



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ميسان – كلية العلوم
قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية للجينات *RUNX1* و *RUNX3* و *JAK2* في مرضى
ابيضاض الدم

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم / جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

ميثم عامر مفتن

بكالوريوس تربية – علوم الحياة (2003)

بإشراف

أ.م. د. ميثم عبد الكاظم دراغ

2023 م

1445 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي لَهُ مَا فِي السَّمَاوَاتِ

وَمَا فِي الْأَرْضِ وَلَهُ الْحَمْدُ فِي الْآخِرَةِ ۚ

﴿ وَهُوَ الْحَكِيمُ الْخَبِيرُ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة سبأ (1)

الإهداء

إلى الأم

وكفاها فخرا أن جعلت لرضاها جنّة الله وآلؤه

إلى .. الأب

الذي لم يأل جهدا أن يوفر رغد العيش إلى
ابنائه

إلى ... المعلم

الفاضل ما برح مربيا قد أغدقنا عطاءه

ميثم عامر

الشكر والامتنان

إلى من دلّ الخلق على الحق فصاروا بفيض جوده شاكرين

ولم يطلب لذلك أجرا إلا أن نكون لقرباه متوددين

نبينا محمد عليه وآله الصلاة والسلام

وبعد

أتقدم بجزيل الشكر ووافره إلى عمادة كلية العلوم لإتاحتها هذه الفرصة في إكمال دراسة الماجستير، والى المشرف العلمي أ. م. د ميثم عبد الكاظم دراغ لإشرافه ومساندته لي خلال فترة انجاز هذه الرسالة، والى كل من مدّ يد العون و ساعدني ولو بكلمة في إجراء عملي هذا وأخص بالذكر مسؤولي مختبر الهندسة الوراثية أ.م.د ميثم عبد الكاظم دراغ و أ.م.د صلاح حسن فرج وأ.م شيماء ربيع بعنوان (كلية العلوم/جامعة ميسان) لسماحهم لطلاب الدراسات العليا بالعمل داخل المختبر، و م.م زينب زامل كاطع (كلية العلوم) لمساعدتها الدائمة بدءاً من الاستخلاص حتى كتابة الشكر، والدكتور حسن حاجم (شركة الباحث العلمي) الذي اتممت عنده الجانب العملي من الرسالة، والدكتور علاء شامخ لمساعدته في الحصول على بعض عينات المرضى وايضا لتقديم المعلومات المفيدة والقيمة لإنجاز مهمة جمع العينات، ولا أنسى الزملاء ممن أعانني بالجهد والنصيحة، وعائلتي لتحملها عبء دراستي، وكذلك الأخوة في مركز أمراض الدم في مدينة الطب لتسهيلهم مهمة جمع العينات، والمتبرعين بعينات الدم وخصوصا المرضى فلهم جميعا خالص الدعاء بدوام التوفيق والسداد في الدنيا والآخرة والشفاء العاجل للمرضى.

ميثم عامر

الخلاصة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في قسم علوم الحياة (مختبر الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية)، كلية العلوم، جامعة ميسان، حيث تم استخلاص الحامض النووي DNA. وهدفت إلى تحديد التباين الوراثي لعينات من مرضى ابيضاض الدم الحاد من النوع اللمفاوي والنخاعي، وجمعت عينات الدم من 40 مصاب تم تشخيص إصابتهم في مركز أمراض الدم في مدينة الطب بمحافظة بغداد و20 عينة دم سليمة اختيرت كمجموعة مقارنة. استمرت الدراسة للفترة من 29 / 10 / 2022 الى 10 / 3 / 2023 .

تمت دراسة التعبير الجيني للجينين *RUNX1* و *RUNX3* باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميريز اللحظي (Real-time PCR)، ومقارنتهما مع جين *GAPDH*. أما بالنسبة للطفرة V617F في الجين *JAK2* فقد استخدمت تقنية التضخيم الحراري رباعية البادئات لدراستها، وايضا لدراسة التباين الوراثي بين المجموعتين استخدمت تقنية التضخيم العشوائي للحامض النووي.

أظهرت النتائج وجود فرق معنوي في تعبير الجين *RUNX1* مع مرضى ابيضاض الدم الحاد النخاعي بقيمة احتمالية (P-value) قدرها 0.04، ولم نسجل فرقا معنويا لهذا الجين مع حالات ابيضاض الدم الحاد اللمفاوي، أما تعبير الجين *RUNX3* فلم نلاحظ فيه فرقا معنويا لعينات ابيضاض الدم التي تمت دراستها. لم تسجل عينات الدراسة الحالية للمرضى ومجموعة المقارنة وجود الطفرة في جين *JAK2*، وكان النمط الوراثي لجميع العينات من النوع الشائع (wild type) ومتجانس الزيجة (GG)، ولم يكن من نمط الطفرة (mutant type) المتجانس أو المتباين الزيجة (TT) و (GT) على التوالي.

أظهرت البادئات العشوائية OPAA11، OPU15، OPD18 في تقنية التضخيم العشوائي للحامض النووي اختلافاً في العدد الإجمالي للحزم بين مجموعة عينات مرضى ابيضاض الدم ومجموعة المقارنة لصالح مجموعة المرضى، حيث بلغ العدد الإجمالي 298 حزمة في المرضى و235 حزمة في مجموعة المقارنة، ولوحظ الاختلاف أيضاً في أعداد الحزم المتجانسة والمتباينة والفريدة بين المجموعتين، مما يشير إلى وجود تباين وراثي بينهما.

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	
		الخلاصة
		الفصل الاول : المقدمة
3 - 1		المقدمة
30 - 4		الفصل الثاني : استعراض المراجع
4	Leukemia	ابيضاض الدم 1 - 2
6	Types of leukemia	انواع ابيضاض الدم 1 - 2
6	Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)	ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد 1 - 1 - 1 - 2
7	Acute Myeloid Leukemia (AML)	ابيضاض الدم النخاعي الحاد 2 - 1 - 1 - 2
8	Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)	ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن 3 - 1 - 1 - 2
8	Chronic Myeloid Leukemia (CML)	ابيضاض الدم النخاعي المزمن 4 - 1 - 1 - 2
10	Causes of leukemia	أسباب ابيضاض الدم 2 - 1 - 2
12	Genetic mutations	الطفرات الوراثية 2 - 2
13	Single Nucleotide Polymorphisms	تعدد اشكال النيوكلو تيدات المفردة 1 - 2 - 2
13		أنماط حدوث تعدد اشكال النيوكلو تيدات المفردة في الجينوم 2 - 2 - 2
14	Types of SNPs in exons	أنواع تعدد اشكال النيوكلو تيدات المفردة في الإكسونات 3 - 2 - 2
15	Insertion and deletion polymorphism	التعدد الشكلي في الاضافة والحذف 4 - 2 - 2
15	Tumor suppressors genes	الجينات الكابتة للورم 3 - 2
15	<i>p53</i> gene	1-3-2
16	<i>PML</i> gene	2-3-2
16	<i>RUNX1</i> gene	3-3-2

16	Oncogenes	الجينات الورمية	4 – 2
17	Fms-like tyrosine kinase 3(<i>FLT3</i>)	شبيهه التايروسين كاينز 3	1-4-2
17	<i>KIT</i> Gene		2-4-2
18	<i>RAS</i> family		3-4-2
18	JAK / STAT signaling pathway	مسار اشارة جاك / ستات	5-2
20	Diagnosis of leukemia	تشخيص ابيضاض الدم	6-2
21	Cell and Transcriptional Regulation	الخلية وتنظيم النسخ	7-2
21	Gene expression	التعبير الجيني	8-2
22	Molecular investigation	التشخيص الجزيئي	9-2
22	Polymerase chain reaction (PCR)	تفاعل البوليميريز المتسلسل	1-9-2
22	Real-Time Polymerase chain reaction RT- PCR	تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي	2-9-2
23	The Amplification Refractory Mutation System (ARMS)	نظام التضخيم الحراري للطفرات	3-9-2
24	DNA Sequencing	تقانة تتابعات القواعد النيتروجينية للدنا	4-9-2
25	Random amplified polymorphic DNA (RAPD)	التعدد الشكلي للـ DNA المضخم عشوائيا	5-9-2
26	<i>RUNX3</i> و <i>RUNX1</i>	جيني	10-2
28	V617F mutation in <i>JAK2</i> gene	الطفرة V617F في جين <i>JAK2</i>	11-2
51 -31	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
31	Materials and Methods	المواد وطرائق العمل	
31	Instrument and Materials used	الاجهزة والمواد المستعملة	1 -3
32	Kits	العدد المختبرية	2 -1-3
34	Primers	البادئات	3-1-3
35	Chemicals	المواد الكيميائية	4-1-3

36	Methods	طرائق العمل	2-3
36	Experiment design	تصميم التجربة	1-2-3
37	Sample of the study	عينات الدراسة	2-2-3
37	Method of collection blood samples	طريقة جمع عينات الدم	3-2-3
37	Genetic study	الدراسة الوراثية	3-3
38	Genomic DNA extraction	استخلاص الحامض النووي	1-3-3
39	Measuring the concentration and purity of DNA	قياس نقاوة وتركيز الـ DNA المستخلص	2-3-3
39	RNA extraction	استخلاص الرنا	3-3-3
40	Estimation of extracted total RNA	قياس الحامض النووي الرايبوسومي الكلي المستخرج	4-3-3
40	DNase I Treatment	المعاملة بانزيم DNase I	5-3-3
41	cDNA synthesis	تصنيع مكمل الدنا	6-3-3
42	Quantitative RT- PCR	تفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي	7-3-3
44	Data analysis of RT-qPCR	تحليل بيانات RT- qPCR	8-3-3
45	Tetra- ARMS-PCR	البوليميريز التسلسلي رباعي البادئات	4-3
45	preparation mix master T-ARMS-PCR	تحضير الخليط الرئيسي T-ARMS-PCR	1-4-3
46	PCR Thermocycler Conditions	ظروف التدوير الحراري	2-4-3
47	T-ARMS-PCR product analysis	تحليل منتج T-ARMS-PCR	3-4-3
48	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	التعدد الشكلي للـ DNA المضخم عشوائيا	5-3
50	DNA sequencing	التسلسل المتتابعي للدنا	6-3
50	Statistical analysis	التحليل الاحصائي	7-3

77-52	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
52	Results and Discussion	النتائج والمناقشة
52	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	تفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي
54	Gene expression of <i>RUNX1</i> in ALL and comparison group	تعبير <i>RUNX1</i> في مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي ومجموعة المقارنة
56	Gene expression of <i>RUNX1</i> in AML and comparison group	تعبير <i>RUNX1</i> في مرضى ابيضاض الدم النخاعي ومجموعة المقارنة
58	Gene expression of <i>RUNX3</i> in ALL and comparison group	تعبير <i>RUNX3</i> في مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي ومجموعة المقارنة
60	Gene expression of <i>RUNX3</i> in AML and comparison group	تعبير <i>RUNX3</i> في مرضى ابيضاض الدم النخاعي ومجموعة المقارنة
62	ARMS-PCR	الكشف عن الطفرة V617F للجين JAK2 بواسطة ARMS-PCR
65	JAK2V617F	دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية للطفرة JAK2V617F
69	PCR-RAPD	كشف التعدد الشكلي الوراثي لعينات ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد بتقنية PCR-RAPD
69	Detection genetic polymorphism of the acute lymphoblastic and myeloid leukemia samples by RAPD - PCR technique	
79-78	الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات	
78	Conclusions	الاستنتاجات
79	Recommendations	التوصيات
107-80	الفصل السادس : المصادر	
112 -108	الملاحق	
A-B	الخلاصة الانكليزية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان
31	جدول (1-3) الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة
32	جدول (2-3) العدد المستعملة في الدراسة
34	جدول (3-3) تسلسل قواعد البادئات للجينات الهدف وجين المقارنة
34	جدول (4-3) تسلسل قواعد البادئات الرباعية لطفرة JAK2V617F لتفاعل الـ ARMS
35	جدول (5-3) بادئات التضخيم العشوائي للدنا وتسلسل قواعدها
35	جدول (6-3) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة
40	جدول (7-3) مكونات وحجوم مزيج تفاعل المعاملة بانزيم DNase I
41	جدول (8-3) مكونات تفاعل تصنيع cDNA
41	جدول (9-3) خليط التضخيم للنسخ العكسي
42	جدول (10-3) ظروف جهاز التدوير الحراري لانتاج cDNA
43	جدول (11-3) مكونات الخليط الرئيسي لتفاعل البوليميريز التسلسلي
44	جدول (12-3) برنامج التضخيم في جهاز التدوير الحراري qPCR
45	جدول (13-3) مزيج تفاعل T-ARMS-PCR القياسي
46	جدول (14-3) برنامج التدوير الحراري لتفاعل الـ ARMS
48	جدول (15-3) يبين حجم مكونات التفاعل المستخدمة في RAPD
49	جدول (16-3) برنامج التدوير الحراري PCR للبادئات OPAA 11, OPU15 and RAPD لتقنية الـ OPAA18
54	جدول (1-4) نتائج احصاء التعبير الجيني للجين <i>RUNX1</i> مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة
56	جدول (2-4) نتائج احصاء التعبير الجيني للجين <i>RUNX1</i> مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
58	جدول (3-4) نتائج احصاء التعبير الجيني للجين <i>RUNX3</i> مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة
60	جدول (4-4) نتائج احصاء التعبير الجيني للجين <i>RUNX3</i> مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
71	جدول (5-4) الاعداد والنسب المئوية للحزم الكلية، متعددة الاشكال polymorphic، والفريدة unique، واحادية التشكل monomorphic، والقوة التشخيصية وفعالية البادئات الثلاثة المستخدمة في تضخيم DNA عينات ابيضاض الدم في تقنية الـ RAPD.
71	جدول (6-4) الاعداد والنسب المئوية للحزم الكلية، متعددة الاشكال polymorphic، والفريدة unique، واحادية التشكل monomorphic، والقوة التشخيصية وفعالية البادئات الثلاثة المستخدمة في تضخيم DNA عينات مجموعة المقارنة في تقنية الـ RAPD.
73	جدول (7-4) التحليل الاحصائي للحزم Polymorphic, unique, monomorphic مع الـ OPAA11 البادئ

74	جدول (8-4) التحليل الاحصائي للحزم Polymorphic ,unique, monomorphic مع البادئ OPU15
75	جدول (9-4) التحليل الاحصائي للحزم Polymorphic ,unique, monomorphic مع البادئ OPD18

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان
9	شكل (1-2) صور لعينات الدم
9	شكل (2-2) طفرة الانتقال بين الكروموسوم 9 والكروموسوم 22
19	شكل (3-2) السايٹوکائينات المختلفة والمستقبلات المقابلة المرتبطة بمستقبلات (JAKs) وأنواع الخلايا المكونة للدم الناتجة عن مجموعة إشارات JAK
26	شكل (4-2) موقع الجين <i>RUNX1</i> على الكروموسوم 21
27	شكل (5-2) موقع الجين <i>RUNX3</i> على الكروموسوم 1
28	شكل (6-2) جينات <i>RUNX</i> في الثدييات
30	شكل (7-2) <i>JAK2</i> النموذجي و <i>JAK2V617F</i> الناجم عن إشارات <i>JAK2-STAT</i> غير المنظمة
36	شكل (1-3) الخطوات العامة للدراسة الحالية
52	شكل (1-4) منحى التضخيم لتفاعل البوليميرز التسلسلي اللحظي لتعبير الجين <i>RUNX1</i> ، لعينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
53	شكل (2-4) منحى التضخيم لتفاعل البوليميرز التسلسلي اللحظي لتعبير الجين <i>RUNX3</i> ، لعينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
53	شكل (3-4) منحى التضخيم لتفاعل البوليميرز التسلسلي اللحظي لتعبير الجين <i>GAPDH</i> ، لعينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
55	شكل (4-4) Box plot تعبير الجين <i>RUNX1</i> مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة
58	شكل (5-4) Box plot تعبير الجين <i>RUNX1</i> مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
60	شكل (6-4) Box plot تعبير الجين <i>RUNX3</i> مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة
61	شكل (7-4) Box plot تعبير الجين <i>RUNX3</i> مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة
62	شكل (8-4) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 2% والمحتوي على نتائج تضخيم PCR-ARMS لقطعة الجين <i>JAK2</i>
63	شكل (9-4) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 2% عند فرق جهد كهربائي 80 فولت ولمدة ساعة يظهر نتائج تفاعل T-PCR-ARMS للطفرة V617F في جين <i>JAK2</i>

66	شكل (10-4) تحليل محاذاة التسلسل المتعدد بطريقة (MSA) للجين <i>JAK2</i> في الإنسان لمرضى ابيضاض الدم
67	شكل (11-4) تحليل الشجرة الوراثية المستند إلى جين <i>JAK2</i> في ابيضاض الدم الحاد للإنسان <i>Homo sapiens</i> لعينات مرضى عراقيين تستخدم لتحديد طفرة V617F في <i>JAK2</i>
68	شكل (12-4) تسلسل الحامض النووي لجين <i>JAK2</i> في ابيضاض الدم الحاد لدى الإنسان وعينات المقارنة
70	شكل (13-4) صورة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز 2% وبفرق جهد 85% فولت لمدة ساعة لتقنية الـ RAPD
72	شكل (14-4) اعداد ونسب اجمالي الحزم، Polymorphic ,unique ,monomorphic لعينات مرضى ابيضاض الدم ومجموعة المقارنة
73	شكل (15-4) العدد الاجمالي للحزم الناتجة من التدوير الحراري مع البادئ OPAA11
74	شكل (16-4) العدد الاجمالي للحزم الناتجة من التدوير الحراري مع البادئ OPU15
75	شكل (17-4) العدد الاجمالي للحزم الناتجة من التدوير الحراري مع البادئ OPD18

قائمة المصطلحات

<i>ABL1</i>	Abelson leukemia virus
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia
AML	Acute myeloid Leukemia
ACTB	β -actin
ARMS	amplification refractory mutation system
<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region
Bm	Bone marrow
B-PLL	B-cell prolymphocytic leukemia
Bp	Base pair
CBC	Complete blood count
CBFB	Core-Binding Factor Subunit Beta
cDNA	Complementary DNA
CLL	Cronic Lymphoid Leukemia
CML	chronic myeloid leukemia
CT	cycle threshold
ddNTPs	dideoxynucleotide phosphates

DNA	Deoxyribonucleic acid
EtBr	Ethidium bromide
et al.	et alli (and others)
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
FLK2	fetal liver kinase 2
Fwt	Forward wild-type specific
FAB	French American British
GTP	Guanosine triphosphate
GE	Gene expression
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GTFs	General Transcription Factors
HKG	housekeeping gene
HSCs	hematopoietic stem cells
Indels	Insertion and deletion polymorphism
IL7R α	Interleukin7 receptor alpha
ITD	internal tandem duplication
JAK	Janus kinase
JH2	pseudokinas domain
mRNA	messenger RNA
MDS	myelodysplastic syndrome
Mg	Microgram
Mi	Microliter
MSA	Multiple sequence alignment
MPD	myeloproliferative disorders
MPN	Myeloproliferative neoplasms
MPs	multipotent progenitors
NK	natural killer
PML	promyelocytic leukemia
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Philadelphia chromosome
PTKs	protein tyrosine kinases
Ph- MPN	negative myeloproliferative neoplasm

P1, P2	Promoter1, Promoter2
RARA	retinoic acid receptor alpha
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RT-PCR	Real-Time Polymerase chain reaction
RMT	Reverse mutant type
<i>RUNX1</i>	Runt-related Transcription Factor 1
<i>RUNX3</i>	Runt - Related Transcription Factor 3
SCF	stem cell factor
STAT	Signal transducer and activator of transcription proteins
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
STK1	human stem cell kinase
TCF	Transcription factors
TKD	tyrosine kinase domain
TSS	Transcription Start Site
TBE	Tris Broate EDTA
UTRs	untranslated regions
UV	Ultra violet radiation
WT	wild-type

الفصل الأول المقدمة

1 - المقدمة Introduction

يشير مصطلح السرطان إلى مجموعة من الأمراض التي تتميز بنمو خلوي غير طبيعي وغير مسيطر عليه ناتج في المقام الأول عن طفرات جينية (Martínez-Jiménez *et al.*, 2020 ; Stratton, 2011). ابيضاض الدم نوع من أنواع السرطان الذي يتميز بالنمو غير المسيطر عليه للخلايا الجذعية المكونة للدم (Hematopoietic stem cells) من نخاع العظم (Davis *et al.*, 2014).

يصنف ابيضاض الدم حسب سلالة الخلية المكونة الى الأنواع الفرعية الأربعة وهي ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (Acute lymphoblastic leukemia (ALL)، و ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (Chronic lymphoid leukemia (CLL)، و ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Acute myeloid leukemia (AML)، و ابيضاض الدم النخاعي المزمن (Chronic myeloid leukemia (CML)، ويتميز ابيضاض الدم الحاد (Acute leukemia) بالانقسام السريع وعدد كبير من الخلايا غير المتميزة وغير الناضجة (الارومات)، بينما يتميز ابيضاض الدم المزمن (Chronic leukemia) بانقسام بطيء وعدد أقل من الارومات (Weinberg, 2013).

يوصف ابيضاض الدم على أنه نقوي المنشأ (myelogenous) عندما يصيب الخلايا الحبيبية والوحيدة، ولمفاوي المنشأ (lymphogenous) عندما يصيب الخلايا اللمفية، و يصنف الى حاد ومزمن اعتمادا على الوصف الشكلي (المظهري) للارومات (Blasts) ونوع الخلايا الجذعية غير الناضجة والخلايا التي ستضج فيما بعد (Almaiman, 2018).

إن أسباب ابيضاض الدم وأنواعه الفرعية غير واضحة وهذا يرجع جزئياً إلى تنوع واختلاف عوامل الإصابة كما في تأثر الجينات بالعوامل البيئية (بما في ذلك التعرض لجرعات عالية من الإشعاع أو المواد الكيميائية المسببة للسرطان)، والاستعداد الوراثي، حيث ترتبط هذه العوامل بزيادة خطر الإصابة بابيضاض الدم (Chokkalingam and Buffler, 2008). يعتبر ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد هو الأكثر شيوعاً بين الأطفال والسبب الرئيسي للوفاة بين الأشخاص الذين تقل أعمارهم عن الأربعين، بينما تكون الأنواع الفرعية الأخرى أكثر تكراراً بين البالغين (Kaatsch, 2010).

أُكتشف المرض لأول مرة وسُجل من قبل Virchow في برلين و Bennett في اسكوتلندا في سنة 1845 (Kampen, 2012). تم وصف الحالات الأولى من ابيضاض الدم النخاعي المزمن خلال القرن التاسع عشر، ولم تكن إلى ذلك الحين معروفة حالة كروموسوم فيلادلفيا Philadelphia chromosome حتى عام 1960 حيث اكتشف الباحثان Peter Nowel و David Hungerford أن سبعة من المرضى الذين يعانون من ابيضاض الدم النخاعي المزمن لديهم أيضاً كروموسوميا

مماثلاً، وهو ما يسمى في الوقت الحاضر كروموسوم فيلادلفيا (Nowell and Hungerford, 1960). وبعد ثلاثة عشر عامًا في عام 1973، أظهرت جانيت رول في شيكاغو أن كروموسوم فيلادلفيا كان نتيجة للانتقال المتبادل بين الأذرع الطويلة للكروموسومات 9 و 22، وفي عام 1985 تم تمييز جين الاندماج Breakpoint cluster region protein – Abelson murine leukemia viral homolog1 (*BCR- ABL1*) (Heisterkamp *et al.*, 1985; Rowley, 1973).

قد ينشأ السرطان من الطفرات (Mutation) التي تسبب تنشيط الجينات المسرطنة Oncogenes أو تعطيل الجينات الكابتة للورم Tumor suppressor genes فتؤدي إلى نمو الخلايا وانتشارها غير المسيطر عليه مما يزيد في تسبب مضاعفات أخرى في الجسم قد تؤدي في النهاية إلى الوفاة (Sarkar *et al.*, 2013). ويمكن أن يؤثر تعدد الأشكال الجيني أو الاختلاف في الحامض النووي على قابلية الإصابة بالأمراض، والاستجابة المستقبلية للعوامل المضادة للسرطان (Sukhumsirichart, 2018). تحتوي الخلايا أو الأنسجة الورمية على الأحماض النووية، بالإضافة إلى العديد من البروتينات، وبالتالي فإن العقيدة المركزية (central dogma) تُظهر أن هذه البروتينات مرتبطة بالأحماض النووية مما يعكس أهمية البروتينات في التنبؤ بحدوث الأمراض (He *et al.*, 2020). وعلى الرغم من البحث المكثف فإنه لم يتم فهم سبب ابيضاض الدم بشكل كامل، لذلك ولمكافحة هذا المرض فمن الضروري استكشاف الأساس الجزيئي لتطور ابيضاض الدم واحتمال خيارات جديدة للعلاج (Kumar *et al.*, 2014).

يُشفّر جين Runt-related Transcription Factor 1 (*RUNX1*) لبروتين يعمل كعامل نسخ ويشكل معقدًا مع العامل المساعد Core-Binding Factor Subunit Beta (CBFB) (Lam and Zhang , 2012). ويشارك هذا البروتين في تكوين الخلايا الجذعية المكونة للدم وتمايزها في الخطوط النخاعية واللمفاوية (Lam and Zhang, 2012 ; Ito, 2004)، وإن الخلل في وظيفة جين *RUNX1* يؤدي إلى إعاقة في تمايز الخطوط النخاعية واللمفاوية، والتي غالبًا ما تؤدي إلى الإصابة بابيضاض الدم (Asou, 2003)، كما إنّ زيادة التعبير عن جين *RUNX1* يمكن أن يكون أيضًا منشطًا للورم من خلال تضخيم منطقة الكروموسوم q22 التي تحتوي على جين *RUNX1* والتي لوحظت في ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد نوع B و ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Ito *et al.*, 2015).

يُشفّر جين Runt - Related Transcription Factor 3 (*RUNX3*) لبروتين ينتمي الى عائلة *RUNX*، ويلعب دورا في تنظيم التعبير الجيني وتطور الأنسجة المختلفة، ويشارك في تحديد مصير الخلية وانتشارها وتمايزها، فهو يرتبط بتسلسلات محددة من الحامض النووي منقوص الاوكسجين في موقع المحفز للجينات المستهدفة ويعمل على تثبيطها أو قمع نسخها وبالتالي تثبيط الورم

الصعترية، وتمايز الخلايا التائية (Mevel *et al.*, 2019). (Whittle and Hingorani, 2017; Haider *et al.*, 2016)، وهو ضروري في عملية تكوين الغدة

يوفر جين *JAK2* معلومات وراثية لإنتاج بروتين يلعب دورًا مهمًا في إعطاء إشارات المسارات المشاركة في نمو الخلايا وتطورها. ويمكن أن تؤدي الطفرات في هذا الجين إلى فرط نشاط مسارات الإشارات هذه، والتي يمكن أن تسهم في تطويع بعض اضطرابات الدم مثل زيادة الكريات الحمر (Steensma *et al.*, 2006). تعد الطفرة النقطية V617F في جين *JAK2* الأكثر اكتشافًا في عائلة *JAK* والتي تؤدي لتنشيط *JAK2* (Dupont *et al.*, 2007; James *et al.*, 2005). تقود الطفرة V617F بشكل متكرر لأورام التكاثر النخاعي (MPN) myeloproliferative neoplasms وهي مجموعة من الأورام الخبيثة النخاعية الناتجة عن زيادة تكاثر ونتاج السايوتوكاين من أنواع مختلفة من الخلايا النخاعية (Baxter *et al.*, 2005 ; Levine *et al.*, 2005b). تتضمن طفرة V617F على وجه التحديد استبدال الفالين (V) للفينيل ألانين (F) في الموقع 617 في بروتين *JAK2*. تؤدي هذه الطفرة إلى أن يصبح بروتين *JAK2* نشطًا بشكل أساسي، مما يعني استمرار النشاط حتى في غياب إشارات التنشيط الطبيعية. ويمكن أن يؤدي التنشيط المستمر لإشارات *JAK2* إلى زيادة إنتاج خلايا الدم، وخاصة كريات الدم الحمر (Tai *et al.*, 2017).

هدفت هذه الدراسة الى:

البحث عن وجود التغيرات الوراثي والطفرة في عينات من مرضى ابيضاض الدم الحاد (اللمفاوي والنخاعي) من خلال ما يأتي:

- ✓ دراسة التعبير الجيني (Gene expression) للجينين *RUNX1* و *RUNX3* لعلاقتهم بتكوين الدم، وللتعرف على مستوى التعبير الجيني فيهما ومقارنته بين مرضى ابيضاض الدم ومجموعة المقارنة.
- ✓ الكشف عن التعدد الشكلي Polymorphism للطفرة V617F في جين *JAK2* لملاحظة اختلاف الأليلات فيها.
- ✓ دراسة التشكل الوراثي بين مرضى ابيضاض الدم ومجموعة المقارنة باستخدام بادئات التضخيم العشوائي للدنا PCR-RAPD.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

2- استعراض المراجع Literature Review

2-1 : ابيضاض الدم Leukemia

ابيضاض الدم هي مجموعة غير متجانسة من الأورام الخبيثة الدموية التي تنتج عن زيادة في خلايا الدم البيض غير الطبيعية أو غير الناضجة، مع قمع إنتاج الخلايا الطبيعية في نخاع العظم والأعضاء الأخرى المكونة للدم (Döhner *et al.*, 2015). و يؤثر الإنتاج السرطاني للخلايا البيض غير الاعتيادية و غير الناضجة على جهاز المناعة، وعلى قدرة نخاع العظم لإنتاج كريات الدم الحمر والصفائح الدموية (Short *et al.*, 2020).

إنّ كلمة Leukemia مشتقة من الكلمات اليونانية "leukos" التي تعني الأبيض، و "haima" تعني الدم. وتم وصف ابيضاض الدم لأول مرة من قبل John Hughes Bennett في إنديرة عام 1845، وربما كان هذا هو أول وصف لابييضاض الدم النخاعي المزمن (Bennett, 1845). وفي عام 1872 لاحظ Ernst Neumann بأن ابيضاض الدم ينشأ في نخاع العظم (Neumann, 1872). وفي عام 1880 اكتشف Paul Ehrlich الخلايا المحببة (الحمضات، القعدات، العدلات) وقسم ابيضاض الدم إلى مجموعتين، المجموعة النخاعية (التي تنشأ منها الخلايا المحببة) والمجموعة اللمفاوية (المكونة للخلايا اللمفاوية) (Ehrlich, 1880).

تختلف الخلايا البيض عن خلايا الدم الأخرى مثل كريات الدم الحمر والصفائح الدموية وبالتالي تقسم في فئتين على أساس منشأ الخلايا الى الخلايا اللمفاوية والخلايا النخاعية وعلى أساس التركيب الخلوي كخلايا غير محببة وخلايا محببة. هذه الفئات من الخلايا البيض تنقسم إلى خمسة أنواع فرعية، هي العدلات، والقعدات، و الحمضات، والخلايا اللمفاوية، والوحيدات. وتشمل الخلايا اللمفاوية أيضًا ثلاثة أنواع من الخلايا مثل الخلايا التائية في الغدة الصعترية thymus gland و الخلايا البائية في نخاع العظم والخلايا القاتلة الطبيعية natural killer cells (LaFleur-Brooks, 2018). يتميز ابيضاض الدم بزيادة الخلايا البيض، او الأرومات Blasts في نخاع العظم والدم (Bagasjvara *et al.*, 2016).

على الصعيد العالمي في عام 2018، احتل ابيضاض الدم المرتبة الخامسة عشر بين الأمراض الأكثر شيوعاً التي تم تشخيصها لـ 437033 حالة، و 309006 حالة وفاة، وهو ما يمثل السبب الحادي عشر للوفاة الناتجة عن الاضطرابات الخبيثة. ويكون التوزيع الجغرافي لايبيضاض الدم عالمياً، مع انتشار أعلى لمعدل الوفيات في البلدان الأكثر تقدماً، ومع ذلك فإن معدل الوفيات أيضاً يكون عالياً في البلدان النامية (Bray et al., 2018).

بناءً على ما قدمته جمعية السرطان الأمريكية لعام 2020، فقد تم تشخيص 178520 حالة لايبيضاض الدم، واللمفوما lymphoma، والورم نخاعي myeloma في الولايات المتحدة الأمريكية، وهذا يمثل 9.9% من ما يقدر بـ 1,806,590 حالة سرطان جديدة للحالات التي تم تشخيصها في ذلك العام. وبينما يتأثر كلا الجنسين، يكون ابيضاض الدم أكثر انتشاراً في الذكور. كانت معدلات الإصابة بابيضاض الدم حسب العمر عند الذكور والإناث في عام 2018 في الولايات المتحدة 6.1 و 4.3 لكل 100,000 على التوالي، وإنّ معدل الوفيات كان 4.2 لكل 100,000 من السكان بالنسبة للذكور مقارنة بـ 2.8 لكل 100,000 عند الإناث (Bray et al., 2018).

خلال عامي 2018 و 2019 تم توثيق 3102 حالة لايبيضاض الدم في المركز العراقي لأمراض الدم في مدينة الطب ببغداد، 1402 موثقة في 2018 و 1700 في عام 2019 لجميع أنواع ابيضاض الدم تراوحت أعمار المرضى بين 1 سنة و 90 سنة، معظم الحالات 36% تتراوح أعمارهم بين 15 عاماً. وأظهرت النتائج أنّ الذكور أعلى نسبة لمرضى ابيضاض الدم 58% مقابل 42% للإناث، وكان ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد الأكثر انتشاراً بين المجموعة المدروسة للعامين، 55.17% ذكور و 53.45% إناث يليها ابيضاض الدم النخاعي الحاد 36.87% مقابل 40.27%، وايبيضاض الدم اللمفاوي المزمن 5.23% مقابل 2.22%، وايبيضاض الدم النخاعي المزمن 2.73% مقابل 4.06% للذكور والإناث على التوالي. ولوحظ ارتفاع معدل انتشار ابيضاض الدم في بغداد بين (2018-2019) من 1402 الى 1700. معظم حالات ابيضاض الدم سجلت في سن 15، وكان الذكور في الغالب ضحية لهذا المرض مقارنة بالإناث حيث كانت أقل تواتراً، ولوحظ أنّ ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد كان النوع الأكثر شيوعاً (Abdulridha et al., 2021).

1-1-2: أنواع ابيضاض الدم Types of leukemia

يقسم ابيضاض الدم اعتماداً على نوع الخلايا البيض المصابة، إذا كانت الخلايا البيض غير الناضجة عبارة عن خلايا لمفاوية، فإن ابيضاض الدم يصنف على أنه ابيضاض الدم اللمفاوي Lymphoid، وإذا كانت الخلايا البيض غير الناضجة عبارة عن خلايا وحيدة وخلايا محببة، فإنه يعتبر ابيضاض الدم النخاعي Myeloid (Butcher, 2015). وبشكل عام يمكن تصنيف ابيضاض الدم على أنه حاد Acute (عندما تكون الخلايا البيض المصابة غير قادرة على أن تكون طبيعية)، أو مزمن Chronic (يمكن أن تؤدي الخلايا البيض المصابة عملها كخلايا طبيعية) (Ahmed et al., 2019).

1-1-1-2: ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)

يحدث هذا النوع من ابيضاض الدم في نخاع العظم والدم في الارومات اللمفاوية Lymphoblast غير الناضجة (التي تتحول إلى خلية لمفاوية ناضجة في الحالة غير المرضية) (NCI, 2014)، ويقسم ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد حسب التصنيف الفرنسي الأمريكي البريطاني French American British (FAB) إلى ثلاث فئات وهي L1 و L2 و L3 وفقاً لاختلافاتها الشكلية. خلايا L1 متجانسة ذات نواة مستديرة محاطة بسايتوبلازم خالي من الفجوات، وخلايا L2 أكبر حجماً من خلايا L1 لها نواة غير منتظمة ومتفاوتة السايوتوبلازم، أما خلايا L3 متجانسة الشكل، مع نواة مستديرة وسايتوبلازم يحتوي على فجوات (Seiter, 2020) شكل b (1-2).

يوجد كروموسوم فيلادلفيا (q34; q11) (9, 22) t في أقل من 5% من الأطفال المصابين بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، و حوالي 30 % في البالغين، وفي أكثر من 50 % من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد الذين تزيد أعمارهم عن 50 عاماً. وينتج عن هذا الانتقال جين هجين BCR-ABL1 يشفر لبروتين 210 كيلو دالتون، و يلاحظ BCR-ABL1 (p210) في نسبة كبيرة من المرضى المصابين بابيضاض الدم النخاعي المزمن ولكن أقل من ثلث هؤلاء مع ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، ويوجد بروتين أقصر هو p190 كيلو دالتون في 50% من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد البالغين، وفي 80% من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد الاطفال (Provan and Gribben, 2010).

2-1-1-2: ابيضاض الدم النخاعي الحاد Acute Myeloid Leukemia (AML)

هو النوع الأكثر شيوعاً بشكل خاص عند البالغين الشباب ويعرف باسم ابيضاض الدم النخاعي الحاد acute myelogenous leukemia، و ابيضاض الدم الحاد غير اللمفاوي - acute non lymphocytic leukemia (Heffner, 2007; Todd *et al.*, 1979). يتميز بتكوين خلايا ارومية غير ناضجة وقد يصنع نخاع العظم في ابيضاض الدم النخاعي الحاد أيضاً كريات دم حمراء وصفائح دموية غير طبيعية (Anilkumar *et al.*, 2020). وتشمل أعراض ابيضاض الدم النخاعي الحاد فقر الدم (Anemia) والحمى وتقرحات الأغشية المخاطية وقصور الخلايا الحبيبية (C. R. UK, 2020).

تتشكل خلايا هذا النوع من ابيضاض الدم من الخلايا النخاعية، قسمت الخلايا الارومية حسب التصنيف الفرنسي الامريكي البريطاني إلى نوعين Type I و Type II وكلا النوعين لهما أنوية مركزية بارزة يتراوح عددها عادة من ثلاثة إلى خمسة، الكروماتين واضح المعالم وغير كثيف. وللنوع الأول عدد أقل من الحبيبات السائتوبلازمية، مقارنة بالارومات من النوع الثاني. إن العامل الرئيسي المميز لابيضاض الدم النخاعي الحاد من أنواع ابيضاض الدم الأخرى هو أنواعها الفرعية الثمانية، وفقاً لتصنيف FAB لتشخيص ابيضاض الدم من النوع M1 إلى M6، وعادة ما تكون نسبة الأرومات تزيد عن 30% في مسحة نخاع العظم في حالة الإصابة بابيضاض الدم النخاعي الحاد (Shah *et al.*, 2021) شكل (1-2)e.

هناك نوعان من التغيرات الشكلية لخلايا الدم البيض في ابيضاض الدم النخاعي الحاد، حيث تحتوي الخلايا الورمية على وفرة من الحبيبات الوردية والعديد من قضبان ايور Auer rods، وتحتوي الخلايا أنوية ثنائية الفص قليلة الحبيبات، وكلا التغيرين مرتبطان بالاندماج الجيني PML-RARA (t(15;17)(q24 ; q21) وتلاحظ هذه الانتقالات في 99% من الحالات، والنسبة 1% المتبقية لانتقالات متغيرة تتضمن تعطيل مستقبل جين حامض الريتينويك ألفا retinoic acid receptor alpha (RARA) وبالتالي تراكم خلايا الدم البيض التي لا تتضج أو تتمايز بعد مرحلة الخلايا النقوية فتزداد اعداد هذه الخلايا غير الطبيعية وتبدأ اعراض المرض (Foucar and Anastasi, 2015).

3-1-1-2 : ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)

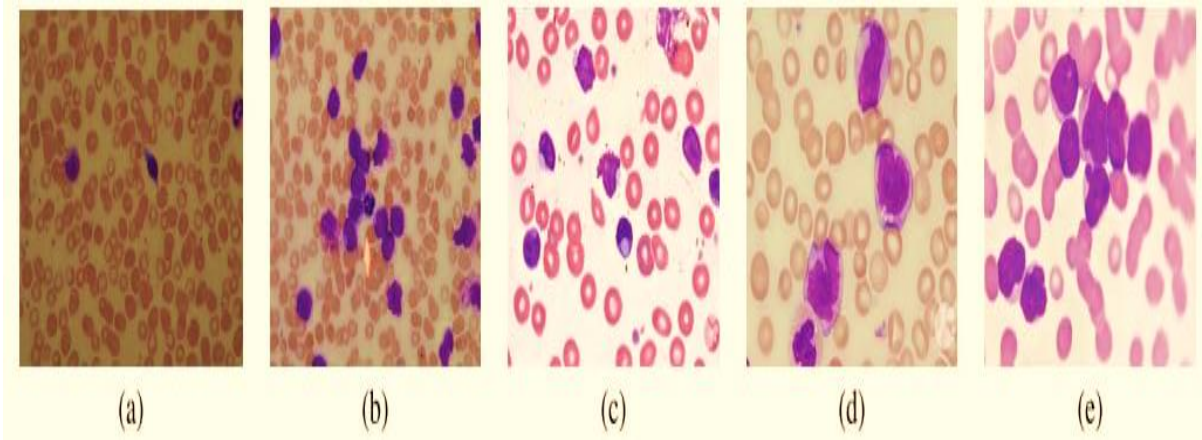
وهو شائع عند البالغين خاصة الأشخاص الذين تجاوزوا سن الستين، وعند الرجال أكثر من النساء. يختلف هذا النوع من ابيضاض الدم عن الأنواع الأخرى من حيث الأعراض كالتهاب الغدد اللمفاوية، وفقدان الشهية، وفقدان الوزن، والتعب والضعف، ويتميز بتراكم الخلايا اللمفاوية، ويظهر في ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن ما يقرب من 90% من الخلايا البيض مشابهه للخلايا الطبيعية، وتكون الخلايا اللمفاوية في هذا النوع من الإصابة قليلة الإنتاج للأجسام المضادة مما يجعل المريض أكثر عرضة للإصابة بالالتهابات، ويكون الكروماتين أحيانا أقل كثافة نسبيا مما في الخلايا اللمفاوية الطبيعية شكل (1-2)c، ولذلك يكون تشخيص ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن مهمة صعبة، في العديد من الخلايا اللمفاوية تكون الأنوية مرئية بوضوح مع سايتوبلازم معتدل (C. R.UK, 2020).

4-1-1-2: ابيضاض الدم النخاعي المزمن Chronic Myeloid Leukemia (CML)

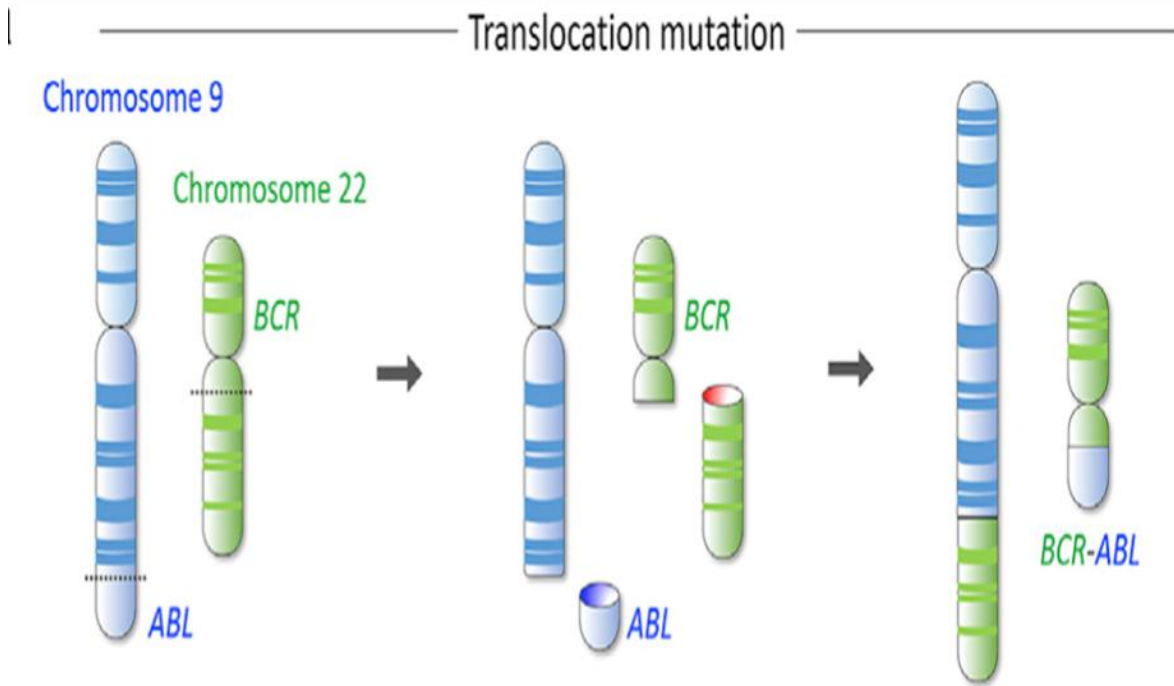
يسود في الشباب والبالغين في منتصف العمر، وفي هذا النوع من ابيضاض الدم يكون هناك إنتاج مفرط للخلايا الحبيبية غير الناضجة التي تتسرب من نخاع العظم وتنتقل إلى مجرى الدم، علاوة على ذلك فإن النسبة المئوية للخلايا النخاعية أقل من 10% مع الإنتاج المفرط للعدلات، والوحيدات، و الحمضات شكل (1-2)d. وفي معظم الحالات الخلايا النخاعية والعدلات تتجاوز نسبتها الخلايا البيض الطبيعية. ويشمل ابيضاض الدم النخاعي المزمن عدة أعراض منها : فقر الدم، وفقدان الوزن، والتضخم التدريجي في الطحال، والحمى، والتعرق الليلي. و بمرور الوقت يعاني المريض انخفاضاً في كمية كريات الدم الحمر والصفائح الدموية مؤدياً إلى فقر الدم (Shah et al., 2021)، ويرتبط سرطان ابيضاض الدم النخاعي المزمن باندماج جيني BCR على الكروموسوم 22 و ABL1 على الكروموسوم 9 مما يؤدي إلى BCR - ABL1، وينتج هذا الاندماج غير الطبيعي عن إزاحة متبادلة بين الكروموسومين 9 و 22 ويؤدي إلى ظهور حالة غير طبيعية لكروموسوم 22 تسمى كروموسوم فيلادلفيا. حيث يكون الكروموسوم 22 محتويًا جين الاندماج BCR-ABL1 (Heasman et al., 2011; Leibowitz et al., 1989) الشكل (2-2).

ينتج عن (BCR- ABL1) بروتينا 210 كيلو دالتون يشار إليه عادة باسم "p210" BCR-ABL1 (Bennour et al., 2013)، ويؤدي بروتين الإندماج هذا إلى تكاثر السلالة النخاعية

myeloid lineage، والتي تظهر عادةً على شكل زيادة في العدلات، والحمضات، والقعدات في الدم المحيطي (Deininger et al., 2020).



الشكل (1-2) صور لعينات الدم (a) عينة من الخلايا البيض السليمة (Labati et al., 2011)، (b) ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، (c) ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن، (d) ابيضاض الدم النخاعي المزمن، (e) ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Ahmed et al., 2019).



الشكل (2-2) طفرة الانتقال بين الكروموسوم 9 والكروموسوم 22 . يحتوي الكروموسوم 9 والكروموسوم 22 على جيني *ABL* و *BCR* على التوالي. وعند الانتقال يتم دمج الجينين معًا وتشكيل جين الاندماج *BCR-ABL* (Manley et al., 2020).

2-1-2 : أسباب ابيضاض الدم Causes of leukemia

لا يزال السبب الدقيق لايبيضاض الدم غير واضح و يعتقد أنّ هناك أسبابا متعددة العوامل تنطوي على التفاعل بين مختلف الجوانب الناشئة من البيئة وكذلك الجينات البشرية، إلا أنّ هناك عددا من العوامل تزيد من فرصة الإصابة بسرطان الدم منها :

- التعرض لمواد كيميائية معينة لفترة طويلة المدى كالمستويات العالية من البنزين تكون سببا خطرا للإصابة بابيضاض الدم، فضلا عن ذلك فمن المعروف أنّ التدخين مرتبط بسرطانات الفم والرئة والبلعوم، ولكن أظهرت الدراسات أنه يمكن أن يؤثر أيضًا على الخلايا التي لا تتلامس مباشرة مع الدخان (Cogliano *et al.*, 2010; Deschler and Lübbert, 2006).

- التعرض للإشعاع بجرعات عالية على سبيل المثال بعض الناجين من التعرض للقنابل الذرية التي أُلقيت على هيروشيما و ناكازاكي، المرتبطة بزيادة خطر الإصابة بسرطان الدم مثل ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن، وأيضا يتعرض الأشخاص الذين خضعوا لأنواع معينة من العلاج الكيميائي والعلاج الإشعاعي لأنواع أخرى من السرطان لخطر متزايد للإصابة بأنواع معينة من سرطان الدم (Buffler *et al.*, 2005).

- العمر والعرق من العوامل المهمة في الإصابة بسرطان الدم على سبيل المثال، في المملكة المتحدة 42.8% من جميع أنواع ابيضاض الدم تصيب الأفراد فوق سن 65 عامًا (Deschler and Lübbert, 2006). في الولايات المتحدة تفيد التقارير بأن المعدل الكلي للإصابة بابيضاض الدم حسب العمر هو الأعلى في السكان البيض عند 15 سنة، يليهم السود عند 11 سنة (Bispo *et al.*, 2020).

قد تؤدي هذه العوامل الى تشوهات جينية تسبب الأورام نتيجة التغيرات الجينية أو اللاجينية (genetic or epigenetic)، قد تنتشر إلى أجزاء أخرى من الجسم لتشكل مجموعة فرعية من الأورام، فالنمو غير المسيطر عليه من الخلايا يكون في مجموعة تسمى ورم (neoplasm or tumor) ويشكل كتلة تسمى بـ (lump or mass) (Sitki Copur, 2019). ترتبط الأورام بتراكم العديد من التغييرات الجزيئية، وعدم استقرار الجينوم genome instability والطفرة mutation، وتؤثر هذه التغييرات الجزيئية على الوظيفة الخلوية داخل الورم، وتتوج في السمات المميزة للورم وهي بدء التكاثر المستمر initiation، ومقاومة موت الخلايا المبرمج resistance apoptosis والشيخوخة senescence، وتكوين الأوعية angiogenesis، والاجتياح invasion، والورم الخبيث metastasis، وتحرير الطاقة الخلوية cellular energetics، وتجنب تدمير المناعة avoiding immune destruction،

Hanahan and Weinberg,) tumor-promoting inflammation الورم المعززة للورم والالتهابات المعززة للورم (2011).

ارتبطت التغيرات الجينية (الطفرات) بالأورام (Kagohara *et al.*, 2018; Lengauer *et al.*, 1998)، وكل هذه التغيرات الجينية تؤدي في النهاية إلى شذوذ في التعبير الجيني، رغم أن هذه التغيرات الجينية لا تفسر بشكل كاف اضطرابات الوظيفة الخلوية في السرطان (Baylin, 2016). وتشمل الجينات الرئيسة الأربعة للأورام الجينات الكابتة للورم tumor suppressor genes (المتبطة لنمو الخلية والانقسام)، الجينات الورمية الأولية proto-oncogenes (تحفيز نمو الخلايا وانقسامها)، جينات إصلاح الحامض النووي DNA repair genes (إصلاح الحامض النووي التالف) (Nyqvist *et al.*, 2011; Hanahan and Weinberg, 2020)، وجينات موت الخلايا المبرمج genes for apoptosis (Kiraz *et al.*, 2016). يتطور الورم بشكل سريع بواسطة تراكم التشوهات الجينية لفتنيتين مختلفتين من مسببات الأورام هما الجينات المسرطنة أو مثبطات الأورام (Colaprico *et al.*, 2020; Vogelstein *et al.*, 2013).

تعتبر العيوب والتشوهات الجينية من عوامل الخطر الرئيسة المرتبطة بحدوث أنواع معينة من ابيضاض الدم. لقد أيدت الأدلة الجزيئية وجود اندماج بين جين *TEL* و جين *AML1* في حوالي ربع الأطفال المصابين بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، وتلك الانتقالات الصبغية عادة ما تكون قد تطورت قبل الولادة (Gilham *et al.*, 2005). و إنَّ عددا من المتلازمات التي تنتج عن الطفرات الجينية والموجودة عند الولادة تزيد من خطر الإصابة بابيضاض الدم، وتشمل هذه المتلازمات متلازمة بلوم bloom syndrome، ومتلازمة بلاك فان دايموند blackfan-diamond syndrome، وفقر الدم فانكوني fanconi anemia، ومتلازمة داون down syndrome، و التثلث الصبغي (الكروموسومي) trisomy 8 الناتج عن مشكلة كروموسومية موجودة عند الولادة تزيد من خطر الإصابة بابيضاض الدم (Buffler *et al.*, 2005).

2 - 2: الطفرات الوراثية Genetic mutations

الطفرة الوراثية هي تغير يمكن أن يحدث في الجين المسيطر على صفة معينة أو في جزء منه مما يؤدي إلى حدوث تباينٍ مظهري في الصفة، وإنّ هذا التغير المفاجئ الذي يصيب المادة الوراثية نتيجة الطفرة قد يؤدي إلى إحداث تحسين أو اضطراب في وظيفة البروتين (Koopaei and Koshkoiyeh, 2011). ويمكن أن تحدث الطفرات من خلال التعرض للعوامل المطفرة (Mutagenic) مثل بعض المواد الكيميائية والتعرض للأشعة كالأشعة السينية (X-ray) والأشعة فوق البنفسجية (UV light) وعدد من العوامل البيئية الخارجية والداخلية، وأيضاً تظهر الطفرات المختلفة في حال لم يتم اصلاح الخطأ في عملية التضاعف المسؤول عنها انزيم DNA polymerase، إلا أنّ أغلب الطفرات تظهر بشكل تلقائي في أثناء عملية التضاعف، قد تشمل الطفرة تغيرات تتضمن عدد من النيوكلويدات بحيث تصل إلى كروموسوم كامل أو مجموعة من الكروموسومات فتكون طفرة كروموسومية (Chromosomal mutation)، أو تغيير قطعة صغيرة جدا من الـ DNA بحيث يشمل نيوكلويدة واحدة أو زوج منها فتسمى بالطفرة النقطية (Point mutation) (Bertram, 2000). وهناك ثلاثة أنواع من الطفرات النقطية حسب نوع تأثير الطفرة الحاصلة :

- الطفرة الصامتة (Silent mutation) :

هي تغيير قاعدة نيتروجينية واحدة، ولكن هذا التغيير لا يؤثر في وظيفة الجين لذلك لا توجد تغييرات في تسلسل الأحماض الأمينية أو البروتين المنتج (Ribeil et al., 2017).

- الطفرة المؤثرة (missense mutation) :

تنتج عن استبدال قاعدة نيتروجينية واحدة في المناطق التعبيرية وتؤثر بشكل فعال في نوعية البروتين المنتج لأنها تسبب تبديل الحامض الأميني بحامض أميني آخر مختلف عنه كيميائياً، والطفرات المؤثرة لها عدة تأثيرات فيمكن أن تؤدي إلى انخفاض أو تغيير وظيفة البروتين (Ribeil et al., 2017; Johnston, 2006).

- الطفرة المحايدة Neutral mutation :

هنا يحصل التغير في المنطقة المشفرة للجين ويؤدي إلى تغيير في السلسلة ينتج عنه تغير الحامض الأميني إلى حامض آخر لا يختلف عنه كيميائياً بقدر يؤدي إلى إحداث فرق كبير في البروتين الناتج (Raza et al., 2016).

2-2-1: تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

يُوصف الموقع الذي يمكن ان تشغله إحدى قاعدتين نيتروجينيتين فتكون أليلاً معيناً وعندما تحل قاعدة اخرى تكون أليلاً آخراً في الجينوم وبالتالي حصول إختلاف أليلي بتعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة (Yang *et al.*, 2013)، قد يحصل هذا التغير في أي منطقة من الجينوم سواء في المناطق المشفرة (Exon) او في المناطق غير المشفرة (Intron) أو في منطقة الحفاز (Promoter) للجين او بين الجينات (Mishra *et al.*, 2017). إنّ تعدد الأشكال الجيني هو وجود متغيرين على الأقل فيما يتعلق بتتابع الجينات، وبنية الكروموسوم، أو النمط الظاهري (تتابع الجينات و المتغيرات الكروموسومية ترى بتكرار 1% أو أعلى). يتكون الجينوم البشري من 6 مليار نيوكليوتيد من الحامض النووي مجتمعة في مجموعتين من 23 كروموسوم، مجموعة واحدة موروثه من كل والد. احتمالية تعدد أشكال الـ DNA في البشر كبيرة نظراً للحجم الكبير نسبياً للجينوم البشري (Teama, 2018 ; Buckingham, 2012).

2-2-2: أنماط حدوث تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة في الجينوم

يعتمد حدوث تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة في الأساس على نوع الطفرة، فقد يتم تحويل القاعدة النيتروجينية الى قاعدة أخرى من النوع نفسه البيورين - البيورين (A↔G) أو بيريميدين - بيريميدين (C↔T) فتسمى بطفرة الإستبدال المتماثل (التبدلات)(Transition)، وقد تتغير القاعدة النيتروجينية بأخرى من نوع آخر البيورين - بيريميدين أو العكس مثل (A-G↔T) فتسمى بطفرة الإستبدال المختلف (التحولات) (Transversion) (Wang *et al.*, 1998). ويعد تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة ظاهرة شائعة وتؤثر على تعبير الـ mRNA، وتمت دراستها على نطاق واسع للتمييز بين التعبير الجيني وتخليق البروتين (Ghosh *et al.*, 2021). وقد يؤثر تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة في الجينات المسؤولة عن إصلاح الحامض النووي ووظيفة البروتين، فضلاً عن ذلك قد تؤثر على تطور أنواع مختلفة من السرطان (Patrono *et al.*, 2014).

2-2-3: أنواع تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة في الإكسونات Types of SNPs in exons

قد يقع تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة ضمن التسلسل المشفر للجين، أو المنطقة غير المشفرة، أو في المنطقة بين الجينات regions between genes. ينقسم تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة في منطقة تشفير الجين إلى تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة المترادفة (synonymous) وغير المترادفة (nonsynonymous) (Sukhumsirichart, 2018).

1. تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة المترادفة: أظهرت العديد من الدراسات أن تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة المترادفة تؤثر على وظيفة الجين من خلال تغيير التعبير عن الجينات المجاورة، وعملية ربط الرنا المراسل (mRNA) splicing messenger RNA، وطي البروتين protein folding، ولا تغير تسلسل الأحماض الأمينية للبروتين المشفر (Deng et al., 2017; Koehn et al., 2008).

2. تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة غير المترادفة تنقسم إلى نوعين:

- تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة المؤثرة: تغير النيوكليوتيدات المفردة وينتج عنها كودون يرمز لأحماض أمينية مختلفة، مما يؤدي إلى فقدان وظيفة البروتين (Deng et al., 2017).
- تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة غير المؤثرة: هي طفرة نقطية تؤدي الى نسخ شفرة الايقاف stop code وتنتج بروتين غير وظيفي. إنَّ التغيرات في تسلسلات الأحماض الأمينية يمكن أن تغير البنية الثانوية للبروتينات عن طريق زيادة أو تقليل الترابط الهيدروجيني و الفسفرة، مما يؤثر على تفاعلات ووظائف البروتين، لذلك تتغير مسارات إشارات الخلية وكذلك مستوى البروتينات الكابطة للأورام والمسرطنة (Deng et al., 2017). ويوجد أكثر من 13000 لتعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة في الاكسونات لجينات مختلفة، منها 58% عبارة عن غير مترادفة (Tenessen et al., 2012). يؤثر تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة غير المترادفة على قابلية الإصابة بالأورام بسبب التغيرات في بنية ووظيفة البروتينات المشفرة (Deng et al., 2017).

4-2-2: التعدد الشكلي في الاضافة والحذف Insertion and deletion polymorphism

عمليات الإضافة والحذف (Indels) هي إضافة أو حذف لوحد أو أكثر من النيوكليوتيدات في تسلسل الحامض النووي. وتحدث عمليات الإضافة والحذف بكثرة في الجينوم البشري، وتحتل المرتبة الثانية بعد تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة، وتشكل 15-21% من تعدد الأشكال الوراثية (Lin *et al.*, 2017; Mullaney *et al.*, 2010). وأثبتت العديد من الدراسات دور عمليات الإضافة والحذف في تطوير عدد من الاورام (Lin *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2016).

3-2 : الجينات الكابتة للورم Tumor suppressors genes

هي جينات تثبط الورم وبذلك تحمي الخلية، وتشفر لبروتين يشارك في التحكم بالنمو الخلوي، وان فقدان وظيفة الجينات المثبطة للورم يعزز تكوين أنواع عديدة من الاورام في الانسان اكثر من تنشيط الجينات الورمية الابتدائية Proto- oncogene، وفي حالة تضررها أو تثبيطها قد تتحول الخلية إلى ورمية (Weinberg, 2013)، ومن هذه الجينات:

1-3-2: جين p53

جين p53 ويسمى ايضا جين (TP53) هو جين مثبط للأورام تم تعريفه ودراسته بشكل دقيق في ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Barbosa *et al.*, 2019). يقع p53 في الإنسان في الكروموسوم 17p13.1 (Matlashewski *et al.*, 1984)، ويشفر جين p53 لبروتين نووي ينظم دورة الخلية، وقد وصف هذا الجين على أنه حارس أو حامي الجينوم فهو مسؤول عن إنتاج بروتين يحفز على قتل الخلايا التي تحتوي على DNA متضرر لمنعها من التحول إلى خلايا سرطانية، ويؤدي خلال التنظيم في مسار p53 إلى تغير في دورة الخلية cell cycle، وموت الخلية المبرمج apoptosis، والشيخوخة senescence، وإصلاح الحامض النووي DNA repair، والتمثيل الغذائي metabolism، والالتهام الذاتي autophagy. وظهر مؤخرًا أن طفرات TP53 مرتبطة بنمط نووي معقد في ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Ohgami *et al.*, 2015)، يعمل جين TP53 على مكافحة الورم من خلال توقف انقسام الخلية وموت الخلية المبرمج apoptosis، فعند إصابة الحامض النووي بضرر، يعمل بروتين p53 على إيقاف نمو الخلية من خلال إيقاف دورة الخلية في مرحلة النمو G1 (Prokocimer *et al.*, 2017).

2-3-2: جين PML

جين ابيضاض الدم النخاعي (PML) promyelocytic leukemia تم وصفه أيضًا بأنه مثبط للورم، ويشارك في تنظيم دورة الخلية، وتثبيط النمو للخلايا غير الطبيعية، وموت الخلايا المبرمج، وإنه مسؤول عن أسئلة *p53 acetylation* (Pearson *et al.*, 2000). ويمكن أن يمنع هذا الجين نسخ البروتينات المضادة لموت الخلايا المبرمج. يمنع تمايز الخلايا المكونة للدم عندما يندمج مع مستقبلات حامض الرايبينويك ألفا (RARα) retinoic acid receptor alpha بسبب الانتقال الكروموسومي (Bernardi and Pandolfi, 2003).

2-3-3: جين RUNX1

هو عامل نسخ Transcription factor (TCF) يشارك بشكل رئيسي في تكاثر الخلايا، وتمايز الخلايا الجذعية المكونة للدم، وموت الخلايا المبرمج (Otalora *et al.*, 2019). وقد شخصت طفرات الإطار frameshift والطفرة المؤثرة missense في جين *RUNX1*، وتظهر عائلة *RUNX* دورًا مزدوجًا بصفاتها الجينات المسرطنة أو مثبطات الورم. وسجلت الطفرة في جين *RUNX1* لحوالي 10% من ابيضاض الدم النخاعي الحاد حديثة التشخيص (de novo) (DiNardo and Cortes, 2016 ;) (Gaidzik *et al.*, 2016).

2-4: الجينات الورمية Oncogenes

تعرف الجينات الورمية في الحامض النووي الطبيعي بالجينات الورمية الإبتدائية Proto-oncogenes، والتي تشفر عن بروتينات وظيفتها التحكم بدورة الخلية وتمايزها، وقد يتحول الجين الورمي الإبتدائي من مفيد الى ضار حيث يزداد نشاطه أو يندمج، وهذا التحول يحدث إما بتغيير قاعدة واحدة وتراكمها في الجين، أو انتقال الجين من الكروموسوم الأصلي إلى كروموسوم آخر، أو عند وجود الجين بعدة نسخ، لذلك قد تنتج الخلية المصابة بروتينا شادا وتتحول من خلية طبيعية إلى خلية سرطانية (الربيعي والجنابي، 2008)، ومن هذه الجينات:

2-4-1: شبيه التايروسين كائيز3 (FLT3) Fms-like tyrosine kinase3

يُعرف جين شبيه التايروسين كائيز3 أيضاً باسم كائيز الكبد الجنيني fetal liver kinase 2 (Flk2) و كائيز الخلايا الجذعية البشرية (STK1) human stem cell kinase و CD135. وله أدوار مهمة في تكون الدم والجهاز المناعي، ويتم التعبير عنه في الخلايا الجذعية المكونة للدم (السلفية غير الناضجة) في نخاع العظم والغدة الصعترية والغدد اللمفاوية (Szilvassy, 2003). وشبيه التايروسين كائيز3 هو من الجينات الورمية الإبتدائية لابيضااض الدم النخاعي الحاد، ويرتبط بالتكاثر والبقاء والتخصص، وله نوعان من الطفرات: الترادف الداخلي المزدوج (ITD) internal tandem duplication وطفرة التايروسين كائيز (TKD) tyrosine kinase domain، ويمكن العثور على FLT3-ITD في ثلث مرضى ابيضااض الدم النخاعي الحاد، وهي علامة تشخيص جزئية غير دقيقة، بينما أفادت التقارير أن FLT3-TKD تكون علامة تشخيص جيدة (Boddu *et al.*, 2017; Wakita *et al.*, 2013). وجدت دراسة أن الخلايا في حالة ابيضااض الدم النخاعي الحاد المصابة بطفرة FLT3-ITD تتمكن من تنشيط المستقبل بشكل أساسي وجعل الخلايا تتكاثر بشكل لا يمكن السيطرة عليه (El Fakih *et al.*, 2018)، ولذلك تقاوم الخلايا في ابيضااض الدم النخاعي الحاد العلاج الكيميائي (Lee *et al.*, 2017).

2-4-2: جين KIT

جين *KIT* عبارة عن مستقبلات تايروسين كائيز type III 145 kDa تعمل كمستقبل لعامل النمو (Yuzawa *et al.*, 2007)، ويُفعل جين *KIT* على سطح الخلية عامل الخلية الجذعية stem cell factor (SCF)، ويؤدي إلى تنشيط المسارات الخلوية المتضمنة بقاء الخلية أو تكاثرها أو توجيهها أو تمايزها. وإنّ الطفرة في جين *KIT* من العوامل المسببة للأورام الرئيسية في مجموعات فرعية من ابيضااض الدم النخاعي الحاد، وفي ابيضااض الخلايا البدئية mast cell leukemia، وأورام الجهاز الهضمي (gastrointestinal stromal tumors (GIST)، ولوحظ الإفراط في التعبير عن stem cell factor (SCF) والنوع الشائع (WT) wild-type للجين *KIT* في عدد من الأورام، بما في ذلك 50% من ابيضااض الدم النخاعي الحاد (Le Gall *et al.*, 2015).

2-4-3: عائلة RAS

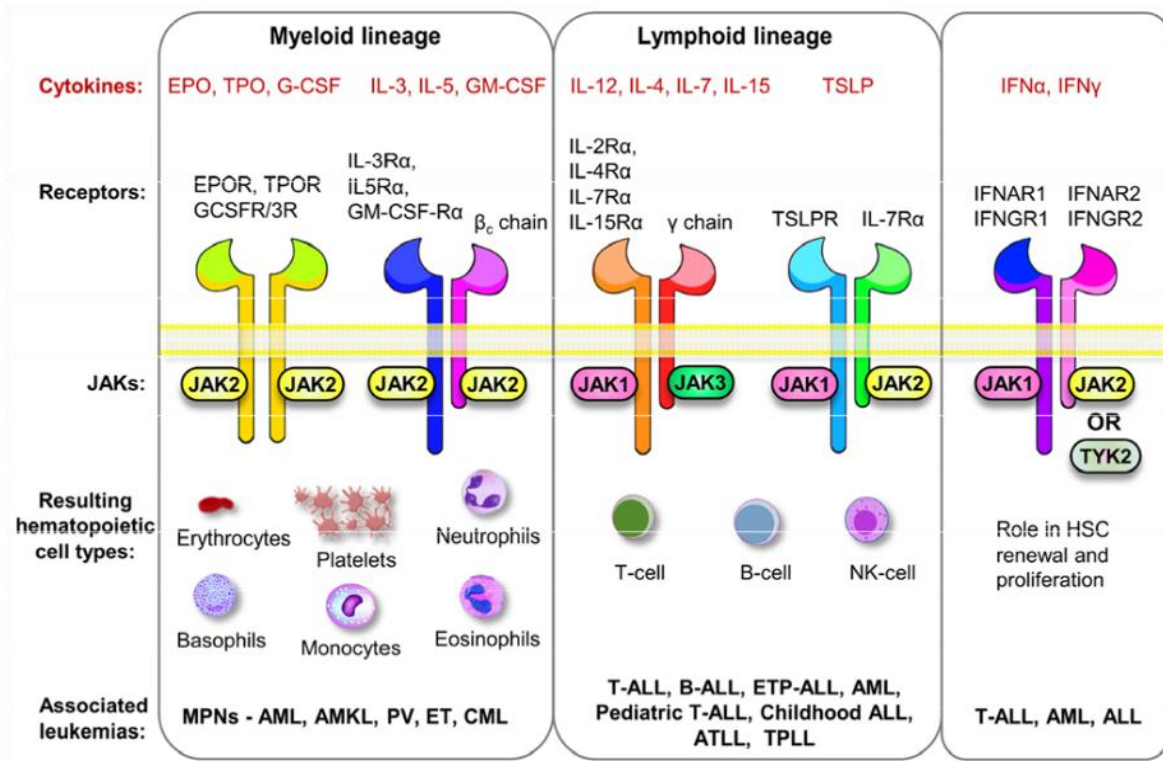
وهي نوع من الجينات الورمية الإبتدائية في ابيضاض الدم النخاعي الحاد. وتشفر RAS لبروتين p21، الذي يقع على السطح الداخلي لغشاء الخلية، وتنشط إنزيم كوانوسين ثلاثي الفوسفات Guanosine triphosphate (GTP) وتشارك في تنظيم إشارة تكاثر الخلايا. KRAS هي الطفرة السائدة الأكثر شيوعاً في السرطان و تؤدي طفرات RAS إلى معقد من GTP - البروتين النشط و بروتين RAS، مما يجعل هذا المعقد نشطاً بشكل مستمر ويؤدي إلى تكاثر و انتشار خلايا ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Stephen et al., 2014). زيادة فعالية KRAS تؤدي الى تغيرات تتضمن الطفرات والتعبير الجيني غير الطبيعي (Infante et al., 2012).

2-5: مسار اشارة جاك / ستات JAK / STAT signaling pathway

مسار اشارة جاك/ستات (JAK-STAT signaling pathway) هو سلسلة من التفاعلات بين البروتينات في الخلية، ويشارك في عدة عمليات مثل المناعة ونمو الخلايا والانقسام وموت الخلايا و التسرطن، و يُوصل المعلومات من الإشارات الكيميائية خارج الخلية إلى نواة الخلية مما يؤدي إلى تنشيط الجينات عبر عملية النسخ، ويتكون مسار إشارات JAK / STAT من ثلاثة مكونات رئيسية : مستقبلات ربط سطح الخلية، ومستقبلات Janus Kinases (JAK) المرتبطة داخل الخلايا، ومحول الاشارة ومنشط نسخ البروتينات Signal transducer and activator of transcription proteins (STAT) (Vainchenker and Constantinescu, 2013)، ويؤدي ارتباط الساييتوكاين كالانترفيرون Interferon والانترلوكين Interleukin بمستقبلاته وبالتالي اقتراب نوعي JAKs جنبا إلى جنب لنقل مجموعة الفسفور وفسفرة التايروسين داخل الخلايا، ثم فسفرة STATs، لتدخل STATs المفسرة إلى النواة حيث تنظم الجينات المستهدفة المتعلقة بالتكاثر والتميز والبقاء (Seif et al., 2017).

تصنف مستقبلات الساييتوكاينات المرتبطة بـ JAK كمستقبلات خلوية من النوع الأول type I والنوع الثاني type II، وهذه المستقبلات لا تكون رئيسية في تنشيط الكاينيز داخل الخلايا ولكنها تعتمد على ارتباطها بأفراد معينين من عائلة JAK. وتسمى مستقبلات النوع الأول أيضاً بمستقبلات hematopoietin وتحتوي على أكبر مجموعة من مستقبلات الساييتوكاين. ويعد مستقبل النوع الأول IL7 سلسلة مستقبلات ألفا (IL7Rα) receptor alpha (IL7Rα) مهما للتطور الطبيعي لخلايا B و T، وللأداء الجيد للخلايا التائية الناضجة (Barata et al., 2019).

تؤدي الطفرات في مسار IL7R / JAK / STAT إلى توقف التكاثر والتمايز والتي يمكن ملاحظتها في كل من ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد نوع (B و T). ويقدر حدوث تنشيط الطفرات في 20-30 % من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد-T، و 11% من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد-B (Montaño *et al.*, 2018) شكل (2-3). نظراً لأن إشارات JAK-STAT يمكن أن تسمح بنسخ الجينات المشاركة في انقسام الخلايا، فإن أحد الآثار المحتملة لإشارات JAK-STAT المفرطة هو تكوين السرطان، وإن مستويات التنشيط العالية لـ STAT ارتبطت بالسرطان (Thomas *et al.*, 2015). يمكن أن تؤدي الطفرات في JAK2 إلى ابيضاض الدم والأورام اللمفاوية، وقد اقترح أن تكون الطفرات في الاكسونات 12 و 13 و 14 و 15 من جين JAK2 عاملاً خطراً في الإصابة بسرطان الغدد اللمفاوية أو ابيضاض الدم (Jatiani *et al.*, 2010). فضلاً عن ذلك، يمكن للطفرات في أنواع من STAT أن تزيد من إشارات JAK-STAT في الخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا التائية، مما يعزز تكاثر هذه الخلايا بشكل كبير للغاية ويزيد من احتمالية الإصابة بابيضاض الدم (Groner *et al.*, 2017).



الشكل (2-3) السايوتوكاينات المختلفة والمستقبلات المقابلة المرتبطة بمستقبلات (JAKs) وأنواع الخلايا المكونة للدم الناتجة عن مجموعة إشارات JAK. ويُظهر الجزء السفلي من الشكل ابيضاض الدم المرتبط بتنظيم JAK غير الطبيعي، وقد تم ربط تنظيم JAK غير الطبيعي في عائلة IFN بابيضاض الدم (Raivola *et al.*, 2021).

2-6 : تشخيص ابيضاض الدم Diagnosis of leukemia

إحدى الطرق التقليدية لتشخيص ابيضاض الدم هي تحليل التاريخ الطبي للشخص وعائلته. و يتطلب ذلك سلسلة من المواعيد وفحوصات الدم، وإنّ التحليل الوراثي الخلوي هو نوع آخر من طرق تشخيص ابيضاض الدم حيث يلاحظ وجود الشذوذ في كروموسومات الفرد (Raje and Rangole, 2014).

تعداد الدم الكامل Complete Blood Count(CBC) هي الطريقة التقليدية لتشخيص ابيضاض الدم يقوم بها الأطباء أثناء فحصهم خلايا الدم البيض، وكريات الدم الحمر والصفائح الدموية. ويحدد تعداد الخلايا ابيضاض الدم ولكنه غير موثوق به لتأكيد الإصابة ولهذا السبب يتم سحب عينة من نخاع العظم والفحص المجهرى لمسحة الدم التقليدية لتشخيص ابيضاض الدم (Short et al., 2020).

يتطلب تشخيص ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن وجود 5000 / مايكرو لتر خلية لمفاوية من نوع B في الدم المحيطي لمدة 3 أشهر على الأقل، وخلايا الدم البيض الموجودة في مسحة الدم هي الخلايا اللمفاوية الناضجة بشكل مميز مع حدود ضيقة من السايكوبلازم، ونواة كثيفة يصعب تمييزها ولها كروماتين متجمع جزئياً (Hallek and Al-Sawaf, 2021; Melo et al., 1986)، ويمكن العثور على هذه الخلايا مع خلايا أكبر أو غير نمطية، خلايا منقسمة، أو خلايا لمفاوية أولية prolymphocytes والتي قد تشكل ما يصل إلى 55% من الخلايا اللمفاوية في الدم، والخلايا اللمفاوية البائية الأولية (B-PLL) prolymphocytic leukemia التي تزيد عن هذه النسبة تفضل لتشخيص هذه الحالة، خلايا smudge توجد كبقايا للخلايا او على شكل بقع، وهي سمات شكلية مميزة أخرى موجودة في حالة ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (Hallek et al., 2018).

بشكل عام يتم تشخيص ابيضاض الدم عن طريق الفحص لصور مسحة الدم المجهرية بواسطة الأطباء والخبراء، وتعتبر الكيمياء النسيجية المناعية Immunohistochemistry طريقة أخرى لتحليل عينات الدم حيث تعتمد على مستضدات الخلايا في الأنسجة التي يتم تحليلها لتشخيص ابيضاض الدم، وهناك طرق أخرى تشمل تقنيات الأشعة التداخلية كالزرعة، وتفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)، وعلم الوراثة الخلوية الجزيئية (Garrett et al., 2002).

Cell and Transcriptional Regulation**7-2 : الخلية وتنظيم النسخ**

تعرف دراسة تنظيم تعبير الجين بالوراثة فوقية epigenetics، وتعني التعديل الخارجي للحامض النووي، وقد تم توضيح هذا المفهوم من قبل Conrad Waddington (1957). وتعرف الوراثة فوقية أيضا على أنها دراسة تغيرات التوريث الانقسامي الاعتيادي أو الاختزالي في وظيفة الجين (Russo *et al.*, 1996). يصف الاستخدام الحديث لمصطلح " الوراثة فوقية " بشكل عام أي اضطرابات في حالة الكروماتين كأن تكون الميثلة Methylation او تعديلات الهستون Histone modification (Bird, 2007). يتم تعبئة الحامض النووي في نواة الخلية البشرية بالبروتينات مثل الهستونات histones لحمايته من التلف وترتيبه بما يمكنه من الوصول إلى المواقع الوظيفية في بنية تعرف بالكروماتين chromatin. ويُنسخ الجين بآلية نسخ أساسية تتكون من RNA polymerase II، وعوامل النسخ العامة (GTFs) General Transcription Factors، والتي يجب أن ترتبط بالحفاز الصممي core promoter، الذي يحتوي على TATA box، حيث يكون في موقع بدء النسخ Transcription Start Site (TSS) (Butler and Kadonaga, 2002).

8- 2 : التعبير الجيني Gene expression

التعبير الجيني (GE) Gene expression هو تخليق منتج جيني وظيفي باستخدام المعلومات الوراثية المقدمة من الحامض النووي منقوص الاوكسجين (Singh *et al.*, 2018). يتم تصنيع الحامض النووي الرايبي (RNA) Ribonucleic acid من الـ DNA من خلال عملية النسخ transcription، وهي جزء من عملية التعبير الجيني يتم التحكم فيها بواسطة عوامل النسخ، والعوامل فوق الوراثة (Koleck and Conley, 2016 ; Koch, 2015). تنتج البروتينات من خلال عملية التعبير الجيني، والتي تحدد الأنماط الظاهرية phenotypes والعمليات البيولوجية، وعندما يحصل تغير في التعبير الجيني فان الجينات تعمل بشكل غير طبيعي مما يؤدي الى اختلافات وراثية تنتج الامراض الوراثية كالأورام (Narrandes and Xu, 2018). يتضمن تكوين البروتين أربع خطوات رئيسة تشمل : النسخ transcription، والتعديل ما بعد النسخ (التذييل بالادنين poly adenylation وربط الحامض الرايبي splicing RNA)، والترجمة translation، والتعديل ما بعد الترجمة post translational modification (Hentze *et al.*, 2018 ; Watson *et al.*, 2014).

9-2: التشخيص الجزيئي Molecular investigation**1-9-2: تفاعل البوليميريز التسلسلي Polymerase chain reaction (PCR)**

تفاعل البلمرة المتسلسل تقنية يتم إجراؤها في المختبر تسمح بتضخيم نسخة واحدة أو بضع نسخ من قطعة من الحامض النووي، ينتج وبسرعة آلاف إلى ملايين النسخ من تسلسل DNA معين خلال وقت مناسب (Pherson *et al.*, 2000). وقد أُخترع الـ PCR بواسطة Mullis في عام 1983، وأحدث ثورة في علم البيولوجيا الجزيئية. تأخذ هذه العملية اسمها من بوليميريز الدنا، الإنزيم الذي يقوم بتكرار الحامض النووي في الخلية (Leland *et al.*, 2000). وتتطلب عمليات تفاعل البوليميريز التسلسلي (التدوير الحراري) سلسلة متكررة من عناصر أساسية في ثلاثة خطوات، تبدأ كل دورة بتسخين العينات إلى 94-96 درجة مئوية لتحقيق مسخ كامل full denaturation للضفيرة المزدوجة لقلب الـ DNA، والفصل الكامل بين الخيطين ضروري لنجاح الـ PCR. تبدأ الخطوة الثانية (annealing) بارتباط كل من البادئين قليلي النيوكليوتيد إلى الشريط المفرد، ثم يتم تبريد العينة إلى 50-68 درجة مئوية، بعدها الخطوة الثالثة بالتمديد الأنزيمي enzymatic extension التي تحدث عند 72 درجة مئوية لمعظم القوالب، وتؤدي هذه الخطوات إلى مضاعفة عدد نسخ الحامض النووي المستهدفة (Innes *et al.*, 1990; Saiki, 1989).

2-9-2: تفاعل البلمرة التسلسلي اللحظي Real-Time Polymerase chain**reaction (RT- PCR)**

يمثل تفاعل البلمرة التسلسلي اللحظي قفزة تكنولوجية تم من خلالها فتح تطبيقات جديدة وقوية للباحثين في جميع أنحاء العالم، بسبب اقتران الحساسية الهائلة لتقنية التدوير الحراري بالدقة التي يوفرها "real-time" من خلال مراقبة منتجات تفاعل التدوير الحراري أثناء إنتاجها (Loftis *et al.*, 2012 ; Valasek and Repa, 2005)، وكان أول عرض توضيحي لتفاعل البلمرة التسلسلي اللحظي يتضمن صبغة فلورية شائعة تسمى Ethidium bromide (EtBr)، وتشغيل التفاعل تحت الضوء فوق البنفسجي ultraviolet، الذي يتسبب في تألق الاثيديوم برومايد، مما يمكن من تصوير وتسجيل تراكم الحامض النووي حيث أن الاثيديوم برومايد يزداد تألقها عند ارتباطها بالأحماض النووية (Le Pecq and Paoletti, 1966).

يشير تفاعل البلمرة التسلسلي اللحظي ببساطة إلى تضخيم الحامض النووي (بالتدوير الحراري) ومراقبته أثناء حدوث التضخيم مما يسمح للباحث بتحديد كمية بدء الحامض النووي في العينة بشكل

أفضل، ويتضمن تفاعل البلمرة التسلسلي اللحظي الحالي بشكل عام fluorogenic probes التي تضيء لإظهار كمية الحامض النووي الموجود (Kang, 2019 ; Valasek and Repa, 2005). ويظهر التفاعل على شكل منحنيات، يتكون كل منحنى من ثلاث مراحل متميزة : (1) المرحلة الأولية مرحلة التأخر lag phase التي لا يمكن فيها قياس تراكم المنتج. (2) المرحلة الأسية exponential phase وفيها يتم التضاعف. (3) مرحلة الاستقرار plateau phase والتي يتوقف فيها التفاعل وبالتالي التضاعف (Wilhelm *et al.*, 2003).

يتم قياس التغييرات في التعبير الجيني للعينة على أساس إما معيار خارجي أو عينة مرجعية لتحليل التغييرات النسبية في مستويات النسخ، ويكون المعيار المختار نسخة من جين يكون بمثابة مرجعاً (Livak and Schmittgen, 2001). وتتضمن هذه التقنية توليف Complementary DNA (cDNA) عن طريق النسخ العكسي للـ mRNA وما يلي هذه الخطوة من التقدير الكمي لـ cDNAs محددة بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي اللحظي، ومعظم فحوصات التعبير الجيني تستند على مقارنة عينتين إحداهما تمثل الجين المستهدف Target gene والأخرى جين المقارنة housekeeping gene وهي من الجينات التي يفترض التعبير عنها بمستوى ثابت في الأنسجة المختلفة في جميع مراحل التطور وغير متأثرة بالعلاج التجريبي. وتشمل الجينات المرجعية الأكثر استخداماً β -actin (ACTB) و Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Seifi *et al.*, 2012). وقد يكون استخدام صبغة SYBR green كافياً لقياس التعبير الجيني (Soheili and Samiei, 2005; Giuletta *et al.*, 2001).

2-9-3: نظام التضخيم الحراري للطفرات The Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

يعتمد نظام التضخيم الحراري للطفرات amplification refractory mutation system (ARMS) على تقنية البوليميريز التسلسلي باستخدام مجموعة من البادئات المكملة لتعدد الأشكال الأكثر شيوعاً في مجموعة معينة قيد الدراسة (Yang *et al.*, 2017). ويعد نظام الـ (ARMS) طريقة بسيطة لاكتشاف أي طفرة تتضمن تغييرات أساسية مفردة أو عمليات حذف صغيرة، وبعد تفاعل ARMS، يشخص منتج الـ PCR وجود أو عدم وجود الأليل المستهدف، و يستخدم تحليل ARMS المعروف أيضاً باسم طريقة PCR الخاصة بالأليل allele-specific PCR method، تفاعلين من البوليميريز المتسلسل، أحدهما يحتوي على البادئ الخاص بالأليل الشائع wild type والآخر يحتوي على بادئ

خاص بالأليل الطافر mutant type، عند الترحيل على هلام الأكاروز ستتوافق الحزم bands التي لا تعاني من طفرة مع الأليل الشائع، وتتوافق الحزم المتحولة نتيجة الطفرة مع الأليل الطافر، والحزم من كلا الأليلين تتوافق مع الزيجة متغايرة الأليل heterozygous allele (Chen et al., 2000; Simsek et al., 1999).

2-9-4: تقانة تتابعات القواعد النيروجينية للDNA Sequencing DNA technique

يشير مصطلح sequencing DNA الى الطريقة المستخدمة في تحديد ترتيب القواعد النيروجينية التي تشمل الأدينين والكوانين والسيتوسين والثايمين في جزيئة المادة الوراثية، تم تتبع سلسلة الـ DNA لأول مرة من قبل الباحثين في بداية السبعينات من القرن الماضي، ثم تطورت تقانة تتابع القواعد النيروجينية تطورا جوهريا من حيث الكلفة والدقة نتيجة للتقدم العلمي الحاصل في مختلف المجالات وأهمها الجانب الوراثي الجزيئي (Munshi, 2012). ومن أهم تقانات التتابع :

1. تسلسل جلبرت Maxam Gilbert sequencing:

هي طريقة كيميائية تعدل نيوكليوتيدات الحامض النووي كيميائياً ثم يشق العمود الفقري للحامض النووي في المواقع المجاورة للنيوكليوتيدات المعدلة، ونتيجة لتعقيد هذه التقنية واستخدام مواد كيميائية خطيرة فيها، لذلك فان هذه الطريقة لا تستخدم حالياً مع الجزيئات الحيوية (Haldar, 2019).

2. تسلسل سانجر Sanger sequencing:

هي طريقة تسلسل الحامض النووي التي يتم فيها دمج الفوسفات بثنائي النيوكليوتيد منقوص الأوكسجين (ddNTPs) dideoxynucleotide phosphates بواسطة بوليميريز الـ DNA أثناء تكرار الحامض النووي في المختبر (Haldar, 2019). وكان الغرض من تطوير هذه الطريقة من قبل Sanger لتوليد جزيئات DNA مفردة السلسلة ومكاملة للقالب والتي تبدأ من الجهة (5') الشائعة وتستطيل لتصل إلى واحد كيلو زوج قاعدي باتجاه النهاية (3') (Ravi et al., 2014). ويتم وسم جزيئات الـ DNA بطريقة تسمح بالتعرف على النهاية (3') في كل جزيئة، ثم تفصل الجزيئات على أساس الحجم من خلال الترحيل الكهربائي وكل حزمة تتطابق مع نوع الجزيئة و تختلف بمقدار نيوكليوتيدة واحدة عن الحزمة المجاورة (Tipu and Shabbir, 2015).

2-9-5: التعدد الشكلي للـ DNA المضمخ عشوائيا

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

تقنية الـ RAPD هي تقنية قائمة على الـ PCR لتحديد التباين الجيني بشكل عشوائي، تطور تضخيم الحامض النووي متعدد الأشكال (RAPD) بواسطة Williams (Williams *et al.*, 1990)، وبواسطة Welsh و McClelland (Welsh and McClelland, 1990). هذه التقنية شائعة الاستخدام كدلالة أو علامة جزيئية في دراسات التنوع الجيني وتحديد التباين الجيني (Rahiman *et al.*, 2015).

يستخدم تحليل RAPD-PCR كوسيلة للتحديد والتحقيق في عدم الاستقرار الجيني المرتبط بتطور الأورام البشرية و كشف الحدوث المتكرر لتعدد الأشكال الجينية في أنواع مختلفة من الأورام (Ismaeel, 2013; Papadopoulos *et al.*, 2002)، يتضمن RAPD-PCR استخدام بادئ (primer) واحد بشكل اعتباطي في تفاعل الـ PCR، مما ينتج عنه تضخيم العديد من منتجات الحامض النووي المنفصلة، تستخدم تقنية الـ RAPD القياسية بادئات قليلة النوكليوتيدات وقصيرة (بطول 10 قواعد نيروجينية) من المتواليات العشوائية للتضخيم بكميات نانوجرام من إجمالي الحامض النووي (الجينوم) تحت درجات حرارة منخفضة للتلدين (annealing) بواسطة تفاعل (PCR) (Rahiman *et al.*, 2015).

يمكن لتقنية الـ RAPD ببساطة وبسرعة اكتشاف التغيرات الجينية لجينوم بأكمله دون معرفة معلومات تسلسل الحامض النووي المحدد ويمكن أن تعمل بشكل فعال مع كمية ضئيلة من الحامض النووي، ويتم استخدامها أيضًا للكشف عن تسلسل الحامض النووي غير الطبيعي في أورام الإنسان، وقد تم استخدام الـ RAPD للكشف عن عدم الاستقرار الجيني في الأورام (Luceri *et al.*, 2000).

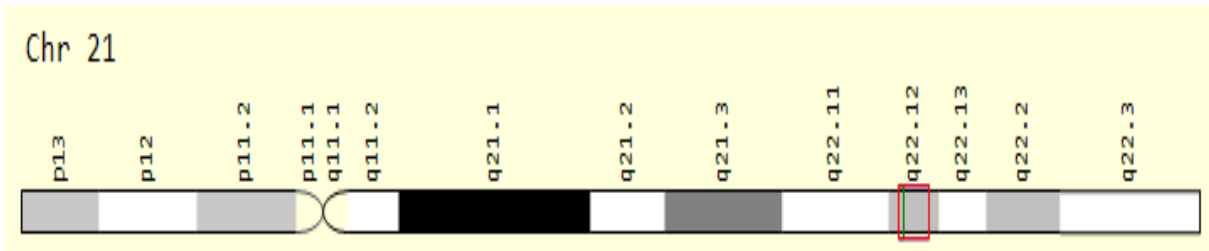
10-2: جيني *RUNX1* و *RUNX3*

تشمل عائلة *RUNX* الجينات (*RUNX3*، *RUNX2*، *RUNX1*) (Yan *et al.*, 2004 ; Warren *et al.*, 2000). جين *RUNX1* هو Runt-Related Transcription Factor 1 المرتبط بعامل النسخ 1، ويشترك في تمايز الخلايا الجذعية المكونة للدم (Okuda *et al.*, 1996)،

اكتشف الجين من قبل Miyoshi وفريقه، وكان الاسم الأول لهذا الجين ابيضاض الدم النخاعي الحاد 1 (*AML1*)، وحاليا *RUNX1*، ويمتد جين *RUNX1* من القاعدة 34,787,801 الى 35,049,302 أي ان طول الجين يبلغ 261,502 nt وطول البروتين الناتج عنه 480 حامض اميني ويحتوي على 12 اكسون، ويقع على كروموسوم 21 (q22) (Levanon *et al.*, 2001) شكل (4-2)، (6-2). كان أول مؤشر على أن اضطراب جين *RUNX1* يمكن ان يؤدي إلى ابيضاض الدم عندما تم استنساخ الكروموسوم عند breakpoint (q22 ; q22) t(8;21) (Miyoshi *et al.*, 1991)،

RUNX1 هو واحد من أكثر الجينات التي يتم استهدافها في ابيضاض الدم، وتؤدي الطفرات لهذا الجين إلى مرض الصفائح الدموية الوراثي والأورام الخبيثة النخاعية، و ابيضاض الدم النخاعي الحاد، و ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، و ابيضاض الدم النخاعي المزمن (Kamikubo, 2018). هناك العديد من الأدوار المهمة لـ *RUNX1* في تطوير العمليات المكونة للدم، واستتباب الخلايا الجذعية المكونة للدم (Goyama *et al.*, 2013).

تحتاج خلايا سرطان الدم النخاعي الحاد إلى قدر معين من نشاط *RUNX1* لتتكاثر، و يمكن أن يعمل كجين ورمي أو مثبط للورم (Kudo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011).

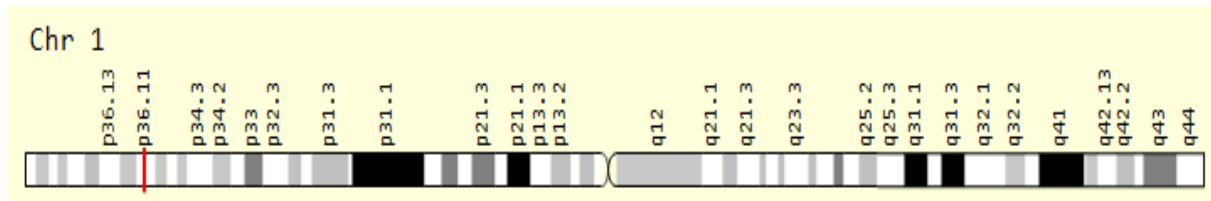


الشكل (4-2) موقع الجين *RUNX1* على الكروموسوم 21 (Gene Cards, 2023).

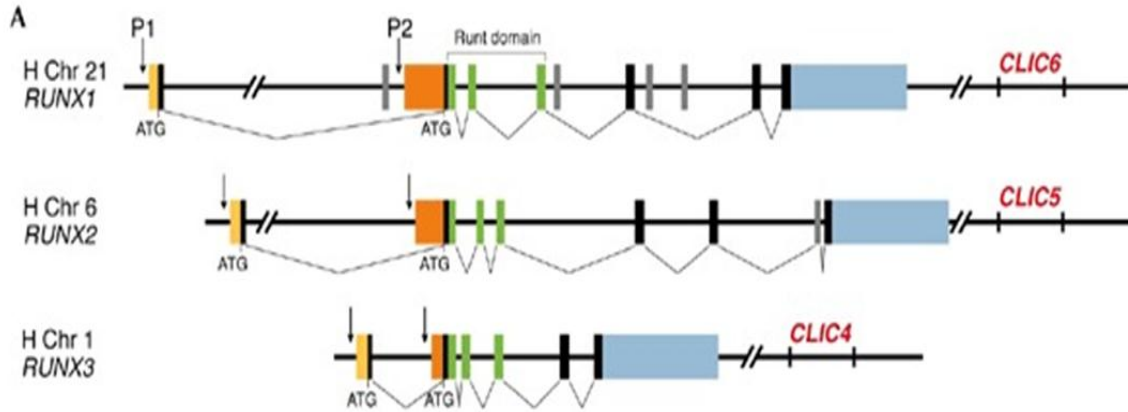
جين *Runt-Related Transcription Factor 3 (RUNX3)*، ويسمى كذلك *AML2* و *CBFA3* و *PEBP2aC* يوجد في الكروموسوم 1(p36.11)، ويحتوي على 8 اكسونات وسبع انترونات ويبلغ طول الجين 30,766 قاعدة نيتروجينية، والبروتين الناتج عنه بطول 415 حامض اميني ، ويشفر لعامل النسخ ويتم التعبير عنه بقوة في جميع الخلايا الجذعية المكونة للدم (Whittle and Hingorani, 2017; Haider et al., 2016) شكل(5-2)، (6-2)، وهو ضروري في عملية تكوين الغدة الصعترية، وتمايز الخلايا التائية، وقد لوحظ أن جين *RUNX3* له علاقة في إحداث الأورام (Mevl et al., 2019).

يوصف جين *RUNX3* بأنه مثبط ومحفز للورم، وأحياناً يعمل بصورة متناقضة في نفس النوع من الورم، وهذا ما يعكس على الأرجح الدور المعقد لهذا الجين حينما يشفر في تكوين الورم (Mevl et al., 2019 ; Whittle and Hingorani, 2017).

وجد ان هناك إفراطاً في التعبير عن *RUNX3* بخصائص وظيفية مسرطنة في أورام الغدد اللمفاوية والخلايا التائية القاتلة الطبيعية (NKTL) natural killer T cell lymphoma، وهكذا تم التشكيك في وظيفة *RUNX3* الدقيقة في العديد من الأورام الخبيثة، بالرغم من أن نمط التعبير والغرض الوظيفي والتفاصيل الأخرى لا تزال غير مفهومة جيداً، إلا ان وظيفة *RUNX3* تنبؤيه وتشخيصية في ابيضاض الدم (Selvarajan et al., 2017).



الشكل (5-2) موقع الجين *RUNX3* على الكروموسوم 1 (Gene Cards, 2023).



الشكل (6-2) جينات *RUNX* في الثدييات: تمتلك جينات *RUNX* الثلاثة للتدييات تنظيمًا جينيًا متشابهًا مع اثنين من الـ promoters (P1 و P2) والـ intron الأول كبير جدًا. تؤدي الحفزات promoters إلى ظهور منطقتين بيولوجيتين مختلفتين 5' غير مترجمتين (UTRs) (أصفر وبرتقالي). ويقع كل جين في كروموسومات مختلفة (الإنسان 21 و 6 و 1) على التوالي. ويشفر runt domain بواسطة الاكسونات الثلاثة المميزة باللون الأخضر، وتظهر الاكسونات التي تشكل مجال المعاملات (تنشيط الجين) باللونين الأسود والرمادي و 3' UTR باللون الأزرق. *RUNX3* هو أصغر الجينات الثلاثة وأبسطها (Levanon *et al.*, 2003).

11-2: الطفرة V617F في جين *JAK2* V617F mutation in *JAK2* gene

يقع جين *JAK2* على الكروموسوم 9 (p24.1)، ويحتوي على 28 اكسون، يمتد موقع الجين من القاعدة النيتروجينية 4,985,272 الى 5,129,948، بطول 144,677 nt ويبلغ طول البروتين الناتج عنه 1,132 حامض اميني. يتم التعبير عن *JAK2* على نطاق واسع في جميع أنواع الخلايا تقريبًا ويعمل كوسيط أساسي داخل الخلايا لنقل إشارات الساييتوكاين أو الهرمونات (Lai and Johnson, 2010). *JAK2* ويسمى ايضا *JTK10* يشفر لبروتين من عائلة تايروسين كينيز (PTKs) protein tyrosine kinases، وقد شهد عام 1992 استنساخ ونشر تسلسل cDNA للجين *JAK2*، تم تسمية عائلة *JAK* على اسم Janus، الإله الروماني للبوابات والمداخل ذات الوجهين (Sandberg *et al.*, 2004)؛ (Wilks *et al.*, 1991).

ظهر أن الجين *JAK2* ضروري لتكوين الدم وتكوين الخلايا المناعية (Saharinen *et al.*, 2000)؛ (Ihle *et al.*, 1997). ارتبط ابيضاض الدم النخاعي الحاد، بالطفرات النقطية والحذف والاضافة في

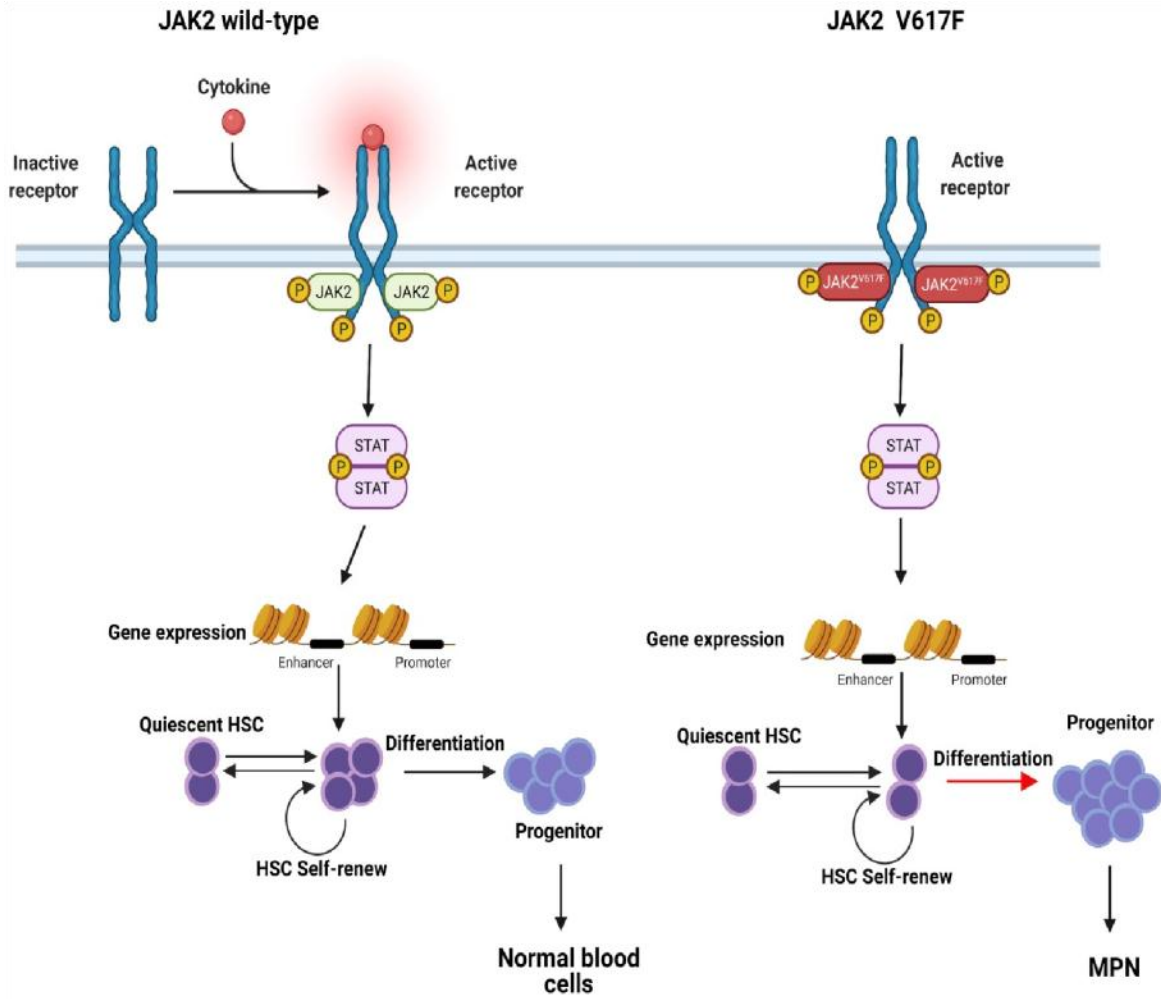
الإكسون 12 من *JAK2* (Steensma *et al.*, 2006)، فضلا عن ذلك تم ربط *JAK2* بجينات اندماج التايروسين كينيز التي تحدث في عدد من الأورام الدموية الخبيثة وخاصة ابيضاض الدم الحاد (Walz *et al.*, 2008).

هناك عدة أدلة تشير الى دور *JAK2* في حدوث أشكال مختلفة من ابيضاض الدم، وأن *JAK2* قد يكون مكوناً أساسياً في مجموعة Breakpoint Cluster Region - Abelson 1 (*BCR-ABL1*) التي تكون سببا لايبيضاض الدم (Li, 2008).

في عام 2005 حددت أربع مجموعات بحثية مختلفة طفرة تحويل في موضع النيوكليوتيدات c1849 في الاكسون 14 من جين *JAK2*، وهي طفرة جسمية تحدث باستبدال النيوكليوتيد G بـ T في مرضى Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasm (Ph⁻ MPN)، وأسفرت عن استبدال الحامض الأميني valine بالحامض الأميني phenylalanine عند الكودون (617) في بروتين Janus kinase-2 (*JAK2*)، وهو ما يشار إليه باسم الطفرة V617F (Moisa *et al.*, 2019; Baxter *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005b). وترتبط طفرة V617F بتنشيط التايروسين كينيز في غياب الساييتوكاينات، مما يؤدي إلى تكاثر الخلايا وبقاتها (James *et al.*, 2005) شكل (2-5).

للجين *JAK2* سبعة مجالات متجانسة homologous domains مرقمة من JH 1-7، توجد طفرة V617F في الجين *JAK2* عند منطقة الترميز الجيني لإنزيم pseudokinase domain (JH2)، وهذا الانزيم له دور مثبت ضد النشاط التحفيزي للكينيز (JH1) (Saharinen *et al.*, 2000)، لذلك يعتقد بان طفرة V617F في *JAK2* تعطل الوظيفة المثبطة للـ pseudokinase domain، وبالتالي زيادة نشاط الكينيز بشكل مستقل عن pseudokinase domain (Levine *et al.*, 2005a; James *et al.*, 2005). يُفترض أن تكون طفرة *JAK2* مسؤولة جزئياً عن تنشيط STAT في ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Lee *et al.*, 2006).

الطفرات الجينية هي الاختلاف الجيني الأكثر شيوعاً لغالبية المتغيرات الجينية، وأحيانا تحدث الأمراض الوراثية بسبب تعدد الأشكال الجينية gene polymorphisms، والاختلاف الأكثر شيوعاً في زوج من القواعد في الإنسان هو تعدد أشكال النيوكليوتيد المفردة وهو النوع الأكثر انتشاراً من تباين النيوكليوتيدات (Khan *et al.*, 2016). وقد تم ربط العديد من تعدد أشكال النيوكليوتيد المفردة بابيضاض الدم في عدد من الأبحاث، وكان للجين *JAK2* ارتباطاً بتعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة المسببة لايبيضاض الدم النخاعي الحاد (Steensma *et al.*, 2006).



الشكل (7-2) $JAK2$ النموذجي و طفرة V617F في $JAK2$ الناجم عن إشارات $JAK2$ -STAT غير المنظمة. يتم التوسط في نقل إشارات JAK -STAT العادية بواسطة الساييتوكاينات وعوامل النمو، على سبيل المثال، EPO و TPO ، والتي تحافظ على توازن منظم لتكاثر الخلايا والتمايز عن طريق التجديد الذاتي في تجمع خلايا HSC وهي ضرورية لتكوين خلايا الدم الطبيعية (اليسار). تتسبب طفرة V617F في جعل $JAK2$ أكثر حساسية للساييتوكاينات وتنشيط مسار JAK -STAT باستمرار، والتنشيط المفرط لإشارات $JAK2$ -STAT يغير في مصير الخلية ويؤدي إلى مزيد من تطوير الخلايا السلفية و بالتالي إلى MPN (اليمين) (Gou et al., 2022).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3 : الأجهزة والمواد المستعملة Instrument and Materials used

أستعمل في الدراسة الحالية عددا من الأجهزة والأدوات، وكما موضح أهم الأجهزة والأدوات والشركات المصنعة والمناشئ في الجدول التالي:

جدول (1-3) الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة.

الشركة المصنعة	الادوات والمعدات	ت
Samsung/ Korea	Digital Camera	1 كاميرا رقمية
Cosmoplas/UAE	EDTA coated tube	2 انابيب مانعة التخثر
Sigma/ England	Eppendorf tubes	3 انابيب ابندورف
Bioneer/ Korea	Exispin vortex centrifuge	4 جهاز طرد مركزي مازج
Eppendorf/ Germany	High speed Cold Centrifuge	5 جهاز طرد مركزي مبرد عالي السرعة
Labtech / Korea	Hot plat stirrer	6 محرك صفيحة ساخنة
Memmert/ Germany	Incubator	7 حاضنة
Eppendorf / Germany	Micropipettes (different volumes)	8 ماصات دقيقة
Bio-Rad/ USA	Miniopticon Real Time PCR	9 جهاز تفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي
Thermo Scientific/ UK	Nanodrop	10 جهاز القطرة الدقيقة
Concord/ Lebanon	Refrigerator	11 ثلاجة
Sartorius /Germany	Sensitive balance	12 ميزان حساس
BioRad/ USA	Thermocycler apparatus	13 جهاز التدوير الحراري
CYAN/ Belgium	Vortex	14 جهاز مازج
PolyScience /USA	Water bath	15 حمام مائي

Kits 2-1-3 : العدد المختبرية

جدول (2-3) العدد المستعملة في الدراسة ومكوناتها التشخيصية.

المنشأ	الشركة	المكونات	Kit العدة
USA	Promega	DNase I enzyme kit	عدة انزيم محلل الدنا
		DNase I enzyme 10x buffer Free nuclease water Stop reaction	
USA	Promega	GoTaq® qPCR Master Mix	خليط تفاعل البوليميريز التسلسلي الكمي
		qPCR Master Mix, 2X SYBER green dye, Taq DNA polymerase dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) and 10X buffer DEPC water	
Korea	Bioneer	M-MLV Reverse Transcriptase kit	عدة تفاعل النسخ العكسي
		M-MLV Reverse Transcriptase (10,000U) 5X M-MLV RTase reaction buffer dNTPs 100mM DTT RNase Inhibitor	
Korea	Bioneer	Total RNA Extraction Kit AccuZol™	عدة استخلاص RNA
		Trizol reagent 100ml	

المنشأ	الشركة	المكونات	العدة Kit
Korea	Promega	GoTaq® G2 Green Master Mix kit	خليط تفاعل التضخيم
		Taq DNA polymerase dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, (dTTP Tris.HCl pH 9.0 KCl MgCl ₂ Loading dye	
Taiwan	Geneaid	gSYAN DNA Extraction Kit	عدة استخلاص الدنا
		GST buffer GSB buffer W1 buffer Wash buffer Elution buffer GD column Collection tube 2ml Proteinase K 10mg/ml	

3-1-3: البادئات Primers

صممت البادئات المتخصصة بالجينات المستهدفة (*RUNX1* , *RUNX3*) وجين المقارنة housekeeping gene (*GAPDH*) على الانترنت بواسطة استعمال قاعدة بيانات بنك الجينات NCBI وPrimer3، و جهزت من شركة (Bioneer company, Korea)، وكما موضح في الجدول التالي:

جدول (3-3) يبين تسلسل قواعد البادئات للجينات الهدف وجين المقارنة.

NCBI Reference	الحجم bp	تسلسل القواعد (5'-3')	اسم الجين
NM_001256799.3	104	F: AATTCATGGCACCGTCAAG	<i>GAPDH</i>
		R: ATCGCCCCACTTGATTTTGG	
NM_001001890.3	109	F: AAGCAACGGGAAATGTGGTC	<i>RUNX1</i>
		R: AAGCCCACGCACGAATTTTC	
NM_001031680.2	90	F: ACAGCCAACCAAGTGAATCC	<i>RUNX3</i>
		R: AGATGCTGTTCGATGCCATG	

وأختيرت البادئات الرباعية المتخصصة بالطفرة JAK2V617F تبعاً لـ (Badrawy and ScientificReseracher. Co. Ltd. , 2014, Ibrahim)، و جهزت من قبل شركة الباحث العلمي (Iraq) وكما مبين في الجدول التالي:

جدول (4-3) تسلسل قواعد البادئات الرباعية لطفرة JAK2V617F لتفاعل الـ ARMS.

الحجم bp	Sequence (5'-3')	تسلسل القواعد	البادئ
463	FO: TTG GAT TTT TCC TTT TTG CTT		الامامي الخارجي
	RO: GGC CTG GAA TCT CCT CTA TCA		العكسي الخارجي
229	Fwt: TCC TCA GAA CGT TGA TGG CAG		الامامي للنوع غير الطافر
267	RMT: GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAA		العكسي للنوع الطافر

أما بادئات التضخيم العشوائي للدنا (RAPD) فقد تم تحضيرها من قبل شركة AUGCT DNA SYN Biotechnology /China، وكما موضح في الجدول التالي:
جدول (3-5) بادئات التضخيم العشوائي للدنا وتسلسل قواعدها.

الطول (عدد القواعد)	تسلسل القواعد	البادئ
10	ACCCGACCTG	OPAA11
10	ACGGGCCAGT	OPU 15
10	GAGAGCCAAC	OPD18

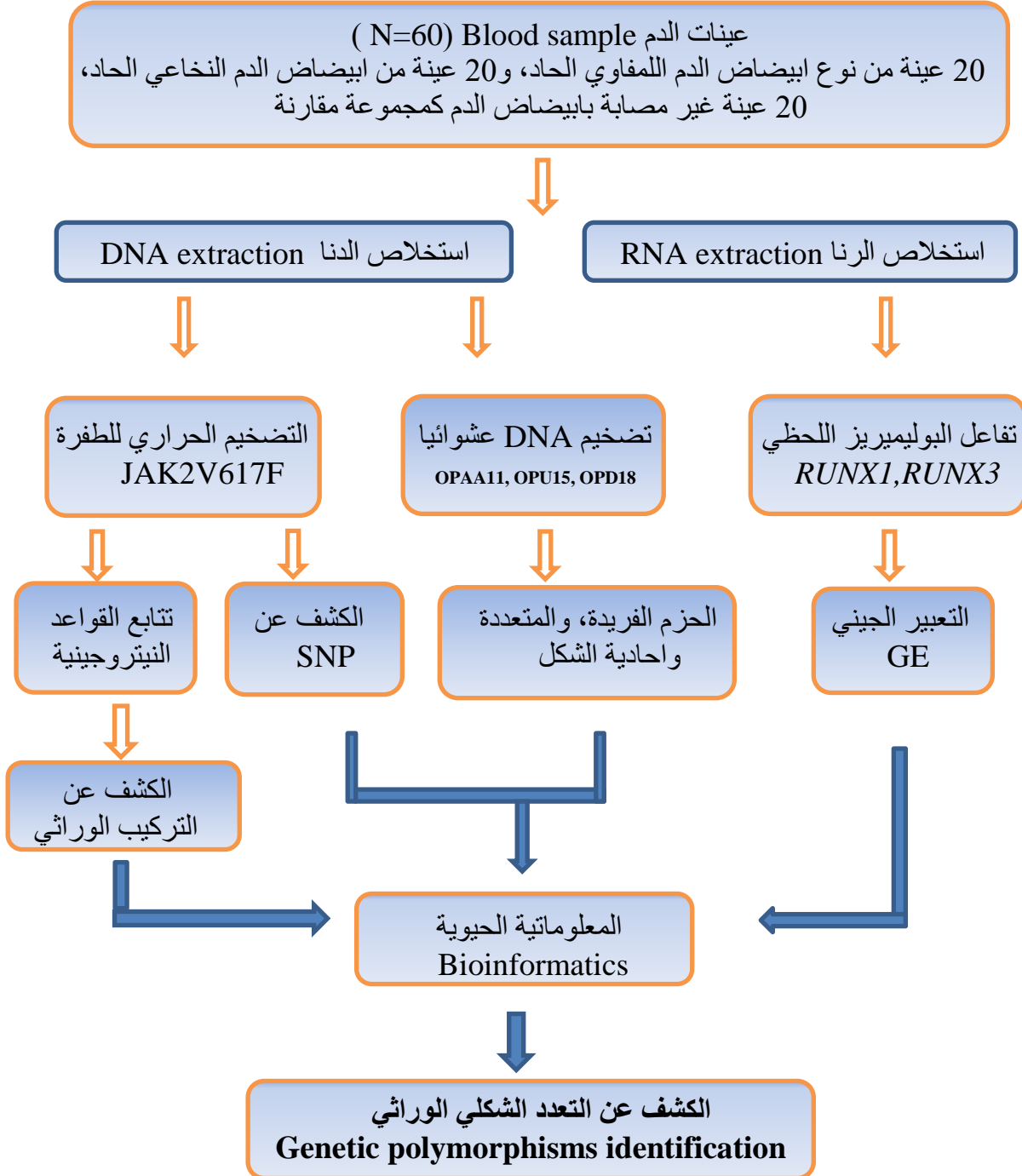
4-1-3: المواد الكيميائية Chemicals

جدول (3-6) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة.

ت	المواد الكيميائية	الشركة	المنشأ
1	Absolute Ethanol	Labort	India
2	Agarose	Promega	USA
3	Buffer (TBE)	Promega	USA
4	Chloroform	Labort	India
5	DEPC water	Bioneer	Korea
6	Ethidium bromide	Promega	USA
7	Isopropanol	Labort	India
8	RNase free water	Bioneer	Korea
9	Molecular Marker DNA	Promega	USA

2-3 : طرائق العمل Methods

1-2-3 : تصميم التجربة Experimental design



الشكل (3-1) الخطوات العامة للدراسة الحالية.

2-2-3 : عينات الدراسة Samples of the study

جمعت 40 عينة سريرية من مرضى عراقيين مصابين بابيضاض الدم والمراجعين لمستشفى الأورام التخصصي في مدينة الطب (التعليمي في مدينة بغداد)، ولمدة ثلاثة أشهر. وتم جمع المعلومات حول المرضى باستعمال استمارة توثيق المعلومات الطبية للمرضى ملحق (1)، وتراوحت الفئات العمرية بين (14- 80) عاماً، وقسمت عينات مجموعة المرضى Patients group بحسب أنواع ابيضاض الدم الى مجموعة المرضى المصابين بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد وشملت 20 مريضاً، ومجموعة المرضى المصابين بابيضاض الدم النخاعي الحاد وشملت 20 مريضاً، وتم جمع 20 عينة كمجموعة مقارنة ملحق (2).

Method of collection blood**3- 2 - 3 : طريقة جمع عينات الدم****samples**

جمعت عينات الدم من مرضى ابيضاض الدم بعد الحصول على موافقة رسمية من المستشفى والمرضى والتأكد من تشخيصهم من قبل الأطباء الإختصاص عن طريق توثيقهم لنتائج الفحوصات السريرية والمختبرية، ثم سحب 2 مليلتر من الدم الوريدي الساعة التاسعة صباحاً بواسطة محقنة طبية نبيذة ووضع العينة في أنبوبة تحتوي على مادة مائعة للتخثر Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ورجت العينة لمنع التخثر، وأخيراً وضعت في التجميد بدرجة حرارة - 20 م لحين استعمالها في استخلاص الحامضين النوويين DNA و RNA.

3-3 : الدراسة الوراثية Genetic study

أجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة ميسان للفترة من 2022 / 10 / 29 الى 2023 / 3 / 10، على 40 عينة لمرضى ابيضاض الدم الحاد و20 عينة من غير المصابين كمجموعة مقارنة بهدف استخلاص المادة الوراثية DNA و RNA وتحديد التراكيب الوراثية (Genotype).

3-1-3: استخلاص الحامض النووي Genomic DNA extraction

استعملت العدة المجهزة من قبل الشركة لغرض استخلاص الحامض النووي DNA (Geneaid, Taiwan)، وحسب الخطوات التالية:

1. ذوبت العينات المجمدة ورجت بالمزج Vortex لمدة ثلاث دقائق، نقل 200 مايكروليتر من الدم إلى أنابيب ابندورف Eppendorf tubes سعة 1.5 مليلتر، وأضيف 20 مايكروليتر من إنزيم Proteinase K ومزج بالماصة الدقيقة Micropipettes ثم حضنت الأنابيب بالحمام المائي Water bath بدرجة 60°C لمدة 5 دقائق.

2. أضيف 200 مايكروليتر من GSB buffer إلى الخليط السابق ومزجت بالمزج Vortex ثم حضنت بالحمام المائي Water bath بدرجة 60°C لمدة 20 دقيقة.

3. أضيف 200 مايكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق إلى العينات المتحللة ومزجت بالمزج Vortex لمدة 10 ثواني، ثم نقل الخليط إلى أنابيب GS column بعد وضعها في أنابيب جمع Collection tube سعة 2 مليلتر ونبذت بجهاز الطرد المركزي الدقيق Micro centrifuge لعدد من الدورات (14000-16000 دورة) ولمدة دقيقة واحدة، ثم استبدلت أنابيب الجمع بأنابيب جديدة وأعيدت عليها عملية النذب بنفس الوقت والسرعة.

4. أضيف 400 مايكروليتر من دارئ الغسل الأول W1 buffer ونبذت بجهاز النذب المركزي الدقيق لمدة 30 ثانية، ثم فرغت أنابيب الجمع Collection tube، وأضيف 600 مايكروليتر من دارئ الغسل الثاني Wash buffer ونبذت بجهاز الطرد المركزي الدقيق لمدة 30 ثانية، بعد ذلك أعيدت لجهاز الطرد المركزي الدقيق بالسرعة نفسها أعلاه للتجفيف.

5. أضيف 50 مايكروليتر من المحلول الدارئ Elution buffer إلى أنابيب GS column الحاوية على الدنا المستخلص وتركت لمدة 5 دقائق ثم وضعت بجهاز الطرد المركزي بالسرعة نفسها المذكورة سابقاً ولمدة 30 ثانية للحصول على الدنا المستخلص، بعد ذلك وضعت إنبوبة الأبندورف الحاوية على الدنا المستخلص بالتجميد بدرجة -20 م لحين الاستعمال.

3-3-2: قياس نقاوة وتركيز الـ DNA المستخلص

Measuring the concentration and purity of DNA

أُعدت طريقة المطياف Spectrophotometer للتأكد من وجود الحامض النووي DNA، ولغرض التأكد من نقاوة وتركيز الدنا المستخلص تم اختبار العينات بواسطة جهاز القطرة الدقيقة Nano drop (Desjardins and Conklin, 2010)، إذ وضع 2 مايكروليتر من العينة على المكان المخصص في الجهاز وسجلت النتائج ببرنامج خاص منصّب على الحاسب الإلكتروني.

3-3-3: استخلاص الرنا RNA extraction

أُستخلص الـ RNA من عينات الدم باستخدام (مجموعة TRIzol®) ووفقاً لتعليمات الشركة وكما يأتي:

1. سحبت مايكروليتر 100 من عينات الدم وتمت مجانستها بإضافة 750 مايكروليتر من TRIzol®.
2. أضيف 200 مايكروليتر من الكلوروفورم لكل أنبوبة ورجها بقوة لمدة 15 ثانية.
3. حضن الخليط في الثلج لمدة 5 دقائق، ثم نُبذ عند 12000 دورة في الدقيقة، في 4°C لمدة 15 دقيقة.

4. نقل المادة الطافية إلى أنبوبة ابندورف جديدة، وأضيفت 500 ميكروليتر من الأيزوبروبانول، ثم مزج الخليط عن طريق قلب الأنبوب 4-5 مرات وحضن عند 4 درجات مئوية لمدة 10 دقائق، ثم بالطرد المركزي عند 12000 دورة في الدقيقة، و4 درجات مئوية لمدة 10 دقائق.

5. تم التخلص من المادة الطافية، وأضيف 1 مل من الإيثانول 80% وخلط بواسطة جهاز المازج مرة أخرى، ثم بجهاز الطرد المركزي عند 12000 دورة في الدقيقة، و4 درجات مئوية لمدة 5 دقائق.
6. التخلص من المادة الطافية وترك قطع الحامض النووي الرايبي الصغيرة RNA pellet معرضة للهواء حتى تجف.

7. أضيف 100 مايكروليتر من الماء الخالي من النيوكليز Nuclease free water إلى كل عينة لإذابة قطع الحامض النووي الرايبي RNA pellet، والاحتفاظ بعينات الحامض النووي الرايبي المستخرجة عند درجة حرارة -20.

4-3-3: قياس الحامض النووي الرايبي الكلي المستخرج Estimation of extracted total RNA

تم تقييم إجمالي الحامض النووي الرايبي المستخرج وقياسه بواسطة مقياس الطيف الضوئي Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA)، وقد اعتمد إجراء ضابطين للجودة على الحامض النووي الرايبي المستخلص، الأول هو تحديد كمية الحامض النووي الرايبي (نانوغرام / ميكرو لتر)، والثاني هو نقاء الحامض النووي الرايبي من خلال قراءة الامتصاصية في مقياس الطيف الضوئي عند 260 نانومتر و 280 نانومتر في نفس آلة Nanodrop (Desjardins and Conklin, 2010).

5-3-3: المعاملة بانزيم DNase I DNase I Treatment

تمت معالجة الحامض النووي الرايبي المستخلص بانزيم DNase I لإزالة الكميات الضئيلة من الحامض النووي DNA من إجمالي الحامض النووي الرايبي باستخدام (DNase I enzyme kit)، وقد تم إجراؤه وفقاً للطريقة التي وصفتها شركة Promega، على النحو التالي :

جدول (7-3) مكونات وحجوم مزيج تفاعل المعاملة بانزيم DNase I.

الحجم Volume	Mix	الخليط
10ul	Total RNA 100ng/ul	اجمالي الرنا
1ul	DNase I enzyme	الانزيم المحلل للدنا
4ul	10X buffer	محلول دارى
5ul	DEPC water	ثنائي إيثيل بيروكربونيت
20ul	Total	الحجم الكلي

بعد ذلك، حضن الخليط عند 37 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة، وأضيف 1 مايكرو لتر من موقف التفاعل واحتضانه عند 65 درجة مئوية لمدة 10 دقائق لتعطيل عمل إنزيم DNase I.

6-3-3: تصنيع مكمل الدنا cDNA synthesis

تم استخدام عينات الحامض النووي الرايبوسومي المعالجة بـ DNase-I في خطوة تصنيع cDNA للجينات *GAPDH, RUNX3, RUNX1* باستخدام مجموعة M-MLV Reverse Transcriptase وتم تنفيذها وفقاً لتعليمات الشركة على النحو التالي:

الخطوة الأولى : جدول (3-8) مكونات تفاعل تصنيع cDNA.

الحجم Volume	RT master mix	خليط تفاعل النسخ العكسي
8ul	Total RNA 100ng/ul	اجمالي الرنا
1ul	Random Hexamer primer	البادئ العشوائي
1ul	DEPC water	ثنائي إيثيل بيروكربونيت
10ul	Total	الحجم الإجمالي

عُرض كل من الرنا والبائد لحرارة 65°C لمدة 10 دقائق خلال عملية denatured ثم بُرد على الفور بالتلج.

الخطوة الثانية : جدول (3-9) خليط التضخيم للنسخ العكسي.

الحجم Volume	RT master mix	خليط تفاعل النسخ العكسي
10ul	Step 1 RT master mix	خليط النسخ العكسي للخطوة الأولى
1ul	M-MLV RTase (200ul)	انزيم النسخ العكسي
4ul	5X M-MLV RTase reaction buffer	محلول دارئ للتفاعل العكسي
2ul	100m M DTT	ثنائي ثايوتريتوتول منظم ومثبت للانزيم والبروتين
2ul	dNTPs	نيوكليوسايد ثلاثي الفوسفات منقوص الاوكسجين
1ul	RNase inhibitor	مثبط انزيم RANase
20ul	Total	الحجم الكلي

ثم وضعت الأنابيب في جهاز المازج لتدور فترة وجيزة، ثم يحول الرنا RNA الى cDNA في جهاز التدوير الحراري وحسب الظروف المبينة في الجدول التالي :

جدول (3-10) ظروف جهاز التدوير الحراري لانتاج cDNA.

الخطوة	Step	درجة الحرارة	الزمن Time
تصنيع مكمل الدنا (خطوة النسخ العكسي) cDNA synthesis (RT step)		42 °C	1 hour ساعة
حرارة التثبيط	Heat inactivation	95 °C	5 دقائق

7-3-3: تفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي Quantitative RT - PCR

أستخدم qPCR في القياس الكمي لتحليل التعبير الجيني لكل من الجينين المستهدفين (*RUNX1* , *RUNX3*)، وتم استخدام جين (*GAPDH*) reference gene لعينات مرضى ابيضاض الدم ومجموعة المقارنة باستخدام تقنية تفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي وكما يأتي :

1. تحضير الخليط الرئيسي لـ qPCR master mix preparation

تم تحضير مزيج qPCR الرئيسي باستخدام مجموعة GoTaq® qPCR Master Mix استنادًا إلى كشف الصبغة الخضراء SYBER green للجين الهدف وجين السيطرة *GAPDH* والتضخيم في Real-Time PCR جدول (3-11):

جدول (3- 11) مكونات الخليط الرئيسي لتفاعل البوليميريز التسلسلي.

الحجم Volume	الخليط الرئيسي للتفاعل الكمي qPCR master mix	
5µL	cDNA template (100ng)	القالب المكمل
1 µL	Forward primer(10pmol)	البادئ الامامي
1 µL	Reverse primer (10pmol)	البادئ العكسي
12.5 µL	qPCR Master Mix	الخليط الرئيسي للتفاعل التسلسلي
5.5 µL	DEPC water	ثنائي إيثيل بيروكربونيت
25 µL	Total	الحجم الاجمالي

بعد ذلك، تم وضع مكونات المزيج الرئيسي لـ qPCR المذكور أعلاه في أنابيب خاصة بجهاز (qPCR tube) وخلطها بوساطة جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge لمدة 3 دقائق، ثم وضعها في جهاز Real-Time PCR.

qPCR Thermocycler conditions

2. ظروف التدوير الحراري لجهاز qPCR

تم إعداد وتهيئة لوحة qPCR وحسب بروتوكول جهاز التدوير الحراري في الجدول التالي:

جدول (3-12) برنامج التضخيم في جهاز التدوير الحراري qPCR.

عدد الدورات Repeat cycle	الزمن Time	درجة الحرارة Temperature	خطوات التضخيم qPCR steps
1	5min	95 °C	Initial Denaturation بداية الدنترة
45	20 sec.	95 °C	Denaturation الدنترة
	30 sec	60 °C	Annealing \ Extention Detection(scan) التلدين / اطالة سلسلة الدنا والكشف عن عملية التضخيم

3-3-8 : تحليل بيانات RT-qPCR Data analysis of RT-qPCR

تم تحليل نتائج بيانات RT-qPCR للجين الهدف target gene وجين السيطرة (housekeeping gene) من خلال حساب مستويات التعبير الجيني النسبية (fold change)، (طريقة ΔCT باستخدام جين مرجعي reference gene) (Kubista, 2007)، على النحو التالي:

$$\Delta C_T (\text{cycle threshold}) = C_T (\text{الجين الهدف target gene}) - C_T (\text{جين HKG})$$

$$\text{Fold change (target / HKG)} = 2^{\Delta C_T}$$

3-4: البوليميريز التسلسلي رباعي البادئات Tetra- ARMS-PCR

اجريت طريقة الـ T-ARMS-PCR للكشف عن طفرة JAK2V617F والتنميط الوراثي لها في عينات مرضى ابيضاض الدم وعينات المقارنة غير المصابة، نفذت هذه الطريقة حسب وصفها في (Medrano and De Oliveira, 2014)، على النحو التالي:

3-4-1: تحضير الخليط الرئيسي T-ARMS-PCR Preparation mix master T-ARMS-PCR

حُضِر المزيج الرئيسي لـ T-ARMS-PCR باستخدام مجموعة GoTaq® G2 Green (Master Mix)، يحصل خلال هذا المزيج الرئيسي تفاعل لكل عينة وفقاً لتعليمات الشركة على النحو التالي:

جدول (3-13) مزيج تفاعل T-ARMS-PCR القياسي.

الحجم Volume	T-ARMS-PCR Master mix	مزيج التفاعل الرئيسي
5µl	DNA template	قالب الدنا
1µl	Forward inner primer (type wild) (10pmol)	البادئ الامامي الداخلي (النوع غير الطافر)
1µl	Reverse inner primer (Mutant type) (10pmol)	البادئ العكسي الداخلي (النوع الطافر)
1µl	Forward outer primer (10pmol)	البادئ الامامي الخارجي
1µl	Reverse outer primer (10pmol)	البادئ العكسي الخارجي
12.5µl	G2 Green Master Mix	المزيج الاخضر الرئيسي
3.5µl	Nuclease free water	الماء الخالي من النيوكلييز
25µl	Total volume	الحجم الكلي

بعد ذلك، تم نقل مكون مزيج PCR الرئيسي المذكور في الجدول أعلاه إلى جهاز الطرد المركزي Exispin vortex عند 3000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق، ثم وضع في جهاز التدوير الحراري (BioRad. USA).

2-4-3: ظروف التدوير الحراري PCR Thermocycler Conditions

أُجريت عملية التدوير الحراري PCR على نحو البرنامج التالي:

جدول (3-14) برنامج التدوير الحراري لتفاعل الـ ARMS.

عدد الدورات Repeat cycle	الزمن Time	درجة الحرارة Temperature	خطوات التضخيم PCR steps
1	5min.	95°C	Initial Denaturation بداية الدنترة
35cycle	30 sec.	95°C	Denaturation الدنترة
	30 sec.	58°C	Annealing التلدين
	30 sec.	72°C	Extention الاستطالة
1	5min	72°C	Final extension الاستطالة النهائية
-	-	4°C	Hold

T-ARMS-PCR product analysis T-ARMS-PCR تحليل منتج 3-4-3

تم تحليل منتجات T-ARMS-PCR product بواسطة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز وحسب الخطوات التالية:

1. حُضِر 2% من Agarose gel باستخدام 1X TBE ووضع في فرن Microwave لإذابة الأكاروز ومجانسته مع محلول TBE، بعد ذلك ترك ليبرد عند 50 درجة مئوية.
2. أُضيف 3 مايكرو لتر من صبغة الإيثيديوم برومايد إلى محلول هلام الاكاروز.
3. صُب محلول هلام الاكاروز في خزان خاص بعد تثبيت المشط في الوضع المناسب، وترك لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ، ثم تم إزالة المشط برفق من الخزان.
4. تُبِت خزان الهلام في حوض الترحيل الكهربائي، ثم تم تعبئته بمحلول منظم 1X TBE.
5. أُضيف 10 مايكرو لتر من منتج PCR لكل حفرة و 3 مايكرو لتر من (100bp الواسم الجزيئي للحامض النووي) في الحفرة الأولى.
6. شُغِل التيار الكهربائي عند 80 فولت لمدة ساعة.
7. صورت منتجات T-ARMS-PCR باستخدام جهاز transilluminator للأشعة فوق البنفسجية.

5-3: التعدد الشكلي للـDNA المضخم عشوائيا Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

يوضح الجدول التالي مكونات خليط RAPD PCR:

جدول (3-15) يبين حجم مكونات التفاعل المستخدمة في الـRAPD.

Volume الحجم (µl)	Mixture	الخليط
5	AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix & Master Mix	الخليط الرئيسي للتدوير الحراري
10	Nuclease free water	الماء الخالي من انزيم تحليل الـDNA
2.5	Genomic DNA	الحامض النووي الـDNA
2.5	RAPD primers (OPAA 11,OPU15,OPD18)	بادئات التضخيم العشوائي
20	Final volume	الحجم النهائي

تم تضخيم الخليط في جهاز التدوير الحراري (BioRad-USA) وفق البرنامج وكما في الجدول (3-16):

جدول (3-16) برنامج التدوير الحراري PCR للبادئات OPAA 11 , OPU15 , OPAA18 ، لتقنية الـRAPD.

الدورات Cycles	الزمن Time	درجة الحرارة Temperature (°C)	خطوات عملية التدوير الحراري PCR steps
		OPAA11 OPU15, OPAA18	
1	1 Min	95	Initial denaturation بداية الدنترة
3	1 Min	95	Denaturation الدنترة
	45 Sec	36	Annealing التلدين
	1 Min	72	Extension الاستطالة
1	10 Min	72	Final Extension الاستطالة النهائية
-	-	10	Final hold

رُحل 20 منتج من ناتج PCR-RAPD (10 لمرضى ابيضاض الدم و 10 من مجموعة المقارنة) لكل بادئ من البادئات الثلاثة كهربائيا على هلام الأكاروز بنسبة 2.5% مع 2.5 مايكرو لتر إيثيديوم برومايد عند 75-85 فولت لمدة 60 دقيقة، واستخدم الواسم الجزيئي للحامض النووي (100-1500) bp في حفرة الهلام الأولى لتحديد حجم الحزم ثم صورت هذه الحزم على جهاز توثيق الهلام Gel DOC بالأشعة فوق البنفسجية. تم تحليل صور الهلام، فالحزم التي تظهر في بعض الحفر وتغيب في الأخرى عند وزن جزيئي معين تسمى متعددة الأشكال polymorphisms، والحزم التي تظهر في جميع الحفر بوزن جزيئي معين تسمى الأشكال الأحادية Monomorphisms، أما الحزمة المفردة التي تظهر عند وزن جزيئي معين فتسمى بالشكل الفريد Unique، وحساب النسبة المئوية لها وفقا لـ (Al-Rawi, 2015).

6-3: التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing

لغرض التحري عن التسلسل التتابعي للنيوكليوتيدات أرسلت نماذج العينات (نتائج PCR مع الباديء الأمامي) للطفرة JAK2V617F بمقدار 20 مايكروليتر إلى شركة Macrogen الكورية، وجاءت النتائج بشكل ملفات يمكن فتحها والتعامل معها بواسطة برامج الحاسوب المتخصصة، وحلت باستعمال برنامج الحاسوب المتوفرة مجاناً على شبكة الأنترنت. وتم عمل المحاذاة والمقارنة بين التسلسلات الناتجة من التسلسل التتابعي، إذ قورنت النتائج مع البيانات العائدة لنفس الجين الموجودة في بنك الجينات و في المركز الوطني الأمريكي للتقانات الإحيائية NCBI التي درست سابقاً في دول أخرى من مختلف أنحاء العالم.

7-3: التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم تحليل البيانات باستخدام البرنامج الإحصائي Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 23)، قورنت الفروق المعنوية للمتوسطات باستخدام اختبار أقل فرقا معنوياً تحت مستوى احتمالية $P < 0.05$ ، حلت التكرارات وفترة الثقة (Confidence Intervals (CI) بإجراء اختبار (T) للعينات المستقلة Independent Samples T-test و مربع كاي χ^2 لإيجاد مدى التوازن بين العينات المشاهدة والمتوقعة، وحلت تتابع النيوكليوتيدات باستعمال برنامج Bioedit المحوسب المتوفر مجاناً على شبكة الأنترنت. وتم عمل المحاذاة والمقارنة بين التسلسلات الناتجة من التسلسل التتابعي، وقدرت كفاءة البادئ والقوة التشخيصية له من وفقاً لـ (Ismaeel, 2013) وحسب المعادلات التالية:

$$\text{Primer efficiency} = \frac{\text{The number of polymorphic bands produced by each the primers}}{\text{Total number of bands of all primers}}$$


$$\text{Primer discriminatory power \%} = \frac{\text{The number of polymorphic bands produced from the primer}}{\text{Total number of polymorphic bands produced from all primers}} \times 100$$

$$\text{Percentage of primer band \%} = \frac{\text{The number of bands produced by the primer}}{\text{Total number of bands of all primers}} \times 100$$

$$\text{Polymorphisms \%} = \frac{\text{The number of polymorphic bands produced from the primer}}{\text{Total number of bands produced from the primer}} \times 100$$

$$\text{Monomorphisms \%} = \frac{\text{The number of monomorphic bands produced from the primer}}{\text{Total number of bands produced from the primer}} \times 100$$

$$\text{Uniqueness \%} = \frac{\text{The number of unique bands produced from the primer}}{\text{Total number of bands produced from the primer}} \times 100$$



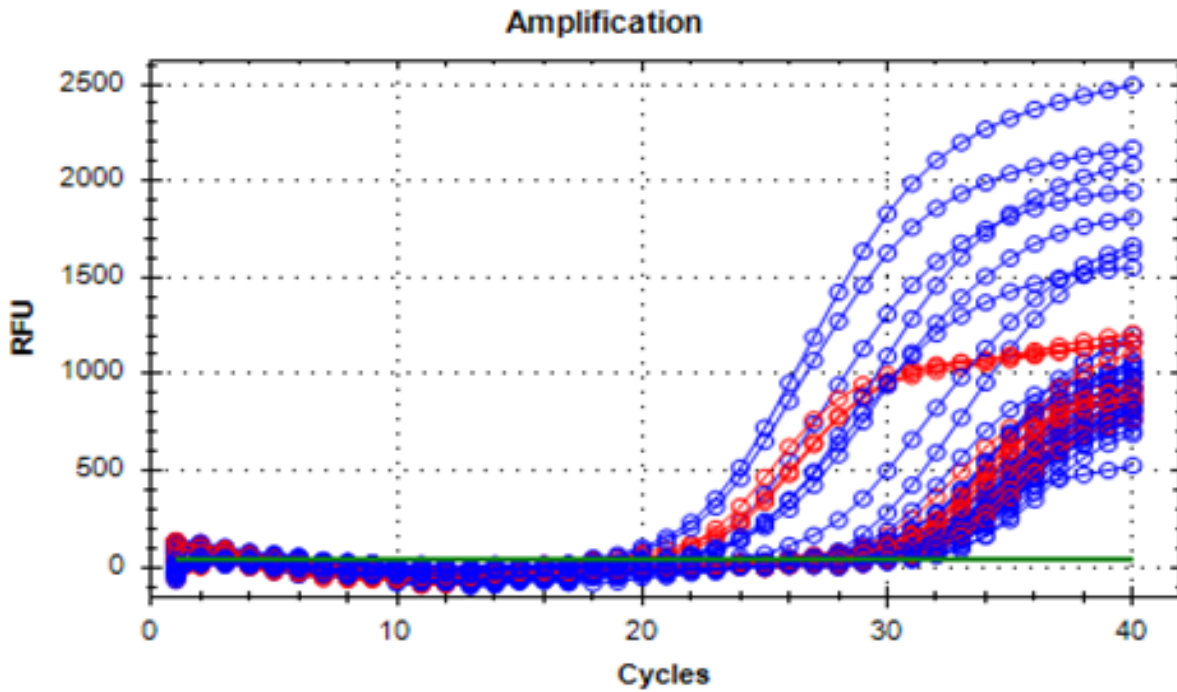
الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

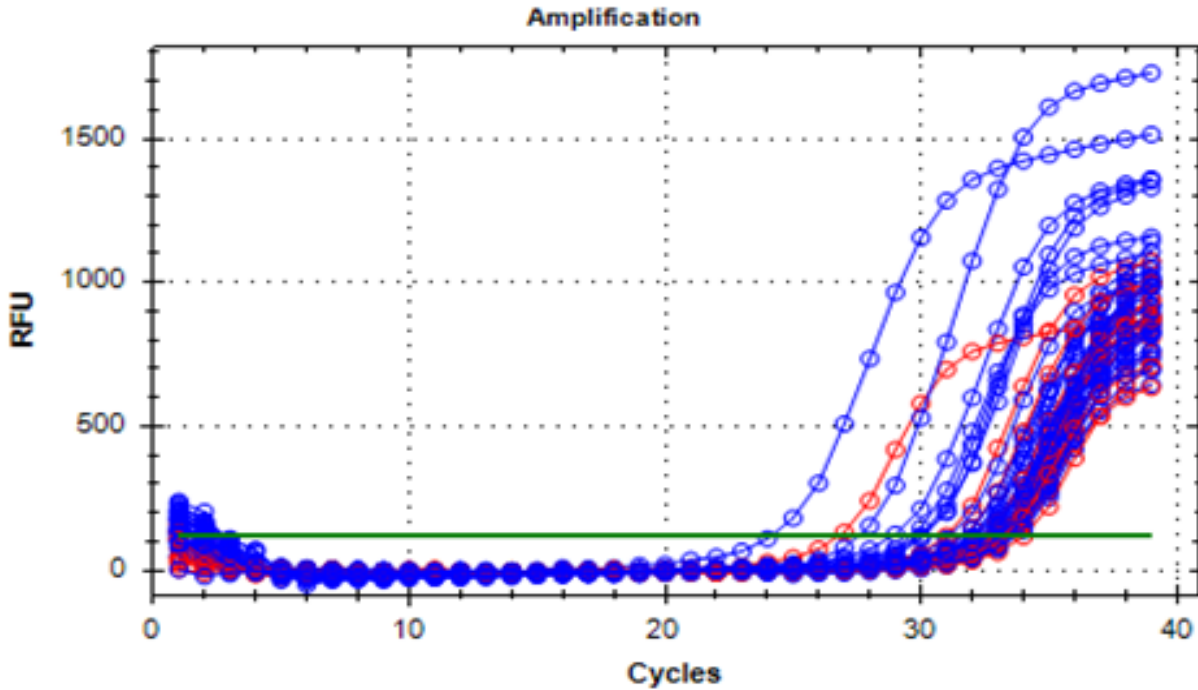
4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

1 - 4 : تفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

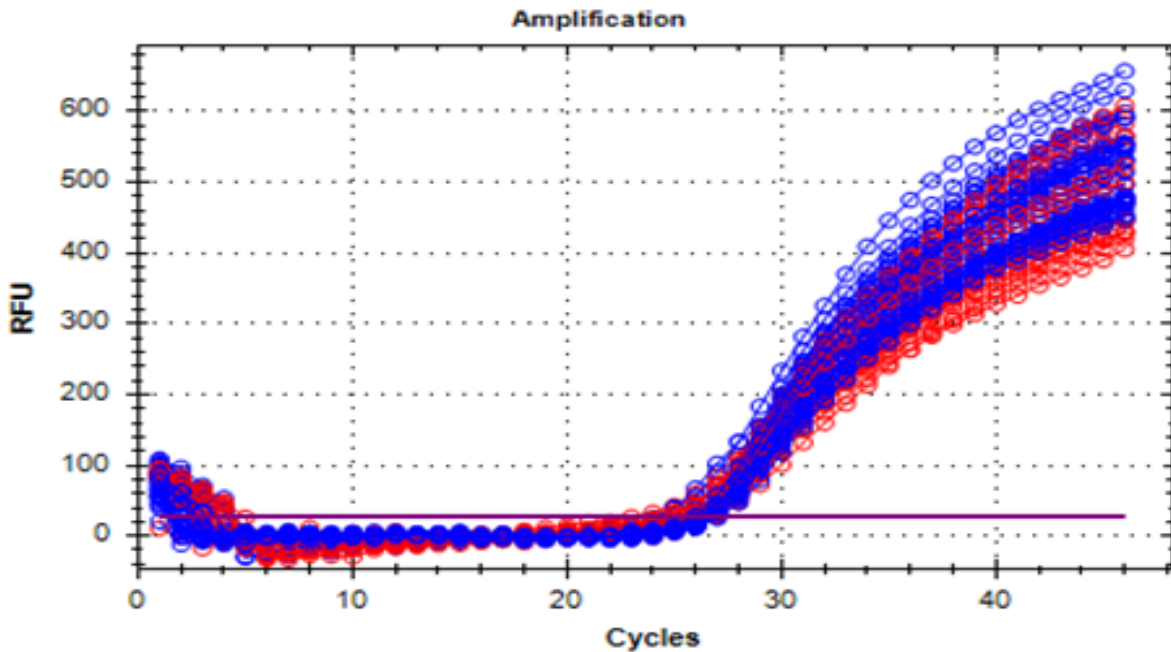
ظهرت نتائج دراسة التعبير الجيني للجينين المستهدفين (*RUNX3, RUNX1*)، و بالقياس مع الجين المرجعي (*GAPDH*)، كما في الأشكال (1 - 4)، (2 - 4)، (3 - 4) :



الشكل (1-4) منحنى التضخيم لتفاعل البوليميريز التسلسلي اللحظي لتعبير الجين *RUNX1*، لعينات ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد ومجموعة المقارنة، حيث يشير اللون الأزرق الى عينات المرضى ويشير اللون الأحمر لعينات المقارنة.



الشكل (2-4) منحنى التضخيم لتفاعل البوليميرز التسلسلي اللحظي لتعبير الجين *RUNX3*، لعينات ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد ومجموعة المقارنة، حيث يشير اللون الأزرق الى عينات المرضى ويشير اللون الأحمر لعينات المقارنة.



الشكل (3-4) منحنى التضخيم لتفاعل البوليميرز التسلسلي اللحظي لتعبير الجين *GAPDH*، لعينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد ومجموعة المقارنة، حيث يشير اللون الأزرق إلى عينات المرضى ويشير اللون الأحمر لعينات المقارنة.

وبعد تحديد قيمة Cycle Threshold (CT) التي تمثل بدء طور تضاعف الحامض النووي DNA لكل من الجين المستهدف و جين المقارنة، وإحصاء قيمة ΔC لهما، و Fold change للـ ΔC_T ، ثم تحليل البيانات باستخدام اختبار (t-test) كانت النتائج كالتالي:

4- 1- 1: تعبير *RUNX1* لعينات ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة

Gene expression of *RUNX1* in ALL and comparison group

نلاحظ من الجدول (1-4) انّ متوسط التعبير الجيني للجين *RUNX1* في مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد بلغ قيمة (4.5) بانحراف معياري (2.1) وهو أعلى قيمة من متوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة البالغ (3.4) بانحراف معياري (1.7)، وجاءت نتيجة اختبار (t) (1.7) بقيمة احتمالية (P-value) مقدارها (0.095) أكبر من مستوى المعنوية (0.05). أوضحت الدراسة من بيانات الجدول (1-4) إنه لا توجد فروق معنوية عند مستوى المعنوية (0.05) بين متوسط التعبير الجيني لـ *RUNX1* في مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومتوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة، كما موضح في الشكل (4- 4).

ان جين *RUNX1* له دور مهم في تكون الدم أثناء التطور الجنيني (Medinger et al., 2016). فضلا عن ذلك، فهو مسؤول عن التشكل في عملية تكوين الدم من الخلايا الجذعية stem cells والخلايا السلفية progenitor cells بسبب عملية التعبير التي يقوم بها في جميع المواقع المكونة للدم (Tracey and Speck, 2000). وقد يلعب جين *RUNX1* دورًا في تكوين الأورام أو دورا مثبطا اعتمادًا على نوع الورم الخبيث أو السرطانات الدموية (Mevel et al., 2019; Fu L et al., 2016). يشير فقدان الطفرات ذات التأثير الوظيفي في ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد للخلايا التائية إلى دور *RUNX1* كعامل كابح في تحول الخلايا التائية (Ito et al., 2015; Taniuchi et al., 2002)، ويقل تعبير *RUNX1* في الأورام الصلبة المعرضة لورم خبيث، مما يشير إلى دوره في قمع تطور الورم (Mevel et al., 2002; Taniuchi et al., 2019)، وإن ملاحظة الطفرة من نوع ثنائية الأليل biallelic mutations (أي حصول الطفرة لأليلي الجين الواحد) في بعض مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد تشير إلى دور جين *RUNX1* ككابح للورم في ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (Sood et al., 2017)، وهذا ما قد يفسر نتائج تعبير هذا الجين مع ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد في دراستنا الحالية.

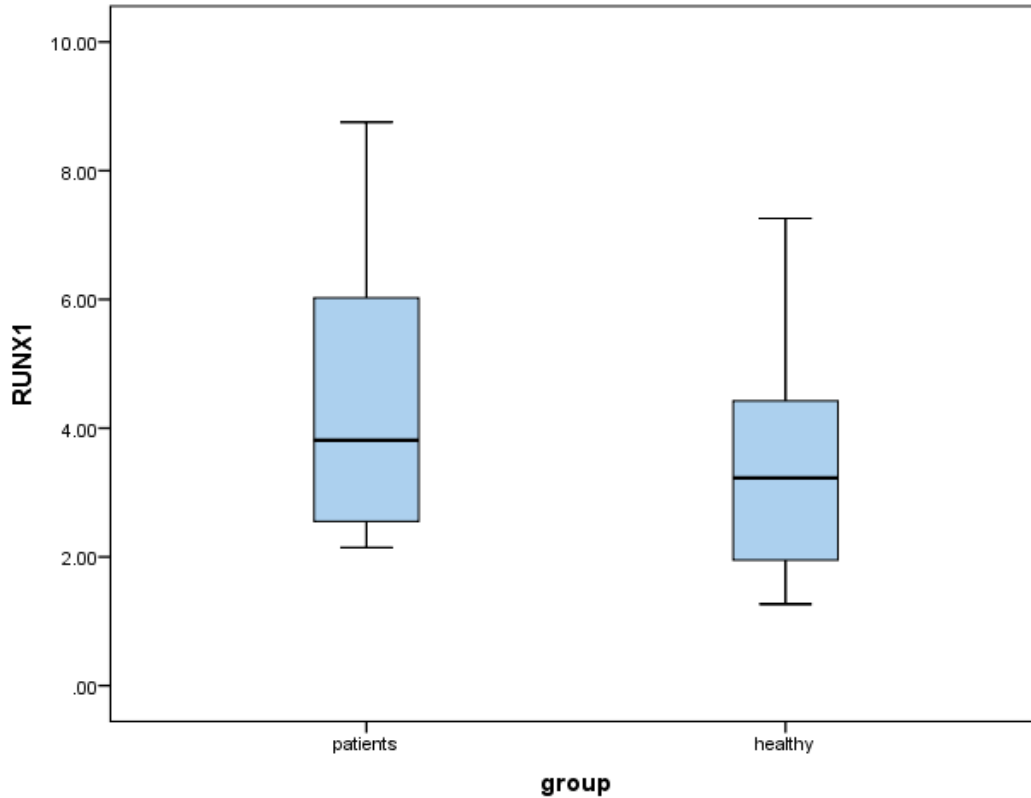
ومن خلال الأدلة التجريبية على الوظيفة المزدوجة لجينات *RUNX* في السرطان يظهر أن السيطرة العلاجية على تعبيرها الجيني يمكن أن تغير وظيفتها الورمية وتحولها إلى جينات كابحة للورم تنظم الورم

بشكل إيجابي وتنظم الجينات المسرطنة بشكل سلبي، وتعكس اتجاه عمليات الورم في المرضى (Morita *et al.*, 2017)، وإنّ الخبرة في التحديد الجزيئي الذي تغير فيه بروتينات RUNX وظيفتها المكونة للأورام إلى كابطة للورم هو مفتاح استخدامها كمؤشرات حيوية وأهداف علاجية في معالجة السرطان (Otálora *et al.*, 2019).

جدول (4 - 1) نتائج إحصاء التعبير الجيني للجين RUNX1 مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة.

العينات Sample	العدد Number	المتوسط الحسابي Mean	الانحراف المعياري Std. deviation	قيمة t	القيمة الاحتمالية P-value	الدلالة الاحصائية
المرضى	20	4.5	2.1	1.7	0.095	غير معنوية
الأصحاء	20	3.4	1.7			

Significance *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.005, NS=No significant P >0.05



الشكل (4 - 4) Box plot تعبير الجين RUNX1 مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة.

2-1-4: تعبير جين *RUNX1* لعينات ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة**Gene expression of *RUNX1* in AML and comparison group**

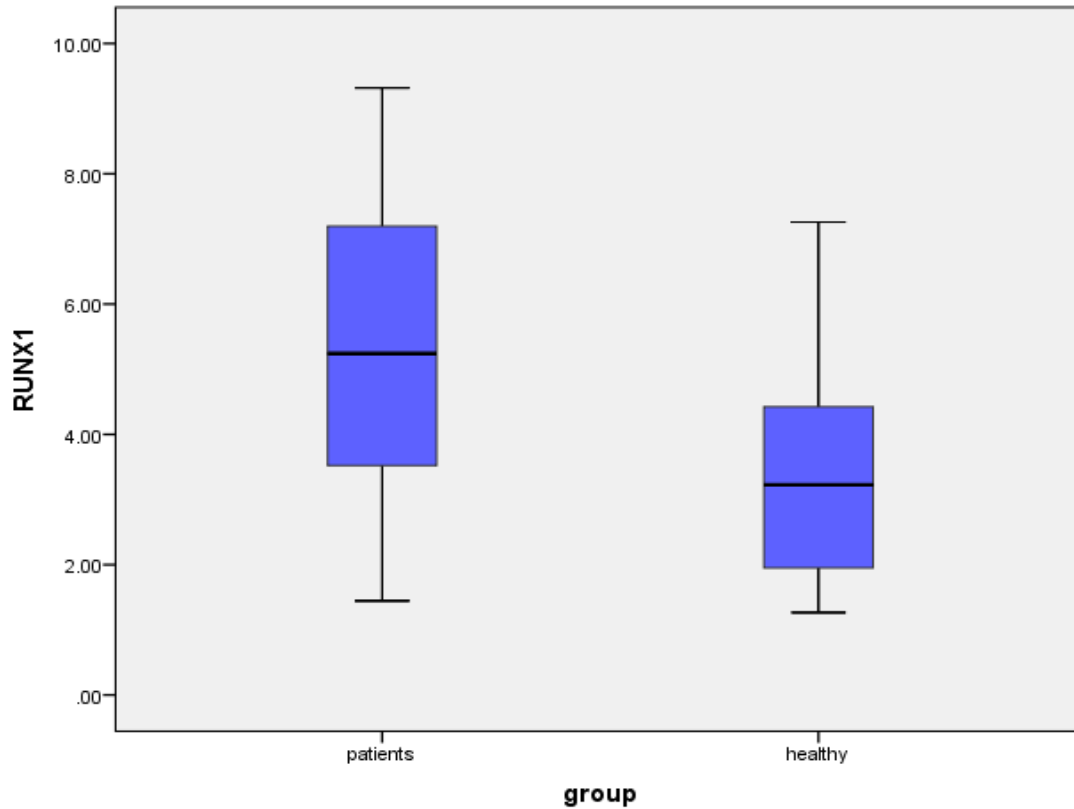
نلاحظ من الجدول (2-4) أنّ متوسط التعبير الجيني للجين *RUNX1* في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد بلغ قيمة (5.4) بانحراف معياري (2.3) وهو أعلى قيمة من متوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة البالغ (3.4) بانحراف معياري (1.7)، وجاءت نتيجة اختبار (t) (3.06) بقيمة احتمالية (P-value) مقدارها (0.04) وهي أصغر من مستوى المعنوية (0.05)، ويظهر من بيانات الجدول (2-4) إنه توجد فروق معنوية عند مستوى المعنوية (0.05) بين متوسط التعبير الجيني لـ *RUNX1* في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومتوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة، كما موضح في الشكل (4-5).

إنّ الطفرات في جين *RUNX1* تتسبب في زيادة أو نقصان الأداء الوظيفي لهذا الجين وتعرض على ابيضاض الدم (Niini *et al.*, 2000)، وقد لوحظ في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد الانتقال الكروموسومي (8؛ 21) t مما قد يسبب هذا الانتقال التأثير على مستويات التعبير عن الجين *RUNX1*، و في ظل التعبير الجيني العالي يمكن أن يعمل *RUNX1* كجين مسرطن يحث بدوره على تكوين ابيضاض الدم (Fu L *et al.*, 2016).

تتوافق نتائج دراستنا الحالية مع (Said *et al.*, 2021) والذي أظهرت دراسته مستويات عالية بشكل ملحوظ من التعبير الجيني لـ *RUNX1* بين مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة، وأيضاً مع دراسة (Krygier A *et al.*, 2018) و (Fu L *et al.*, 2016) حيث وجدوا لدى دراستهم لـ 157 عينة من عينات نخاع العظم من ابيضاض الدم النخاعي الحاد أن تعبير *RUNX1* كان أعلى بشكل ملحوظ في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد.

جدول (4-2) نتائج إحصاء التعبير الجيني للجين *RUNX1* مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة.

العينات Sample	العدد Number	المتوسط الحسابي Mean	الانحراف المعياري Std. deviation	قيمة t	القيمة الاحتمالية P-value	الدلالة الاحصائية
المرضى	20	5.4	2.3	3.06	0.04*	معنوي
الاصحاء	20	3.4	1.7			
Significance *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.005, NS=No significant P >0.05						



الشكل (4-5) Box plot تعبير الجين *RUNX1* مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة.

3-1-4: تعبير جين *RUNX3* لعينات ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة**Gene expression of *RUNX3* in ALL and comparison group**

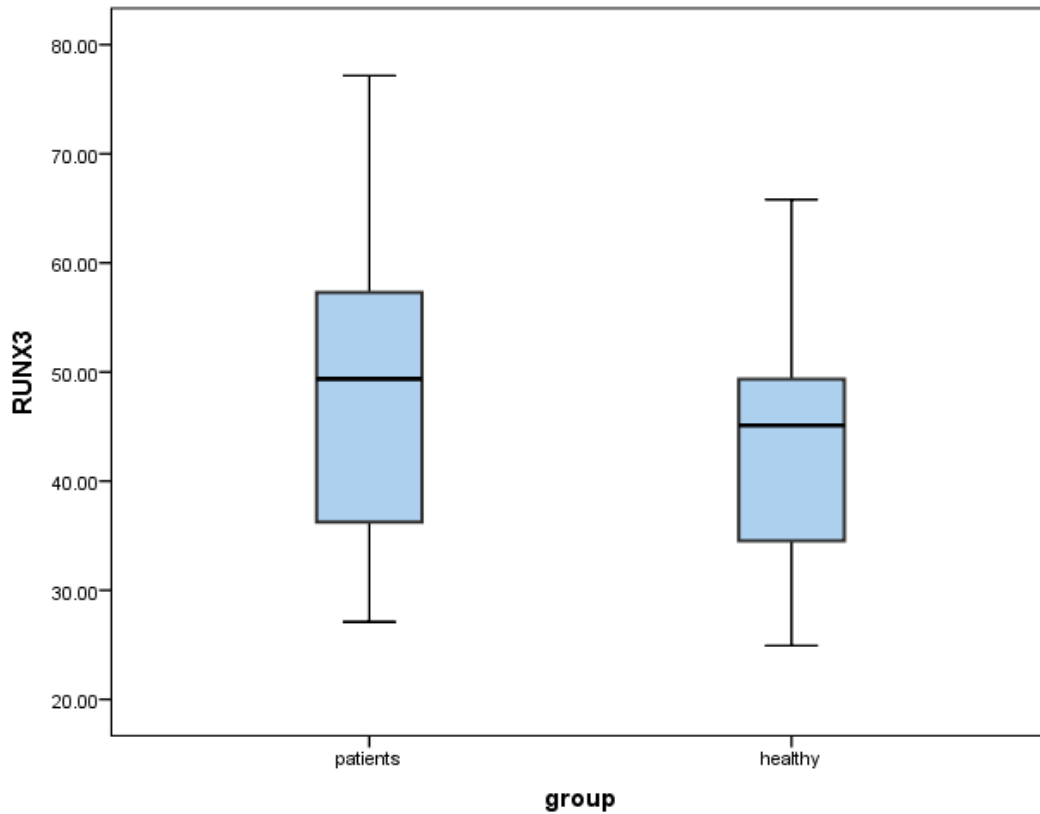
نلاحظ من الجدول (3-4) أنّ متوسط التعبير الجيني للجين *RUNX3* في مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد بلغ قيمة (48.7) بانحراف معياري (14.5) وهو أعلى قيمة من متوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة البالغ (42.3) بانحراف معياري (10.4)، وجاءت نتيجة اختبار (t) (1.59) بقيمة احتمالية (P-value) مقدارها (0.12)، وهي أكبر من مستوى المعنوية (0.05)، ويظهر من بيانات الجدول (3-4) أنه لا توجد فروق معنوية عند مستوى المعنوية (0.05) بين متوسط التعبير الجيني لـ *RUNX3* في مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومتوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة، كما موضح في الشكل (4-6).

بالنظر للطبيعة المثبطة للجين *RUNX3* في أورام الخلايا التائية في الإنسان، فإنه قد يبدو أن جين *RUNX3* يعمل بشكل مختلف في الأورام الخبيثة المختلفة، فقد يزيد من مستوى التعبير الجيني أو يخفض مستوى التعبير الجيني مما يسهم في تقدم وتطور الأمراض الورمية (Haider *et al.*, 2016).

تتفق دراستنا مع (Szmajda - Krygier *et al.*, 2022)، إذ تضمنت دراستهم 60 عينة من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد مع 40 عينة كمجموعة مقارنة، حيث ظهرت القيمة الاحتمالية لتعبير جين *RUNX3* (0.123) بما لا يدل على وجود فرق معنوي بين المجموعتين في مستوى التعبير الجيني، وإن مستويات التعبير الجيني المنخفضة لـ *RUNX3* قد ترتبط بحدوث كروموسوم فيلادلفيا في حالات ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد عند البالغين. ويبدو أن هذا الكروموسوم ينظم بشكل سلبي مستوى نسخ الجين *RUNX3*، وإن المعلومات حول مستوى تعبير جين *RUNX3* عند البالغين من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد مع جين الاندماج *BCR-ABL* المتكون في حالة كروموسوم فيلادلفيا محدودة، والمصادر العلمية المتاحة تشير فقط إلى إمكانية أن يحدث تقليل في تنظيم تعبير *RUNX3* بسبب Hypermethylation في Promoter1 (P1) أو Promoter2 (P2) من هذا الجين، وهذا ما تم ملاحظته في ابيضاض الدم النخاعي الحاد، و ابيضاض الدم النخاعي المزمن، وكذلك في خلايا سرطان المعدة، مما يشير إلى أن Hypermethylation في الجين *RUNX3* تقلل من تعبيره خلال تطور السرطان (Yokomizo-Nakano and Sashida, 2021).

جدول (4 - 3) نتائج إحصاء التعبير الجيني للجين *RUNX3* مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة.

الدلالة الاحصائية	القيمة الاحتمالية P-value	قيمة t	الانحراف المعياري Std. deviation	المتوسط الحسابي Mean	العدد Number	العينات Sample
غير معنوية	0.12	1.59	14.5	48.7	20	المرضى
			10.4	42.3	20	الاصحاء
Significance *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.005, NS=No significant P >0.05						



الشكل (4 - 6) يوضح Box plot تعبير الجين *RUNX3* مع مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ومجموعة المقارنة.

4-1-4: تعبير جين *RUNX3* لعينات ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنةGene expression of *RUNX3* in AML and comparison group

نلاحظ من الجدول (4-4) أنّ متوسط التعبير الجيني للجين *RUNX3* في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد بلغ قيمة (45.9) بانحراف معياري (13.7) وهو أعلى قيمة من متوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة البالغ (42.3) بانحراف معياري (10.4)، وجاءت نتيجة اختبار (t) (0.93) بقيمة احتمالية (P-value) مقدارها (0.36) وهي أكبر من مستوى المعنوية (0.05)، ويظهر من بيانات الجدول (4-4) إنه لا توجد فروق معنوية عند مستوى المعنوية (0.05) بين متوسط التعبير الجيني لـ *RUNX3* في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومتوسط التعبير الجيني لمجموعة المقارنة، كما موضح في الشكل (4-7).

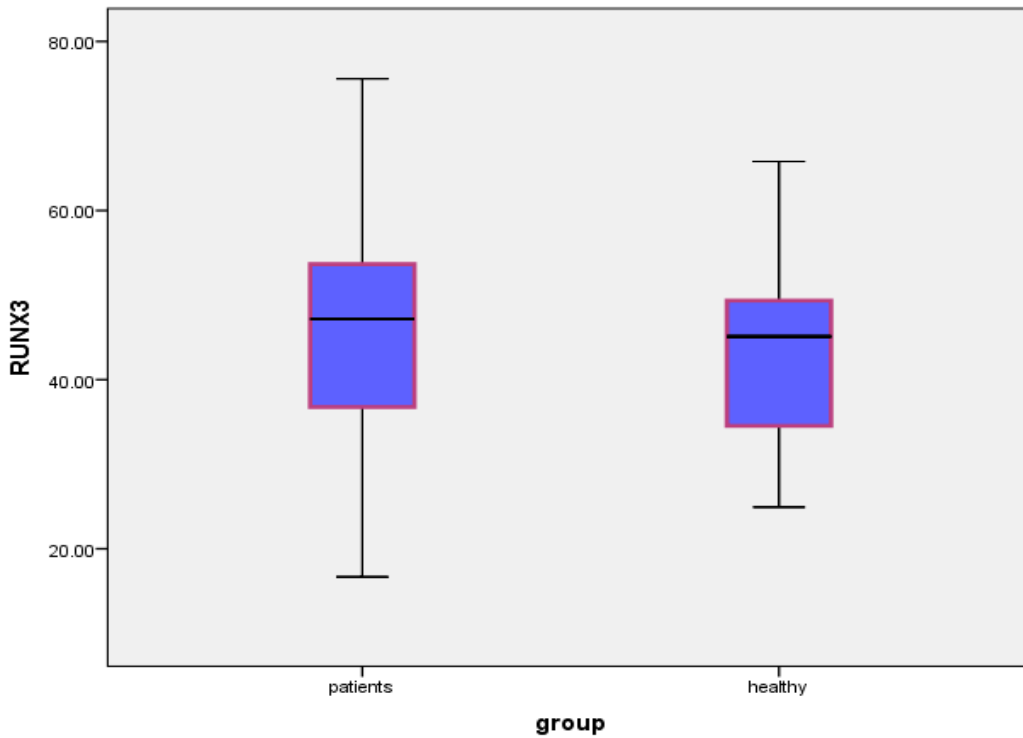
يقوم جين *RUNX3* بدور مثبط للورم في سرطان المعدة (Inoue et al., 2002 ; Li et al., 2002)، وأنّ الطفرات الملاحظة في الجين *RUNX3* هي أقل مما في *RUNX1* الأمر الذي قد يقلل من مستوى التعبير في *RUNX3* (Otto et al., 2003).

تتفق دراستنا مع ما جاء في دراسة (Mourtada et al., 2020) والتي تتضمن 46 عينة من مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد حيث لم تظهر فروق معنوية بين مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة وكانت القيمة الاحتمالية لتعبير جين *RUNX3* (0.727)، أيضاً تتفق مع Krygier et al., (2018) والذين تضمنت دراستهم 43 عينة من ابيضاض الدم النخاعي الحاد وكانت القيمة الاحتمالية لتعبير جين *RUNX3* (0.771). ذكرت دراسة أجراها (Jiang et al., 2008) أنّ مستوى تعبير *RUNX3* مرتبط بتطور سرطان الثدي وأنه ينخفض في هذا النوع من السرطان، وبين (Cheng et al., 2008) أنّ السبب الرئيسي لآلية التعطيل هذه قد يكون hypermethylation في منطقة المحفز، وأثبت من خلال الدراسة التي أجراها أن التعبير في جين *RUNX3* كان عاملاً تنبؤياً مستقلاً في مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد من الاطفال، وإنّ تعبير جين *RUNX3* لم يكن مرتبطاً مع مستوى العمر أو الجنس، ومع ذلك في مجموعة من المرضى الذين يعانون من انخفاض مستوى التعبير الجيني في جين *RUNX3*، كان هذا الانخفاض مرتبطاً بشكل كبير بوجود الانتقالات الكروموسومية (8؛21) t. وإنّ مستويات التعبير الجيني لـ *RUNX3* المنخفضة كثيراً ما يتم تحديدها في المرضى الذين يعانون من M2 و M4 حسب التصنيف الفرنسي الأمريكي البريطاني لابيضاض الدم النخاعي الحاد (Cheng et al., 2008).

جدول (4- 4) نتائج إحصاء التعبير الجيني للجين *RUNX3* مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة.

العينات Sample	العدد Number	المتوسط الحسابي Mean	الانحراف المعياري Std. deviation	قيمة t	القيمة الاحتمالية P-value	الدلالة الاحصائية
المرضى	20	45.9	13.7	0.93	0.36	غير معنوية
الاصحاء	20	42.3	10.4			

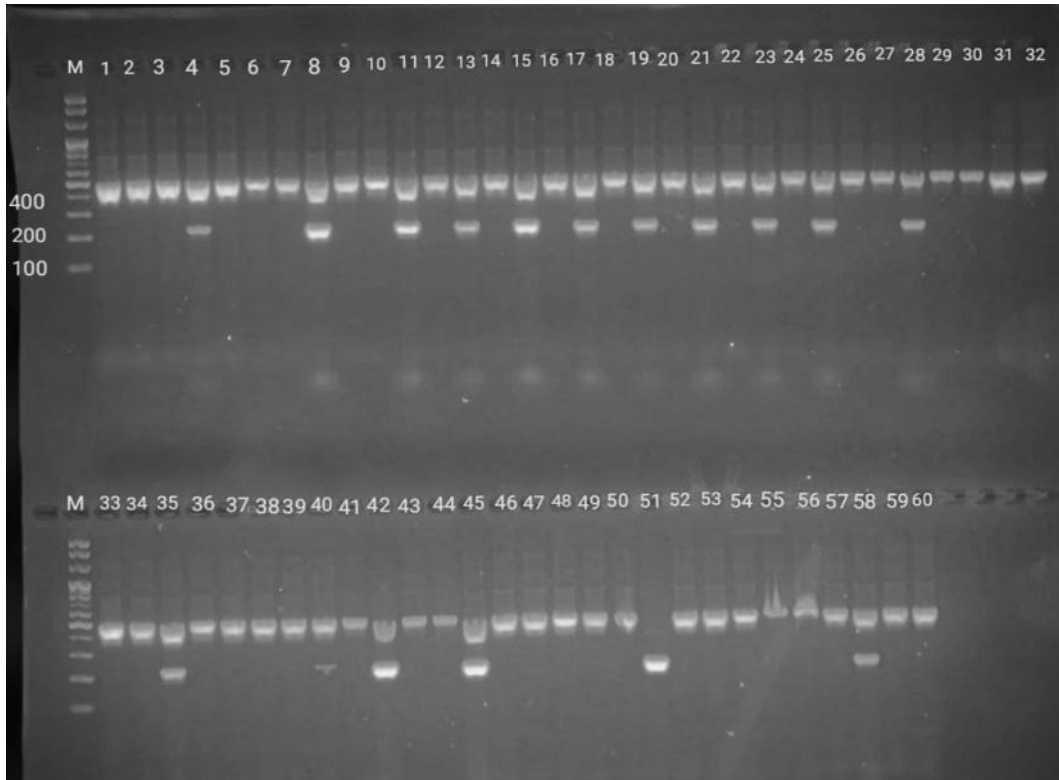
Significance *P <0.05,**P <0.01,***P <0.005,NS=No significant P >0.05



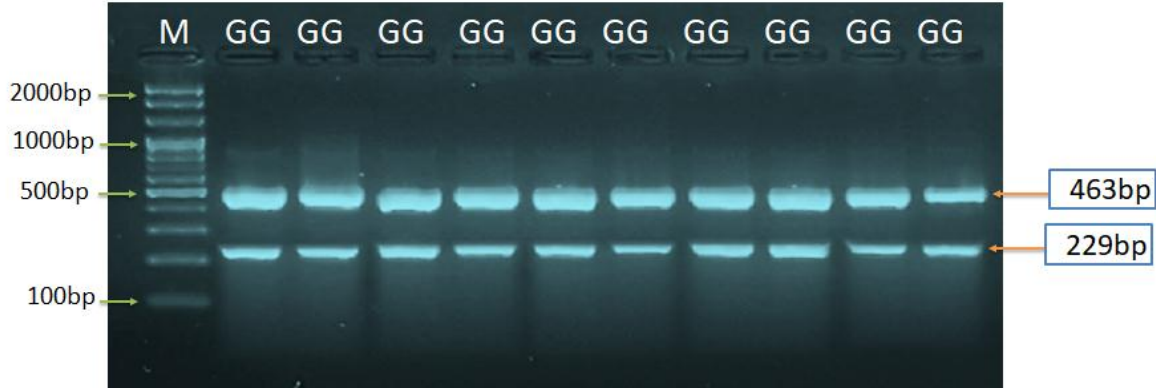
الشكل (4- 7) Box plot تعبير الجين *RUNX3* مع مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ومجموعة المقارنة.

2-4: الكشف عن الطفرة V617F للجين *JAK2* بواسطة ARMS-PCRDetection the Gene Mutation *JAK2V617F* by ARMS-PCR

أظهر الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بعد اجراء عملية التضخيم بواسطة تفاعل البوليميريز المتسلسل بطريقة ال-ARMS النتائج كما في الشكل التالي:



الشكل (4-8) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 2 % والمحتوي على نتائج تضخيم PCR-ARMS لقطعة الجين *JAK2* عند فرق جهد كهربائي 80 فولت ولمدة ساعة مع الدليل الحجمي (M) (100 - 2000) ، حيث ان العينات (lane 1- 40) تمثل مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد، والعينات (lane 41- 60) تمثل مجموعة المقارنة من الأصحاء. ظهرت الحزم عند 463bp والتي تمثل internal control، وعند 229bp وتمثل النوع الشائع wild-type.



الشكل (4-9) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز 2% عند فرق جهد كهربائي 80 فولت ولمدة ساعة والتي تظهر نتائج تفاعل T-PCR-ARMS للطفرة V617F في جين *JAK2* لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد. حيث M الدليل الحجمي (100bp- 2000)، lane GG يمثل النوع الشائع الطبيعي لـ *JAK2* والذي يظهر عند الحزمة 463bp والحزمة 229bp.

لتفسير هذه النتائج نلاحظ ما يلي:

1. وجود الحزمة عند 463bp فقط يشير إلى أن العينة تحتوي control band وإنها سالبة negative للطفرة *JAK2V617F*.
2. وجود الحزمة عند 463bp و 267bp يشير إلى أن العينة تحتوي على control band و mutant أي أنها موجبة positive للطفرة *JAK2V617F* وتكون من النوع الطافر mutant type.
3. وجود الحزمة عند 463bp و 229bp يشير إلى أن العينة control band و wild type وإنها سالبة للطفرة *JAK2V617F* وتكون من النوع الشائع wild type.

وفي ضوء ذلك يظهر لنا عدم وجود الطفرة *JAK2V617F* عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد للعينات قيد دراستنا الحالية، ولم تظهر هذه الطفرة أيضا عند مجموعة المقارنة.

تصنف الأورام النخاعية إلى AML، و Myeloproliferative neoplasm (MPN)، و myelodysplastic syndrome (MDS) وإن السمة المشتركة للأورام النخاعية تكمن في أصلها الذي يكون من الخلايا السلفية المنتجة لخلايا متميزة نهائيًا لسلسلة من الخلايا النخاعية، ولقد لوحظت الطفرة JAK2V617F في MPD (myeloproliferative disorders) (Baxter *et al.*, 2005;) وفي MDS (Jekarl *et al.*, 2010)، فمن الممكن تصور أن في حالة ابيضاض الدم النخاعي الحاد يكون هناك اضطراب في الخلايا الجذعية النخاعية، قد تحصل فيه أيضًا طفرة JAK2. على الرغم من أن إشارات STAT يتم تنشيطها في معظم حالات ابيضاض الدم النخاعي الحاد، يُفترض أن طفرة JAK2 يمكن أن تكون مسؤولة جزئيًا عن تنشيط STAT في ابيضاض الدم النخاعي الحاد (Lee *et al.*, 2006).

أظهرت بعض الدراسات وجود طفرة V617F في JAK2 في ابيضاض الدم النخاعي الحاد، كما في دراسة Lee *et al.*, (2022) حيث شخصت هذه الدراسة الطفرة في JAK2 لحالتين من ابيضاض الدم النخاعي الحاد بدون إصابة سابقة ب MPN، و Farasani, (2022) الذي شخص وجود الطفرة بنسبة 15% من بين 100 عينة من مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد، وأيضا (Jekarl *et al.*, 2010) الذي ذكر أن حدوث طفرة V617F في ابيضاض الدم النخاعي الحاد كان بنسبة 13.3%، من ناحية أخرى وجد Lee *et al.*, (2006) أن نسبة صغيرة من عينات ابيضاض الدم النخاعي الحاد حوالي 2.7% فقط تحتوي على طفرة V617F وأدت إلى حدوثها بنسبة منخفضة جدًا.

في هذه الدراسة، لاحظنا عدم وجود طفرة V617F في JAK2 في جميع العينات المدروسة من ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد وهذه النتائج تتماشى مع Jaradat *et al.*, (2015) الذي أظهرت نتائج دراسته لـ 40 عينة من ابيضاض الدم للحالات الأربعة منها (اللمفاوية الحادة والمزمنة والنخاعية الحادة والمزمنة) عدم تشخيص الطفرة في أي من الحالات السابقة، وكذلك مع دراسة Badrawy and Ibrahim, (2014) التي تضمنت 90 عينة منها 30 من ابيضاض الدم النخاعي الحاد ولم تشخص الطفرة في عينات الدراسة.

أشار Itzykson *et al.*, (2013) إلى أن 10% من ابيضاض الدم النخاعي المزمن يحملون الطفرة V617F، و بين Levine *et al.*, (2005) إمكانية ملاحظة V617F في ابيضاض الدم النخاعي الحاد بشكل متكرر عندما تتحول MPN إلى ابيضاض الدم النخاعي الحاد ولكن ليس في ابيضاض الدم النخاعي الحاد للإصابة الحديثة de novo، و ذكرت دراستهم أن الطفرة V617F نادرة جدًا في ابيضاض الدم النخاعي الحاد de novo، بالرغم من حدوث الفسفرة بشكل متكرر نسبيًا لـ STAT3 في الأرومات النقوية، حيث درس 222 مريضًا من مرضى ابيضاض الدم النخاعي الحاد، وحدد طفرة V617F في

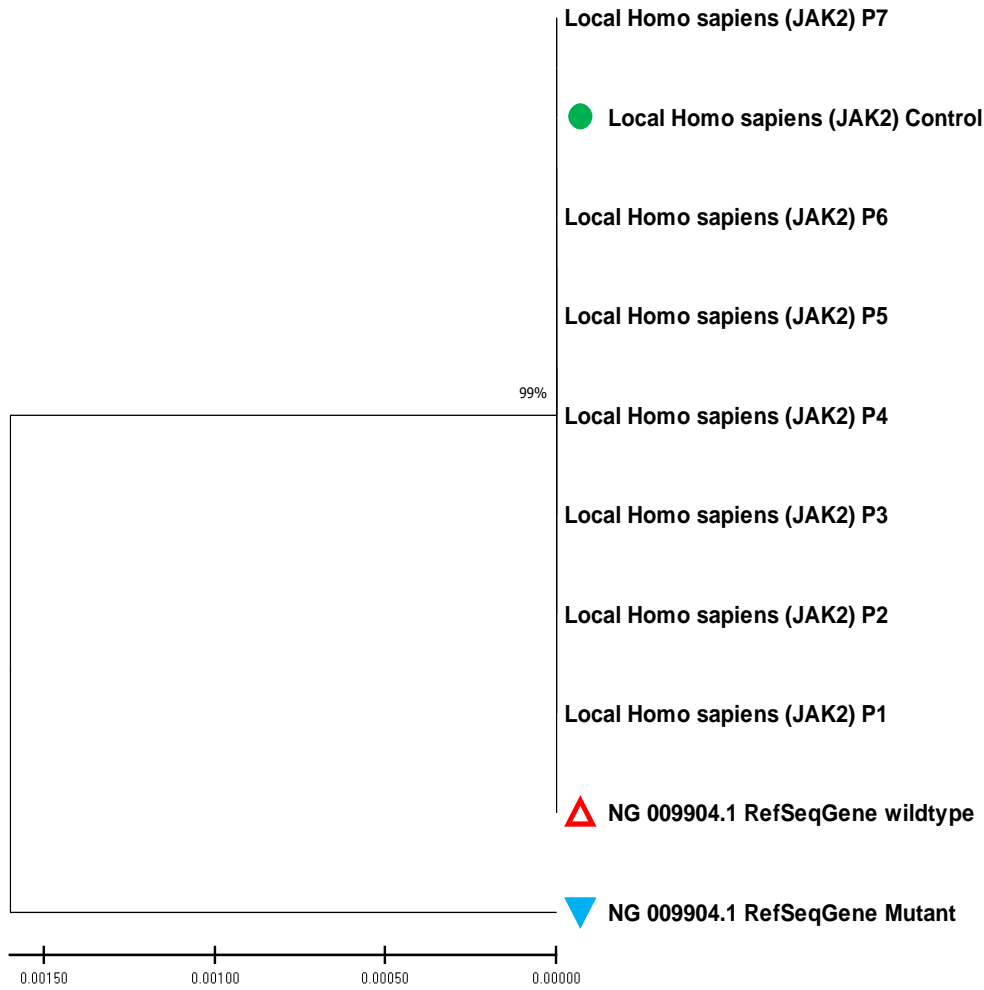
أربع حالات فقط أي بنسبة % 2، ثلاثة منهم كان لديهم اضطراب (MPN)، وواحد كان لديه ابيضاض الدم النخاعي الحاد ثانوي ناتج عن كثرة الصفيحات thrombocythemia الأساسي.

فيما يتعلق بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، فإن الآلية المعروفة لتنشيط *JAK2* في ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد هي إنتقال كروموسومي (9;12)(p24;p13) t، الذي ينتج من اندماج *chimaeric Tel-Jak2* والبروتين الناتج عن هذا الاندماج ينشط *Jak2 kinase*، والذي يحدث على التكاثر بشكل مستقل عن السايوتوكاين وينتج عنه تكوين ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد، وقد لوحظ حدوث ذلك في الدراسات على الحيوانات المختبرية مثل الفئران (Carron *et al.*, 2000; Lacronique *et al.*, 1997). أظهرت نتائجنا أيضاً عدم وجود طفرة V617F في جميع الحالات المدروسة من ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد وهي متفقة مع نتائج (Sulong *et al.*, 2005)، حيث أظهرت دراستهم لـ 128 عينة من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد عدم الحصول على طفرة V617F عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بالأليل، وتتوافق مع (Ruiz-Argüelles *et al.*, 2006) الذين لم يجدوا حالات إيجابية من طفرة V617F في أي من ابيضاض الدم اللمفاوي و النخاعي الحاد، وأيضاً مشابهه لنتائج دراسة (Badrawy and Ibrahim, 2014) التي شملت 60 من مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد.

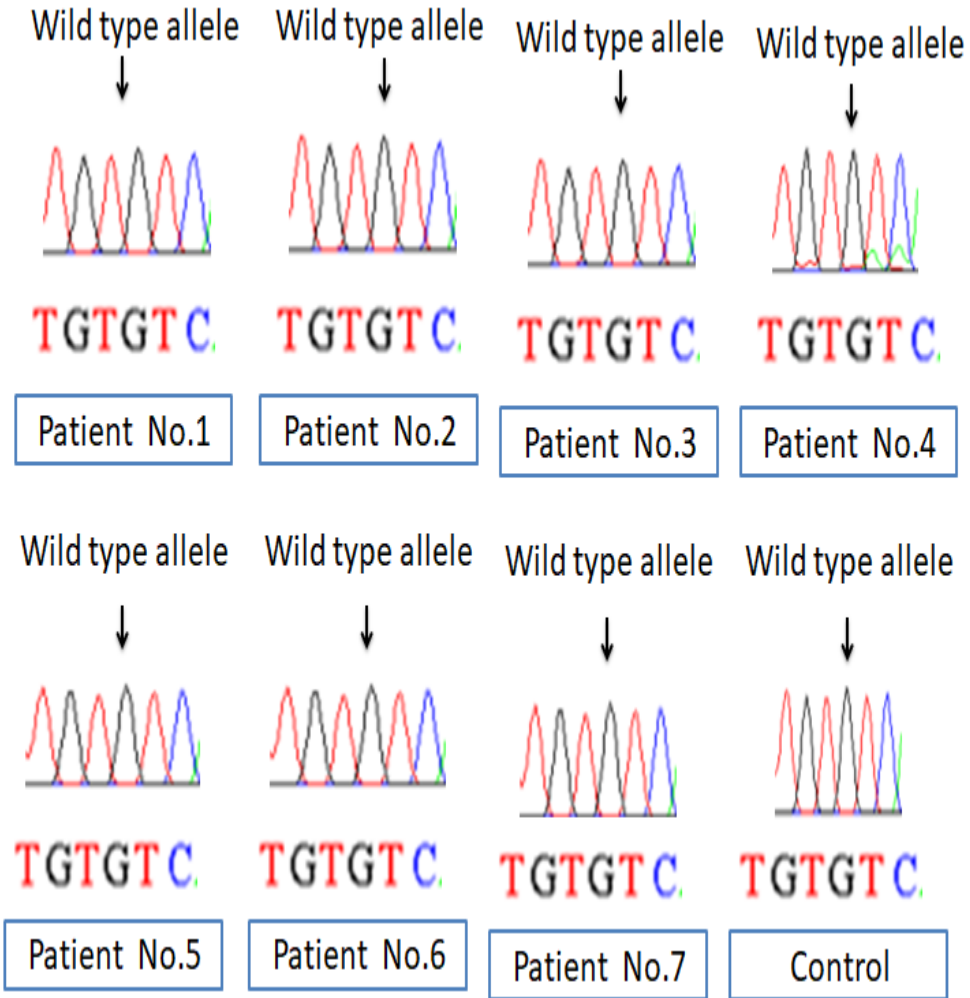
4 - 3 : دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية للطفرة JAK2V617F

Study of nitrogen bases sequencing JAK2V617F

أظهرت نتائج تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية لسبعة من عينات المرضى وواحدة من عينات مجموعة المقارنة بطريقة محاذاة التسلسل المتعدد (Multiple sequence alignment (MSA) (Clustalw omega 1.2.3., 2022) للقطعة المدروسة من جين *JAK2* في منطقة إكسون 14 والبالغ حجمها 463 bp وبالمقارنة مع التتابعات المذكورة في بنك الجينات لنفس الجين تحت رقم الانضمام (NG-009904.1)، إنَّ عينات مرضى ابيضاض الدم الحاد لدى الإنسان في دراستنا ذات صلة وثيقة بالنوع الشائع المرجعي NCBI-BLAST *JAK2* Reference wild type (NG_009904.1)، وإنَّ التتابعات التي تم الحصول عليها لهذه العينات لم تلاحظ فيها الطفرة JAK2V617F أي أنها ذات طراز وراثي Homozygous (GG) من النوع الشائع wild type ولا تحمل الطراز Heterozygous (GT) أو Homozygous (TT) من النوع الطافر mutant type. تتوافق هذه النتيجة مع جانب من دراسة (Jaradat *et al.*, 2015) التي حصل فيها على النوع الشائع wild type بالنسبة للطفرة JAK2V617F (c.1849G homozygous wild-type).



الشكل (4-11) تحليل الشجرة الوراثية المستند إلى جين *JAK2* في ابيضاض الدم الحاد للإنسان *Homo sapiens* لعينات مرضى عراقيين تستخدم لتحديد تحليل طفرة V617F في *JAK2* . وتم إنشاء هذه الشجرة باستخدام طريقة مجموعة الأزواج غير الموزونة Unweighted Pair group مع المتوسط الحسابي (UPGMA tree) في (MEGA 6.0 version). أظهرت عينات مرضى ابيضاض الدم الحاد لدى الإنسان أنها ذات صلة وثيقة بالنوع الشائع المرجعي NCBI-BLAST *JAK2* Reference wild type (NG_009904.1).



الشكل (4-12) Chromatogram peaks توضح تسلسل الحامض النووي لجين *JAK2* في ابيضاض الدم الحاد لدى الإنسان وعينات المقارنة التي أظهرت فقط أليل من النوع الشائع (أليل G) ولا توجد أنواع طافرة من (أليل T).

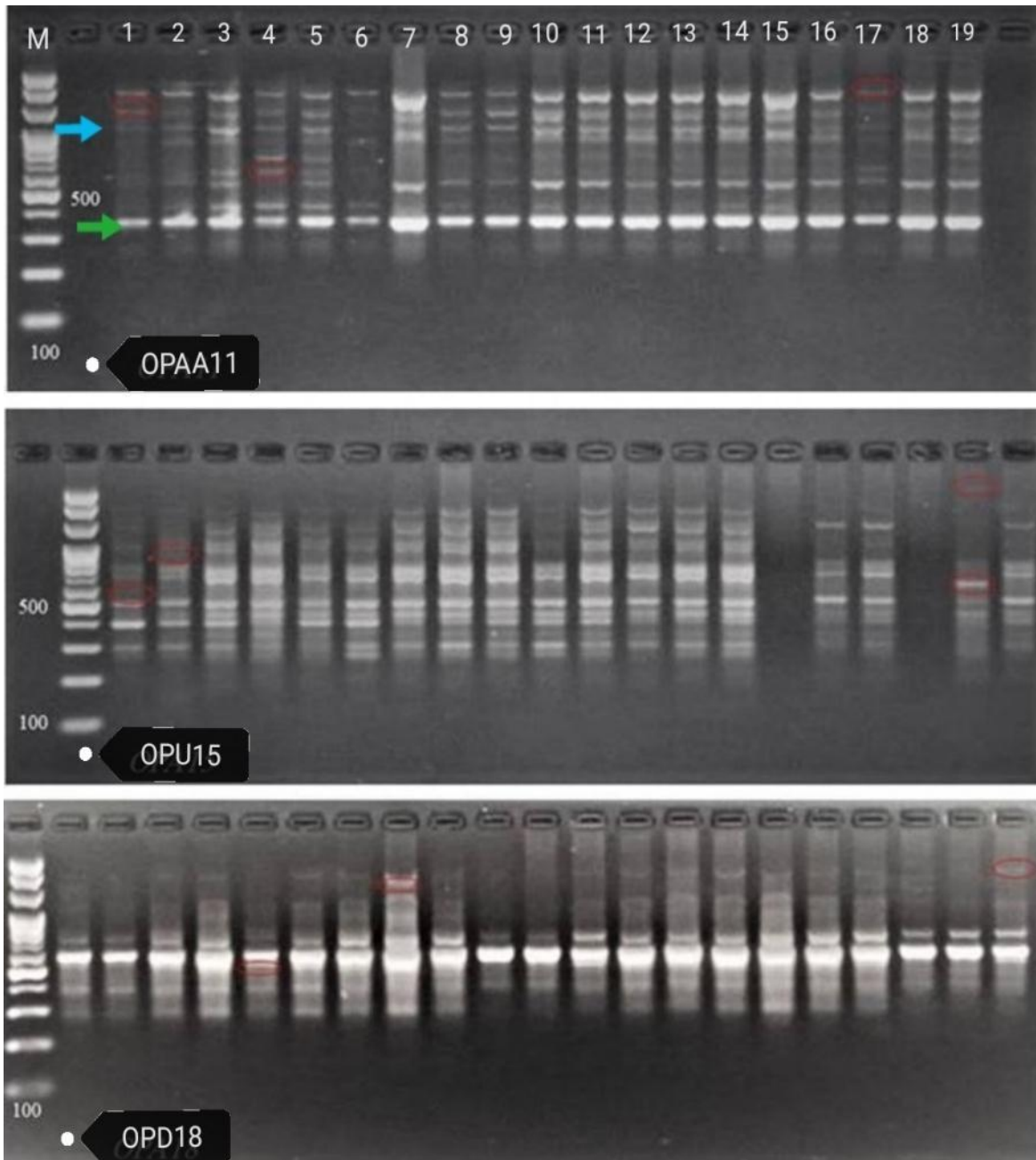
4-4: كشف التعدد الشكلي الوراثي لعينات ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد بتقنية PCR-RAPD

Detection genetic polymorphism of the Acute lymphoblastic and myeloid leukemia samples by RAPD-PCR technique

أظهرت نتائج التضخيم أن جميع البادئات (OPD18 و OPU15 و OPAA11) قد أسهمت في عملية التضخيم لدى عينات المرضى ومجموعة المقارنة وتم تحديد نوع الحزمة اعتمادًا على حجمها وموقعها في هلام الاكاروز، وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج عملية التضخيم اختلافًا في عدد الحزم للحامض النووي بين المجموعتين حيث بلغ العدد الكلي 298 في المرضى، و235 في مجموعة المقارنة، كما هو موضح في شكل (4-13).

كشفت الدراسة الحالية أن الحزم الناتجة عن البادئ OPU 15 كانت الأكثر عدداً وبلغت 111 حزمة من مجموع الحزم، في مجموعة المرضى كان OPAA11 أعلى كفاءة 0.020، ويلاحظ أن هذا البادئ أعطى أعلى نسبة مئوية من تعدد الأشكال Polymorphism بلغت 6.741، مع قوة تشخيصية تبلغ % 37.5 وهي أعلى قوة تشخيصية، بينما مع مجموعة المقارنة أعطى البادئ OPU15 أعلى عدد من الحزم متعددة الأشكال (7)، بكفاءة 0.029 وهي الأعلى، ويلاحظ أن هذا البادئ أعطى أعلى نسبة مئوية من تعدد الأشكال بلغت 9.722 مع أعلى قوة تشخيصية % 50.

سجلت الحزم الأصغر حجمًا عند 180 bp مع OPU15 في مجموعة المرضى، بينما تم تسجيل الحزم الأكبر حجمًا في البادئين OPAA11 و OPU15 بحجم 1800 bp، مقارنةً بعينات المقارنة تم تسجيل الحزم الأكبر حجمًا في OPU15، وهو الحجم الأعلى 2000 bp. أظهرت النتائج أن للبادئ OPU15 الحزمة 180 bp في مجموعة المرضى والتي لم تلاحظ في مجموعة المقارنة كما هو مبين في الشكل (4-13).



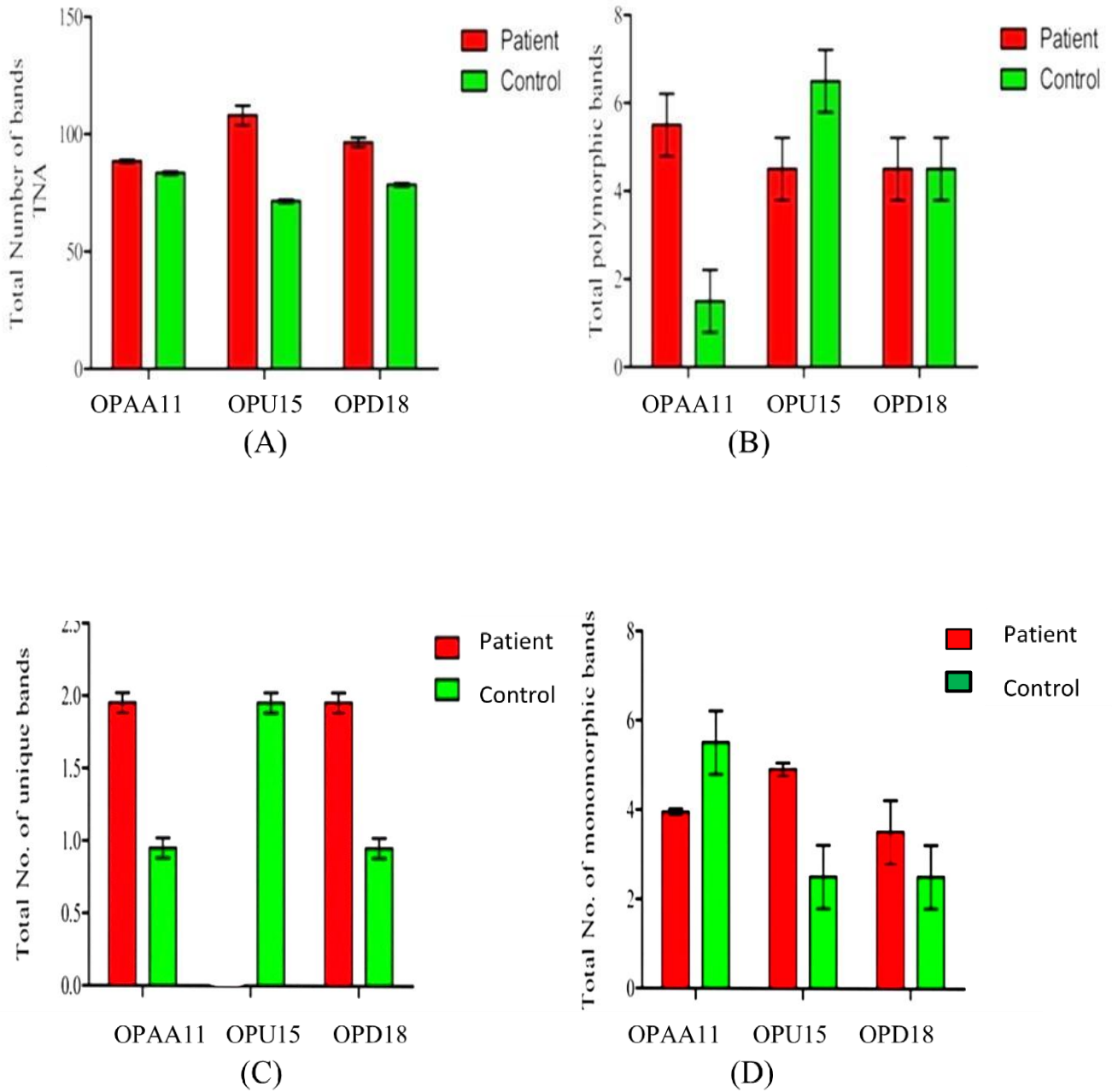
الشكل (4-13) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز 2% وبفرق جهد 85% فولت لمدة ساعة لتقنية RAPD. M الدليل الحجمي 100bp - 2000 ، lane 1 - lane 10 تمثل عينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد، lane 11 - lane 20 تمثل مجموعة المقارنة من الأصحاء و الدائرة الحمراء تشير لل unique band، والسهم باللون الأخضر يشير لل monomorphic band والأزرق لل polymorphic band .

جدول (4-5) الأعداد والنسب المئوية للحزم الكلية، متعددة الأشكال polymorphic، والفريدة unique، وأحادية التشكل monomorphic، والقوة التشخيصية وفعالية البادئات الثلاثة المستخدمة في تضخيم DNA عينات مرضى ابيضاض الدم في تقنية الـ RAPD.

Genomic DNA	RAPD Primer	Total No. of bands	Percentage of primer bands %	Total No. of polymorphic band	Polymorphism %	Primer efficiency	Primer discriminatory power %	Total No. of unique bands	Uniqueness%	Total No. of monomorphic bands	Monomorphism %
DNA patient	OPAA 11	89	29.86	6	6.741	0.020	37.5	2	2.247	4	4.494
	OPU15	111	37.24	5	4.504	0.016	31.25	0	0	5	4.504
	OPD18	98	32.88	5	5.102	0.016	31.25	2	2.040	4	4.081
Total		298		16	16.347			4	4.287	13	13.079

جدول (4-6) الأعداد والنسب المئوية للحزم الكلية، متعددة الأشكال polymorphic، والفريدة unique، وأحادية التشكل monomorphic، والقوة التشخيصية وفعالية البادئات الثلاثة المستخدمة في تضخيم DNA عينات مجموعة المقارنة في تقنية الـ RAPD.

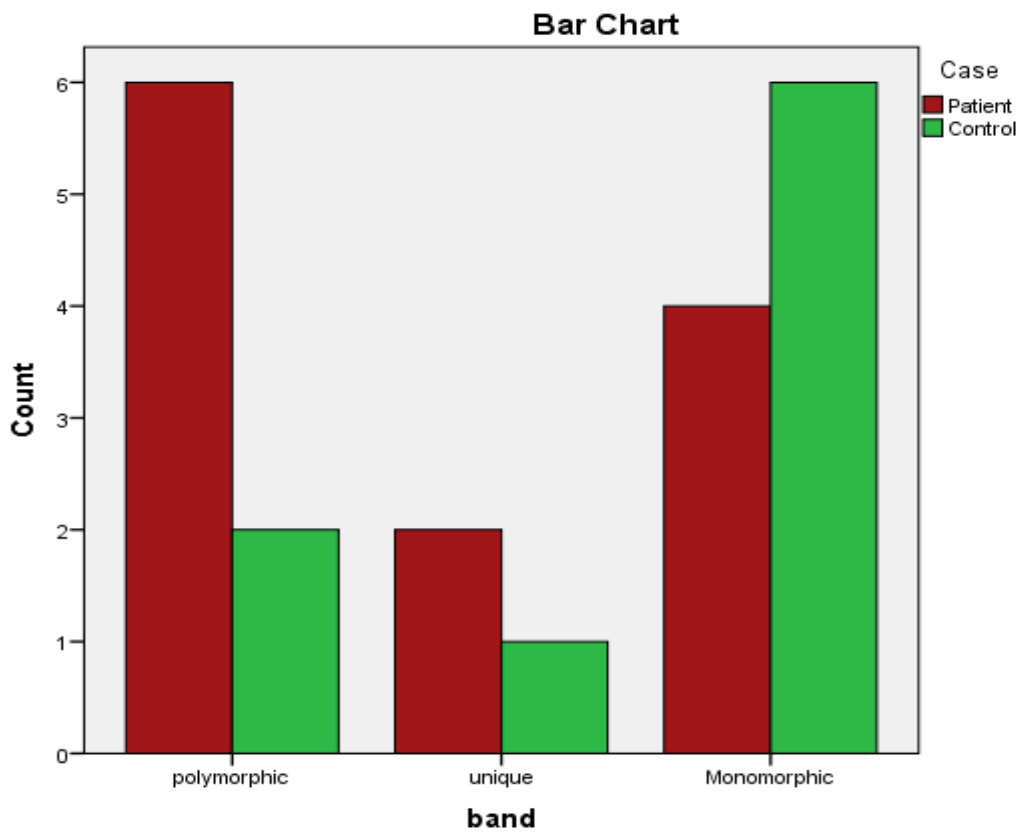
Genomic DNA	RAPD Primer	Total No. of bands	Percentage of primer bands %	Total No. of polymorphic band	Polymorphism %	Primer efficiency	Primer discriminatory power %	Total No. of unique bands	Uniqueness%	Total No. of monomorphic bands	Monomorphism %
DNA Control	OPAA11	84	35.74	2	2.380	0.008	14.28	1	1.190	6	7.142
	OPU15	72	30.63	7	9.722	0.029	50	2	2.777	3	4.166
	OPD18	79	33.61	5	6.329	0.021	35.71	1	1.265	3	3.797
Total		235		14	18.431			4	5.232	12	15.105



الشكل (4-14) أعداد ونسب إجمالي الحزم، polymorphic, unique, monomorphic لعينات مرضى ابيضاض الدم ومجموعة المقارنة. (A) العدد الكلي للحزم من البادئات الثلاثة، (B) العدد الكلي لحزم polymorphic، (C) العدد الكلي لحزم unique، (D) العدد الكلي لحزم monomorphic.

جدول (7-4) التحليل الإحصائي للحزم Polymorphic ,unique, monomorphic مع البادئ OPAA11.

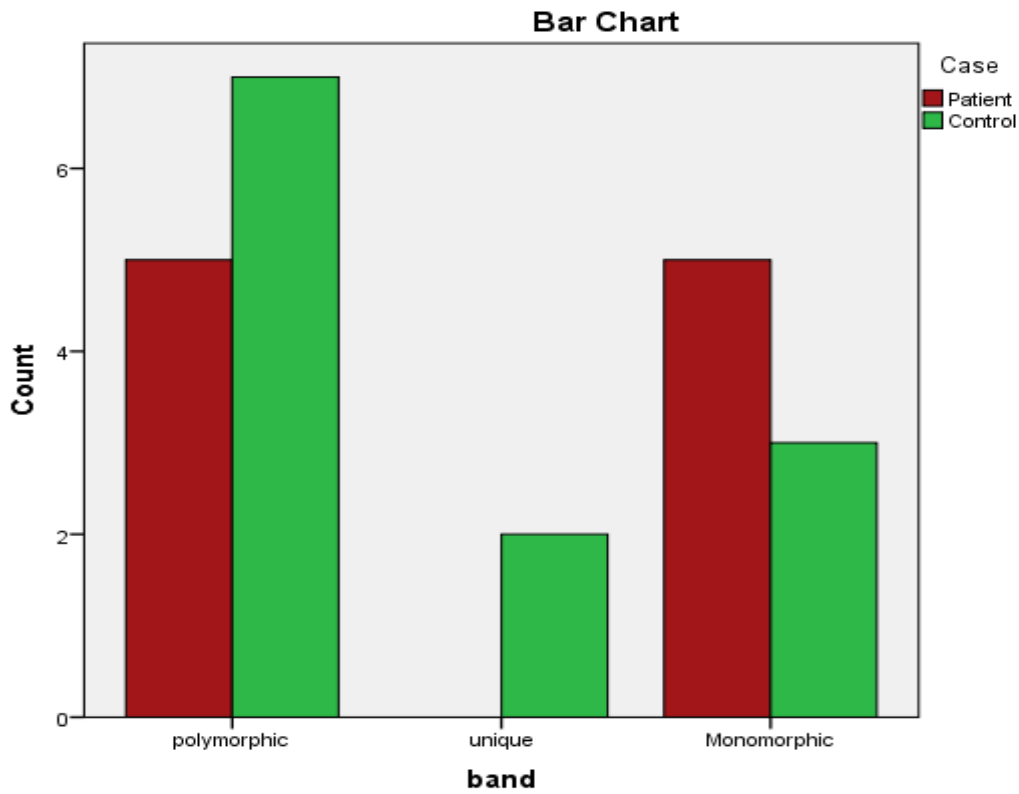
Primer 11	Type of band	Total No. of band (Patient)	Total No. of band (Control)	X ₂	P-value
	Polymorphic band	6	2	2.353	0.308
	Unique band	2	1		
	Monomorphic band	4	6		
	Overall total	12	9		
Significance *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.005, NS=No significant P >0.05					



الشكل (4-15) العدد الإجمالي للحزم الناتجة من التدوير الحراري مع البادئ OPAA11.

جدول (8-4) التحليل الإحصائي للحزم Polymorphic ,unique, monomorphic مع البادئ OPU15.

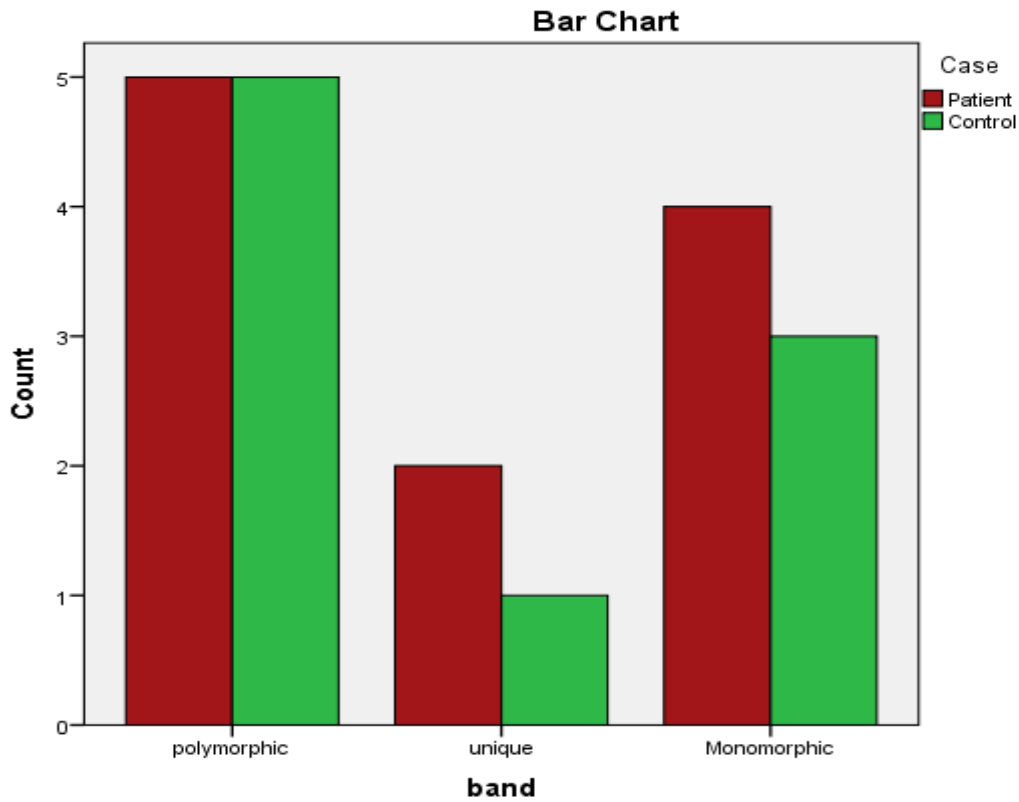
	Type of band	Total No. of band (Patient)	Total No. of band (Control)	X ₂	P-value
Primer 15	Polymorphic band	5	7	2.674	0.263
	Unique band	0	2		
	Monomorphic band	5	3		
	Overall total	10	12		
Significance *P <0.05, **P <0.01, ***P <0.005, NS=No significant P >0.05					



الشكل (16-4) العدد الإجمالي للحزم الناتجة من التدوير الحراري مع البادئ OPU15.

جدول (9-4) التحليل الإحصائي للحزم Polymorphic ,unique, monomorphic مع البادئ .OPD18

Primer 18	Type of band	Total No. of band (Patient)	Total No. of band (Control)	X ₂	P-value
	Polymorphic band	5	5	0.279	0.870
	Unique band	2	1		
	Monomorphic band	4	3		
	Overall total	11	9		
Significance *P <0.05,**P <0.01,***P <0.005,NS=No significant P >0.05					



الشكل (17-4) العدد الإجمالي للحزم الناتجة من التدوير الحراري مع البادئ .OPD18

أُكتشف (Boysen *et al.*, 2019) و Sabra *et al.*, (2020) أنه من خلال إجراء مقارنة تقنية RAPD للخلايا الطبيعية والخبثية، أمكن تتبع التغيرات الجيني من الخلايا الطبيعية إلى الخلايا الخبثية. ويمكن لهذه التقنية أن تكتشف ببساطة وسرعة التغيرات الجينية في الجينوم بأكمله دون معرفة معلومات تسلسل الحامض النووي المحددة والعمل بفعالية مع كمية ضئيلة من الحامض النووي (Williams *et al.*, 1990).

أظهرت نتائج دراستنا أن عينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد لديهم عددا من حزم DNA أكثر من عينات مجموعة المقارنة الأصحاء، وهذا قد يكون ناجما عن خصائص الارتباط لتسلسل النيوكليوتيدات في بادئات الـ RAPD بالإضافة إلى تشوهات النمط الجيني لمرضى ابيضاض الدم، في تقنية الـ RAPD - PCR ترتبط الطفرات الجينية بالتغيرات في عدد الحزم وكثافتها (Rocco *et al.*, 2014). وإن تعدد أشكال الحامض النووي هو علامة على عدم الاستقرار الجيني الناجم عن انحراف في Methylation الجينوم، ومن المعتقد أن عدم الاستقرار الجيني و Methylation الحامض النووي غير الطبيعية هي من الأسباب الرئيسية لتطور الاورام (Strathdee and Brown, 2002).

كشفت نتائج دراستنا عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية ($P < 0.05$) بين عينات مرضى ابيضاض الدم قيد الدراسة و مجموعة المقارنة في الحزم متعددة الأشكال polymorphic، والفريدة unique، وأحادية الشكل monomorphic، قد يعزى ذلك نتيجة لاختلاف جيني بين المجموعتين، وإلى تغير في طبيعة تفاعل الحامض النووي المتضرر بسبب العوامل الخارجية والداخلية التي يمكن أن تطور الأمراض الوراثية (Perrone *et al.*, 2016).

هناك فروق ذات دلالة إحصائية في القوة التشخيصية للبادئ OPAA11 بين عينات المرضى ومجموعة المقارنة، ويمكن تفسير هذه الاختلافات من خلال حقيقة أن قوة البادئ التشخيصية تعتمد على كل من عدد الحزم متعددة الأشكال التي ينتجها البادئ والعدد الإجمالي للحزم متعددة الأشكال التي تنتجها جميع البادئات، وتعرف قدرة البادئ على اظهار التعدد الشكلي بالمقارنة مع الأشكال المتعددة التي تظهرها جميع البادئات الأخرى باسم القوة التشخيصية الأولية primer discriminatory power (Ismaeel, 2013).

أظهرت النتائج اختلافات ملحوظة في كفاءة البادئ OPAA11 بين عينات المرضى ومجموعة المقارنة، وهذه الاختلافات قد تعزى الى أن كفاءة البادئ تتفاوت بين مجموعة المرضى ومجموعة المقارنة اعتمادًا على كمية الحزم متعددة الأشكال التي ينتجها البادئ و العدد الإجمالي للحزم التي تنتجها جميع البادئات، قام كل من Newton and Graham, (1997) و Ismaeel, (2013) بتقييم كفاءة

البادئ primer efficiency والتي تتراوح من 0 إلى 1، وهي قياس لقدرة البادئ على تكوين الأشكال المتعددة.

بالإشارة إلى Ibrahim *et al.*, (2010) و ZZg and Dragh, (2022)، فإن قدرة البادئ على إنتاج أعلى نسبة من الحزم متعددة الأشكال مقارنة بإجمالي عدد الحزم المضخمة هي علامة على فعاليتها، وهناك ميزة أخرى مهمة في البادئ الفعال هي قدرته على إظهار تعدد الأشكال بين الأفراد الأصحاء والمرضى كما في ابيضاض الدم.

أظهر الحجم الجزيئي للحزم المنتجة من البادئات اختلافات بين عينات المرضى ومجموعة المقارنة، فلوحظت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 1800 bp المنتجة مع البادئ OPD18 في مجموعة المرضى ولم تلاحظ في مجموعة المقارنة، لذلك قد يكون من الممكن بعد مزيد من البحث في الحزم والبادئات الخاصة بها، استخدامها للفصل الجيني بين مجموعة مرضى ابيضاض الدم و مجموعة المقارنة، فقد وجد كل من Papadopoulos *et al.*, (2002)، و Xian *et al.*, (2005)، و Ibrahim, (2010)، أن تعدد الاشكال المتضمن حزما مضخمة ذات الاختلاف في الأوزان الجزيئية والناجمة عن حدوث أنواع متعددة من الطفرات والانتقالات، يتسبب في حركة الحزم وربما إضافة حزم جديدة.

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

5- الإستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

5-1: الإستنتاجات Conclusions

يمكن الإستنتاج من الدراسة الحالية ما يأتي :

1. يُشير الفحص الجزيئي باستخدام تقنية RT-qPCR إلى وجود اختلاف في تعبير جينات *RUNX1* و *RUNX3* بين عينات مرضى ابيضاض الدم الحاد. ويشير وجود اختلاف معنوي في تعبير جين *RUNX1* إلى أنه يمكن أن يكون عاملاً مساهماً في تطور ابيضاض الدم النخاعي الحاد. بالمقابل، لم يتم اكتشاف اختلاف معنوي في تعبير جين *RUNX3*، مما يشير إلى دوره كجين مثبط للأورام.
2. لم يتم العثور على طفرة V617F في *JAK2* في عينات مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي والنخاعي الحاد وعينات المقارنة في هذه الدراسة، فضلاً عن ذلك تبين أن جميع العينات كانت تحمل النمط الشائع (wild type) وهي ذات التكافؤ الأحادي (GG) (homozygous)، وليس الأنماط الطافرة ذات التكافؤ الأحادي والتكافؤ المختلط (TT) و (GT) على التوالي.
3. توضح تقنية RAPD-PCR وجود اختلاف في عدد الحزم بين مجموعة مرضى ابيضاض الدم الحاد قيد الدراسة ومجموعة المقارنة. وهذا يشير إلى وجود اختلافات وراثية بين الأفراد المصابين بابيضاض الدم وأفراد مجموعة المقارنة.

Recommendations 2 – 5 : التوصيات

توصي الدراسة بما يلي :

1. استكمال البحوث: ينصح بمواصلة البحث لفهم أكثر عن الاختلافات الوراثية في ابيضاض الدم الحاد وأثرها على تطور المرض. قد تساعد الدراسات المستقبلية في تحديد آليات الهندسة الوراثية التي تؤدي إلى ظهور المرض وتوجيه استراتيجيات العلاج.
2. توسيع نطاق العينة: ينصح بزيادة عدد المرضى والأفراد الأصحاء في العينة للحصول على نتائج أكثر دقة وتمثيلية.
3. تكرار الدراسة: يُنصح بتكرار هذه الدراسة بمجموعة من المرضى الجدد والأفراد الأصحاء للتحقق من صحة النتائج وتعزيز قوة الاستدلال العلمي.
4. البحث عن تطبيقات عملية: استغلال النتائج الحالية في التطوير المستقبلي لأساليب التشخيص والعلاج لابيضاض الدم الحاد، فيمكن أن يساعد فهم الاختلافات الوراثية في توجيهات العلاج للمرضى وتحسين نتائجه.

الفصل السادس

المصادر

6- المصادر Reference

- الربيعي، عباس حسين مغير والجنابي، عباس عبد الله محمد (2008). علم الوراثة. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بابل.
- **Abdulridha, R. H., Jawad, N. K., and Numan, A. T. (2021).** Prevalence and Risk of Leukemia Reported Cases, Observational Descriptive Statistic from Iraqi Center for Hematology in Baghdad Province. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 15(1), 2429.
- **Ahmed, N., Yigit, A., Isik, Z., and Alpkocak, A. (2019).** Identification of leukemia subtypes from microscopic images using convolutional neural network. *Diagnostics*, 9(3), 104.
- **Almaman, A. (2018).** Proteomic Profile of Lymphoid Leukemia. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 28(2), 133–145.
- **AL-Rawi, T. (2015).** Study of sex determination of date palm in seeding stage using convential molecular indice (Doctoral dissertation, Baghdad university).
- **Anilkumar, K. K., Manoj, V. J., and Sagi, T. M. (2020).** A survey on image segmentation of blood and bone marrow smear images with emphasis to automated detection of Leukemia. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 40(4), 1406-1420.
- **Asou, N. (2003).** The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Critical reviews in oncology/hematology*, 45(2), 129-150.
- **Badrawy, H., and Ibrahim, A. (2014).** JAK-2V617F Mutation in Acute Leukemia (South Egypt Experience).

- **Bagasjvara, R. G., Candradewi, I., Hartati, S., and Harjoko, A. (2016).** Automated detection and classification techniques of Acute leukemia using image processing: A review. In *2016 2nd International Conference on Science and Technology-Computer (ICST)* (pp. 35-43). IEEE.
- **Barata, J. T., Durum, S. K., and Seddon, B. (2019).** Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nature immunology*, *20*(12), 1584-1593.
- **Barbosa, K., Li, S., Adams, P. D., and Deshpande, A. J. (2019).** The role of TP53 in acute myeloid leukemia: challenges and opportunities. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *58*(12), 875-888.
- **Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G. S., Bench, A. J., Boyd, E. M., Curtin, N., Scott, M. A., Erber, W. N., and Green, A. R., (2005).** Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*, *365*(9464), 1054-1061.
- **Baylin, S. B., and Jones, P. A. (2016).** Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *8*(9), a019505.
- **Bennett, J. H. (1845).** Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Sug J*, *64*, 413-423.
- **Bennour, A., Ouahchi, I., Achour, B., Zaier, M., Youssef, Y. B., Khelif, A., Saad, A., and Sennana, H. (2013).** Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Medical oncology*, *30*, 1-6.

- **Bernardi, R., and Pandolfi, P. P. (2003).** Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene*, 22(56), 9048-9057.
- **Bertram, J. S. (2000).** The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
- **Bird, A. (2007).** Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396.
- **Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., and Kobetz, E. K. (2020).** Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(6), a034819.
- **Boddu, P., Kantarjian, H., Borthakur, G., Kadia, T., Daver, N., Pierce, S., and Kornblau, S. M. (2017).** Co-occurrence of FLT3-TKD and NPM1 mutations defines a highly favorable prognostic AML group. *Blood Advances*, 1(19), 1546-1550.
- **Boysen, L., Viuff, B. M., Landsy, L. H., Price, S. A., Raymond, J. T., Lykkesfeldt, J., and Lauritzen, B. (2019).** Formation and glomerular deposition of immune complexes in mice administered bovine serum albumin: Evaluation of dose, frequency, and biomarkers. *Journal of immunotoxicology*, 16(1), 191-200.
- **Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018).** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- **Buckingham, L. (2012).** Chromosomal structure and chromosomal mutation. *Molecular Fundamentals Methods and Clinical Applications*. 2nd ed. Philadelphia: FA Davis Company, 348-352.

- **Buffler, P. A., Kwan, M. L., Reynolds, P., and Urayama, K. Y. (2005).** Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest*, 23(1), 60-75.
- **Butcher, L. (2015).** Profiles in Oncology Social Media: Dana-farber cancer institute@ danafarber. *Oncology Times*, 37(10), 69-70.
- **Butler, J. and Kadonaga, J. (2002).** The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*, 16(20), 2583–2592.
- **Carron, C., Cormier, F., Janin, A., Lacronique, V., Giovannini, M., Daniel, M. T., and Ghysdael, J. (2000).** TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(12), 3891-3899.
- **Chandira, R. M., Prabakaran, M., Jaykar, B., Venkateswarlu, B. S., and Palanisamy, P. (2019).** BRCA mutation: A review of breast cancer. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(4), 750-758.
- **Chen, C. P., Shih, J. C., and Chan, Y. J. (2000).** Accuracy of prenatal diagnosis for haemoglobin disorders in the UK: 25 years' experience. *Prenatal Diagnosis*, 20(12), 986–991.
- **Cheng, C. K., Li, L., Cheng, S. H., Lau, K. M., Chan, N. P., Wong, R. S., and Ng, M. H. (2008).** Transcriptional repression of the RUNX3/AML2 gene by the t (8; 21) and inv (16) fusion proteins in acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(8), 3391-3402.
- **Chokkalingam, A. P., and Buffler, P. A. (2008).** Genetic susceptibility to childhood leukaemia. *Radiation protection dosimetry*, 132(2), 119-129.
- **Clustalw Omega. (2022).** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

- **Cogliano, V. J., Baan, R., and Straif, K. (2010).** Updating IARC's carcinogenicity assessment of benzene. *American journal of industrial medicine*, 54(2), 165-167.
- **Colaprico, A., Olsen, C., Bailey, M. H., Odom, G. J., Terkelsen, T., Silva, T. C., Olsen, A. V., Cantini, L., Zinovyev, A., and Barillot, E. (2020).** Interpreting pathways to discover cancer driver genes with Moonlight. *Nature Communications*, 11(1), 1-17.
- **C. R. UK.** About Various Cancer Types. Accessed: Oct. 17, 2020. [Online]. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/type>
- **Davis, A., Viera, A. J., and Mead, M. D. (2014).** Leukemia: an overview for primary care. *American family physician*, 89(9), 731-738.
- **Deininger, M. W., Shah, N. P., Altman, J. K., Berman, E., Bhatia, R., Bhatnagar, B., and Sundar, H. (2020).** Chronic myeloid leukemia, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(10), 1385-1415.
- **Deng, N., Zhou, H., Fan, H., and Yuan, Y. (2017).** Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 8(66), 110635-110649.
- **Deschler, B., and Lübbert, M. (2006).** Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 107(9), 2099-2107.
- **Desjardins, P., and Conklin, D. (2010).** NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565.

- **DiNardo, C. D., and Cortes, J. E. (2016).** Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book, 2016(1)*, 348-355.
- **Döhner, H., Weisdorf, D. J., and Bloomfield, C. D. (2015).** Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine, 373(12)*, 1136-1152.
- **Dupont, S., Massé, A., James, C., Teyssandier, I., Lécluse, Y., Larbret, F., and Delhommeau, F. (2007).** The JAK2 617V> F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 110(3)*, 1013-1021.
- **Ehrlich P. 1880.** Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift Klinische Medizinische.*;1:553-8.
- **El Fakih, R., Rasheed, W., Hawsawi, Y., Alsermani, M., and Hassanein, M. (2018).** Targeting FLT3 mutations in acute myeloid leukemia. *Cells, 7(1)*, 4.
- **Farasani, A. (2022).** Screening of V617F mutation in JAK2 gene with acute myeloid leukemia in the Saudi population. *Acta Biochimica Polonica, 69(1)*, 211-214.
- **Foucar K, and Anastasi J (2015).** Acute myeloid leukemia with recurrent cytogenetic abnormalities. *American Journal of Clinical Pathology, 144(1)*, 6–18.
- **Fu, L., Fu, H., Tian, L., Xu, K., Hu, K., Wang, J., Wang, J., Jing, H., Shi, J., and Ke, X. (2016).** High expression of RUNX1 is associated with poorer outcomes in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget, 29(7)*, 15828.

- **Gaidzik, V. I., Teleanu, V., Papaemmanuil, E., Weber, D., Paschka, P., Hahn, J., Wallrabenstein, T., Kolbinger, B., Köhne, C. H., Horst, H. A., Brossart, P., Held, G., Kündgen, A., Ringhoffer, M., Götze, K., Rummel, M., Gerstung, M., Campbell, P., Kraus, J. M., Kestler, H. A., and Döhner, H. (2016).** RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*, 30(11), 2160-2168.
- **Garrett, K. M., Hoffer, F. A., Behm, F. G., Gow, K. W., Hudson, M. M., and Sandlund, J. T. (2002).** Interventional radiology techniques for the diagnosis of lymphoma or leukemia. *Pediatric radiology*, 32, 653-662.
- **Gene Cards. (2023).** RUNX Gene. The Human Gene Database.
- **Ghosh, A., Mukherjee, D., Patel, P., and Mukhopadhyay, D. (2021).** THE EFFECT OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME. *OSF Preprints*. May, 4.
- **Gilham, C., Peto, J., Simpson, J., Roman, E., Eden, T. O., Greaves, M. F., and Alexander, F. E. (2005).** Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study. *Bmj*, 330(7503), 1294.
- **Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001).** "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." *Methods*, 25(4), 386-401.
- **Gou, P., Zhang, W., and Giraudier, S. (2022).** Insights into the potential mechanisms of JAK2V617F somatic mutation contributing distinct phenotypes in myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1013.

- **Goyama, S., Schibler, J., Cunningham, L., Zhang, Y., Rao, Y., Nishimoto, N., and Mulloy, J. C. (2013).** Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 3876-3888.
- **Groner, B., and von Manstein, V. (2017).** Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Molecular and cellular endocrinology*, 451, 1-14.
- **Haider, A., Steininger, A., Ullmann, R., Hummel, M., Dimitrova, L., Beyer, M., and Möbs, M. (2016).** Inactivation of RUNX3/p46 promotes cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(11), 2287-2296.
- **Haldar, S. (2019).** Bioinformatics methods: Application toward analyses and interpretation of experimental data. In *Advances in biological science research* (pp. 1-19). Academic Press.
- **Hallek, M., and Al-Sawaf, O. (2021).** Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, 96(12), 1679-1705.
- **Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., and Kipps, T. J. (2018).** iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 131(25), 2745-2760.
- **Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

- **He, Z., Chen, Z., Tan, M., Elingarami, S., Liu, Y., Li, T., Deng, Y., He, N., Li, S., Fu, J. and Li, W. (2020).** A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell Proliferation*, 53(7), 12822-12838.
- **Heasman S, Small M, and Macewan DJ. (2011).** Targeted treatments of chronic myeloid leukaemia. *BritOncol Pharm Ass*,11-15.
- **Heffner, Jr , L.T. (2007) .** Acute myeloid leukemia. In: Sekeres , M.A. ; Kalayao , M.E. ; and Bolwell , B.J. (Eds.). *Clinical malignant hematologyy* . McGraw-Hill, New York. pp: 1-7.
- **Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, and Grosveld G. (1985).** Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*,315(6022),758-61.
- **Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018).** A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(5), 327-341.
- **Ibrahim, M.A., N. Saleh, E. Archoukieh, H.W. Al-Obaide, M.M. Al-Obaidi ., and H.M. Said, 2010.** Detection of novel genomic polymorphism in acute lymphoblastic leukemia by random amplified polymorphic DNA analysis. *Int. J. Cancer Res*.
- **Ihle, J. N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F. W., and Shimoda, K. (1997).** Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*, 15(S2), 105-112.
- **Infante, J. R., Fecher, L. A., Falchook, G. S., Nallapareddy, S., Gordon, M. S., Becerra, C., DeMarini, D. J., Cox, D. S., Xu, Y., Morris, S. R., Peddareddigari, V. G., Le, N. T., Hart, L., Bendell, J. C., Eckhardt, G., Kurzrock, R., Flaherty, K., Burris, H. A., 3rd, and Messersmith, W. A. (2012).** Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic,

and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *The lancet oncology*, 13(8), 773-781.

- **Innes, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. and White, T.J.(1990).** PCR protocol. In: "A guide to methods and Application" 1 set ed . *Academic press, San Diego, CA*.PP:482.
- **Inoue, K. I., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., and Ito, Y. (2002).** Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nature neuroscience*, 5(10), 946-954.
- **Ismaeel, H. M. (2013).** Identification of genomic markers by RAPD–PCR Primers in Iraq Breast Cancer patients. *Iraq J Sci*, 54, 97-104.
- **Ito, Y. (2004).** Oncogenic potential of the RUNX gene family: ‘overview’. *Oncogene*, 23(24), 4198-4208.
- **Ito, Y., Bae, S. C., and Chuang, L. S. H. (2015).** The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(2), 81-95.
- **Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Gelsi-Boyer, V., Meggendorfer, M., Morabito, M., Berthon, C., Adès, L., Fenaux, P., Beyne-Rauzy, O., Vey, N., Braun, T., Haferlach, T., Dreyfus, F., Cross, N. C., Preudhomme, C., Bernard, O. A., Fontenay, M., Vainchenker, W., Schnittger, S., and Solary, E. (2013).** Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of clinical oncology*, 31(19), 2428-2436.
- **James, C., Ugo, V., Le Couédic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J. L., Constantinescu, S. N., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (2005).** A unique clonal JAK2 mutation leading to

constitutive signalling causes polycythaemia vera. *nature*, 434(7037), 1144-1148.

- **Jaradat, S. A., Khasawneh, R., Kamal, N., Matalka, I., Al-Bishtawi, M., Al-Sweedan, S., and Ayesh, M. H. (2015).** Analysis of JAK2V617F mutation in Jordanian patients with myeloproliferative neoplasms. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 8(4), 160-166.
- **Jatiani, S. S., Baker, S. J., Silverman, L. R., and Reddy, E. P. (2010).** Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. *Genes & cancer*, 1(10), 979-993.
- **Jekarl, D. W., Han, S. B., Kim, M., Lim, J., Oh, E. J., Kim, Y., Kim, H. J., Min, W. S., and Han, K. (2010).** JAK2 V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia. *Korean Journal of Hematology*, 45(1), 46-50.
- **Jiang, Y., Tong, D., Lou, G., Zhang, Y., and Geng, J. (2008).** Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines. *Pathobiology*, 75(4), 244-251.
- **Johnston, M. O. (2006).** Mutations and New Variation: Overview. *Encyclopedia of Life Sciences*, 3, 1-10.
- **Kaatsch, P. (2010).** Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36(4), 277-285.
- **Kagohara, L. T., Stein-O'Brien, G. L., Kelley, D., Flam, E., Wick, H. C., Danilova, L. V., and Fertig, E. J. (2018).** Epigenetic regulation of

gene expression in cancer: techniques, resources and analysis. *Briefings in functional genomics*, 17(1), 49-63.

- **Kamikubo, Y. (2018).** Genetic compensation of RUNX family transcription factors in leukemia. *Cancer Science*, 109(8), 2358-2363.
- **Kampen, K. R. (2012).** The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia research*, 36(1), 6-13.
- **Kang, T. S. (2019).** Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 574-585.
- **Khan IA, Vattam KK, Jahan P, Hasan Q, and Rao P (2016).** Importance of glucokinase -258G/A polymorphism in Asian Indians with posttransplant and type 2 diabetes mellitus. *Intractable Rare Dis Res* 5: 25–30.
- **Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., and Baran, Y. (2016).** Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471-8486.
- **Koch, L. (2015).** Adding another dimension to gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 16(10), 563-563.
- **Koehn, J., Fountoulakis, M., and Krapfenbauer, K. (2008).** Multiple drug resistance associated with function of ABC-transporters in diabetes mellitus: molecular mechanism and clinical relevance. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 8(2), 109-118.
- **Koleck, T. A., and Conley, Y. P. (2016).** Identification and prioritization of candidate genes for symptom variability in breast cancer survivors

- based on disease characteristics at the cellular level. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 29-37.
- **Koopaei, H. K., and Koshkoiyeh, A. E. (2011).** Application of genomic technologies to the improvement of meat quality in farm animals. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 6(6), 126-132.
 - **Krygier A, Szmajda D, Żebrowska M, Jeleń A, and Balcerczak E (2018).** Expression levels of the runt-related. *Oncol Lett* 15:6733 –6738.
 - **Kubista, M. (2007).** The prime technique real-time PCR data analysis. *GIT Laboratory Journal Europe*, 11(9/10), 33.
 - **Kudo, Y., Tsunematsu, T., and Takata, T. (2011).** Oncogenic role of RUNX3 in head and neck cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 112(2), 387-393.
 - **Kumar, A., Vashist, M., and Rathee, R. (2014).** Maternal Factors and Risk of Childhood Leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 781–784.
 - **Labati, R. D., Piuri, V., and Scotti, F. (2011, September).** All-IDB: The acute lymphoblastic leukemia image database for image processing. In *2011 18th IEEE international conference on image processing* (pp. 2045-2048). IEEE.
 - **Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V. D., Poirel, H., Quang, C. T., Mauchauffé, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J., and Bernard, O. A. (1997).** A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, 278(5341), 1309-1312.
 - **LaFleur-Brooks, M. (2018).** Exploring Medical Language: A Student-Directed Approach, DL Brooks, Ed. St. Louis, MO.

- **Lai, S. Y., and Johnson, F. M. (2010).** Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. *Drug Resistance Updates*, 13(3), 67-78.
- **Lam, K., and Zhang, D. E. (2012).** RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 17, 1120.
- **Le Gall, M., Crépin, R., Neiveyans, M., Auclair, C., Fan, Y., Zhou, Y., and Poul, M. A. (2015).** Neutralization of KIT Oncogenic Signaling in Leukemia with Antibodies Targeting KIT Membrane Proximal Domain 5 Anti-KIT Domain 5 Inhibitory Antibodies. *Molecular cancer therapeutics*, 14(11), 2595-2605.
- **Leibowitz, D., Young, K. S., Band, P. R., Deschamps, M., and Israël, L. (1989).** The molecular biology of CML: a review. *Cancer Investigation*, 7(2), 195-203.
- **Le Pecq, J. B., and Paoletti, C. (1966).** A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical biochemistry*, 17(1), 100-107.
- **Lee, J. W., Kim, Y. G., Soung, Y. H., Han, K., Kim, S. Y., Rhim, H. S., and Lee, S. H. (2006).** The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene*, 25(9), 1434-1436.
- **Lee, C. W. L., Chuang, L. S. H., Kimura, S., Lai, S. K., Ong, C. W., Yan, B., and Ito, Y. (2011).** RUNX3 functions as an oncogene in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 122(2), 410-417.
- **Lee, Y., Lee, J. Y., Lee, J. O., Bang, S. M., and Hwang, S. M. (2022).** JAK2 V617F-Positive Acute Myeloid Leukemia: Clinicopathological Features of Two Cases. *Laboratory Medicine Online*, 12(1), 53-57.

- **Lee, L. Y., Hernandez, D., Rajkhowa, T., Smith, S. C., Raman, J. R., Nguyen, B., Small, D., and Levis, M. (2017).** Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(2), 257-260.
- **Leland, H.H.; Leroy, H.; Michael, L.G.; Ann, E.R.; Lee, M.S. and C.V. Ruch. (2000).** Genetics from genes to genome. 1 sted. Macgraw hill companies.
- **Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998).** Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649.
- **Levanon, D., Brenner, O., Otto, F., and Groner, Y. (2003).** Runx3 knockouts and stomach cancer: The challenge of identifying phenotypic defects directly attributable to loss of gene function. *EMBO reports*, 4(6), 560-564.
- **Levanon, D., Glusman, G., Bangsow, T., Ben-Asher, E., Male, D. A., Avidan, N., Bangsow, C., Hattori, M., Taylor, T. D., Taudien, S., Blechschmidt, K., Shimizu, N., Rosenthal, A., Sakaki, Y., Lancet, D., and Groner, Y. (2001).** Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene*, 262(1-2), 23-33.
- **Levine, R. L., Loriaux, M., Huntly, B. J., Loh, M. L., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R., Clark, J. J., Willis, S. G., Nguyen, K. T., Flores, N. J., Estey, E., Gattermann, N., Armstrong, S., Look, A. T., Griffin, J. D., Bernard, O. A., Heinrich, M. C., Gilliland, D. G., Druker, B., and Deininger, M. W. (2005a).** The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106(10), 3377-3379.

- **Levine, R. L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B. L., Wernig, G., Huntly, B. J., Boggon, T. J., Wlodarska, I., Clark, J. J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J. C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Fröhling, S., Döhner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., and Gilliland, D. G. (2005b).** Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell*, 7(4), 387-397.
- **Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- **Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K.i, Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B., Kim, H. M., Kim, W. J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., and Ito, Y. (2002).** Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, 109(1), 113-124.
- **Li, W. X. (2008).** Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends in cell biology*, 18(11), 545-551.
- **Lin, M., Whitmire, S., Chen, J., Farrel, A., Shi, X., and Guo, J. T. (2017).** Effects of short indels on protein structure and function in human genomes. *Scientific reports*, 7(1), 9313.
- **Loftis, A. D., Reeves, W. K., Wang, C., Kaltenboeck, B., and Freeman, M. D. (2012).** Principles of real-time PCR. *Veterinary PCR Diagnostics, Basseterre: Bhentam E-Books, 1*, 3-6.
- **Luceri, C., De Filippo, C., Caderni, G., Gambacciani, L., Salvadori, M., Giannini, A., and Dolara, P. (2000).** Detection of somatic DNA

alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis*, 21(9), 1753-1756.

- **Manley, P. W., Barys, L., and Cowan-Jacob, S. W. (2020).** The specificity of asciminib, a potential treatment for chronic myeloid leukemia, as a myristate-pocket binding ABL inhibitor and analysis of its interactions with mutant forms of BCR-ABL1 kinase. *Leukemia research*, 98, 106458.
- **Martínez-Jiménez, F., Muiños, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., Mularoni, L., Pich, O., Bonet, J., and Kranas, H. (2020).** A compendium of mutational cancer driver genes. *Nature Reviews Cancer*, 20(10), 555-572.
- **Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., and Benchimol, S. (1984).** Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO journal*, 3(13), 3257-3262.
- **Medinger, M., Lengerke, C., and Passweg, J. (2016).** Novel prognostic and therapeutic mutations in acute myeloid leukemia. *Cancer genomics & proteomics*, 13(5), 317-329.
- **Medrano, R. F. V., and De Oliveira, C. A. (2014).** Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular biotechnology*, 56, 599-608.
- **Melo, J. V., Catovsky, D., and Galton, D. A. (1986).** The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia: I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *British journal of haematology*, 63(2), 377-387.
- **Mével, R., Draper, J. E., Lie-a-Ling, M., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2019).** RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development*, 146(17), dev148296.

- **Mishra, S. P., Mishra, C., Mishra, D. P., Rosalin, B. P., and Bhuyan, C. (2017).** Application of advanced molecular marker technique for improvement of animal: A critical. *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 5(5): 1283-1295
- **Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991).** t (8; 21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10431-10434.
- **Moisa, C., Gaman, M. A., Diaconu, C. C., and Gaman, A. M. (2019).** Oxidative stress levels, JAK2V617F mutational status and thrombotic complications in patients with essential thrombocythemia. *Rev Chim*, 70(8), 2822-2825.
- **Montaño, A., Forero-Castro, M., Marchena-Mendoza, D., Benito, R., and Hernández-Rivas, J. M. (2018).** New challenges in targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia by NGS approaches: An update. *Cancers*, 10(4), 110.
- **Morita, K., Suzuki, K., Maeda, S., Matsuo, A., Mitsuda, Y., Tokushige, C., and Kamikubo, Y. (2017).** Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *The Journal of clinical investigation*, 127(7), 2815-2828.
- **Mullaney, J. M., Mills, R. E., Pittard, W. S., and Devine, S. E. (2010).** Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human molecular genetics*, 19(2), 131-136.
- **Mourtada, F. A., Assem, M. M., El Leithy, A., Hassan, N. M., and Hassan, N. H. A. (2020).** RUNX3 gene expression confers an independent Overall survival advantage in non-M3 adult acute myeloid leukemia patients in Egypt. *International Journal of Cancer and Biomedical Research*, 4(2), 87-98.

- **Munshi, A. (Ed.). (2012).** *DNA sequencing: methods and applications*. BoD–Books on Demand.
- **Narrandes, S., and Xu, W. (2018).** Gene expression detection assay for cancer clinical use. *Journal of Cancer*, 9(13), 2249.
- **National Cancer Institute (NCI) (2014).** *Leukemia*". 13 June 2014.
- **Neumann, E. (1872).** Ein neuer fall von Leukamie mit erkrankung des knochenmarks. *Archives Heilkunde*, 13, 502-8.
- **Newton, C. R., and Graham, A. (1997).** Polymerase chain reaction. *Bios. Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK*.
- **Niini, T., Kanerva, J., Vettenranta, K., Saarinen-Pihkala, U. M., and Knuutila, S. (2000).** AML1 gene amplification: a novel finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 85(4), 362-366.
- **Nowell, P. C., and Hungerford, D. A. (1960).** Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25(1), 85-109.
- **Nyqvist, J., Parris, T. Z., Helou, K., Sarenmalm, E. K., Einbeigi, Z., Karlsson, P., and Kovács, A. (2020).** Previously diagnosed multiple primary malignancies in patients with breast carcinoma in Western Sweden between 2007 and 2018. *Breast Cancer Research and Treatment*, 184, 221-228.
- **Ohgami, R. S., Ma, L., Merker, J. D., Gotlib, J. R., Schrijver, I., Zehnder, J. L., and Arber, D. A. (2015).** Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Modern Pathology*, 28(5), 706-714.
- **Okuda, T., Van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., and Downing, J. R. (1996).** AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 84(2), 321-330.

- **Otálora-Otálora, B. A., Henriquez, B., López-Kleine, L., and Rojas, A. (2019).** RUNX family: Oncogenes or tumor suppressors. *Oncology reports*, 42(1), 3-19.
- **Otto, F., Lübbert, M., and Stock, M. (2003).** Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *Journal of cellular biochemistry*, 89(1), 9-18.
- **Papadopoulos, S., Benter, T., Anastassiou, G., Pape, M., Gerhard, S., Bornfeld, N., Ludwig, W. D., and Dörken, B. (2002).** Assessment of genomic instability in breast cancer and uveal melanoma by random amplified polymorphic DNA analysis. *International journal of cancer*, 99(2), 193-200.
- **Patrono, C., Sterpone, S., Testa, A., and Cozzi, R. (2014).** Polymorphisms in base excision repair genes: Breast cancer risk and individual radiosensitivity. *World journal of clinical oncology*, 5(5), 874.
- **Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000).** PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, 406(6792), 207-210.
- **Perrone, S., Lotti, F., Geronzi, U., Guidoni, E., Longini, M., and Buonocore, G. (2016).** Oxidative stress in cancer-prone genetic diseases in pediatric age: the role of mitochondrial dysfunction. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- **Pherson, M. C., Moller, M. J., and Moller, S. G. (2000).** PCR: The Basics from Background to Bench. *BIOS Scientific Publishers Ltd.*
- **Prokocimer, M., Molchadsky, A., and Rotter, V. (2017).** Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 130(6), 699-712.

- **Provan, D., and Gribben, J. (Eds.). (2010).** *Molecular hematology*. John Wiley & Sons.
- **Rahiman, F., Balasubramanian, T., Kumar, P., and Shejina, M. (2015).** RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) -A TOOL FOR GENE MAPPING . *National conference on Advances in Laboratory Medicine*, 2, 163-166.
- **Raje, C., and Rangole, J. (2014).** Detection of Leukemia in microscopic images using image processing. In *2014 International conference on communication and signal processing* (pp. 255-259). IEEE.
- **Raivola, J., Haikarainen, T., Abraham, B. G., and Silvennoinen, O. (2021).** Janus kinases in leukemia. *Cancers*, 13(4), 800.
- **Ravi, I., Baunthyal, M. and Saxena, J. (2014).** Advances in biotechnology. *Springer*, India, 264.
- **Raza, S., Shoaib, M. W., and Mubeen, H. (2016).** Genetic Markers: Importance, uses and applications. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(3), 221-2250.
- **Ribeil, J. A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., Bartolucci, P., Weber, L., Puy, H., Meritet, J. F., Grevent, D., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Ross, R. W., Negre, O., and Cavazzana, M (2017).** Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 376(9), 848-855.
- **Rocco, L., Valentino, I. V., Scapigliati, G., and Stingo, V. (2014).** RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from *Dicentrarchus labrax*. *Cytotechnology*, 66, 383-393.
- **Rowley, J. D. (1973).** A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290-293.

- **Ruiz-Argüelles, G. J., Garcés-Eisele, J., Reyes-Núñez, V., Ruiz-Delgado, G. J., Navarro-Vázquez, M., and González-Carrillo, M. L. (2006).** The Janus Kinase 2 (JAK2) V617F mutation in hematological malignancies in México. *Revista de investigación clínica*, 58(5), 458-461.
- **Russo, V. E., Martienssen, R. A., and Riggs, A. D. (1996).** *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Sabra, S. A., Saad, A. A., Abd El Moneim, N. A., Hemida, M. A., Moussa, N., and Haroun, M. (2020).** Evaluation of breast cancer regarding molecular and immunochemical markers. *International Journal of Immunotherapy and Cancer Research*, 6(1), 001-9.
- **Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. (2000).** Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Molecular and cellular biology*, 20(10), 3387-3395.
- **Said, F., Shafik, R. E., and Hassan, N. M. (2021).** RUNX1 gene expression in Egyptian acute myeloid leukemia patients: may it have therapeutic implications?. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22(1), 1-8.
- **Saiki, R. K. (1989).** The design and optimization of the PCR. *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*, 7-16.
- **Sandberg, E. M., Wallace, T. A., Godeny, M. D., VonDer Linden, D., and Sayeski, P. P. (2004).** Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades?. *Cell biochemistry and biophysics*, 41, 207-231.
- **Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., and Longacre, M. (2013).** Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 21087-21113.
- **Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., and Bahar, M. (2017).** The role of JAK-STAT signaling pathway and

- its regulators in the fate of T helper cells. *Cell communication and signaling*, 15, 1-13.
- **Seifi1, M., Ghasemi, A., Heidarzadeh, S., Khosravi, M., Namipashaki, A., Soofiany, V, M., Khosroshahi, A. A., and Danaei, D. (2012).** Overview of real-time PCR principles. *Polymerase Chain Reaction*, 39.
 - **Seiter, K. (2020).** What is the French American British (FAB) Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Accessed: Oct, 18, 207631-105131*.
 - **Selvarajan, V., Osato, M., Nah, G. S. S., Yan, J., Chung, T. H., Voon, D. C., Ito, Y., Ham, M. F., Salto-Tellez, M., Shimizu, N., Choo, S. N., Fan, S., Chng, W. J., and Ng, S. B. (2017).** RUNX3 is oncogenic in natural killer/T-cell lymphoma and is transcriptionally regulated by MYC. *Leukemia*, 31(10), 2219-2227.
 - **Shah, A., Naqvi, S. S., Naveed, K., Salem, N., Khan, M. A., and Alimgeer, K. S. (2021).** Automated diagnosis of leukemia: a comprehensive review. *IEEE Access*, 9, 132097-132124.
 - **Short, N. J., Zhou, S., Fu, C., Berry, D. A., Walter, R. B., Freeman, S. D., and Ravandi, F. (2020).** Association of measurable residual disease with survival outcomes in patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *JAMA oncology*, 6(12), 1890-1899.
 - **Simsek, M., Daar, S., Ojeli, H., and Bayoumi, R. (1999).** Improved diagnosis of sickle cell mutation by a robust amplification refractory polymerase chain reaction. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 677-680.
 - **Singh, K. P., Miaskowski, C., Dhruva, A. A., Flowers, E., and Kober, K. M. (2018).** Mechanisms and measurement of changes in gene expression. *Biological Research for Nursing*, 20(4), 369-382.
 - **Sitki Copur, M. (2019).** State of Cancer Research Around the Globe. *Oncology (08909091)*, 33(5).

- **Soheili, Z., and Samiei, S. (2005).** Real time PCR: principles and application. *Hepatitis Monthly*, 5(3), 83-87.
- **Sood, R., Kamikubo, Y., and Liu, P. (2017).** Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(15), 2070-2082.
- **Steensma, D. P., McClure, R. F., Karp, J. E., Tefferi, A., Lasho, T. L., Powell, H. L., DeWald, G. W., and Kaufmann, S. H. (2006).** JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia*, 20(6), 971-978.
- **Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., and McCormick, F. (2014).** Dragging ras back in the ring. *Cancer cell*, 25(3), 272-281.
- **Strathdee, G., and Brown, R. (2002).** Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert reviews in molecular medicine*, 4(4), 1-17.
- **Stratton, M. R. (2011).** Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*, 331(6024), 1553-1558.
- **Sukhumsirichart, W. (2018).** Polymorphisms. In *Genetic diversity and disease susceptibility*. IntechOpen. . PP154.
- **Sulong, S., Case, M., Minto, L., Wilkins, B., Hall, A., and Irving, J. (2005).** The V617F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*, 130(6), 964-965.
- **Szilvassy, S.J. (2003).** The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*, 34, 446-460.
- **Szmajda-Krygier, D., Krygier, A., Jamroziak, K., Korycka-Wołowiec, A., Żebrowska-Nawrocka, M., and Balcerczak, E. (2022).** RUNX1 and RUNX3 Genes Expression Level in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia—A Case Control Study. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(8), 3455-3464.

- **Tai, E. W., Ward, K. C., Bonaventure, A., Siegel, D. A., and Coleman, M. P. (2017).** Survival among children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in the United States, by race and age, 2001 to 2009: Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer*, 123, 5178-5189.
- **Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S. C., Komori, T., Ito, Y., and Littman, D. R. (2002).** Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, 111(5), 621-633.
- **Teama, S. (2018).** DNA polymorphisms: DNA-based molecular markers and their application in medicine. *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*, 25.
- **Tennessen, J. A., Bigham, A. W., O'Connor, T. D., Fu, W., Kenny, E. E., Gravel, S., McGee, S., Do, R., Liu, X., and Jun, G. (2012).** Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science*, 337(6090), 64-69.
- **Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P., and Danson, S. J. (2015).** The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British journal of cancer*, 113(3), 365-371.
- **Tipu, H. N., and Shabbir, A. (2015).** Evolution of DNA sequencing. *J Coll Physicians Surg Pak*, 25(3), 210-5.
- **Todd, J. C., Henry, J. B., Sanford, A. H., and Davidsohn, I. (1979).** *Todd, Sanford, Davidsohn Clinical Diagnosis and Management by Clinical Methods*. Saunders.
- **Tracey, W. D., and Speck, N. A. (2000).** Potential roles for RUNX1 and its orthologs in determining hematopoietic cell fate. In *Seminars in cell & developmental biology* (5, pp. 337-342).
- **Vainchenker, W., and Constantinescu, S. N. (2013).** JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*, 32(21), 2601-2613.

- **Valasek, M. A., and Repa, J. J. (2005).** The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.
- **Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr, L. A., and Kinzler, K. W. (2013).** Cancer genome landscapes. *science*, 339(6127), 1546-1558.
- **Waddington, C. H. (1957).** *The Strategy of the Genes, a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology, by CH Waddington... With an Appendix [Some Physico-chemical Aspects of Biological Organisation] by H. Kacser...* G. Allen and Unwin.
- **Wakita, S., Yamaguchi, H., Omori, I., Terada, K., Ueda, T., Manabe, E., Kurosawa, S., Iida, S., Ibaraki, T., Sato, Y., Todoroki, T., Hirakawa, T., Ryotokuji, T., Arai, K., Kitano, T., Mitamura, Y., Kosaka, F., Dan, K., and Inokuchi, K. (2013).** Mutations of the epigenetics-modifying gene (DNMT3a, TET2, IDH1/2) at diagnosis may induce FLT3-ITD at relapse in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 27(5), 1044-1052.
- **Walz, C., Cross, N. C., Van Etten, R. A., and Reiter, A. (2008).** Comparison of mutated ABL1 and JAK2 as oncogenes and drug targets in myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 22(7), 1320-1334.
- **Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., Kilburn, D., and Lander, E. S. (1998).** Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280(5366), 1077-1082.
- **Warren, A. J., Bravo, J., Williams, R. L., and Rabbitts, T. H. (2000).** Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute

- leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBF β . *The EMBO journal*, 19(12), 3004-3015.
- **Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., and Losick, R. (2014).** Expression of the genome. *Molecular Biology Of The Gene*, 5, 343-74.
 - **Weinberg, R. A. (2013).** *The biology of cancer*. Garland science.
 - **Welsh, J., and McClelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
 - **Whittle, M. C., and Hingorani, S. R. (2017).** Runx3 and cell fate decisions in pancreas cancer. *RUNX Proteins in Development and Cancer*, 333-352.
 - **Wilhelm, J., Pingoud, A., and Hahn, M. (2003).** So FAR: Software for Fully Automatic Evaluation of Real-Time PCR Data. *Biotechniques*, 34(2), 324-332.
 - **Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
 - **Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zurcher, G., and Ziemiecki, A. (1991).** Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 11(4), 2057-2065.
 - **Xian, Z. H., Cong, W. M., Zhang, S. H., and Wu, M. C. (2005).** Genetic alterations of hepatocellular carcinoma by random amplified polymorphic DNA analysis and cloning sequencing of tumor differential DNA fragment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(26), 4102.
 - **Yang, L., Ijaz, I., Cheng, J., Wei, C., Tan, X., Khan, M. A., and Fu, J. (2017).** Evaluation of amplification refractory mutation system (ARMS) technique for quick and accurate prenatal gene diagnosis of CHM variant in choroideremia. *The application of clinical genetics*, 1-8.

- **Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., and Fang, M. (2013).** Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of animal science and biotechnology*, 4(1), 1-6.
- **Yan, J., Liu, Y., Lukasik, S. M., Speck, N. A., and Bushweller, J. H. (2004).** CBF β allosterically regulates the Runx1 Runt domain via a dynamic conformational equilibrium. *Nature structural & molecular biology*, 11(9), 901-906.
- **Ye, K., Wang, J., Jayasinghe, R., Lameijer, E. W., McMichael, J. F., Ning, J., McLellan, M. D., Xie, M., Cao, S., Yellapantula, V., Huang, K. L., Scott, A., Foltz, S., Niu, B., Johnson, K. J., Moed, M., Slagboom, P. E., Chen, F., Wendl, M. C., and Ding, L. (2016).** Systematic discovery of complex insertions and deletions in human cancers. *Nature medicine*, 22(1), 97-104.
- **Yokomizo-Nakano, T., and Sashida, G. (2021).** Two faces of RUNX3 in myeloid transformation. *Experimental Hematology*, 97, 14-20.
- **Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., and Schlessinger, J. (2007).** Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell*, 130(2), 323-334.
- **ZZg, A., and Dragh, M. A. (2022).** Detection of Breast Cancer Related Gene Polymorphisms By a New Modified PCR-RAPD-PCR Technique.

الملاحق

الملاحق Appendices

ملحق (1) نموذج الاستبيان المستخدم في التجربة.

الاسم :	رقم العينة :	رقم الاضبارة :
نوع المرض :	فصيلة الدم :	
العنوان :	رقم الهاتف :	المواليد :
عدد افراد العائلة :	ذكور :	اناث :
ترتيب الشخص بالعائلة :	هل لديه اخوه مصابون :	عددهم :
هل لديه اقرباء مصابون :	عددهم :	
هل توفي احد افراد العائلة بنفس المرض :	متى :	
هل اصيب بالتهاب الكبد الفيروسي :	هل عولج :	اين :
محل الاقامة :	الجنس :	الحالة الاجتماعية: اعزب متزوج
صلة القربى بين الوالدين :	اقرباء	غير اقرباء
صلة القربى حسب الفئات :		
التحصيل الدراسي :	حالة العمل :	موظف رعاية متقاعد عاطل
نوع اللقاح :	التهاب كبد	مكورات عنقودية
مضاعفات المرض :	تضخم طحال	سكري
	غدد درقية	فوق الدرقية
	تأخر نمو	وهن العظم
	وفاة	
كمية العلاج :	بدون علاج	نقل دم
	نقل دم	نقل دم مع علاج
	دسفيرال+اكسجيد 125	دسفيرال +اكسجيد 500
العمليات الجراحية :	رفع طحال	زرع نخاع عظم
	اخرى	لا توجد

ملحق (2) : قيم التعبير الجيني لعينات المرضى ومجموعة المقارنة.

(أ) تعبير الجين *RUNX1* مع ابيضاض الدم نوع ALL

ت	نوع اللوكيميا	الجنس	العمر	Fold change ($2^{\Delta\text{CT}}$) for <i>RUNX1</i>
1	ALL	ذكر	33	6.19
2	ALL	ذكر	80	3.56
3	ALL	ذكر	57	3.66
4	ALL	ذكر	50	2.43
5	ALL	ذكر	18	2.14
6	ALL	ذكر	32	7.36
7	ALL	ذكر	53	2.17
8	ALL	ذكر	28	4.89
9	ALL	ذكر	35	2.35
10	ALL	ذكر	16	3.36
11	ALL	ذكر	17	3.27
12	ALL	ذكر	16	6.92
13	ALL	ذكر	20	8.75
14	ALL	ذكر	58	8.23
15	ALL	ذكر	26	2.33
16	ALL	ذكر	37	5.86
17	ALL	ذكر	33	2.68
18	ALL	ذكر	51	3.97
19	ALL	انثى	65	5.13
20	ALL	انثى	65	4.63

(ب) تعبير الجين *RUNX1* مع ابيضاض الدم نوع AML

ت	نوع اللوكيميا	الجنس	العمر	Fold change ($2^{\Delta\text{CT}}$) for <i>RUNX1</i>
1	AML	انثى	20	3.23
2	AML	انثى	85	2.91
3	AML	ذكر	14	3.81
4	AML	ذكر	72	5.1
5	AML	ذكر	55	5.32
6	AML	ذكر	48	4.11
7	AML	ذكر	36	9.32
8	AML	ذكر	46	7.89
9	AML	ذكر	28	6.36
10	AML	ذكر	56	5.32
11	AML	ذكر	36	8.63
12	AML	ذكر	16	5.98
13	AML	ذكر	22	8.88
14	AML	ذكر	45	5.17
15	AML	ذكر	60	8
16	AML	ذكر	72	3.34
17	AML	ذكر	40	6.5
18	AML	ذكر	19	3.71
19	AML	ذكر	43	1.44
20	AML	انثى	52	2.97

(ج) تعبير الجين *RUNX1* مع عينات المقارنة

ت	الجنس	العمر	Fold change ($2^{\Delta\Delta CT}$) for <i>RUNX1</i>
1	انثى	26	1.741
2	ذكر	41	1.803
3	ذكر	19	2.908
4	ذكر	50	1.347
5	ذكر	53	3.458
6	ذكر	47	7.260
7	انثى	23	5.897
8	انثى	53	3.972
9	انثى	22	4.627
10	انثى	49	6.821
11	ذكر	35	3.074
12	ذكر	21	2.099
13	ذكر	37	3.317
14	ذكر	30	4.500
15	ذكر	44	3.482
16	ذكر	51	3.138
17	ذكر	27	1.266
18	ذكر	50	2.428
19	ذكر	29	4.347
20	ذكر	18	1.485

(د) تعبير الجين *RUNX3* مع ابيضاض الدم نوع ALL

ت	نوع اللوكيميا	الجنس	العمر	Fold change ($2^{\Delta\Delta CT}$) for <i>RUNX3</i>
1	ALL	ذكر	33	32.45
2	ALL	ذكر	88	30.27
3	ALL	ذكر	57	65.8
4	ALL	ذكر	50	27.1
5	ALL	ذكر	18	30.91
6	ALL	ذكر	32	36
7	ALL	ذكر	53	50.21
8	ALL	ذكر	28	45.57
9	ALL	ذكر	35	57.28
10	ALL	ذكر	16	38.59
11	ALL	ذكر	17	53.82
12	ALL	ذكر	16	77.17
13	ALL	ذكر	20	41.93
14	ALL	ذكر	58	56.49
15	ALL	ذكر	26	36.5
16	ALL	ذكر	37	48.5
17	ALL	ذكر	33	73.01
18	ALL	ذكر	51	63.12
19	ALL	انثى	65	57.28
20	ALL	انثى	65	51.27

(هـ) تعبير الجين *RUNX3* مع ابيضاض الدم نوع AML

ت	نوع اللوكيميا	الجنس	العمر	Fold change ($2^{\Delta\Delta CT}$) for <i>RUNX3</i>
1	AML	انثى	20	32.22
2	AML	انثى	85	36.76
3	AML	ذكر	14	55.72
4	AML	ذكر	72	47.18
5	AML	ذكر	55	35.02
6	AML	ذكر	48	75.58
7	AML	ذكر	36	41.07
8	AML	ذكر	46	66.26
9	AML	ذكر	28	47.84
10	AML	ذكر	56	16.68
11	AML	ذكر	36	36.76
12	AML	ذكر	16	61.39
13	AML	ذكر	22	55.33
14	AML	ذكر	45	49.52
15	AML	ذكر	60	47.18
16	AML	ذكر	72	25.63
17	AML	ذكر	40	50.21
18	AML	ذكر	19	45.26
19	AML	ذكر	43	40.22
20	AML	انثى	52	51.98

(و) تعبير الجين *RUNX3* مع عينات المقارنة

ت	الجنس	العمر	Fold change ($2^{\Delta\Delta CT}$) for <i>RUNX3</i>
1	انثى	26	24.933
2	ذكر	41	25.634
3	ذكر	19	32.900
4	ذكر	50	36.252
5	ذكر	53	34.535
6	ذكر	47	30.274
7	انثى	23	49.522
8	انثى	53	49.180
9	انثى	22	51.984
10	انثى	49	45.570
11	ذكر	35	52.346
12	ذكر	21	48.503
13	ذكر	37	37.271
14	ذكر	30	46.851
15	ذكر	44	36.504
16	ذكر	51	65.799
17	ذكر	27	47.505
18	ذكر	50	51.625
19	ذكر	29	44.632
20	ذكر	18	34.535

ملحق (3) تسلسل قواعد جين *JAK2*.

H210927-030_A20_T1_TF.ab1<

GAATCGGTAGCTCTGTACCATGCCTAATTCGCTAATCGTAAACATCAGGG
 AATCAGAACAATTCTTTAGCAAGTGTTATTTAAAGGCTACATCCATCTAC
 CTCAGTTTCCTATATCTATCTCTGACATCTACCTCTAGTTGTA CTCTGT
 CCTCTATTTCAAGGTGTTATGGGTCAAGCCTGTTGACTGGCATTATTCAT
 GATTCCTGTACCACTCTTGCTCTCTCTCACTTTGATCTCCATATTCCAGG
 CTTACACAGGGGTTTCCTCAGAACGTTGATGGCAGTTGCAGGTCCATATA
 AAGGGACCAAAGCACATTGTATCCTCATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGG
 AGAAAGTGCATCTTTATTATGGCTGGATGGACCATGGATTTA

H210927-030_B22_T2_TF.ab1<

CGATGGATGCATGCTACTGCTTATTTGCTTGTTAAAAACCTGGGTTTACA
 ATTCTTTAGCAAGTGTTATTTAAAGGCTACATCCATCTACCTCAGTTTCC
 TATATCTATCTCTGACATCTACCTCTAGTTGTA CTCTGTCTCTATTTTC
 AGGTGTTATGGGTCAAGCCTGTTGACTGGCATTATTCATGATTCTGTGA
 CCACTCTTGCTCTCTCTCACTTTGATCTCCATATTCCAGGCTTACACAGG
 GGTTTCCTCAGAACGTTGATGGCAGTTGCAGGTCCATATAAAGGGACCAA
 AGCACATTGTATCCTCATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCA
 TCTTTATTATGGCACCAATGAATCAACCGTTACTTTTCGG

H210927-030_C22_T3_TF.ab1<

GTCAGTAGTGGTATGTGTCTGCATTAGGATTTTCCTGTTTGGCATCAGGT
 ATCTGAACAGCAATTCTTTAGCAAGTGTTATTTAAAGGCTACATCCATCT
 ACCTCAGTTTCCTATATCTATCTCTGACATCTACCTCTAGTTGTA CTCT
 GTCCTCTATTTCAAGGTGTTATGGGTCAAGCCTGTTGACTGGCATTATTC
 ATGATTCTGTACCACTCTTGCTCTCTCTCACTTTGATCTCCATATTCCA
 GGCTTACACAGGGGTTTCCTCAGAACGTTGATGGCAGTTGCAGGTCCATA
 TAAAGGGACCAAAGCACATTGTATCCTCATCTATAGTCATGCTGAAAGTA
 GGAGAAAGTGCATCTTTATTATGTCAATAACCTGACCCACCTTT

Summary

The random primers OPAA11, OPU15, OPD18 in the random nucleic acid amplification technique showed a difference in the total number of bands between the leukemia patient group and the comparison group in favor of the patient group, as the total number reached 298 bands in the patients and 235 bands in the comparison group, also the difference was noted in the numbers of bands, monomorphic, polymorphic and unique between the two groups, which indicates the presence of genetic variation between them.

Summary

Summary

This study was conducted in the Laboratory of Molecular Genetics and Genetic Engineering, in the Department of biology, College of Science, University of Maysan, where DNA was extracted. The study continued for the period from 29/10/2022 to 10/3/2023 and aimed to determine the genetic variation in a sample of patients with acute lymphoblastic and myeloid leukemia. Blood samples were collected from 40 patients who were diagnosed with the disease at the Hematology Center in the Medical City in Baghdad Governorate and 20 A healthy blood sample was chosen as a comparison group.

The gene expression of the genes *RUNX1* and *RUNX3* was studied using the Quantitative Real Time - PCR technique, and compared with the *GAPDH* gene. As for the V617F mutation in the *JAK2* gene, the amplification refractory mutation system was used to study it, and also to study the genetic variation between the two groups, the random amplification polymorphic DNA technique.

The results showed a significant difference in the expression of the *RUNX1* gene in patients with acute myeloid leukemia, with a probability value (P-value) of 0.04. We did not find a significant difference for this gene in cases of acute lymphoblastic leukemia. As for the expression of the gene *RUNX3*, we did not notice a significant difference in it for patients with leukemia. studied, this suggests its role as a tumor suppressor gene.

The current study samples of patients and the comparison group did not record the presence of the mutation in the *JAK2* gene, and the genotype of all samples was wild type and homozygous (GG), and the mutation type was not homozygous or heterozygous (TT) and (GT) respectively.



Summary

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Science Research
University of Misan
College of Science
Department of Biology



**Molecular study of *RUNX1*, *RUNX3* and *JAK2* genes in
Leukemia patients**

A thesis

Submitted to the Council of the College of Science / University of
Misan as Partial Fulfillment of the Requirements for the Master
Degree in Biology

By

Maytham Ammer Muftin

B. Sc. Biology (2003)

Supervised

Assist. Prof. Dr. Maytham Abdulkadhim Dragh

2023 A.D

1445 A.H