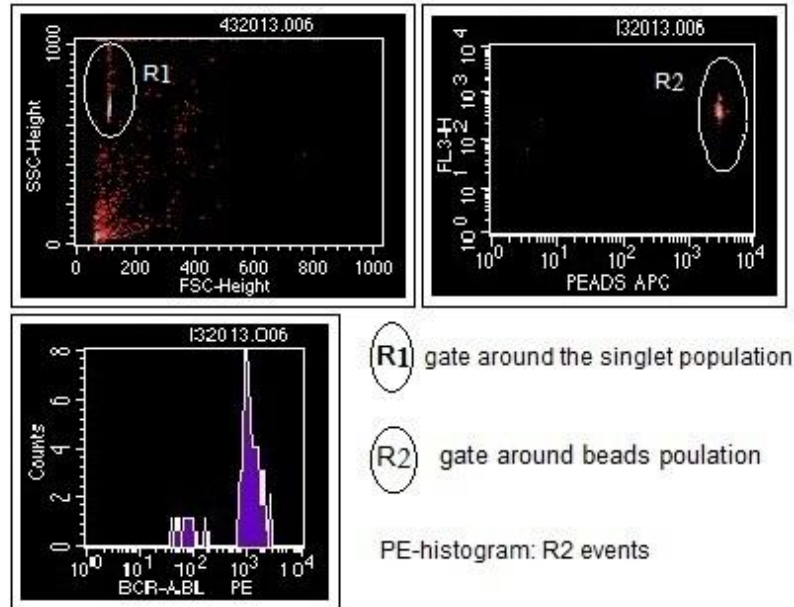


الشكل (13): مخطط انسيابي يوضح المراحل الأساسية للعمل على عتيدة BCR-ABL Protein kit

## 7.4 . اكتشاف البروتين المندمج

### BCR-ABL fusion protein detection

عند الاستخدام، أُخرجت الحلالات الخلوية من المجمدة (-80 °س)، وأذيت، وأجري اختبار الخزرات المناعي حسب تعليمات الشركة الصانعة، ثم كُشف البروتين المندمج BCR-ABL protein وتمّ اكتساب المعطيات باستخدام جهاز التدفق الخلوي flow cytometer، بالاستعانة بالبرنامج BD CellQuest™ Pro software بعد إجراء الضبط المناسب للجهاز حسب التّعليمات الإرشادية للشركة الصانعة. في حال تشكّل المعقد الشطيري sandwich complex (beads, BCR-ABL protein, PE) وبعد تعرّف الجهاز على جمهرة خزرات الالتقاط المشكّلة لجزء من هذا المعقد الشطيري، تمّ قياس شدة التآلق بعد تبويب gating هذه الجمهرة، وحسبت قيمة وسيط شدة التآلق (MFI) median fluorescence intensity، الشكل (14).  
حُسبت القيمة الحديثة للـ MFI بقياس هذه القيم في 20 عينة شاهد سلبي صبغي فيلادلفيا، وحساب متوسط هذه القيم (m) mean مضافاً إليه ضعف الانحراف المعياري standard deviation (SD) (m+2SD)، كما أوصت الشركة الصانعة للعينة.



الشكل (14): تبويب gating جمهرة خزرات الالتقاط والمنسج histogram الدال على البروتين

### BCR-ABL protein

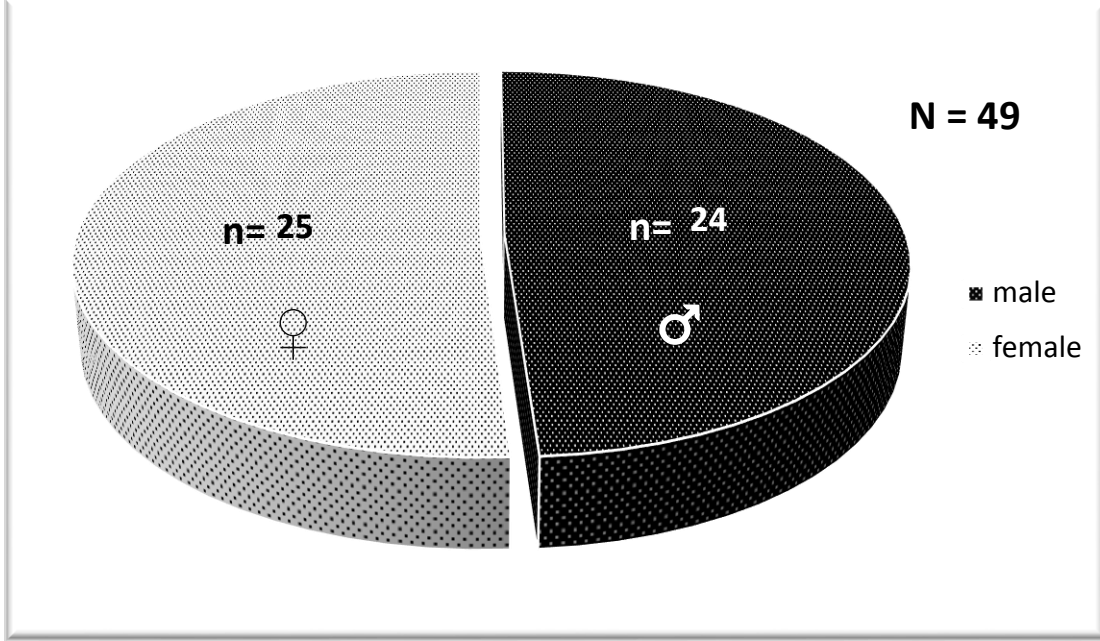


النتائج

Results

## 1. توزع أفراد العينة المدروسة حسب الجنس والعمر

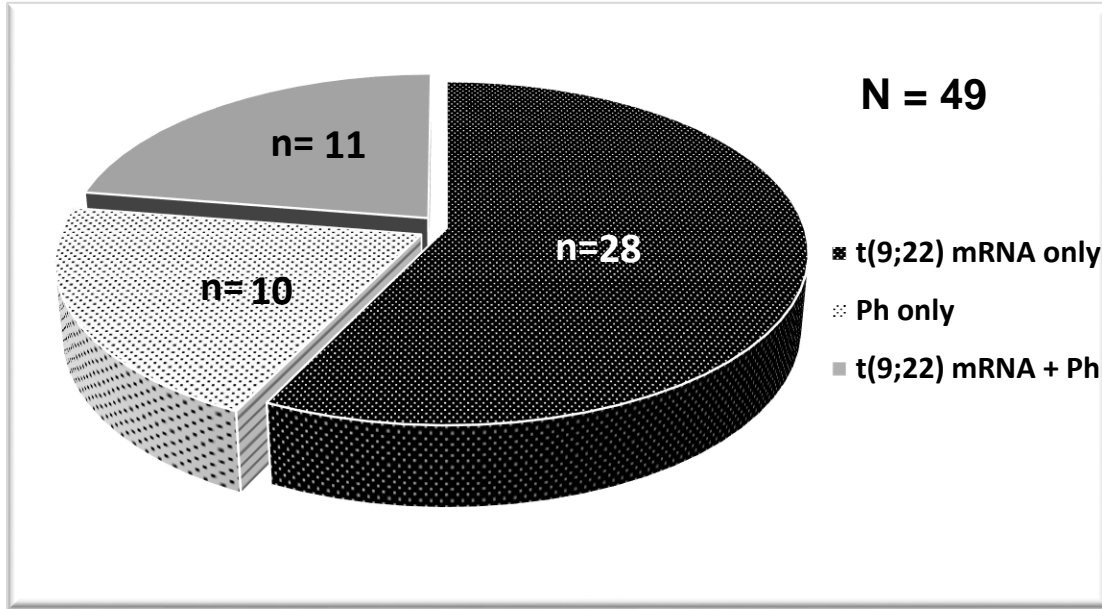
ضمت الدراسة 49 مريضاً ممن حققوا شروط الإدخال في البحث، كان متوسط أعمارهم 39.7 عاماً (6 - 69 عاماً)، منهم 24 من الذكور (49%) و25 من الإناث (51%)، الشكل (15).



الشكل (15): توزع المرضى المشاركين في الدراسة حسب الجنس.

## 2. توزع أفراد العينة المدروسة حسب توفر أحد شرطَي المشاركة في الدراسة

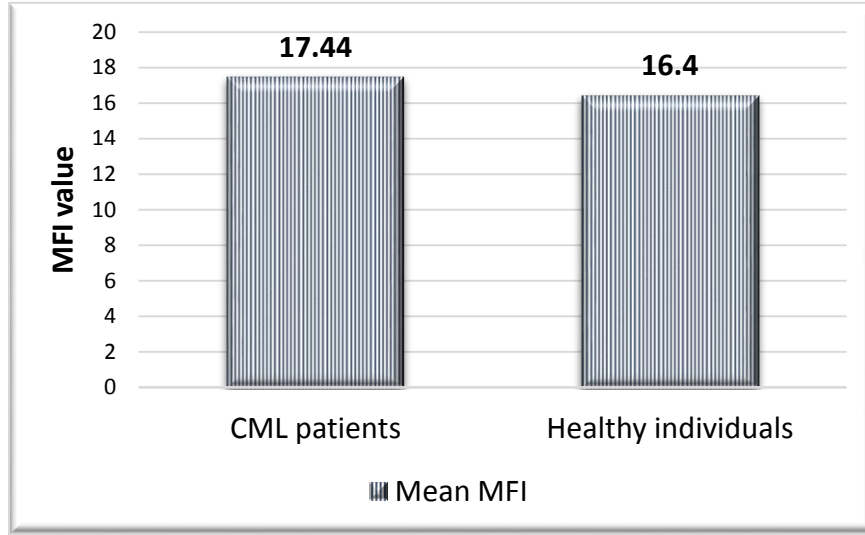
توفر شرط وجود نتيجة mRNA t(9;22) فقط لدى 28/49 مريضاً، ووجود نتيجة لاختبار صبغي فيلادلفيا بالطريقة الوراثة الخلوية فقط لدى 10/49 مريضاً، بينما حقق 11/49 فرداً توفر نتيجة لكلا الاختبارين معاً، الشكل (16).



الشكل (16): توزع مرضى الدراسة حسب توفر نتيجة تحري صبغي فيلادلفيا لديهم.

3. قيم البروتين المندمج **BCR-ABL protein** باستخدام طريقة تحريره من الكريات البيضاء (**WBC**) لدى عدد من مرضى **CML** وعدد من الأفراد الأصحاء

عند اكتشاف البروتين المندمج المحرر released من الكريات البيضاء (**WBC**) حصلنا على قيم شدة تألق **MFI** لأفراد إيجابي صبغي فيلادلفيا (غير معالجين naive) تتراوح في مجال مماثل (16.11-18.77) لتلك القيم للأفراد الأصحاء (**Ph-**)، الشكل (17).



الشكل (17): متوسط قيم شدة التآلق MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein عند كل من مرضى CML والأفراد الأصحاء بعد تحريره من الكريات البيضاء WBC.

#### 4. حساب القيمة الحدية لاختبار الخزرات المناعي بالتدفق الخلوي للبروتين المندمج BCR-ABL protein المحرّر من خلايا الدّم المحيطي وحيدة النواة PBMCs

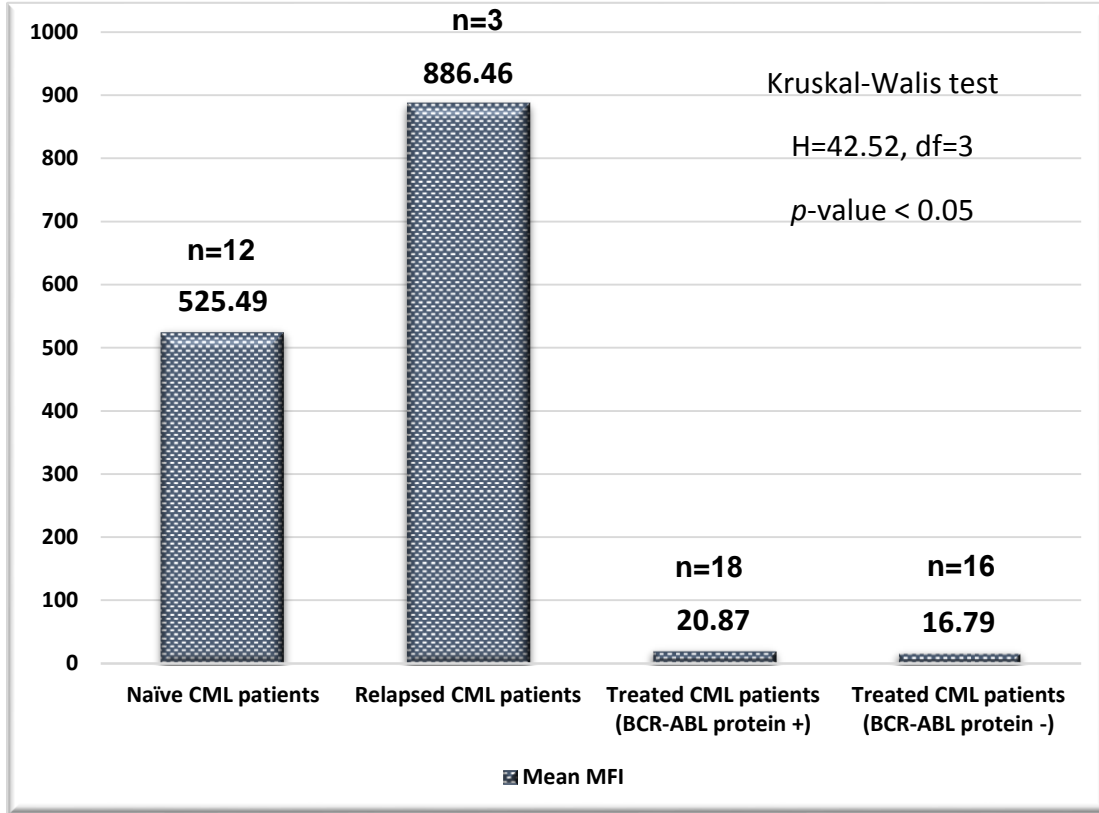
تم الحصول على قيم شدة التآلق MFI من الأفراد الأصحاء (n=20) بهدف الحصول على حدود الكشف detection limits والقيمة الحدية cut-off value لاختبار الخزرات المناعي بالتدفق الخلوي للبروتين BCR-ABL protein، حيث تراوحت القيم بين 14.59 و 19.63 (mean=16.40, SD=1.24)، وعليه فقد تمّ حساب القيمة الحدية (المتوسط + ضعفي الانحراف المعياري Mean+2SD) وكانت تساوي 18.88، والتي تمّ تبنيها في القياسات التآلية، حيث اعتبرت كلّ قيمة أعلى من 18.88 إيجابية البروتين المندمج BCR-ABL protein، وكلّ قيمة أقل من 18.88 سلبية البروتين، واستخدم هذا الحدّ للاعتبار الكيفي (سلبى/إيجابى) والكمي لهذا البروتين.

## 5. قيم البروتين المندمج BCR-ABL protein المحرّر من خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة PBMCs لمرضى CML

أظهرت دراستنا أن قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى 12/12 مريضاً من فئة المشخصين بالـ CML الذين لم يبدؤوا العلاج (naïve) كانت أعلى من القيمة الحدية، وقد تراوحت بين 24.47 و 1498.93 (mMFI=525.49).

كما أظهرت الدراسة قيماً للـ MFI تجاوزت القيمة الحدية لدى 21/37 مريضاً خاضعاً للمعالجة بمثبطات التيروسين كيناز، حيث تباينت هذه القيم فيما بينهم، فكان 3/21 منهم مرضى ناكسين تراوحت قيم MFI لديهم بين 53.76 و 1893.84 (mMFI=886.46)، بينما تراوحت هذه القيم لدى 18/21 مريضاً أبدوا استجابة للعلاج ما بين 18.97 و 31.62 (mMFI=20.87). كما أوضحت نتائجنا أن قيم MFI لم تتجاوز القيمة الحدية لدى 16/37 مريضاً خاضعاً للمعالجة، وقد تراوحت بين 14.99 و 18.27 (mMFI=16.79).

وعند استخدام معادلة Kruskal-Walis الإحصائية تبين وجود اختلاف ذي دلالة إحصائية بين قيم MFI ما بين فئات المرضى المختلفة (naïve, relapsed, treated CML patients with BCR-ABL protein +, treated CML patients - with BCR-ABL protein) [H=42.52, df=3, p-value<0.05]، الشكل (18).



الشكل (18): توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى مجموعات الدراسة. CML : chronic myeloid leukemia (ابيضاض الدم النقوي المزمن)؛ Naïve : المرضى الذين لم تبدأ معالجتهم بعد تشخيصهم؛ Relapsed : المرضى الناكسين؛ Treated : المرضى تحت المعالجة بمثبطات التيروسين كيناز؛ BCR-ABL protein + : عندما تكون قيمة MFI < 18.88 (القيمة الحدية)؛ BCR-ABL protein - : عندما تكون قيمة MFI > 18.88 (القيمة الحدية).

## 6. دراسة الاستقلالية independence بين إيجابية وسلبية البروتين المندمج BCR-ABL protein ووجود المنتسخات t(9;22) mRNA باستخدام اختبار كاي مربع (X<sup>2</sup>) Chi square

أظهرت نتائجنا إيجابية البروتين المندمج BCR-ABL protein لدى 24/39، وسلبيته لدى 15/39 مريضاً محسوباً تبعاً للقيمة الحدية المعتمدة في الدراسة (18.88). وأوضحت السجلات الطبية وجود الإزفاء t(9;22) لدى 23/39 مريضاً وغيابه لدى 16/39 مريضاً.

وبعد تطبيق اختبار كاي مربع  $X^2$  الإحصائيّ تبين وجود ارتباطٍ ذي دلالةٍ إحصائيّةٍ بين النتائج الكيفية للبروتين BCR-ABL وإيجابية وسلبية المنتسخات *BCR-ABL transcripts* [ $\chi^2(1, N=39)=27.56, p\text{-value}<0.05$ ].

#### 7. دراسة الارتباط **correlation** بين مستويات البروتين المندمج **BCR-ABL protein** ومستويات **t(9;22) mRNA** باستخدام اختبار **Spearman test**

بلغ متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى المرضى الذين تحقّق لديهم شرط توفّر نتيجة  $t(9;22) mRNA$  127.67، بينما بلغ متوسط نسبة  $t(9;22) mRNA$  لديهم 2.53%. وعند تطبيق اختبار Spearman الإحصائيّ تبين وجود علاقة ارتباطٍ إيجابيةٍ قويةٍ ذات دلالةٍ إحصائيّةٍ بين مستويات MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein ومستويات  $t(9;22) mRNA$ ، (Spearman's  $\rho=0.813, p\text{-value}<0.05$ ).

#### 8. دراسة الاستقلالية **independence** بين إيجابية وسلبية البروتين المندمج **BCR-ABL protein** ووجود صبغي فيلادلفيا باستخدام اختبار كاي مربع $X^2$

أظهرت نتائجنا إيجابية البروتين المندمج BCR-ABL protein لدى 16/21، وسلبية لدى 5/21 مريضاً محسوبة تبعاً للقيمة الحدية المعتبرة في الدراسة (18.88). وأوضحت السجلات الطّبيّة وجود صبغي فيلادلفيا لدى 15/21 مريضاً وغيابه لدى 6/21 مريضاً. وبعد تطبيق اختبار كاي مربع  $X^2$  الإحصائيّ تبين وجود ارتباطٍ ذي دلالةٍ إحصائيّةٍ بين النتائج الكيفية للبروتين BCR-ABL وإيجابية وسلبية صبغي فيلادلفيا [ $\chi^2(1, N=21)=16.41, p\text{-value}<0.05$ ].

9. دراسة الارتباط correlation بين مستويات البروتين المندمج BCR-ABL protein ومستويات صبغي فيلادلفيا باستخدام اختبار Spearman test

بلغ متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى المرضى الذين تحقق لديهم شرط توفّر نتيجة لصبغي فيلادلفيا 392.28، بينما بلغ متوسط نسبة الخلايا الحاملة لصبغي فيلادلفيا إلى الخلايا الطبيعية لديهم 55%. وعند تطبيق اختبار Spearman الإحصائي تبين وجود علاقة ارتباط إيجابية قوية ذات دلالة إحصائية بين مستويات MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein ومستويات صبغي فيلادلفيا (Spearman's rho=0.857, p-value<0.05).

10. مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفّر لديهم نتيجة t(9;22) mRNA تعكس استجابتهم الجزئية للمعالجة

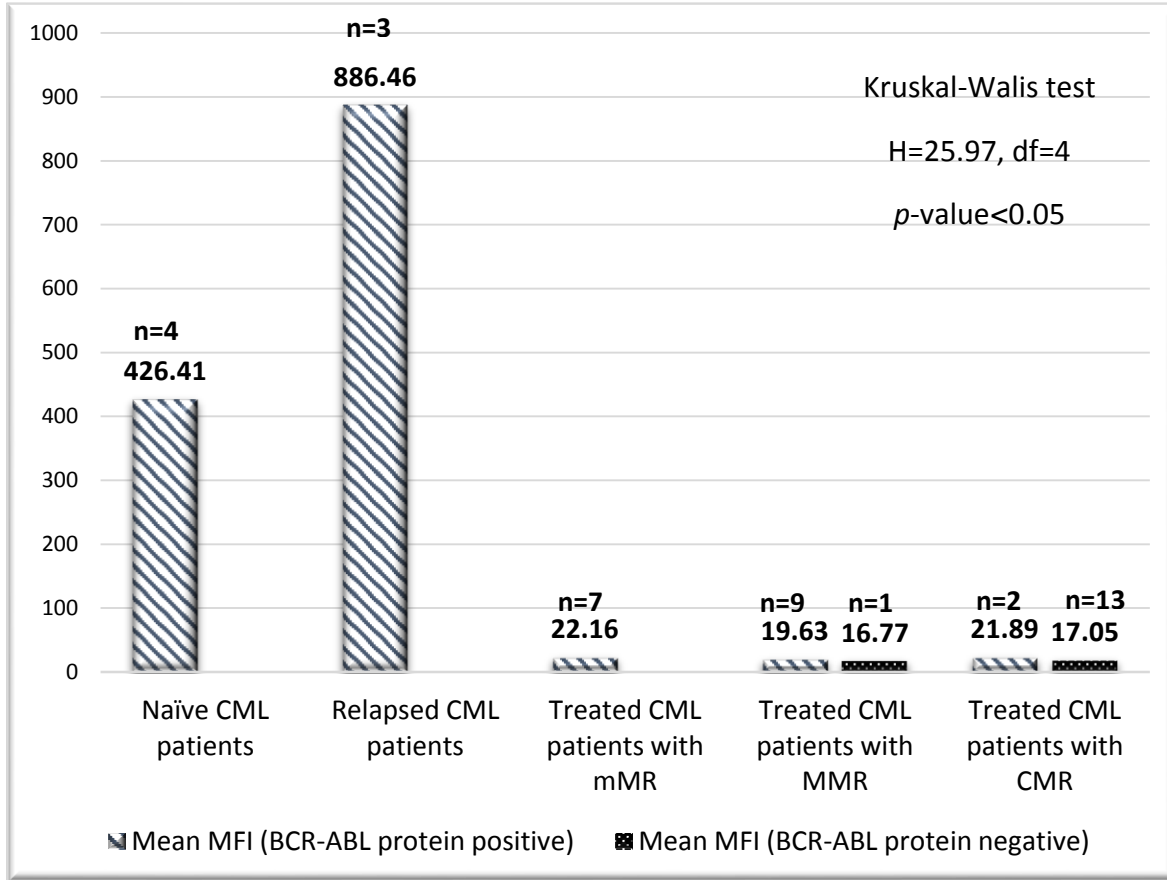
من أجل إجراء المقارنة بين فئة المرضى الذين لم يتلقوا المعالجة بمثبطات التيروسين كيناز بعد (naïve) (n=4)، وبين الفئات التي خضعت لهذه المعالجة (n=35) والمقسمة حسب الاستجابة إلى:

- استجابة جزئية تامة CMR (n=15)، كان منهم 13/15 مريضاً سلبي البروتين BCR-ABL protein (mMFI=17.05، تراوحت القيم بين 15.4-18.27)، و2/15 مريضاً إيجابي البروتين (mMFI=21.89، بقيمتي 20.91 و22.88).
- استجابة صبغية كبرى MMR (n=10)، كان منهم 9/10 مريضاً إيجابي البروتين BCR-ABL protein (mMFI=19.63، تراوحت القيم بين 18.97-20.86)، ومريضاً واحداً (1/15) سلبي البروتين (MFI=16.77).
- استجابة جزئية صغرى mMR (n=7)، كانوا جميعاً إيجابي البروتين BCR-ABL protein (mMFI=22.16، تراوحت القيم بين 19.47-31.62).



- نكس relapse (n=3)، أظهروا جميعاً إيجابية للبروتين BCR-ABL protein (mMFI=886.46، تراوحت القيم بين 53.76-1893.84).

وعند استخدام معادلة Kruskal-Walis الإحصائية تبين وجود اختلاف ذي دلالة إحصائية بين قيم MFI ما بين فئات المجموعات المصنفة حسب تباين استجابتها للعلاج (MMR، CMR، mMR، نكس)، والفئة التي لم تتلق العلاج بعد (naïve) (الشكل (19)، [H=25.97, df=4, p-value<0.05]).



الشكل (19): مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفّر لديهم نتيجة mRNA t(9;22) تعكس استجابتهم الجزيئية للمعالجة.

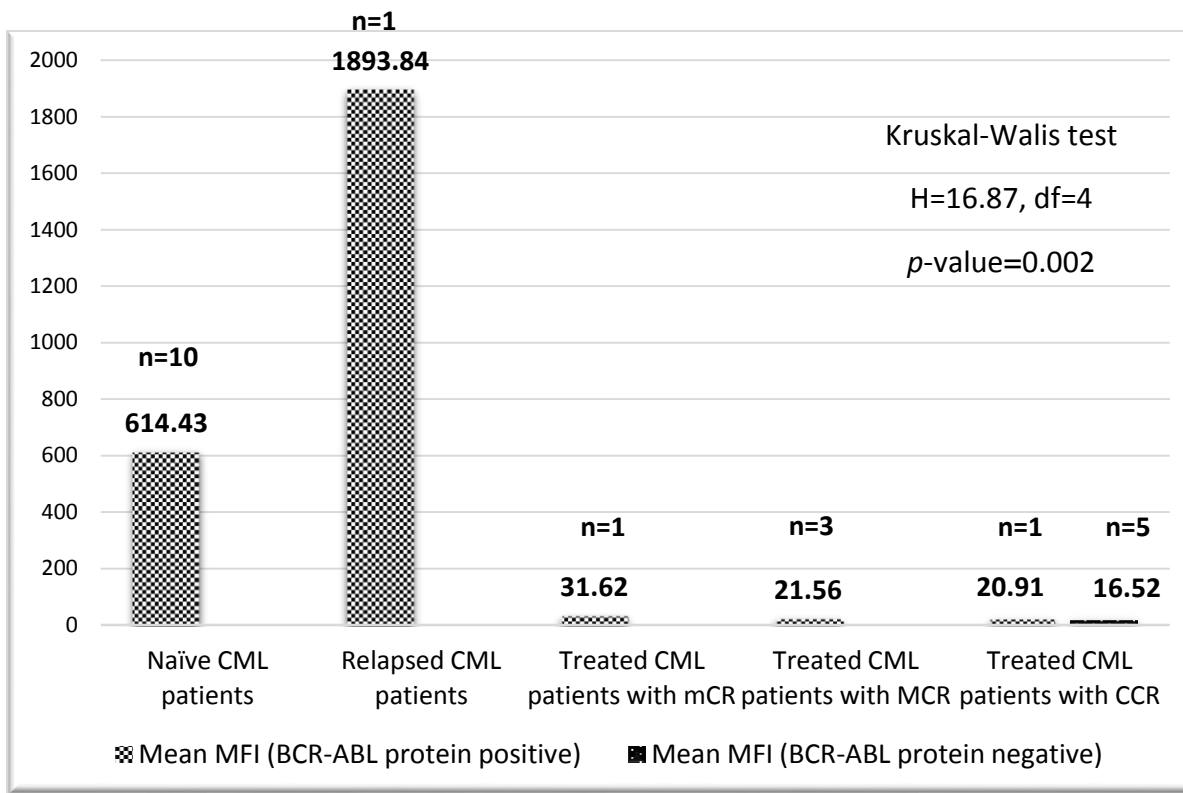
median fluorescence intensity : **MFI** ؛ chronic myeloid leukemia : **CML**  
 (استجابة جزيئية صغيرة) minor molecular response : **mMR**  
 (استجابة جزيئية كبرى) major molecular response : **MMR**  
 (استجابة جزيئية تامة) complete molecular response : **CMR**

**11. مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات المرضى الذين توفّر لديهم نتيجة لصبغي فيلادلفيا تعكس استجابتهم الصبغية للمعالجة**

لإجراء المقارنة بين فئة المرضى الذين لم يتلقوا المعالجة بمتبظات التيروزين كيناز بعد (naïve) (n=10)، وبين الفئات التي خضعت لهذه المعالجة (n=11) والمقسمة حسب الاستجابة إلى:

- استجابة صبغية تامة CCR (n=6)، كان منهم 5/6 مريضاً سلبيّ البروتين BCR-ABL protein (mMFI=16.52، تراوحت القيم بين 14.99-18.27)، و1/6 مريضاً إيجابياً البروتين (MFI=20.91).
- استجابة صبغية كبرى MCR (n=3)، كانوا جميعاً إيجابياً البروتين BCR-ABL protein (mMFI=21.56، تراوحت القيم بين 19.62-23.4).
- استجابة صبغية صغرى mCR لدى مريض واحد فقط، بلغت قيمة MFI لديه 31.62.
- نكس لدى مريض واحد فقط كانت قيمة MFI لديه 1893.84.

وبعد استخدام معادلة Kruskal-Walis الإحصائية تبين وجود اختلاف ذي دلالة إحصائية بين قيم MFI ما بين فئات المجموعات متباينة الاستجابة للعلاج (CCR، MCR، mCR، نكس)، وتلك التي لم تتلق العلاج بعد (naïve) [H=16.87, df=4, p-value=0.002]، الشكل (20).



الشكل (20): مقارنة متوسط قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بين مجموعات

المرضى الذين توفّر لديهم نتيجة لصبغي فيلادلفيا تعكس استجابتهم الصغية للمعالجة.

median fluorescence intensity : **MFI** ؛ chronic myeloid leukemia : **CML**

minor cytogenetic response : **mCR** (استجابة صغية صغرى)

major cytogenetic response : **MCR** (استجابة صغية كبرى)

complete cytogenetic response : **CCR** (استجابة صغية تامة)

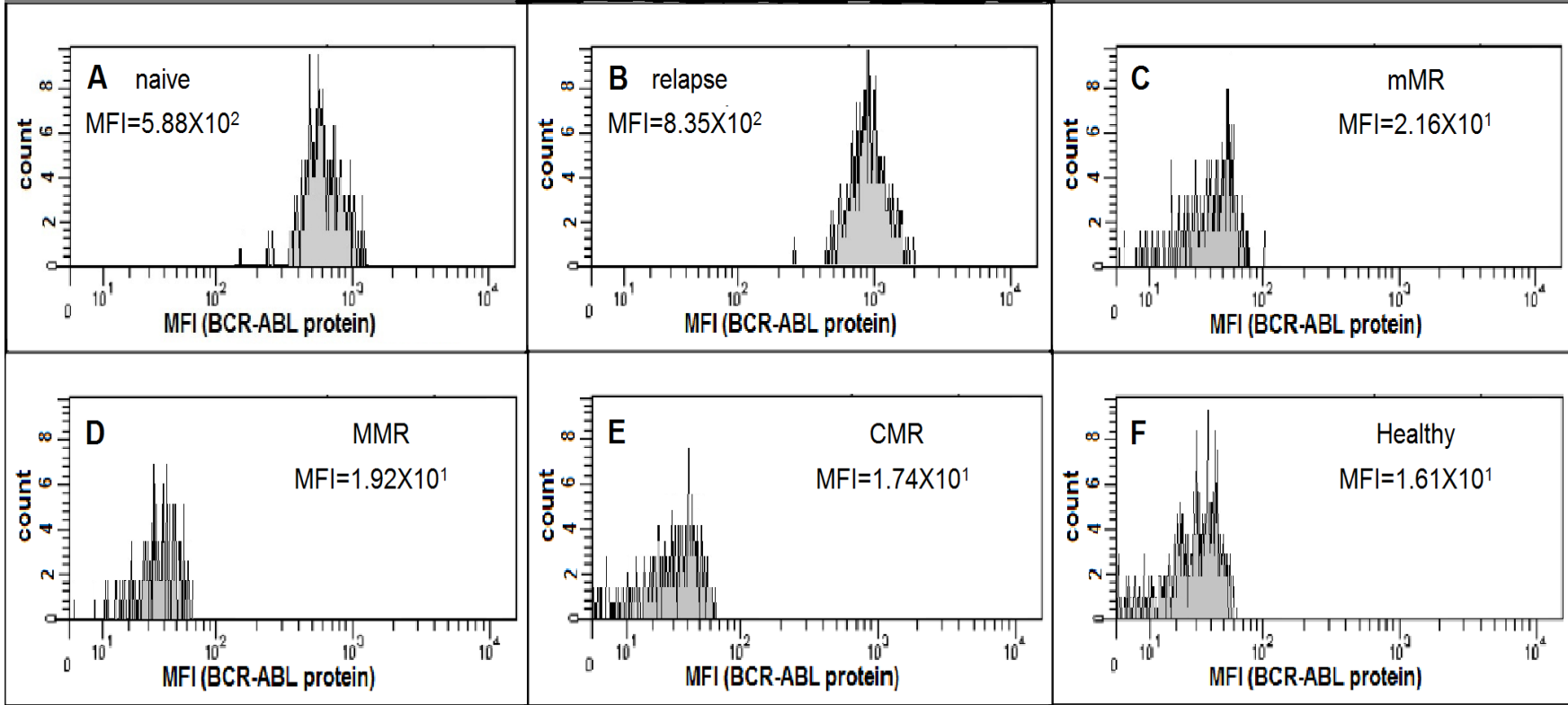
12. اختبار الخزرات المناعي لقياس البروتين المندمج BCR-ABL protein بتقنية

القياس الخلوي بالتدفق في مجموعات المرضى مختلفي الاستجابة الجزئية للمعالجة

يبين الشكل (21) أمثلة عن منسجات histograms ممثلة لقيم MFI لدى مرضى مختلفي

الاستجابة الجزئية بعد معالجتهم بمتبذات التيروزين كيناز، ومرض لم يتلق العلاج بعد، وفرداً

سليماً.



**الشكل (21):** منسجات اختبار الخزرات المناعي لقياس البروتين المندمج *BCR-ABL protein* ممثلة لقيم *MFI* لدى مرضى مختلفي الاستجابة الجزيئية بعد معالجتهم بمثبطات التيروسين كيناز، ومرض لم يتلقَ العلاج بعد، وفرداً سليماً.

**CML** : chronic myeloid leukemia (ابيضاض الدم النقوي المزمن)؛ **MFI** : متوسط شدة التألق median fluorescence intensity

**Naïve** : مريض لم يتلقَ العلاج بعد،  $MFI=588.21$ ؛

**mMR** : مريض ذو استجابة جزيئية صغيرة،  $MFI=21.67$ ؛

**CMR** : مريض ذو استجابة جزيئية تامة،  $MFI=17.40$ .

**Relapse** : مريض ناكس،  $MFI=835.36$ ؛

**MMR** : مريض ذو استجابة جزيئية كبرى،  $MFI=19.28$ ؛

**Healthy** : فرد سليم سلبي صبغي فيلادلفيا،  $MFI=16.11$ ؛

**13. توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein الموجود لدى أفراد  
الدراسة المعالجين بمثبطات التيروسين كيناز حسب استجابتهم الجزيئية t(9;22)  
mRNA والصبغية (صبغي فيلادلفيا) وغير المعالجين**

يوضح كل من الجدول (1) والجدول (2) خلاصة نتائج توزيع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى أفراد الدراسة المعالجين بمثبطات التيروسين كيناز حسب استجابتهم الجزيئية mRNA t(9;22)، والصبغية (صبغي فيلادلفيا)، وغير المعالجين.

**جدول (1):** توزُّع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بطريقة اختبار الخزرات المناعي لدى مرضى CML الذين لم يتلقوا العلاج بعد (naïve) (n=12)، حسب التشخيص الجزيئي (t(9;22)mRNA) أو الصبغي (صبغي فيلادلفيا).

		Molecular results			
		n (mean MFI; range)			
		t(9;22)mRNA (+)	t(9;22)mRNA (-)	t(9;22)mRNA (NA)	Total
Cytogenetic results n (mean MFI; range)	Ph (+)	2 (772.02; 45.11-1498.93)	0	8 (575.03; 24.47-1472.21)	10 (614.43; 24.47- 1498.93)
	Ph (-)	0	0	0	0
	Ph (NA)	2 (80.8; 74.99-86.6)	0	0	2 (80.8; 74.99-86.6)
	Total	4 (426.41; 45.11-1498.93)	0	8 (575.03; 24.47-1472.21)	12 (525.49; 24.47- 1498.93)

**CML:** chronic myeloid leukemia (ابيضاض الدم النقوي المزمن)

**MFI:** متوسط شدة التآلق median fluorescence intensity

**Ph:** صبغي فيلادلفيا Philadelphia chromosome

**(+):** الاختبار إيجابي؛ **(-):** الاختبار سلبي؛ **(NA):** نتيجة الاختبار غير متوفرة.

**جدول (2):** توزع قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein بطريقة اختبار الخزرات المناعي لدى مرضى CML\* (n=37) معالجين بمثبطات التيروسين كيناز حسب تباين استجاباتهم الجزيئية (t(9;22)mRNA) أو الصبغية (صبغي فيلادلفيا) للمعالجة.

		Molecular results					Total
		CMR	MMR	mMR	PCR (NA)	Relapse	
Cytogenetic results n (mean MFI; range)	CCR	4 (18.31; 16.92-20.91) <sup>a</sup>	0	0	2 (15.12; 14.99-15.26)	0	6 (17.25; 14.99-20.91)
	MCR	0	0	3 (21.56; 19.62-23.4)	0	0	3 (21.56; 19.62-23.4)
	mCR	0	0	1 (31.62)	0	0	1 (31.62)
	Ph (NA)	11 (17.47; 15.4-22.88) <sup>b</sup>	10 (19.34; 16.77-20.86) <sup>c</sup>	3 (19.61; 19.47-19.81)	0	2 (382.77; 53.76-711.78)	26 (46.54; 15.4-711.78)
	Relapse	0	0	0	0	1 (1893.84)	1 (1893.84)
	Total	15 (17.69; 15.4-22.88)	10 (19.34; 16.77-20.86)	7 (22.16; 19.47-31.62)	2 (15.12; 14.99-15.26)	3 (886.46; 53.76-1893.84)	37 (89.29; 14.99- 1893.84)

**CML**: chronic myeloid leukemia (ابيضاض الدم المقوي المزمن)

**Ph** : صبغي فيلادلفيا Philadelphia chromosome

**(+)** : الاختبار إيجابي؛ **(-)**: الاختبار سلبي؛ **(NA)**: نتيجة الاختبار غير معروفة

**MFI** : وسيط شدة التآلق median fluorescence intensity

**CCR**: استجابة صبغية تامة complete cytogenetic response ؛ **MCR**: استجابة صبغية كبرى major cytogenetic response

**mCR**: استجابة صبغية صغرى minor cytogenetic response

**CMR**: استجابة جزيئية تامة complete molecular response ؛ **MMR**: استجابة جزيئية كبرى major molecular response

**mMR**: استجابة جزيئية صغرى minor molecular response

**a** : نتيجة اختبار البروتين BCR-ABL protein لمريض واحد من أربعة مرضى إيجابية (MFI=20.91)

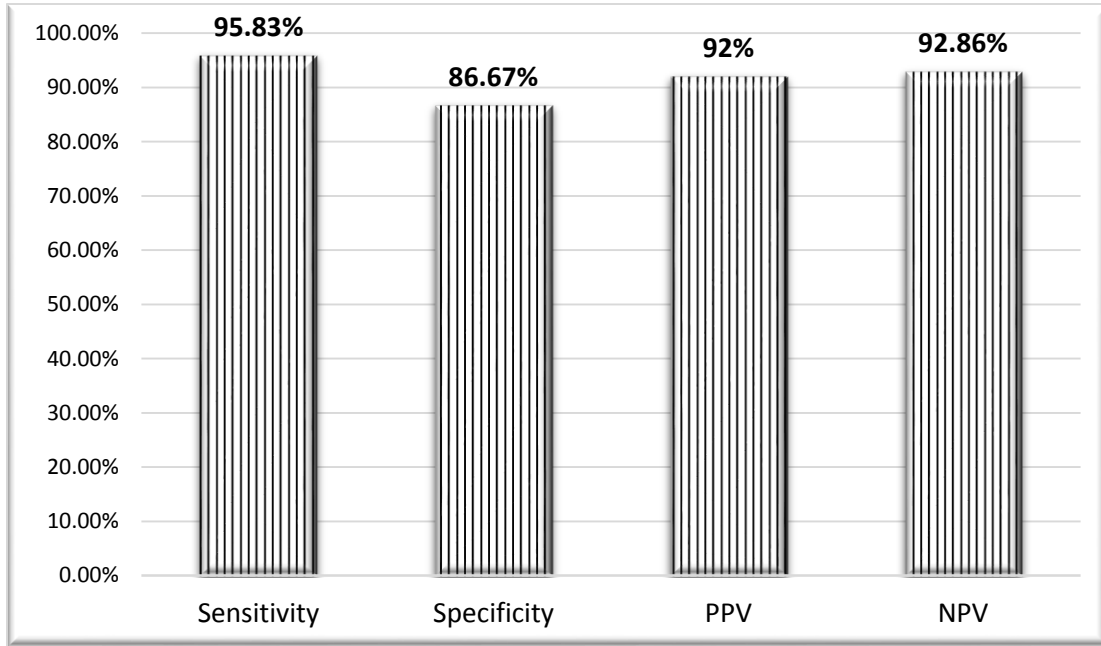
**b** : نتيجة اختبار البروتين BCR-ABL protein لمريض واحد من 11 مريضاً إيجابية (MFI=22.88)

**c** : نتيجة اختبار البروتين BCR-ABL protein لمريض واحد من عشرة مرضى سلبية (MFI=16.77)



14. مقاييس المضبوطية التشخيصية **Diagnostic accuracy measures** لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج **BCR-ABL protein** بتقنية القياس الخلوي بالتدفق مقارنة بنتائج الاختبارات الجزيئية **t(9;22) mRNA**

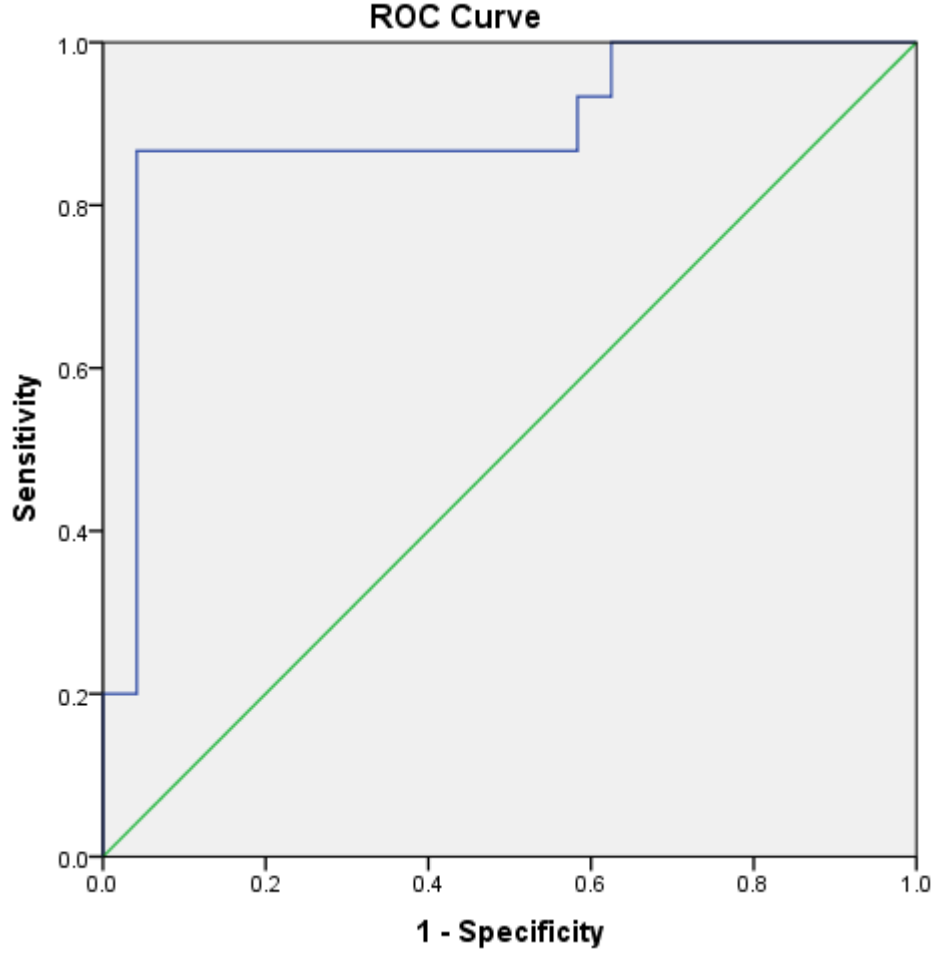
أظهر اختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج **BCR-ABL protein** حساسية 95.83% (95% ) وخصوصية 86.67% (95% CI: 59.54%-98.34%)، وذلك بعد مقارنتها مع التشخيص النهائي للمرض المعتمد على نتائج الاختبارات الجزيئية **t(9;22) mRNA**. وقد كانت القيمة التنبؤية الإيجابية **PPV** والقيمة التنبؤية السلبية **NPV** له 92.00% (95% CI: 73.97%-99.02%) و 92.86% (95% CI: 66.13%-99.82%)، على الترتيب، الشكل (21).



الشكل (21): مقاييس المضبوطية التشخيصية لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج **BCR-ABL protein** مقارنة بنتائج الاختبارات الجزيئية **t(9;22) mRNA**.

**Sensitivity** : الحساسية ؛ **specificity** : النوعية  
**PPV** : positive prediction value (القيمة التنبؤية الإيجابية)  
**NPV** : negative prediction value (القيمة التنبؤية السلبية).

رُسم منحنى ROC وقُدِّرت المساحة المحصورة تحته لتقدير القيمة التشخيصية لهذا الاختبار فكانت 0.892 (95% CI: 0.773-1.00,  $p$ -value<0.05)، الشكل (22).



**الشكل (22):** منحنى ROC لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein.

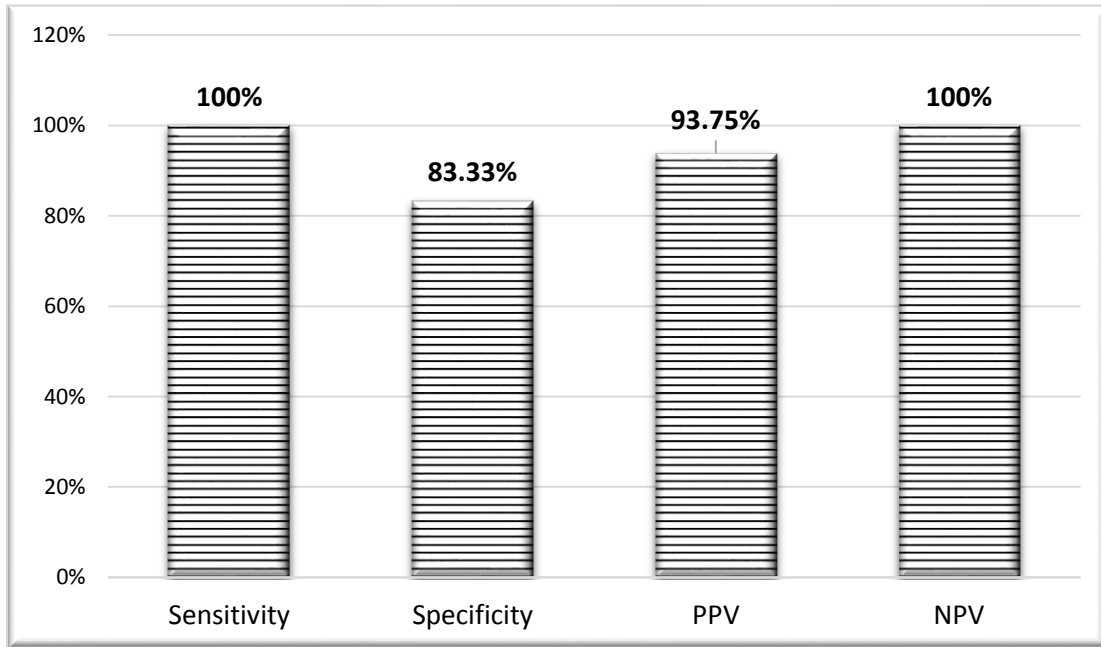
(sensitivity=0.95; specificity=0.86; AUC=0.892,  $p$ -value<0.05)

Receiver Operating Characteristics curve : **ROC curve**

Area Under the Curve : **AUC** (المساحة تحت المنحنى)

15. مقاييس المضبوطية التشخيصية **Diagnostic accuracy measures** لاختبار  
الخرزات المناعي للبروتين المندمج **BCR-ABL protein** بتقنية القياس الخلوي بالتدفق  
مقارنة بنتائج الاختبارات الصبغية (صبغي فيلادلفيا)

أظهر اختبار الخرزات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein حساسية 100% ( 95% )  
ونوعية 83.33% (CI: 78.20%-100%)، مقارنة بنتائج الاختبارات الصبغية الوراثية الخلوية. وقد  
مقارنتها مع التشخيص النهائي للمرض المعتمد على نتائج الاختبارات الصبغية الوراثية الخلوية. وقد  
كانت القيمة التنبؤية الإيجابية PPV والقيمة التنبؤية السلبية NPV له 93.75% ( 95% CI: )  
و 100% (69.77%-99.84%) و 100% (95% CI: 47.82%-100%)، على الترتيب، الشكل (23).



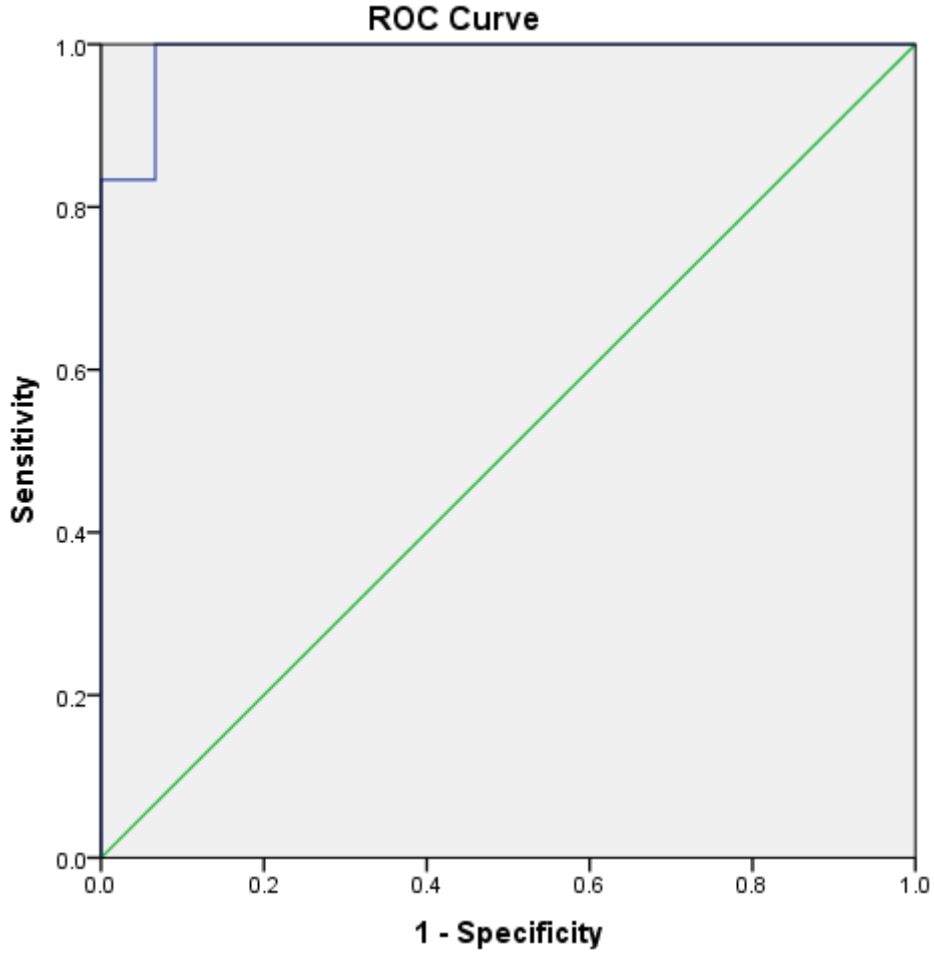
الشكل (23): مقاييس المضبوطية التشخيصية لاختبار الخرزات المناعي للبروتين المندمج BCR-  
ABL protein مقارنة بنتائج الاختبارات الصبغية.

**Sensitivity** : الحساسية ؛ **specificity** : النوعية

**PPV** : positive prediction value (القيمة التنبؤية الإيجابية)

**NPV** : negative prediction value (القيمة التنبؤية السلبية)

رُسم منحنى ROC وقُدِّرت المساحة المحصورة تحته لتقدير القيمة التشخيصية لهذا الاختبار فكانت 0.989 (95% CI: 0.954-1.00,  $p$ -value=0.001)، الشكل (24).



**الشكل (24):** منحنى ROC لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein.

(sensitivity=1.00; specificity=0.83; AUC=0.989,  $p$ -value=0.001)

Receiver Operating Characteristics curve : **ROC curve**

Area Under the Curve : **AUC** (المساحة تحت المنحنى)

المناقشة

Discussion

قمنا في دراستنا بتحري البروتين المندمج BCR-ABL protein باستخدام طريقة تحريره من الكريات البيضاء WBC لدى عددٍ من مرضى CML وعددٍ من الأفراد الأصحاء، فحصلنا على نتائج قاصرة عن استعراف الأفراد إيجابيي صبغي فيلادلفيا من السلبيين منهم، بخلاف ما توصلنا إليه عند تحريره في خلايا الدّم المحيطيّ وحيدة النوى PBMCs، وهذا قد يعزى إلى وجود المحبّبات عند اتباع طريقة تحرير البروتين من الكريات البيضاء WBC، والتي تحوي كمّيات كبيرة من البروتينات التي تتحرّر من اليحلولات (الجسيمات الحالة) lysosomes الموجودة في جدار الخلية، مؤدية إلى تدرك البروتين المندمج عند تحرّره منها، وهو ما قد يُفسّر قيم MFI المنخفضة التي حصلنا عليها في العينات إيجابية صبغي فيلادلفيا، وهذا ما أكّدته لنا أيضاً مراسلاتنا مع الشركة الصانعة للعنيدة.

أظهرت نتائجنا أن قيم MFI للبروتين المندمج BCR-ABL protein لدى مجموعة مرضى CML الذين لم يتلقوا المعالجة بعد naïve قد توزّعت على مجال واسع، على عكس توزّع هذه القيم لدى مجموعة الأفراد الأصحاء سلبيي صبغي فيلادلفيا، حيث انحصرت هذه القيم في مجال ضيقٍ محدّد. وحيث أن مستويات البروتين المندمج متفاوتة تمثّل تبايناً في التّعبير عن الجين *BCR-ABL gene*، وتزداد في الخلايا الابيضاضية البدائية primitive السليفة progenitors مقارنة بالخلايا الأكثر نضجاً (61)، لذا قد يمكن اعتبارها مؤشراً للحمل السرطاني tumor load، وهذا ما أشارت إليه الدراسات الأخرى (62، 63).

قيّمنا في هذه الدراسة اختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein باستخدام تقنية التدفق الخلوي، وذلك بالمقارنة مع الاختبارات الجزيئية t(9;22) mRNA واختبار الصبغيات (صبغي فيلادلفيا)، وقد وجدنا أنّ هذا الاختبار يملك إمكانيّة التمييز الكيفي والكمّي للزبغ abberation الصبغي BCR-ABL، فهو قادرٌ على تشخيص وجود الإزفاء المتوازن بين الصبغين التاسع والثاني والعشرين t(9;22) بالإضافة إلى تمييز تباين مستوياته. لقد تمّ الوصول إلى مثل هذه النتائج في دراساتٍ سابقةٍ تضمّنت مجموعات دراسة غير متجانسة تضمّ مرضى ابيضاضات مختلفة مستبعدة مجموعة المرضى غير المعالجين بمتبّطات التيروزين كيناز (16، 63-65)، أما دراستنا (66) فقد شملت إضافة إلى المرضى غير المعالجين، مرضى خاضعين للمعالجة ذوي مستويات استجابة صبغية أو

جزئية مختلفة ، وكانت نتائجنا منسجمة مع ما بيّنه Lucas وزملاؤه عام 2011 (67)، و Recchia وزملائها عام 2015 (68).

توافق اختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein تحليلياً مع كل من اختباري اكتشاف t(9;22) mRNA بالطرق الجزئية الخلوية، وصبغي فيلادلفيا باستخدام الطرق الوراثة الخلوية، ولم يظهر أي اختلاف بين الطرق سوى في 49/3 حالة؛ تم الوصول في حالتين منها إلى استجابة جزئية و/أو صبغية تامة، بينما كان البروتين المندمج BCR-ABL protein فيهما إيجابياً، وقد يُفسّر ذلك بكون هذا البروتين في طريقه إلى التدرّك في هاتين الحالتين، حيث أن مستويات MFI المنخفضة نسبياً التي أظهرتها نتائجنا تدل على ذلك. أمّا الحالة الثالثة فقد كانت لمريض ذو استجابة جزئية كبرى MMR في حينه، بينما كان البروتين المندمج BCR-ABL protein لديه سلبياً، علماً بأن هذا المريض كان قد أبدى سابقاً استجابة جزئية تامة CMR، وهذا قد يُعزى - كما صرّح المريض - إلى عدم تمكّنه من الحصول على العلاج، ونعتقد أنه في فترة الانتقال من الحالة CMR إلى الحالة MMR كان البروتين تحت الاضطراع في الجسم بعد انتساخ mRNA، لذلك لم نتمكن من كشفه في الدم.

كانت مقاييس المضبوطة التشخيصية لاختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein مقارنة بكل من اختباري اكتشاف t(9;22) mRNA بالطرق البيولوجية الجزئية واكتشاف صبغي فيلادلفيا بالطرق الوراثة الخلوية مرتفعة نسبياً، وكانت النتائج الإيجابية والسلبية الكاذبة في اختبارنا محصورةً فقط في حالات المرض المتبقي الأصغري minimal (MRD) residual disease، حيث تم الوصول إلى الاستجابة الجزئية التامة CMR، وفيما عدا هذه الحالات فقد وجد توافق تام بين نتائج اختبارنا ونتائج الاختبارات البيولوجية الجزئية و/أو الوراثة الخلوية، وهذا ما يتوافق مع الدراسات الأخرى (16، 63-65، 67).

يشير منحنى الـ ROC لاختبار القيمة التشخيصية لاختبارنا تجاه كل من اختباري اكتشاف t(9;22) mRNA بالطرق البيولوجية الجزئية واكتشاف صبغي فيلادلفيا بالطرق الوراثة الخلوية، إلى أنه يمكن اعتبار اختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein بتقنية التدفق الخلوي اختباراً

تشخيصياً ممتازاً، وهذا ما تدل عليه القيم المرتفعة للمساحة تحت المنحنى AUC سواء عند مقارنته بنتائج الاختبارات الصبغية (0.989)، أو بنتائج الاختبارات الجزيئية (0.892).

على الرغم من الموثوقية العالية لاختبار التّئميط النّوويّ karyotype كطريقةٍ معياريةٍ لتشخيص مرضى CML ومراقبة العلاج لديهم، إلا أنّه اختبار باضع يُجرى على عينة نقي عظم تسبّب إزعاجاً وألماً للمريض عند الحصول عليها، كما أنه يستغرق وقتاً طويلاً (1-2 أسبوع وسطياً)، ويحتاج لإنجازه ذوي خبرةٍ تقنيةٍ عاليةٍ تمكّنهم من تصنيف الصّبغيات ومعرفة شذوذاتها (11، 62، 69)، إضافةً إلى احتمال ضرورة الحصول على عينة نقي عظم أخرى عند فشل الزرع الخلوي أثناء إجراء هذا الاختبار. ومما يجدر ذكره أن طريقتنا قد أعطت معلوماتٍ مختلفةٍ إضافيةٍ عن تلك التي قدّمتها الطرق الأخرى، الصبغية التي تعتمد على المستوى الوراثي الخلوي، أو البيولوجية الجزيئية التي تعتمد على المستوى الجيني، كونها كشفت البروتين المندمج BCR-ABL protein، الذي يعتبر مسؤولاً عن النّمط الظاهريّ للمرض، ومعياراً لنشاطه.

إضافةً إلى أنها قد أُجريت عينة دمٍ محيطي، وأنجزت خلال مدّةٍ لم تتجاوز الأربع ساعاتٍ، بأسلوبٍ سهلٍ غير معقّدٍ.



## الاستنتاجات

## Conclusions

أظهرت نتائجنا أنه يمكن اعتماد مقايسة البروتين المندمج BCR-ABL protein نصف الكمية كطريقة واعدة سريعة سهلة وموثوقة لتشخيص ومراقبة الزيج المتمثل بوجود صبغي فيلادلفيا (Ph) عند مرضى الابيضاض النقوي المزمن CML بعد المعالجة.

لكنها كانت ضعيفة القدرة على مراقبة تقدّم progression المرض واستجابته للمعالجة في ثلاث من حالات من المرض المتبقي الأصغري (MRD) minimal residual disease.

## التوصيات والمقترحات

## Recommendations & Sugessions

- ننصح باستخدام اختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein كاختبار تشخيصي diagnostic test لدى المرضى الذين يُشتبه بإصابتهم بالابيضاض النقوي المزمن CML.
- وننصح باستخدام الفيكول لإجراء اختبار الخزرات المناعي للبروتين المندمج BCR-ABL protein في خلايا الدم المحيطي وحيدة النوى PBMCs لتلافي تأثير البروتيناز المتحرر من المحبيبات والمدرك لهذا البروتين، أو إضافة كميات أكبر من مثبطات البروتيناز عند تطبيق هذا مقاسة البروتين بعد تحريره من الكريات البيضاء WBCs.
- وننصح باللجوء إلى الاختبارات المعتمدة [t(9;22) mRNA] لمراقبة مرضى الابيضاض النقوي المزمن CML الذين وصلوا إلى مرحلة المرض المتبقي الأصغري (MRD) minimal residual disease.

الخلاصة

Summery

## الملخص باللغة العربية

**المقدمة النظرية:** يترافق الابيضاض النقوي المزمن CML نموذجياً مع صبغي فيلادلفيا، وهو ما يؤدي إلى إنتاج البروتين المندمج الورمي BCR-ABL fusion oncoprotein، والذي يملك نشاط تيروزين كيناز متزايد.

**هدف البحث:** البحث عن طريقة لكشف ومعايرة البروتين الورمي BCR-ABL oncoprotein لدى مرضى الابيضاض النقوي المزمن CML، بطريقة موثوقة وسهلة، وعن علاقة ممكنة بين كميات هذا البروتين المندمج وتطور المرض، وشدته، ومدى استجابة المرضى للعلاج، وذلك بمقايسة هذا البروتين المندمج مقايسةً نصف كميةً باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق.

**المواد والطرق:** تضمّنت الدراسة 49 مريضاً يعانون من الابيضاض النقوي المزمن CML ممّن أرسلوا إلى قسم المخبر في مستشفى الأسد الجامعي بدمشق، وذلك لاكتشاف t(9;22) detect mRNA لديهم باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي بالانتساح العكسي qRT-PCR و/أو اكتشاف صبغي فيلادلفيا باستخدام التحاليل الصبغية (الوراثية الخلوية) cytogenetic analysis، يشملون مرضى غير معالجين وآخرين تتم معالجتهم بمثبطات التيروسين كيناز tyrosine kinase inhibitors (TKIs) وبدرجات مختلفة من الاستجابة. كما شملت الدراسة 20 فرداً سليماً سلبياً صبغي فيلادلفيا للحصول على شواهد سلبية تحليلية. جمعت عينات دم محيطي من جميع الأفراد المشاركين واختبر البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق.

**النتائج:** استطاع اختبار البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein بالقياس الخلوي بالتدفق تشخيص وجود شذوذ صبغي فيلادلفيا ( $p\text{-value} > 0.0001$ ) وتمييز مستوياته ( $p\text{-value} = 0$ ) بكفاءة. كما كان قادراً على تمييز مجموعة المرضى غير المعالجين عن المرضى المعالجين، وتصنيف درجة الاستجابة للمعالجة بمثبطات التيروسين كيناز ( $p\text{-value} > 0.01$ ). وقد أظهر قيمة تشخيصية معتبرة ( $AUC=0.892, 0,989$ )؛

على التوالي. ( $p$ -value<0.05) تجاه كل من الاختبارين: t(9;22)mRNA و الاختبار الوراثي الخلوي (Ph)،

**الاستنتاجات:** يمكن استخدام اختبار البروتين المندمج BCR-ABL fusion protein في تشخيص ومراقبة شذوذ صبغي فيلادلفيا.

**Running title:** البروتين المندمج BCR-ABL عند مرضى CML.

**الكلمات المفتاحية:** صبغي فيلادلفيا، البروتين المندمج BCR-ABL، القياس الخلوي بالتدفق، الابيضاض النقوي المزمن، مثبطات النيروزين كيناز

## **Abstract**

**Introduction:** Chronic Myeloid Leukemia (CML) is typically associated with the Philadelphia chromosome, resulting in the production of BCR-ABL fusion oncoprotein with upregulated tyrosine kinase activity. We aimed to evaluate a new flow cytometric immunobead assay to detect BCR-ABL protein in a group of CML patients.

**Methods:** We enrolled 49 CML patients, whose qRT-PCR and/or cytogenetic analysis of Philadelphia chromosome aberration was available, including tyrosine kinase inhibitors (TKIs)-naïve and -treated patients with various levels of response. Twenty Philadelphia-negative healthy individuals were also enrolled to obtain analytical negative controls. Peripheral blood samples were analyzed for BCR-ABL fusion protein by flow cytometry.

**Results:** The BCR-ABL fusion protein flow cytometric assay seemed efficacious to both diagnose the presence ( $p$ -value  $<0.0001$ ) and distinguish the levels ( $p$ -value=0) of the Philadelphia chromosome aberration. Groups of TKI-naïve and -treated patients as well as levels of molecular/cytogenetic response to TKI-therapy were effectively discriminated ( $p$ -value  $<0.01$ ). The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis indicated the diagnostic value of the assay as excellent (AUC=0.892, 0,989,  $p$ -value $<0$ ) against t(9;22) mRNA and cytogenetics tests, respectively.

**Conclusions:** The evaluated BCR-ABL fusion protein assay might be useful for diagnosing and monitoring Philadelphia chromosome aberration.

**Running title:** BCR-ABL Protein in CML Patients.

**Keywords:** Philadelphia chromosome, BCR-ABL fusion protein, flow cytometry, chronic myeloid leukemia, Tyrosine kinase inhibitors

## المراجع

## References

1. Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M, Thiele J. Chronic myelogenous leukaemia, BCR-ABL1 positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008. p. 32-7.
2. Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists. 2007;64(24 Suppl 15):S4-9.
3. Wang L, Pearson K, Pillitteri L, Ferguson JE, Clark RE. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. British journal of haematology. 2002;118(3):771-7.
4. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 1999;341(3):164-72.
5. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 1999;340(17):1330-40.
6. Vardiman JW. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. American journal of clinical pathology. 2009;132(2):250-60.
7. Randolph TR. Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology. 2005;18(1):38-48.
8. Chávez-González A, Avilés-Vázquez S, Moreno-Lorenzana D, Mayani H. Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. In: Alimoghaddam PK, editor. Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases: InTech; 2013. p. 137-64.
9. Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012;18(4):793-802.
10. Eiring AM, Khorashad JS, Morley K, Deininger MW. Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. BMC medicine. 2011;9:99.
11. Dekking E, van der Velden VH, Bottcher S, Bruggemann M, Sonneveld E, Koning-Goedheer A, et al. Detection of fusion genes at the protein level in leukemia patients via the flow cytometric immunobead assay. Best practice & research Clinical haematology. 2010;23(3):333-45.
12. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 2006;355(23):2408-17.
13. Dasgupta S, Mukhopadhyay A, Mukhopadhyay S. An accurate and rapid flow cytometric diagnosis of BCR ABL fusion protein an alternative way to detect the different phases of chronic

myeloid leukemia. International journal of advanced scientific and technical research. 2013;3(3):195-207.

14. Jilani I, Kantarjian H, Faraji H, Gorre M, Cortes J, Ottmann O, et al. An immunological method for the detection of BCR-ABL fusion protein and monitoring its activation. *Leukemia research*. 2008;32(6):936-43.

15. Hamilton A, Elrick L, Myssina S, Copland M, Jorgensen H, Melo JV, et al. BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CrkL phosphorylation status using flow cytometry. *Leukemia*. 2006;20(6):1035-9.

16. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, van der Velden VH, Wai H, Bottcher S, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*. 2009;23(6):1106-17.

17. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.

18. Dikshit RP, Nagrani R, Yeole B, Koyande S, Banawali S. Changing trends of chronic myeloid leukemia in greater Mumbai, India over a period of 30 years. *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*. 2011;32(2):96-100.

19. Goldman J. Chronic myeloid leukaemia. In: Provan D, editor. *ABC of clinical haematology* 2ed Edition ed: BMJ Books; 2003. p. 19-22.

20. Berger U, Engelich G, Maywald O, Pfirrmann M, Hochhaus A, Reiter A, et al. Chronic myeloid leukemia in the elderly: long-term results from randomized trials with interferon alpha. *Leukemia*. 2003;17(9):1820-6.

21. Dutta AK. Study of Imatinib Mesylate Treated Patients sufferening from Chronic Myeloid Leukemia2012.

22. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103.22-4010:(11)

23. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *The New England journal of medicine*. 2003;349(15):1451-64.

24. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *American journal of blood research*. 2013;3(3):191-200.

25. Vignetti M, Fazi P, Cimino G, Martinelli G, Di Raimondo F, Ferrara F, et al. Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) LAL0201-B protocol. *Blood*. 2007;109(9):3676-8.

26. Frazer R ,Irvine AE, McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *The Ulster medical journal*. 2007;76(1):8-17.

27. Shaul Y, Ben-Yehoyada M. Role of c-Abl in the DNA damage stress response. *Cell research*. 2005;15(1):33-5.

28. Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretzschmar J, Dorey K, Kuriyan J, et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*. 2003;112(6):845-57.

29. Wei y. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. Göteborg, Sweden: Göteborg University; 2007.

30. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*. 2002;16(8):1402-11.



31. Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;94(1):319-25.
32. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18(2):189-218.
33. Heidel FH, Mar BG, Armstrong SA. Self-renewal related signaling in myeloid leukemia stem cells. *International journal of hematology*. 2011;94(2):109-17.
34. Jabbour EJ, Hughes TP, Cortes JE, Kantarjian HM, Hochhaus A. Potential mechanisms of disease progression and management of advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(7):1451-62.
35. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Annals of hematology*. 2015;94 Suppl 2:S141-7.
36. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
37. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-84.
38. Shubeilat T, Oudat R, Fares AK. Immunophenotypic characteristics of the blast crisis in chronic myelogenous leukemia: Experience at princess Iman research and laboratory sciences center. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2006;13(1):5-8.
39. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-67.
40. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997;90(8):2863-92.
41. Mark HF, Sokolic RA, Mark Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Experimental and molecular pathology*. 2006;81(1.7-1):
42. Brazier RM, Shipp MA, Feldman AL, Espina V, Winters M, Jaffe ES, et al. Molecular diagnostics. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2003:279-93.
43. Ried T. Cytogenetics--in color and digitized. *The New England journal of medicine*. 2004;350(16):1597-600.
44. Deininger MW. Management of early stage disease. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2005:174-82.
45. Lowenberg B. Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(15):1399-401.
46. Otazu IB, Zalcborg I, Tabak DG, Dobbin J, Seunemann HN. Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders. *Leukemia & lymphoma*. 2000;37(1-2):205-11.

47. Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: Seeking a cure. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2007;64(24 Suppl 15):S9-15.
48. Garcia-Manero G, Talpaz M, Kantarjian HM. Current therapy of chronic myelogenous leukemia. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2002;41(4):254-64.
49. Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001;98(10):3074-81.
50. Gora-Tybor J, Robak T. Targeted drugs in chronic myeloid leukemia. *Current medicinal chemistry*. 2008;15(29):3036-51.
51. Martinelli G, Iacobucci I, Rosti G, Pane F, Amabile M, Castagnetti F, et al. Prediction of response to imatinib by prospective quantitation of BCR-ABL transcript in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2006;17(3):495-502.
52. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Jr., Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leukemia research*. 2010;34(10):1255-68.
53. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *The New England journal of medicine*. 2002;346(9):683-93.
54. Shah NP. Loss of response to imatinib :mechanisms and management. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2005:183-7.
55. Mughal A, Aslam HM, Khan AM, Saleem S, Umah R, Saleem M. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors- current status. *Infectious agents and cancer*. 2013;8(1):23.
56. Ramirez P, DiPersio JF. Therapy options in imatinib failures. *The oncologist*. 2008;13(4):424-34.
57. Baccarani M, Pileri S, Steegmann JL, Muller M, Soverini S, Dreyling M. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 7:vii72-7.
58. Brown M, Wittwer C. *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. Clinical Chemistry*. 2000;46(8):1221-9.
59. Rahman M. Principles of Flow Cytometer. In: Rahman M, editor. *Introduction to Flow cytometry: Serotec Ltd; 2006*. p. 4-8.
60. BD Biosciences. BCR-ABL Protein Kit. In: BD Biosciences, editor.: BD; 2008. p. 1-13.
61. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, Baird JW, Allan EK, Jordanides N, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006;107(11):4532-9.
62. Raponi S, De Propriis MS, Wai H, Intoppa S, Elia L, Diverio D, et al. An accurate and rapid flow cytometric diagnosis of BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2009;94(12):1767-70.
63. Heiba N. Rapid Detection of Bcr-Abl Fusion Proteins by Immunobead Assay Flow Cytometry in Leukemia Patients. *Life Science Journal*. 2012;9(4):197-203.

64. Hevessy Z, Hudak R, Kiss-Sziraki V, Antal-Szalmas P, Udvardy M, Rejto L, et al. Laboratory evaluation of a flow cytometric BCR-ABL immunobead assay. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2012;50(4):689-92.
65. Yujie W, Yu Z, Sixuan Q, Li W, Peng L, Zeng G, et al. Detection of BCR-ABL fusion proteins in patients with leukemia using a cytometric bead array. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(3):451-5.
66. Kelani R, Monem F. Reconsideration of BCR-ABL protein flow cytometric immunobead assay: how potent to diagnose and monitor chronic myeloid leukemia? *International journal of laboratory hematology*. 2015.
67. Lucas CM, Fagan JL, Carter A, Swale B, Evans C, Clark RE, et al. Rapid diagnosis of chronic myeloid leukemia by flow cytometric detection of BCR-ABL1 protein. *Haematologica*. 2011;96(7):1077-8.
68. Recchia AG, Caruso N, Bossio S, Pellicano M, De Stefano L, Franzese S, et al. Flow Cytometric Immunobead Assay for Detection of BCR-ABL1 Fusion Proteins in Chronic Myeloid Leukemia: Comparison with FISH and PCR Techniques. *PloS one*. 2015;10(6):e0130360.
69. Grigoriou EE, Psarra KK, Garofalaki MK, Tziotziou EC, Papasteriades CA. BCR-ABL fusion protein detection in peripheral blood and bone marrow samples of adult precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia patients using the flow cytometric immunobead assay. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2012;50(9):1657-63.

### :Websites المواقع الالكترونية

70. <http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n10/images/nrd2324-f2.jpg>
71. [http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/micro161/antigen-antibody\\_reactions/Chap5\\_Ag\\_Ab\\_reactions\\_files/image007.gif](http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/micro161/antigen-antibody_reactions/Chap5_Ag_Ab_reactions_files/image007.gif)
72. [http://flowcytometry.med.ualberta.ca/wp-content/uploads/2015/03/flow-cytometry\\_5001.jpg](http://flowcytometry.med.ualberta.ca/wp-content/uploads/2015/03/flow-cytometry_5001.jpg)
73. [http://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)
74. <http://www.bio-equip.com/img2014/3291363.jpg>

## جدول المصطلحات

Aberration زيغ

Abnormal شاذ، غير سوي

Accelerated اشتدادي

Accuracy مضبوطية

Activity نشاط

Acute myeloblastic leukemia

ابيضاض الدم النقوي الحاد

Adhesion التصاق

Advantages ميزات

Alternative بديل

Analyte حليلة (حلائل)

Antiviral مضاد الفيروسات

Array مصفوفة، منظومة

Assessment تقييم، تقدير

Automated cell counter عدّاد إلكتروني

للخلايا

Basophils الأسّسات

Biologic بيولوجي، حيوي

Blast أرومة (أرومات)

Abnormality شذوذ

Accidental عارض

Activated مُنشّط، مُفَعّل

Acute lymphoblastic leukemia

ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد

Adapter ملئم

Adjacent مجاور، ملاصق

Allogeneic خيفي

Analysis تحليل

Anorexia فقد شهية

Apoptosis استماتة

Assay مقايسة

Asymptomatic لا عرضي

Basophilia كثرة الأسّسات

Bead خرزة (خرزات)

Biphenotypic ثنائي النمط الظاهري

Blocking حصر

Burden عبء	Capacities سعة
Capture التقاط	Categories فئات
Centrifugation تنبيذ	Centrifuge منبذة
Centromere القسم المركزي	Chain reaction تفاعل سلسلي
Characteristics خصائص، صفات	Chemotherapy معالجة كيميائية
Well-being العافية	Chimeric (مختلف المنشأ الوراثي) خيمر
Chromosome صبغي	Clinical سريري
clonal evolution تطور نسيلي	Clone نسيلة
Clone نسيلة (نائل)	Cluster عنقود
Coated مغللة	coiled-coil motif الشكل الحلزوني المحلزن
Complementary متمم	Complete تام
Conclusive diagnosis تشخيص جازم	Conjugated مقترن
conserved محفوظ، مصان	Constitute يشكل
Constitutive بنيوي	Control شاهد
Core لب	Coupling تقارن
Crisis نوبة (نوب)	Criteria معايير
C-terminal النهاية الكربونية	Curative شافٍ، علاجي
Cytochemistry الكيمياء الخلوية	Cytogenetic map خريطة الصبغيات
Cytogenetics الوراثة الخلوية	Cytometry عد الكريات
Defect عيب (عيوب)	Deletion خبن
Denatured متمسخ	De-regulation إزالة القيود
Deregulation إلغاء القوانين التنظيمية	Detect يكتشف
Detection اكتشاف	Detector مكشاف
Determine يقرر	Diagnosis تشخيص

Diagnostic accuracy measures	مقاييس	Differential count	عد تفريقي
	مضبوطية التشخيص		
Diffuse lymphoma	لمفومة منتشرة	dimer	مثنوي، ديمر
Disadvantages	مساوئ	Discontinue	وقف
Discrimination	تمييز	Diseases	أمراض
Disruption	انفتاح، تمزيق	Diverse	متنوعة
Domains	ميدان	Dormant	هاجع
Downstream	لاحق	Edema	وذمة (وذمات)
Effector	مستفعل	Emission	إصدار
Encode	يرمز، يشفر	Eosinophilia	كثرة اليوزينيات
Eosinophils	اليوزينات	Epidemiology	الوبائيات
Erythroblastic	متعلق بأرومة الحمراء	Erythroid	سلسلة الكريات الحمر
Etiologic factor	عامل سببي	Etiology	السببيات، علم الأسباب
Evolving	يتطور إلى	Exchange	تبادل
Extramedullary	خارج النخاع	Fatality	إماتة
Fatigue	تعب	Feasible	ممکن، مجدٍ
Features	معالم، سمات، ملامح	Findings	موجودات، نتائج
Fluorescence	تألق	Functional	وظيفي
Fused	مندمج	G-banding	الاستشراف G
Generate	يولد	Genetic	جيني، وراثي
Giemsa banding	استشراف بالغيمزا	Glycoprotein	بروتين سكري
Governing	المنظمة لـ	Granulocytic	محببات
Hallmark	سمة مميزة	Hematologists	اختصاصي الدمويات
Hematopoiesis	تكون الدم	Homology	تنادد، تماثل

Hybridization	تهجين	Hypercellular	مفرط الخلوية
Identify	يتعرف على، يستعرف	Immature	غير ناضج
Immunological	مناعي	Immunophenotype	النمط الظاهري المناعي
<i>in vivo</i>	في الأحياء	Incidence	ورود، وقوع
Incubate	يحضن	Indistinct	غير واضح
Indolent	بطيء التنامي	Induce	يُحدث، يحرض
Infiltrates	رشيحة (رشائح)	Inhibition	تثبيط
Initiate	يبتدئ	Intensity	شدة
Interactions	تأثر	Interfere	يتداخل
Interphase	الطور البيني	Intracellular	داخل الخلايا
Invasive	باضع	Ionizing radiation	إشعاع مؤين
Isochromosome	صبغي متساوي الأذرع (أي صبغي متساوي الأذرع)	Isolate	يعزل
	فقدان أحد الذراعين وتضاعف الذراع الثاني الذي يكتب اسمه في الرمز)		
Juxtaposed	تجاور	Karyotyping	تتميط نووي
Labeled	موسوم	Landmark	معلم
Leukemic	ابيضاضي	Leukemogenic	محدث الابيضاض
Leukocytosis	كثرة الكريات البيض	Lineage	سلالة
Link	رابط	Localization	توضُّع
Major	كبرى	Manifest	يتظاهر
Marker	واسمة (واسمات)	Masked	مقنع
Match	توافق	Matched	موافق
Maturation	نضج	Median	وسيط
Megakaryoblastic	متعلق بأرومة النواء	Megakaryocytes	النواء

Metaphase	الطور التالي (في انقسام الخلية)	Micro	مكروي
Micropipet	ممص مكروي	Mild	خفيف
Mimic	يحاكي	Minimal	أصغري، أدنى
Minor	صغرى	Mitogen	محدث للتفئل
mitosis	الانقسام الفتيلي	Models	نماذج
Molecular	جزيئي	Monitoring	مراقبة، تتبع، رصد
Monitoring	مراقبة	Monocytosis	كثرة الوحيدات
Mononuclear	وحيدة النواة	Morphologic	مورفولوجي
Mortality	وفيات	Mutation	طفرة
Myalgia	ألم عضلي	Myeloblasts	أرومة نقوية
Myelocytes	النقويات	Myelogenous leukemia	ابيضاض نقوي
Myeloid leukemia	ابيضاض نخاعي	Myeloid	نخاعي
Myeloproliferative	تكاثري نقوي	Neoplasm	تنشؤ
Neoplastic	ورمي	Neutropenia	قلة العدلات
Neutrophilia	كثرة العدلات	Neutrophils	العدلات
N-terminal	المطرف النتروجيني	Nuclear	نووي
Nuclei	نوى	Oncogenic	مكون للورم
Particle	جسيم	Pathogenesis	إمراض
Pathology	المرضيات	Persistent	مستديم
Phagocytic	بلعمي	Phenotype	النمط الظاهري
Phosphokinase	فوسفوكيناز (إنزيم)	Physical examination	فحص جسمي (بدني)
Pipet (Pipette)	ممص ، يوزع بالميمص	Pluripotent	متعدد القدرات
Polymerase	بوليميراز	Polysaccharide	عديد السكريد
Population	جمهرة، سكان	Potential	إمكانية



Powder (مسحوق (مساحيق)	Preclinical قبل السريري
Precursor سلف، طليعة،	Premyelocyte, Promyelocyte سليفة النقوية
Presentation تجلي	Primary أولي
Primer مشرع	Primitive بدائي
Probe مسبار (مسابير)	Progenitor سلف
Progression تقدم	progressive splenomegaly طحل مترقي
Proliferation تكاثر	Prolong يطيل
Promegakaryocytes سليفة النواء	Prominent بارز
Quinacrine fluorescent التلوين بالكيناكرين	Random عشوائي
المتألق	
Reagent كاشف	Reciprocal translocation إزفاء متبادل
Reciprocating تبادلي	Reduce يقلل
Reduction إنقاص، اختزال	Regulation تنظيم
Relapsed نكس	Release إطلاق
Reliable معوّل	Remission هدأة
Renewal تجدد	Residual ثمالي، متبقي
Residue ثمالة	Resistance مقاومة
Response استجابة	Reverse transcriptase المنتسخة العكسية
RNA messenger الرنا المرسل	Saline ملحي
Sandwich complex المعقد الشطيري	Scant نزير (قليل)
Segment (segmenta) قطعة (قطع)	Selective انتقائي
Sequence متوالية	Shaker رجاجة
Shift زيحان	Signal إشارة (إشارات)
Site مقر (مقرات)	Splenomegaly طحل

Splicing	تضفير	Standard	معياري
State	حالة	Stimulant	منبه
Stock	مخزون، خزين	Stroma	سدى
Substrate	ركيزة، ركائز	Superimposition	تراكب
Suppress	يكبت	Sustained	مستديم
System	جملة، مجموع، نظام، جهاز	Target	هدف
Technology	تكنولوجيا	Template	مرصاف
Therapeutic	علاجي	Thrombocytopenia	قلة الصفيحات
Transcripts	منتسحات	Transduction	تنبيغ
Transform	يستحيل	Transforming	محوّل
Transplant	طعم	Transplantation	زرع
Treatment	معالجة	Triphasic	ثلاثي الأطوار
Trisomy	تثلث صبغي	Tumor	الورم (أورام)
Qualitative	كيفي	uiescent	هادئ، هامد
Typical	نموذجي	Upstream	سابق
Vague	مبهم	Value	قيمة (قيم)

الملاحق

Appendices

## ملحق (1): استمارة استبيان المريض

استبيان مريض	
نقصي علاقة البروتين المندمج BCR-ABL يتطور وتزداد الابيضاض النقوي المزمن باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق	
اسم المريض الثلاثي: .....	الجنس: <input type="checkbox"/> ذكر <input type="checkbox"/> أنثى
مكان وتاريخ الولادة: .....	
رقم الهاتف: .....	جوال: .....
العنوان: .....	
اسم الطبيب: .....	رقم هاتف الطبيب: .....
تاريخ التشخيص: .....	
الصورة الدموية: WBC: ..... E/nL	
NEU: .....%	HGB: ..... g/dL
LYM: .....%	HCT: .....%
MONO: .....%	PLT: ..... E/nL
EOS: .....%	
BASO: .....%	
تجري RT-PCR (9,22): % .....	تاريخ إجراء التحليل: ...../...../.....
الأدوية المستخدمة: Hydria <input type="checkbox"/>	Zyloric <input type="checkbox"/>
Glivec <input type="checkbox"/>	ملغ/يوم، منذ: .....
Tasigna <input type="checkbox"/>	ملغ/يوم، منذ: .....
التطاع بالمعالجة: <input type="checkbox"/> لا <input type="checkbox"/> نعم: <input type="checkbox"/>	
ملاحظات الطبيب السريري: .....	
.....	

التحاليل السابقة للمريض

اسم التحليل	تاريخه	النتيجة	مكان إجراء التحليل

ملاحظات:

.....

.....

.....

.....

## الملحق (2): استمارة الموافقة المستنيرة

كثية صبيحة	جامعة دمشق
<b>استمارة الموافقة على المشاركة في بحث بمد فهم فحواه</b>	
<b>عنوان البحث:</b> تلصي علاقة الموتين للدمج BCR-ABL بتطور وشدة الايضاض النقوي المزمن باستخدام تقنية القياس الخلوي بالتدفق.	
<b>اسم الباحث:</b> د. ريم كيلاني	
<b>اسم المشرف:</b> أ. د. نورة منعم	
<b>الجهة الراعية:</b> كلية الصيدلة – جامعة دمشق.	
<b>الهدف من البحث:</b> يوجد بروتين معروف بعلاقته بايضاض الدم النقوي المزمن حيث تتعلق كميته بسلطة المرض، وتهدف من بحثنا إلى معايرته ومعرفة علاقته بتطور المرض، ومدى تأثير المعالجة على مستوياته.	
<b>هروط المشاركة في البحث:</b>	
1. لك الخيار بالتطوع بالمشاركة في هذا البحث إن رغبت بذلك.	
2. لك كامل الحرية بأن تعدل عن قرارك بالمشاركة في البحث في أي لحظة.	
3. لن تتأثر رعايتك الصحية حيث تلقاها سواء قررت المشاركة في البحث أو انسحبت منها في أي وقت تشاء.	
4. لن يترتب أي عاظر صحية أو تكاليف مادية على مشاركتك.	
5. يمكنك الحصول على نتائج التحاليل المخبرية التي سيتم إجراؤها في بحثنا، والتي قد تلهد في تليم مدى استجابتك للعلاج.	
6. نضمن لك كتمان هويتك ومعلوماتك الشخصية.	
7. يحتاج بحثنا إلى عينة دم وريدي لا تتجاوز 3 مل، ولا تتوقع أية إزعاجات من ذلك سوى الوخزة البسيطة التي قد تشعر بها أثناء سحب عينة الدم.	
<b>يملأ من قبل العاشارك بالبحث:</b>	
اسم المشارك: .....	
أقر بأن قد قرأت/قرأت علي المعلومات الواردة أعلاه، وشرحت لي بلغة مفهومة، وقد فهمتها، وأتبع في أن أسأل جميع الأسئلة المتعلقة بالدراسة وتلقيت الإجابات الوافية.	
وعليه أتطوع بكامل إرادتي وأصليتي للمشاركة في هذا البحث الذي تقريه د. ريم كيلاني في عاير جامعة دمشق، وأوافق على استخدام عينات دم وريدي مني لأغراض البحث العلمي.	
اسم وتوقيع المشارك: .....	دمشق في ..... / ..... / .....
<b>يملأ من قبل الباحث:</b>	
أقر بأن شرحت للمشارك المعلومات السابقة بلغة مفهومة، ورجيت بأي أسئلة تتعلق بالدراسة، وقدمت إجابات وافية عن جميع الأسئلة المطروحة.	
اسم وتوقيع الباحث: .....	دمشق في ..... / ..... / .....
عند وجود أي استفسارات يمكنك الاتصال على الرقم 0932349581	

الملحق (3): جدول يمثل نتائج مرضى CML المشاركين في الدراسة

ID	Sex	Age	TKIs treatment response	BCR-ABL FC assay		t(9,22) qRT-PCR		Cytogenetics result	
				MFI value	Result	Result	BCR-ABL/G6PD ratio	Result	Ratio
1	F	28	Naïve	956.02	Pos	NA		Pos	100%
2	M	69	complete molecular response	16.25	Neg	Neg	Neg	NA	
3	M	50	major molecular response	19.28	Pos	Pos	0.01%	NA	
4	M	40	minor molecular response	19.55	Pos	Pos	0.93%	NA	
5	M	29	complete molecular response	18.27	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
6	M	51	Relapse	835.36	Pos	Pos	46.9%	NA	
7	F	22	Relapse	1893.84	Pos	Pos	16.57%	Pos	95%
8	M	6	complete cytogenetical response	14.99	Neg	NA		Neg	Neg
9	M	59	complete molecular response	15.4	Neg	Neg	Neg	NA	
10	F	55	complete molecular response	17.78	Neg	Neg	Neg	NA	
11	M	53	Minor molecular response, major cytogenetical response	21.67	Pos	Pos	0.73	Pos	8%
12	F	44	Naïve	114.44	Pos	Pos	2.3%	NA	
13	M	60	complete molecular response	17.47	Neg	Neg	Neg	NA	
14	M	30	major molecular response	19.28	Pos	Pos	0.12%	NA	
15	F	33	Naïve	24.47	Pos	NA		Pos	100%

16	F	22	major molecular response	19.31	Pos	Pos	0.01%	NA	
17	F	42	minor molecular response	19.68	Pos	Pos	0.08%	NA	
18	F	31	Naïve	1498.93	Pos	Pos	10.7%	Pos	100%
19	F	17	Naïve	45.11	Pos	Pos	8%	Pos	100%
20	F	53	complete molecular response	17.15	Neg	Neg	Neg	NA	
21	M	54	major molecular response	19.46	Pos	Pos	0.007%	NA	
22	F	27	Naïve	513.97	Pos	NA		Pos	100%
23	F	23	Naïve	1154.78	Pos	NA		Pos	100%
24	M	27	minor molecular and cytogenetic response	31.62	Pos	Pos	1.32%	Pos	50%
25	F	38	Naïve	46.77	Pos	NA		Pos	80%
26	M	55	Complete molecular and cytogenetic response	20.91	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
27	M	20	minor molecular response	19.61	Pos	Pos	0.06%	NA	
28	M	54	complete molecular response	16.52	Neg	Neg	Neg	NA	
29	F	22	complete molecular and cytogenetic response	17.15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
30	M	37	major molecular response	20.55	Pos	Pos	0.11%	NA	
31	F	17	major cytogenetic response, minor molecular response	19.62	Pos	Pos	0.65%	Pos	30%
32	F	28	Naïve	1472.21	Pos	NA		Pos	100%
33	M	34	complete cytogenetic response	15.26	Neg	NA		Neg	Neg
34	M	65	Naïve	381.97	Pos	NA		Pos	100%



35	F	59	Naïve	50.03	Pos	NA		complex karyotype with PH+	80%
36	M	45	minor cytogenetic response	19.47	Pos	Pos	0.51%	NA	
37	F	44	Naïve	86.6	Pos	Pos	3.66%	NA	
38	F	26	Complete molecular response	17	Neg	Neg	Neg	NA	
39	F	33	complete molecular and cytogenetic response	16.92	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
40	F	49	minor molecular response	19.81	Pos	Pos	0.21%	NA	
41	F	50	minor molecular response	19.11	Pos	Pos	0.02%	NA	
42	F	42	major molecular response	18.97	Pos	Pos	0.009%	NA	
43	M	54	complete molecular response	17.15	Neg	Neg	Neg	NA	
44	M	36	complete molecular response	17.31	Neg	Neg	Neg	NA	
45	F	36	complete molecular response	17.78	Neg	Neg	Neg	NA	
46	M	69	minor molecular response	16.77	Neg	Pos	0.04%	NA	
47	F	31	major cytogenetic response, minor molecular response	23.4	Pos	Pos	0.75%	Pos	16%
48	M	39	Relapse	53.76	Pos	Pos	5.13%	NA	
49	M	38	complete molecular response	22.88	Pos	Neg	Neg	NA	

**CML** : ابيضاض الدم المقوي المزمن chronic myeloid leukemia

**TKIs** : مثبطات التيروسين كيناز Tyrosine kinase inhibitors

**MFI** : وسيط شدة النألق median fluorescence intensity

**BCR-ABL FC assay** : اختبار البروتين BCR-ABL الخرزات المناعي بالتدفق الخلوي

**F** : أنثى female؛ **M** : ذكر male؛ **NA** : غير معروف.

الملحق (4): موافقة النشر في مجلة التشخيص المخبري.

Syrian Clinical Laboratory  
Association

هيئة مخابر التحاليل الطبية  
في سورية

الرقم: ٩٠/ص  
التاريخ: ٢٠١٥/٠٧/٠٢

Ref:  
Date:

مجلة التشخيص المخبري  
ISSN 1814-411X

الصيدلانية ريم كيلاني ، أ. د. فوزة منعم  
كلية الصيدلة، جامعة دمشق

تحية طبية:

بسرنا إعلامكم بأنه قد تم تحكيم وقبول البحث المرسل من قبلكم بتاريخ ٢٠١٥/٠٣/٢٩ والذي يحمل العنوان:  
قياس البروتين المندمج BCR-ABL بالجريان الخلوي: هل هي طريقة واعدة لاستعراف  
الابيضاض النقوي المزمن لدى مرضى سوريين

لننشر في مجلة التشخيص المخبري، التي تصدرها هيئة مخابر التحاليل الطبية في سورية،  
ونعلمكم بأن بحثكم سيتم نشره في أحد الأعداد القادمة من المجلة.

إن هيئة وأمانة تحرير مجلة التشخيص المخبري تشكر لكم مساهمتكم في العمل على إغناء  
هذه المجلة بأبحاثكم القيمة.

ومع أطيب تحياتنا

دمشق في ٢٠١٥/٠٧/٠٢

رئيس تحرير مجلة التشخيص المخبري /  
الاستاذ الدكتور أميل شاهين

الهيئة العامة للتحاليل الطبية في سورية  
مجلة التشخيص المخبري

جادة صالح العلي - المزرعة - صندوق بريد ٧٦٧١ - دمشق - سورية  
Tel.: +963 11 446 4945 - Fax : +963 11 446 98 999 - E-mail: scla@scla.org.sy - http://www.scla.org.sy

**الملحق (5):** النص الكامل للورقة العلمية التي نُشرت في مجلة  
.International Journal of Laboratory Hematology