

## Hematological Parameters and Genetic Diversity in Acute Myeloid Leukemia and their Clinical Prognosis

Dr. Michael Gerges<sup>\*</sup>  
Dr. Haitham Yazigi<sup>\*\*</sup>  
Dr. Atieh Khamis<sup>\*\*\*</sup>  
Yahia Moualla<sup>\*\*\*\*</sup>

(Received 8 / 5 / 2022. Accepted 9 / 6 / 2022)

### □ ABSTRACT □

Acute myeloid leukemia (AML) has the highest death rate among all types of hematological neoplasms. Recently, cytogenetic and molecular genetics are crucial in the management, as a consequence of their effect on AML pathogenesis, classification, risk-stratification, prognosis and treatment. 100 Syrian adults with Normal Karyotype (NK) newly diagnosed AML patients were included in this study, all cases confirmed histologically and immunohistochemically. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on exon 11-12 for FMS-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) and exon 12 for Nucleophosmin1 (*NPM1*) using target primers, the electropherograms were analyzed for gene mutations by comparing with the reference DNA sequence. Data were compared and aligned with different sequences using the NCBI BLAST Assembled Genomes tool. *FLT3* and *NPM1* were detected in 26%, 22 % patients respectively. M2 subtype had the most frequent incidence of diagnosis in AML. *FLT3-ITD* mutation patients had the highest mean of death cases. Patients with *FLT3-ITD* and *NPM1* mutations have a bad prognosis, where the presence of those mutations was significantly related to high death rates. We can declare according to this study that genetic mutation and variants detection could easily be incorporated into the regimen evaluation of AML patients.

**Keywords:** Acute myeloid leukemia (AML), Cytogenetic, Prognostic factors, *NPM1*, *FLT3*

\*Professor - Department of Oncology - Tishreen University Hospital - Lattakia - Syria  
prof.georgeosmichael@gmail.com

\*\*Professor- Department of Laboratory Medicine- Tishreen University Hospital- Lattakia- Syria  
Haissam.yazigi@tishreen.edu.sy

\*\*\*Instructor - Department of Biochemistry and Microbiology - Faculty of Pharmacy - Tishreen University - Lattakia - Syria - att.khamis@gmail.com

\*\*\*\*PhD Student - Department of Biochemistry and Microbiology - Faculty of Pharmacy - Tishreen University - Lattakia - Syria yahia.moualla@tishreen.edu.sy

## المعالم الدموية والاختلاف الجيني في الابيضاض الدموي النقوي الحاد ودورها في تحديد الإنذار السريرية

د. ميخائيل جرجس\*

د. هيثم يازجي\*\*

د. عطية خميس\*\*\*

يحيى معلّ\*\*\*\*

(تاريخ الإيداع 8 / 5 / 2022. قُبِلَ للنشر في 9 / 6 / 2022)

### □ ملخص □

يحتل الابيضاض الدموي النقوي الحاد (AML) المرتبة الأولى كمسبب لأعلى معدل وفيات بين جميع أنواع الأورام الدموية. في الآونة الأخيرة، اعتُبرت كل من الوراثة الخلوية والطب الجزيئي الجيني وسائل أساسية في تدبير وعلاج الابيضاضات، نتيجة لتأثيرها على إمراضية الـ AML، وعلى تصنيف المرض، وتقييم درجة الخطورة، والإنذار والعلاج. شملت دراستنا على 100 مريض بالغ، سوي الصيغة الصبغية، مشخصين حديثاً. تم تأكيد جميع الحالات من الناحية النسيجية والنسجية المناعية. تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) على الإكسون 11-12 من مورثة الازدواج الترادفي الداخلي لمستقبلات التيروسين كيناز FMS- Like Tyrosine Kinase: Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD) والإكسون 12 من مورثة النوكليوفوسمين NPM1 باستخدام بواقي محددة. تم استخدام الرحلان الكهرومغناطيسي لتحديد الطفرات الجينية من خلال المقارنة مع تسلسل الحمض النووي المرجعي. تمت مقارنة البيانات ومواءمتها مع تسلسلات مختلفة باستخدام منصة NCBI Blast Assembled Genomes. كانت نسبة انتشار طفرات FLT3 و NPM1 هي 26% و 22% على التوالي بين مرضى الدراسة. كان تحت المجموعة M2 هو التشخيص الأكثر شيوعاً عند المرضى. أظهر مرضى الابيضاض الحاملين لطفرات FLT3-ITD و NPM1 الإنذار الأسوأ حيث كان وجودها مرتبطاً بشكل كبير بمعدلات وفيات مرتفع. تظهر هذه الدراسة أهمية الاختبارات التشخيصية الجينية والجزيئية في تقييم مرضى الـ AML وإدراجها ضمن التحاليل الروتينية لتحديد الإنذار والتنبؤ بسير المرض.

**الكلمات المفتاحية:** ابيضاض الدم النقوي الحاد (AML)، الوراثة الخلوية، العوامل التنبؤية، NPM1، FLT3

\* أستاذ - قسم الأورام - مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية - سورية [prof.georgeosmichael@gmail.com](mailto:prof.georgeosmichael@gmail.com)

\*\* أستاذ - قسم الطب المخبري - مشفى تشرين الجامعي - اللاذقية - سورية [Haissam.yazigi@tishreen.edu.sy](mailto:Haissam.yazigi@tishreen.edu.sy)

\*\*\* مدرس - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية [att.khamis@gmail.com](mailto:att.khamis@gmail.com)

\*\*\*\* طالب دكتوراه - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية [yahia.moualla@tishreen.edu.sy](mailto:yahia.moualla@tishreen.edu.sy)

## مقدمة:

ابيضاض الدم النقوي الحاد Acute Myeloid Leukemia هو مجموعة متغايرة heterogeneous من الاضطرابات النقية، تنتج عن تكاثر خلايا نقوية أرومية غير ناضجة وحيدة النسيلة monoclonal ضمن نقي العظم وانتشارها إلى الدم المحيطي واعضاء أخرى. انخفاض قدرة الخلايا النقية على التمايز يؤدي لانخفاض القدرة على إنتاج الخلايا الطبيعية من الكريات الحمر والصفائح والعدلات الناضجة مؤدياً بالتالي لتظاهرات جهازية متعددة: كفقر الدم، النزف، انخفاض المناعة والقدرة على مقاومة الأمراض (1). تطور التصنيف العالمي لـ AML من التصنيف الفرنسي الأمريكي البريطاني (1982) FAB، والذي اعتمد على علم المورفولوجيا المرضية فقط، إلى ذلك الذي صدر عن منظمة الصحة العالمية WHO الذي يعتمد إلى جانب المورفولوجيا المرضية، كلاً من التتميط المناعي immunophenotype، والوراثة الخلوية cytogenetic والخصائص الجينية الجزيئية molecular genetic في مخطط التصنيف. كما شمل التصنيف الأخير لمنظمة الصحة العالمية لعام 2017 الانحرافات والاضطرابات الجينية الأكثر تواتراً، بالإضافة إلى الانتقالات الصبغية chromosomal translocation المرتبطة بالـ AML (2). يحدث الانتقال الصبغي المتكرر recurrent chromosomal translocation عند 30-40% من حالات AML، بينما 60-70% من المرضى يظهرون صبغة صبغية طبيعية normal karyotype. نظراً لأن الأساس الجيني لـ AML عند المرضى طبيعياً الصبغة الصبغية لا يزال مبهماً، فقد ركز الباحثون والدراسات على ايجاد تغييرات جينية معينة لفهم آلية التطور واختيار العلاج المناسب والاستجابة له، حيث وُجد أن 85% من مرضى AML طبيعياً الصبغة الصبغية لديهم طفرات جينية، وكانت هذه الاضطرابات أكثر تواتراً في كل من FLT3 و NPM1 (3). الاضطرابات الجينية في NPM1 هي واحدة من الأكثر انتشاراً في الـ AML، حيث وُجدت عند 45-64% من مرضى الابيضاض النقوي الحاد طبيعياً الصبغة الصبغية. تُظهر الأورام البشرية الأخرى تعبيراً مُقيداً للنواة لهذا الحين nucleus-restricted NPM1 expression ما يشير إلى انتقائيته للابيضاض النقوي الحاد AML-specific، وغالباً ما تشاهد في الإكسون 11 و 12 في جين NPM1 (4,5). تم ربط طفرات الـ NPM1 بخصائص سريرية ومرضية محددة عند مرضى الابيضاض النقوي الحاد وادرجها التصنيف الفرنسي الأمريكي البريطاني (FAB) French American British classification في تحت الأنماط M4 و M5 من تصنيف الـ AML، حيث كان الارتفاع كبيراً في تعداد الصفائح والارومات، والإمراضيات متعددة السلالات Multilineage involvement، والاعتلالات خارج النخاعية التي تظهر على شكل تضخم لنوي واعتلال العقد للمفاوية، وغلبة الانتشار عند الإناث هي من الميزات الإضافية التي تظهرها الاضطرابات الجينية في NPM1 (6,7). من جهة أخرى كان لمرضى AML الذين لديهم انحرافات جينية في NPM1 معدل هدأة تامة complete remission اكبر مقارنة مع اقارنهم السلبين، ما يظهر أهمية النقصي السريري في التنبؤ بسير المرض (8). FLT3 ترمز الصنف الثالث من مستقبلات تيروزين كيناز، تساهم في تمايز وانتشار الخلايا النقية الدموية، يتم التعبير عن هذا النوع من المستقبلات في كل من الخلايا السلفية progenitor cell والخلايا الأرومية blast cell في معظم حالات ابيضاض الدم النقوي الحاد. يمكن تقسيم طفرات جين الـ FLT3 إلى نوعين رئيسيين: النوع الأول هو طفرات الازدواج الترادفي الداخلية FLT3-ITD والتي تكون داخل مجال juxtamembrane شاملة كل من الإكسون 14 وجزء من الإكسون 15، تكون طفرات هذا النوع الأكثر تواتراً في طفرات FLT3 وبنسبة حدوث تتراوح حوالي 25% عند مرضى الـ AML. أما النوع الثاني فهو الطفرات النقطية أو طفرات الحذف في مجال التيروزين

كيناز FLT3-TKD والتي تؤثر على كودونات 835 أو 836، تحدث هذه الطفرات عند حوالي 7-10% من مرضى الـ AML ولا تزال قيمتها الإندازية التنبؤية غير محددة بالضبط (9). لوحظ أن حدوث FLT-ITD يزداد مع التقدم بالعمر، حيث أشارت دراسات عديدة إلى أن نسبة الحدوث كانت أقل عند الأطفال مقارنةً بالبالغين، لتزداد النسبة بشكل ملحوظ عند المسنين (10)، إلى جانب أن هذه الطفرة ارتبطت بشكل ملحوظ بضعف التطور المرتبط بالاستجابة للعلاج، سوء التشخيص ومعدل بقيا منخفض، مما يؤكد على دور الوراثة الخلوية كعامل تنبؤي هام عند مرضى الـ AML (11). تم ترخيص مثبطات FLT3 من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA)، حيث أظهرت هذه الأدوية زيادة الاستجابة السريرية لدى المرضى عند استخدامها بمفردها أو عند إشراكها مع العلاج الكيميائي (9)، نتيجةً لذلك توصي منظمة اللوكيميا الأوروبية (ELN) بأن تكون نتائج اختبار طفرات FLT3 متوافرة بغضون 72 ساعة عند جميع مرضى AML ليتم بناء الخطة العلاجية تبعاً لحالة الطفرة عند المريض (12).

### أهمية البحث وأهدافه:

هذه الدراسة هي الأولى من نوعها التي تكشف نسبة انتشار كل من طفرات الـ FLT3 والـ NPM1 عند مرضى اللابيضاض النقوي الحاد محلياً، وبالتالي تستهدف الدراسة إلى إيجاد العلاقة بين وجود هذه الطفرات والمعالم الدموية الروتينية ودورها في تحديد الإندازية وسير المرض.

### المواد والطرق Materials and Methods:

#### عينة البحث Subjects:

شملت عينة البحث 100 مريض بالغ من المراجعين لشعبة الدم وشعبة الأورام في كل من مشفى تشرين الجامعي (اللاذقية) والبيروني الجامعي (دمشق). جميع المرضى تم تشخيصهم حديثاً بالابيضاض الدموي النقوي الحاد (AML) بين تشرين الأول 2018 وآب 2021. تمت الموافقة على العمل من قبل لجنة الأخلاقيات في وزارة التعليم العالي السورية وتم الحصول على موافقة خطية مستتيرة من جميع المشاركين. تم تضمين الحالات المؤكدة نسيجياً، وكيميائياً ومناعياً لأول مرة بالابيضاض النقوي الحاد مع عدم وجود اي علاج كيميائي سابق. تم اختيار المرضى الذين اظهروا صيغة صبغية طبيعية (NK)، تم تصنيف المرضى إلى تحت مجموعات من M1 إلى M6 تبعاً للتصنيف الفرنسي الأمريكي البريطاني (FAB).

#### البروتوكول العلاجي Treatment Protocol:

تلقى جميع مرضى AML العلاج الكيميائي الهجومي والتعزيزي. يتكون العلاج من ثلاثة أيام من دوكسوروبيسين Doxorubicin بجرعة 50 مغ/م<sup>2</sup>، و سبعة أيام من السيترابين Cytarabine بجرعة 200 مغ/م<sup>2</sup>، ويكون هذا الشوط العلاجي متبوعاً بجرعة عالية من السيترابين كعلاج داعم بجرعة 3 مغ/م<sup>2</sup> كل 12 ساعة لمدة ثلاثة أيام، يكرر هذا البروتوكول لشوطين أو ثلاثة أشواط علاجية.

## تحليل الوراثة الخلوية والجزيئية Cytogenetic and molecular cytogenetic analyses

تم إجراء تحليل الكروموسوم باستخدام تقنية GTG-banding التي طبقت على عينات المرضى قبل العلاج وفقاً للبروتوكولات القياسية (13). تم استخدام التهجين المتألق في الموضع Fluorescence in situ hybridization (FISH) باستخدام مسابير محددة للكشف عن الشذوذات الأكثر انتشاراً في الابيضاض النقوي الحاد وخصوصاً: الإزفاء :translocation t(8;21), t(15;17), t(9;11), t(16;16), t(12;21), t(6;9) والانتقال :deletion del(13q)، والانتقال inv(16) ، وتم استبعاد كل المرضى الذين ظهرت لديهم شذوذات صبغية كما ذكرنا سابقاً وفقاً لمعايير الاشتمال.

### استخلاص الحمض النووي منقوص الاوكسجين DNA extraction:

تم استخلاص الـ DNA من عينات الدم المحيطي (PB) أو عينات نقي العظم (BM) لمرضى AML باستخدام عتيدة DNA (Qiagen, Germany) QIAamp DNA Blood Mini kit، وفقاً لتعليمات المصنّع وتم حفظ عينات الـ DNA المستخلصة بتجميدها عند درجة -20 درجة مئوية. مع ذكر انه قد تمّ قياس كمية الـ DNA، تركيزه ونقاوته لكل عينة بواسطة مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer، بحيث تكون مناسبة لإجراء السلسلة والتضخيم.

### تحديد الطفرات الجينية Identification of Gene Mutations:

تم إجراء تحليل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR على الإكسون 11 و 12 لـ FLT3-ITD والإكسون 12 لـ NPM1. تم وصف جميع تسلسلات البودائ Primers المستخدمة في تفاعل الـ PCR في الجدول (1). تم تشغيل دورة الـ PCR وفقاً لتعليمات وشروط MyTaq HS polymerase condition (Bioline, London, UK)، حيث تم إجراء مرحلة التسخن الأولية initial denaturation عند 95 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة ، تليها 35 دورة عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، و 58 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة على thermal cycler من شركة (Eppendorf Mastercycler, USA). تم تنقية منتجات الـ PCR باستخدام عتيدة GeneJET PCR Purification Kits (Thermo scientific, USA)، وتم وسمها بواسطة 0.5 µl من BigDye Terminator version 3.1 (applied Biosystems, Foster city, California, USA)، حتى الحصول على حجم نهائي 10 ميكرو لتر من العينة المطلوبة لتفاعل السلسلة. تم إجراء السلسلة في كلا الاتجاهين، تمت تنقية تفاعلات السلسلة باستخدام مزيج إيثانول ثنائي أمين رباعي حمض الأسيتيك (EDTA)، وطريقة ترسيب أسيتات الصوديوم. تم تشغيل الرحلان الكهربائي الشعري ABI Prism® 3130 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, California, USA). تم تحليل electropherograms للطفرات والانحرافات الجينية بالمقارنة مع تسلسلات مرجعية reference DNA sequence للحمض النووي المنقوص الاوكسجين DNA لجميع الطفرات بواسطة برنامج SeqScape program V2.5 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)، تم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل و السلسلة مرة ثانية لتأكيد النتائج. تم الاستناد على تسلسلات الطفرات للجينات المذكورة على تسلسل مرجعي coding DNA reference sequences لكل من FLT3-ITD(NM\_004119.2) و NPM1(NM\_002520.6) معتمدة من الـ GenBank. تم مقارنة النتائج وتحليلها

ومواعمتها مع التسلسلات المختلفة باستخدام NCBI BLAST Assembled Genomes tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

الجدول (1): تسلسل البوادي المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

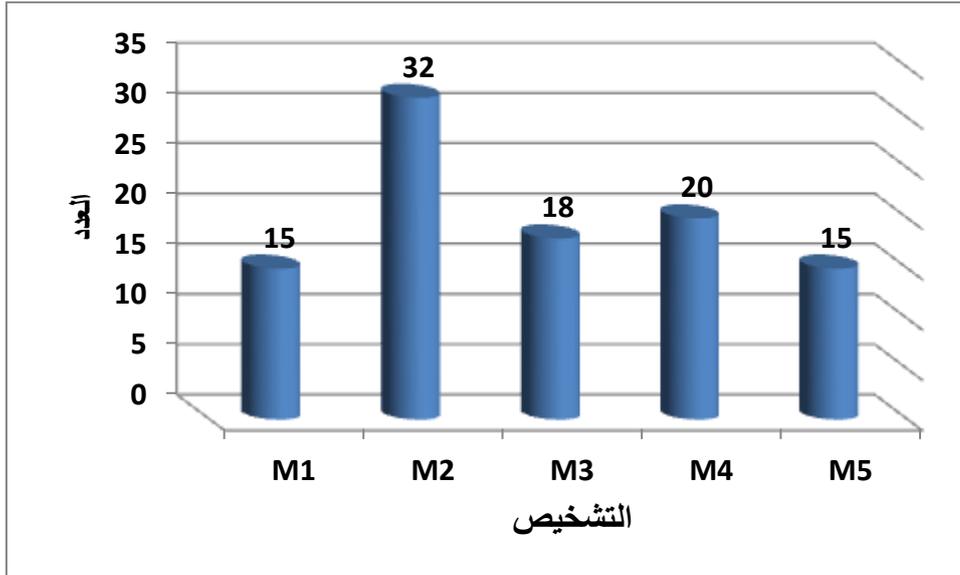
Gene	Primer	Sequences (5'-3')
<b>FLT3-ITD</b>	Forward primer	5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3'
	Reverse primer	5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3'
<b>NPM1</b>	Forward primer	5'-TTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3'
	Reverse primer	5'-CAAGACTATTTGCCATTCCTAAC-3'
<i>FLT3-ITD</i> , FMS-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplication; <i>NPM1</i> , Nucleophosmin1		

### الأساليب الإحصائية المستخدمة :Statistical analysis

لتحقيق أهداف البحث قمنا باستخدام برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS v25) Statistical Package For Social Sciences، وذلك للقيام بعملية التحليل، كما تم استخدام مستوى دلالة (5%)، ويُعد مستوى مقبول في العلوم الاجتماعية بصفة عامة، ويقابله مستوى ثقة يساوي (95%) لتفسير نتائج الدراسة، وتم استخدام الأساليب الإحصائية التالية: منحى خاصية التشغيل للمستقبل (Kaplan–Meier) لتحليل الفعالية التمييزية بين المكونات المختلفة قيد الدراسة وإجراء تحليل البقاء والمقارنة بين منحنيات البقاء على قيد الحياة، تم إجراء تحليل سيرمان لتحليل الارتباط بين العلامات.

### النتائج :Results

تمّ جمع البيانات السريرية والفحوص الكيميائية المختلفة للمرضى المشمولين في الدراسة وفق استمارة معدة لهذا البحث، تمّ الحصول على عينات دم محيطي من جميع المرضى مجموعة على مانع تخثر EDTA، توزعت عينة البحث بين 51% من الرجال و49% من السيدات بمتوسط عمر لعينة البحث 43.47 سنة وياحرف معياري 18.19 سنة، كان أقل عمر في العينة هو 17 وأعلاه هو 86 عام. تمّ تقسيم المرضى حسب تصنيف الـ FAB إلى تحت أنماط تبعاً للتميط المناعي والتلوينات الخلوية، حيث لوحظ أنّ أعلى تشخيص كان لتحت النمط M2 وينسب مقارنة لباقي تحت الأنماط كما هو موضح في الشكل (1).



الشكل (1): توزع عينة البحث حسب التشخيص

بلغ متوسط تعداد الكريات البيض  $10^9/L$  43.96 بتفاوت كبير بين المرضى، وانحراف معياري 53.45، كما بلغ متوسط الهيموغلوبين 8.39 g/dl بانحراف معياري قدره 2.16، بينما تراوح متوسط الصفائح الدموية 90.62  $10^9/L$  بقيمة 4.00  $10^9/L$  كحد ادنى، و 592  $10^9/L$  كحد أعلى. بلغ متوسط تعداد الأرومات على اللطاخة 58%، بقيمة عليا بلغت 94% من الأرومات على الدم المحيطي كما هو موضح بالجدول (2).

الجدول(2): الإحصاءات الوصفية للمؤشرات الدموية

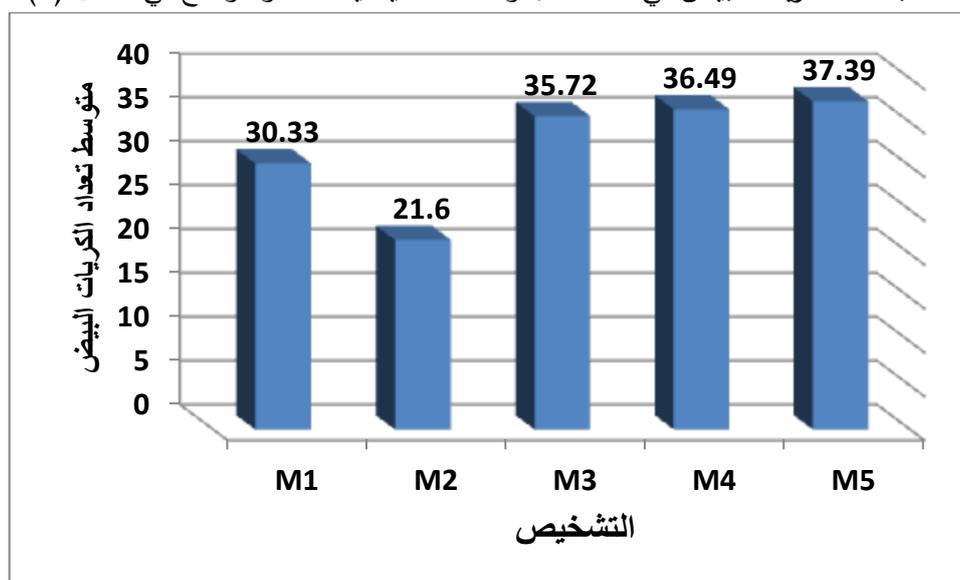
القيمة الكبرى Maximum value	القيمة الصغرى Minimum value	الانحراف المعياري Std. Deviation	المتوسط Mean	المعالم الدموية Hema. Parameters
300.00	0.8	53.45	43.96	الكريات البيض WBC ( $10^9/L$ )
16.70	2.40	2.16	8.39	الهيموغلوبين HG (g/dl)
592.00	4.00	80.64	69.28	الصفائح Platelets ( $10^9/L$ )
0.94	0.16	0.21	0.58	الأرومات على اللطاخة % blast cell

تمّ دراسة الإحصاءات الوصفية لنسب عدد الكريات البيض ودراسة ارتباطها بتحت مجموعات الابيضاض النقوي الحاد تبعاً لـ FAB عند المرضى، فكان أعلى متوسط للكريات البيض عند المرضى المدرجين تحت المجموعة M5، بمتوسط بلغ  $10^9/L$  37.39، وأقله عند المشخصين تحت المجموعة M2 بمتوسط  $10^9/L$  21.60، ولإجراء المقارنة تم استخدام اختبار تحليل التباين ANOVA ونوضح نتائجه في الجدول (3):

الجدول(3): اختبار ANOVA للمقارنة بين متوسطات الكريات البيض في تحت مجموعات التشخيص المختلفة

WBC	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4443.474	4	1110.869	.528	.715
Within Groups	199806.590	95	2103.227		
Total	204250.064	99	3214.096		

حيث نلاحظ من الجدول السابق أن  $P\text{-value}=0.715 > 0.05$  وعليه لا توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسطات نسب عدد الكريات البيض في تحت المجموعات التشخيصية كما هو موضح في الشكل (2).



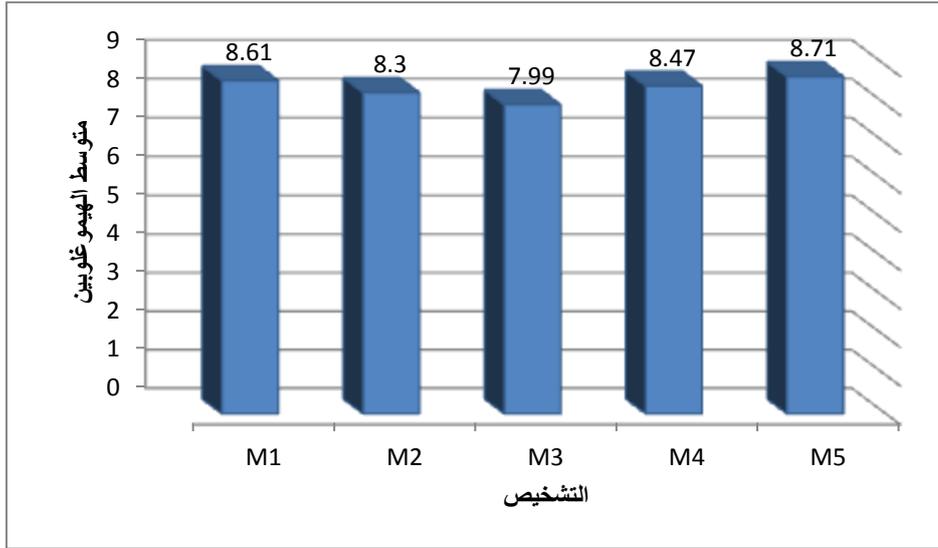
الشكل(2): متوسطات تعداد الكريات البيض في تحت مجموعات التشخيص وفق FAB

تمت المقارنة بين متوسطات الهيموغلوبين عند تحت المجموعات المختلفة، كانت أعلى متوسط في التشخيص M5 وأقله في التشخيص M3 و لإجراء المقارنة تم استخدام اختبار تحليل التباين ANOVA ونوضح نتائجه في الجدول الآتي:

الجدول(4): اختبار ANOVA للمقارنة بين متوسطات الهيموغلوبين في تحت مجموعات التشخيص المختلفة

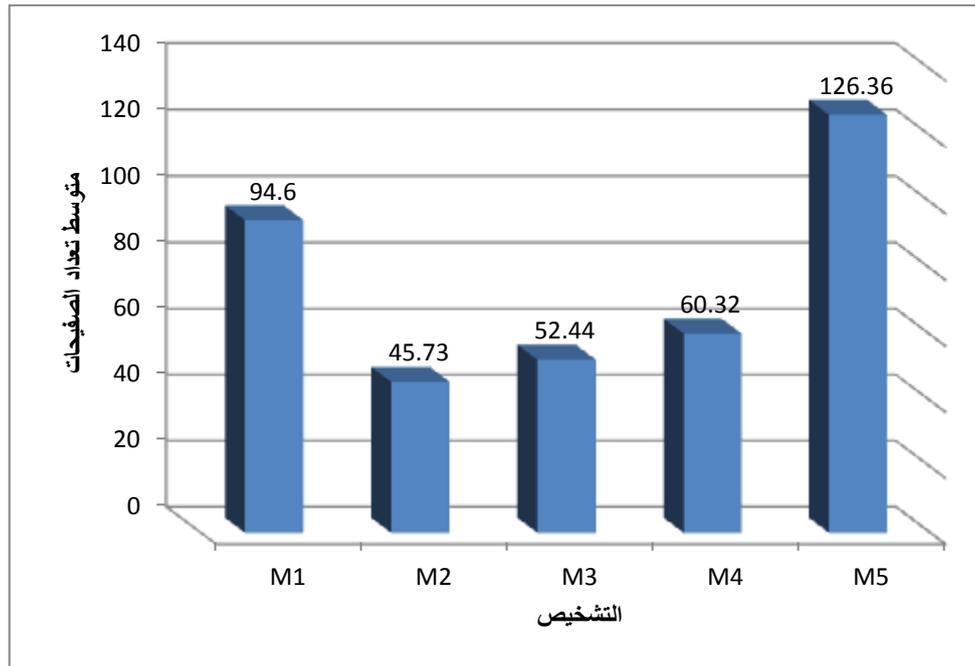
Hemoglobin	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.537	4	1.384	.288	.885
Within Groups	456.756	95	4.808		
Total	462.293	99			

حيث نلاحظ من الجدول السابق أن  $P\text{-value}=0.885 > 0.05$  وعليه لا توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسطات الهيموغلوبين في أنواع التشخيص الخمسة وبعبارة أخرى أن مرحلة التشخيص لا تؤثر على متوسط الهيموغلوبين.



الشكل (3): اختبار ANOVA للمقارنة بين متوسطات الهيموغلوبين في تحت مجموعات التشخيص المختلفة

عند دراسة تعداد الصفيحات عند كل نوع من تحت المجموعات التشخيصية وفق FAB، وُجد أنَّ أعلى متوسط كان لتحت المجموعة M5 بمتوسط  $126.36 \times 10^9/L$  بالمقابل كان أقله في تحت المجموعة M2 بمتوسط 45.73  $10^9/L$ . وعند دراسة الارتباط بين متوسط تعداد الصفيحات ومرحلة التشخيص كان  $P\text{-value}=0.01 < 0.05$  وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسطات تعداد الصفيحات في أنواع التشخيص الخمسة وبعبارة أخرى أن مرحلة التشخيص تؤثر على متوسط تعداد الصفيحات ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5%، فأظهرت النتائج وجود فرق معنوي بين متوسط تعداد الصفيحات للتشخيصين M1 و M2 حيث كان متوسط تعداد الصفيحات في التشخيص M1 أعلى من متوسط تعداد الصفيحات في التشخيص M2 بنسبة 106.86%. ووجود فرق معنوي بين متوسط تعداد الصفيحات للتشخيص M5 و كل من التشخيصات M2, M3, M4 حيث كان متوسط تعداد الصفيحات في التشخيص M5 أعلى من متوسط تعداد الصفيحات في التشخيصات M2, M3, M4 بنسب 176.31%, 140.94%, 109.48% على الترتيب ونوضح ذلك بالشكل (4).



الشكل (4): متوسط تعداد الصفائح في تحت مجموعات التشخيص المختلفة

تمّ دراسة الإحصاءات الوصفية لتعداد الأرومات على اللطاخة في تحت أنواع التشخيص الخمسة، أعلى متوسط للأرومات كان في التشخيص M3, M5 وأقله في التشخيص M1، إلا أنه لم تلاحظ فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسطات تعداد الأرومات على اللطاخة في أنواع التشخيص الخمسة وبعبارة أخرى أن مرحلة التشخيص لا تؤثر على متوسط تعداد الأرومات على اللطاخة.

أظهرت نتائجنا أنّ 22% من المرضى حملوا طفرة في جين NPM1، في حين أنّ 26% من المرضى كانوا حاملين لطفرة في جين ال FLT3. تم دراسة المعايير الإنذارية للمرضى بعد فترة متابعة تراوحت حوالي 32 شهراً. تم دراسة العلاقة بين المرضى الحاملين لطفرة FLT3 والمعالم الدموية، حيث يبين الجدول (5) نتائج اختبار Mann-Whitney test البديل اللاوسيطي لاختبار ستودنت لعينتين مستقلتين لدراسة الفرق بين الحاملين لطفرة FLT3 وغير الحاملين لها في المتغيرات الدموية.

الجدول (5): المقارنة بين حاملي طفرة FLT3 وغير الحاملين لها في المعالم الدموية

Mann-Whitney (P-value)	حامل لطفرة FLT3			غير حامل لطفرة FLT3			المعالم الدموية
	Mean Rank	Mean± SD	العدد	Mean Rank	Mean± SD	العدد	
<0.001*	71.21	69.15±49.5	24	43.96	36.01±52.5	76	الكريات البيض
0.383	46.00	7.98± 2.0	24	51.92	8.52±2.2	76	الهيموغلوبين
<0.001*	71.17	143.4±112.9	24	43.97	73.96±86.8	76	الصفائح
0.439	54.48	0.62±0.2	24	49.24	0.57± 0.2	76	الأرومات

تبين نتائج الجدول السابق أن معنوية الاختبارات في كل من: خضاب الدم ونسبة الأرومات على اللطاخة هي أكبر من مستوى دلالة 0.05، أي أنه بثقة 95%، لا يوجد فرق بين المرضى الحاملين لطفرة FLT3 وغير الحاملين لها بالنسبة لهذين المعلمين. في حين كان مستوى الدلالة أصغر من 0.05 بين الحاملين للطفرة وغير الحاملين بالنسبة لتعداد الكريات البيض والصفائح، مما يدل على وجود ارتباط بين المرضى الحاملين لطفرة FLT3 والكريات البيض والصفائح التي ظهرت أن نسبتها أعلى عند المرضى الحاملين لطفرة FLT3. كما تم إجراء اختبار كاي مربع للاستقلال لدراسة العلاقة بين وجود طفرة FLT3-ITD وكل من الحياة والنكس. حيث تبين وجود علاقة حقيقية بين الحياة ووجود طفرة FLT3، حيث توفي 75% من المرضى حاملي الطفرة، بينما توفي فقط 27.6% من المرضى غير الحاملين لها. في حين لم نجد هذه العلاقة الحقيقية مع النكس.

تم دراسة العلاقة بين المرضى الحاملين لطفرة NPM1 والمعالم الدموية، تم أيضاً إجراء اختبار Mann-Whitney test لدراسة الفرق بين الحاملين لطفرة NPM1 وغير الحاملين لها في المتغيرات الدموية. لم نجد أي دلالة ارتباط بين المرضى الحاملين لطفرة NPM1 وكل من: تعداد الكريات البيض، الخضاب وتعداد الصفائح. بينما كانت معنوية الاختبار بين المرضى الحاملين لطفرة NPM1 وغير الحاملين لها بالنسبة لتعداد الأرومات على اللطاخة هو 0.017 أي أصغر من 0.05 وبالتالي كان هناك ارتباط بين وجود طفرة NPM1 ونسبة الأرومات على اللطاخة التي كانت أكبر بشكل ملحوظ عند المرضى ايجابيين طفرة NPM1. وعند دراسة معنوية الاختبار للعلاقة بين حمل طفرة NPM1 ومعدل البقيا، كان مستوى الدلالة أصغر من 0.05 أي هناك ايضاً ارتباط بين وجود الطفرة والبقيا، حيث توفي أيضاً 72.7% من حاملي هذه الطفرة، في حين لم يكن لها دور في النكس عند مرضى الدراسة.

#### – المناقشة Discussion:

ابيضاض الدم النقوي الحاد هو مجموعة من الاضطرابات غير المتجانسة فيما يتعلق بالسمات المورفولوجية والتنميطات المناعية والخلوية. عند البالغين يكون الالبيضااض النقوي الحاد هو 80% من حالات اللوكيميا الحادة، بينما على النقيض من ذلك تكون نسبته عند الأطفال ضئيلة جداً (14). يشكل اللوكيميا نسبة كبيرة نسبياً من الاورام المنتشرة في المجتمع السوري، حيث بلغت 4.8% من نسبة الأورام الكليّة، هذه النسبة كانت قريبة نسبياً من معدل الانتشار في العديد من المجتمعات والدول الأخرى، حيث بلغت في أميركا الجنوبية 5.4%، 6.1% في أوروبا الغربية، و 6.9% في أوروبا الشرقية. بينما كانت نسبة الانتشار في سورية أقل بشكل ملحوظ من نسبة اللوكيميا في شرق اسيا 22.4%، وفي اميركا الشمالية 14.3% حسب تقارير منظمة غلوبوكان 2020. عند التشخيص كان أغلب المرضى مشخصين بنحت النمط M2 بنسبة 32% وكانت متقاربة مع نسب تحت الأنماط الأخرى، كانت هذه النتائج متوافقة مع دراسة أجراها الباحث Preethi على 1039 مريض (15). وعند دراسة الارتباط بين تحت المجموعات المختلفة وارتباطها بتعداد الكريات البيض، كان أعلى متوسط للكريات البيض في تحت المجموعة M5، وأقله عند تحت المجموعة M2، ولكن لم يكن هناك أي ارتباط بين العاملين، أي بعبارة أخرى أن مرحلة تطور الورم لا تؤثر على تعداد الكريات البيض، كالسابق شهد تحت النمط M5 اعلى نسبة للعديد من المعالم الدموية الأخرى، كالهيموغلوبين، تعداد الأرومات وتعداد الصفائح، إلا أنه لم يكن هناك أي ارتباط بين هذه العوامل ومرحلة التشخيص وفق الـ FAB باستثناء تعداد الصفائح، والتي وُجد أنها مرتبطة مع مرحلة التشخيص M5، هذه النتيجة قد تكون مؤشراً هاماً للارتباط بين تعداد الصفائح الدموية في مرحلة التشخيص ودوره بالتنبؤ بالبقيا وسير العلاج كما أشارت العديد من الدراسات لأهمية

تعداد الصفائح كمشعر دموي تنبؤي هام عن معظم المعالم الدموية الروتينية (16)، حيث يُعتبر تعداد الصفائح فحص روتيني سهل وغير مُكلف عند جميع مرضى الابيضاض النقوي الحاد. أشارت العديد من الدراسات إلى هذا الارتباط بدون إعطاء تفسير واضح عن ذلك، لذا يجب تحليل هذه العوامل بشكل أكبر من أجل تقديم مزيد من المعلومات بخصوص ملاحظتنا. في هذه الدراسة كانت الطفرات في جين ال FLT3 هي الأكثر شيوعاً بنسبة 26%، توزعت هذه النسبة بين 24% لطفرات الازدواج الترادفي الداخلية FLT3-ITD، و2% فقط للطفرات النقطية في مجال التيروزين كيناز FLT3-TKD. كانت نسبة طفرات ال FLT3-ITD متوافقة مع النسب العالمية للعديد من الدراسات، بينما كانت طفرات ال FLT3-TKD أقل من الانتشار العالمي (17). يُعزى الاختلاف والتوافق في نسب حدوث الطفرات بين المجتمعات إلى العديد من العوامل التي تتحكم به، أهمها الاختلافات الوراثية عند الشعوب والأعراق المختلفة، الموقع الجغرافي والعوامل البيئية (18). وعند دراسة الارتباط بين المرضى الحاملين لطفرة FLT3 والمعالم الدموية المختلفة، وُجد ارتباط هام بين وجودها وتعداد الكريات البيض والصفائح الدموية. توافقت العديد من الدراسات مع دراستنا والتي وجدت أن مستويات مرتفعة من الكريات البيض مترافقة مع المرضى ايجابيي ال FLT3 والتي قد يُعزى لها سوء التشخيص عند هؤلاء المرضى (19)، حيث أن الطفرات في FLT3-ITD تؤدي إلى تنشيط بروتين ال FLT3 الذي يسبب التكاثر ويمنع موت الخلايا المبرمج ويثبط تمايز خلايا سرطان الدم التي تعطي الخلايا مزاي الانتشار والبقاء (20-21). وعند دراسة العلاقة بين الحياة والنكس عند المرضى ايجابيي ال FLT3، لم يكن هناك ارتباط واضح بين وجود الطفرة والنكس، على الرغم من ارتفاع معدل النكس عند المرضى ايجابيي الطفرة، لكن لم يكن له دلالة واضحة، هذه النتيجة يجب تأكيدها بعد الأخذ بعين الاعتبار عوامل اخرى، كوجود طفرات مرافقة لهذه الطفرة مما قد يحسن من الإنذار أو يجعله أسوأ، وخصوصاً أن تكرار النكس قد يؤدي لسوء الوظيفة العامة والوفاة، حيث كان لدينا ارتباط بين المرضى ايجابيي FLT3-ITD وحصول الوفاة، كانت هذه النتيجة متوافقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى تورط هذه الطفرة في معدل بقيا أقل، وخفض نسبة حصول الهدأة الكاملة (22-23). إن دور طفرات FLT3-ITD المسبب لزيادة في إنتاج الأوكسجين التفاعلي، يُعزى التخريب التأكسدي لل DNA، وإلحاق الضرر في سلسلتي ال DNA، ويسبب أخطاء في آلية الإصلاح ما يؤدي إلى عدم الاستقرار الجيني والانحرافات الهيكلية في الكروموسومات، وبالتالي دورها في التأثير على النكس ومعدل البقاء عند مرضى ال AML (24). وعند دراسة العلاقة بين طفرة NPM1 والمعالم الدموية عند مرضى الابيضاض النقوي الحاد، كانت نتائجنا متوافقة مع دراسة أجراها Merdin وزملاؤه حيث لم يستخلصوا أي ارتباط بين تعداد البيض، الهيموغلوبين وحمل طفرة NPM1 بينما كانت مستويات الصفائح عند مرضى ال AML- NPM1+ أعلى بشكل ملحوظ منه عند أقرانهم السلبيين (25)، في سياق مماثل، كان في دراستنا ارتباط بين حمل طفرة NPM1 وتعداد ارومات مرتفع على اللطاخة، هذه النتيجة كانت متوافقة مع دراسة أجراها Chauhan وزملاؤه، والتي أشاروا فيها إلى وجود ارتباط بين تعداد الأرومات ومستويات الصفائح، حيث بيّنوا أنّ الأرومات تساهم في الاحتفاظ بقدرة معينة على تمايز الارومات، وبالتالي الارتباط الوثيق بين العاملين (26). هنا نستطيع الاستنتاج أن مستويات الصفائح عند مرضى AML- NPM1+ بحاجة لمزيد من المتابعة والتقييم. في حين أنه من المعروف ان طفرة NPM1 المستقلة تحمل إنذاراً جيداً عند مرضى ال AML عندما تكون كعامل مستقل، إلا أنه وجدت العديد من الدراسات الاخرى تأثيرها السلبي على معدل البقاء والحياة (28-29)، توافقت دراستنا مع هذه الدراسات، إلا أنه من محدودية دراستنا أننا لم نتحرى عن وجود طفرات مرافقة لها والتي قد تكون

ساهمت في ذلك، لذا فإن الشبكة الأوروبية للوكيميا European Leukemia Net أوصت بتشخيص الابيضاضات بواسطة الـ NGS معتمدين على قناة Panel تضم أكثر من 50 جين متورط في حصول اللوكيميا. نستنتج من هذه الدراسة دور طفرات FLT3-ITD و NPM1 في التنبؤ بالإنداز حيث لعبت كل من الطفرتين دوراً سلبياً على معدل البقاء والحياة عند مرضى AML في دراستنا، كما بيّنت نتائجنا تأثير وجود هذه الطفرات على المعالم الدموية المختلفة والتي قد تساعد في التشخيص والتنبؤ بسير المرض. كان هناك العديد من العوامل السلبية التي أثرت على دراستنا، حيث لم تتوفر الإمكانيات المادية والتجهيزات الحديثة لإمكانية التقصي عن الجينات الطافرة المتورطة في الابيضاض النقوي الحاد والتي تجرى بواسطة الـ NGS، كما أن حجم العينة يعتبر قليلاً نسبياً، إلا أن هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في مجتمعنا وبالتالي نستطيع تكوين فكرة عن نسبة انتشار هذه الطفرات الأكثر أهمية في الـ AML في المجتمع، ودورها في الإنداز والتنبؤ بالبقاء. كما تشير إلى أهمية إدراج هذه التحاليل الجينية كإجراء روتيني عند مرضى الـ AML.

#### References:

- 1- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. (2010) *Acute myeloid leukemia*. N Eng J Med;341: 1051-1062.
- 2- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (2017) *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Revised 4th edition; IARC press: Lyon. pp. 15-28.
- 3- Moarii M, Papaemmanuil E. (2017) *Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 37-44.
- 4- Brown P, McIntyre E, Rau R, et al. (2007) *The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML*. Blood; 110(3): 979-85.
- 5- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. (2005) *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med;352(3):254-66.
- 6- Bhattacharyya J, Nath S, Saikia KK, et al. (2018) *Prevalence and clinical significance of FLT3 and NPM1 mutations in acute myeloid leukaemia patients of Assam, India*. Indian J Hematol Blood Transfus. **34**, 32-42.
- 7-NBoonthimat C, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU (2008). *Nucleophosmin mutation in Southeast Asian acute myeloid leukemia: eight novel variants, FLT3 coexistence and prognostic impact of NPM1/FLT3 mutations*. Haematologica, **93**, 1565-9.
- 8- Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S (2012). *An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment*. Oncol Rev, **6**.
- 9- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al (2012). *Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13–15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data*. Genes Chromosomes Cancer, **51**, 910-24.
- 10- Friederike Schneider, Eva Hoster, et al (2012). *Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML)*. Ann Hematol, 91(1):9-18.
- 11- Frank G. Rücker, Ling Du, et al (2021). *Molecular landscape and prognostic impact of FLT3-ITD insertion site in acute myeloid leukemia: RATIFY study results*. Leukemia, 36, 90–99.

- 12- Kennedy VE, Smith CC (2020). *FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies*. Front Oncol, **10**, 2927.
- 13- Al-Achkar W, Wafa A, Nweder M. (2007) *A complex translocation t (5; 9; 22) in Philadelphia cells involving the short arm of chromosome 5 in a case of chronic myelogenous leukemia. J Exp Clin Cancer Res*, 26(3):411-415.
- 14- Vakiti A, Mewawalla P: (2021) *Acute Myeloid leukemia*. StatPearls Publishing.
- 15- Preethi CR. (2014) *Clinico-hematological study of acutemyeloid leukemias*. J Clin Diagn Res: JCDR ;8(4):FC14–17.
- 16- Zhang Q, Dai K, Bi L, et al. (2017) *Pretreatment platelet count predicts survival outcome of patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia*. PeerJ. 2017;5:e4139.
- 17- Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ (2019). *Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence*. Leukemia, 33, 299-312.
- 18- Moualla Y, Moassass F, Al-Halbi B, Al-Achkar W, Georgeos M, Yazigi H, Khamis A. (2022) *Prognostic Relevance of DNMT3A, FLT3 and NPM1 Mutations in Syrian Acute Myeloid Leukemia Patients*. Asian Pac J Cancer Prev:1;23(4):1387-1395.
- 19- Rezaei N, Arandi N, Valibeigi B, et al. (2017) *FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and Nucleophosmin 1 (NPM1) in Iranian adult acute myeloid leukemia patients with normal karyotypes: mutation status and clinical and laboratory characteristics*. Turk J Haematol;34:300–6.
- 20- Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. (2002) *Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain*. Oncogene. 2002;21(16):2555–2563.
- 21- Rocnik JL, Okabe R, Yu J-C, et al. (2006) *Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD*. Blood;108(4):1339–1345.
- 22- Park SH, Chi HS, Min SK, et al. (2011) *Prognostic significance of the FLT3 ITD mutation in patients with normal-karyotype acute myeloid leukemia in relapse*. Korean J Hematol. 2011;46(2):88-95.
- 23- Ayatollahi H, Sadeghian M, Kooshyar M, et al. (2018) *Absence of FLT3 mutations in Iranian adult T-cell leukemia/lymphoma patients*. Med J Islam Repub Iran. 2018;32:47.
- 24- Kim HJ, Ryu H, Choi H-K, et al (2021). *Anti-leukemic Activity of AIU2008 in FLT3-ITD-positive Acute Myeloid Leukemia*. Anticancer Research, **41**, 731-7.
- 25- Merdin A, Dal MS, Çakar MK, et al. (2020) *Analysis of pre-chemotherapy WBC, PLT, monocyte, hemoglobin, and MPV levels in acute myeloid leukemia patients with WT1, FLT3, or NPM gene mutations*. Medicine (Baltimore).;99(14):e19627.
- 26- Chauhan PS, Ihsan R, Singh LC, Gupta DK, Mittal V, Kapur S. (2013) *Mutation of NPM1 and FLT3 genes in acute myeloid leukemia and their association with clinical and immunophenotypic features*. Dis Markers ;35(5):581-588. doi:10.1155/2013/582569
- 27- Koh Y, Park J, Bae EK, Ahn KS, Kim I, et al. (2009) *Non-A type nucleophosmin 1 gene mutation predicts poor clinical outcome in de novo adult acute myeloid leukemia: differential clinical importance of NPM1 mutation according to subtype*. Int J Hematol 90: 1–5
- 28- Alpermann T, Haferlach C, Dicker F, Eder C, Kohlmann A, et al. (2013) *Evaluation Of Different NPM1 Mutations In AML Patients According To Clinical, Cytogenetic and Molecular Features and Impact On Outcome*. Blood 122: 51–51