دراسة ورلثية خلوية لعينات دم مرضى ابيضاض الدم النخاعيني الحاد Acute myeloid leukemia (AML)

هند حسين عبيد ناهي يوسف ياسين رجوة حسن عيسى

الخلاصة:

تم في هذه الدراسة التحري عن التغيرات الوراثية الخلوية في الخلايا السرطانية (myeloblast) المعزولة من عينات دم مرضى إبيضاض الدم النخاعيني الحاد Acute myeloid leukemia (AML)، فضلا" عن دراسة قدرة تلك الخلايا على الانقسام وكذلك عن انقسام الخلايا اللمفاوية لمرضى AML.

توصلت الدراسة الى النتائج الآتية:

- تمكنت الخلايا السرطانية لمرضى AML من النمو في الزجاج بوجود وسط زرعي نسيجي مزود بـ(20%) من مصل العجل الجنيني.
- لاتمتلك الخلايا السرطانية (myeloblast) القدرة على الإنقسام والتضاعف أو أنها قد تكون ذات إنقسام بطيء جداً.
- تكون الخلايا اللمفاوية لمرضى AML فاقدة القدرة على الانقسام والتضاعف بالرغم من وجود التحفيز بالمادة المشطرة (PHA).
- أظهرت نتائج الدراسة، أن خلايا مرضى AML ذات معامل إنقسام واطئ فقد بلغت أعلى قيمة له (0.52%) لأحد المرضى، في حين كانت السيطرة الموجبة للأصحاء (3.62%) وبفروق معنوية عالية ($P<0.01$).
- وجدت هناك تغايرات كروموسومية في الخلايا الدموية لبعض مرضى AML.

Cytogenetic Study for Blood Samples of Acute Myeloid Leukemia(AML) Patient

Hind Hussein Obaid **Nahiy Yousif Yaseen** **Rajwa Hassan Essa**

Abstract

This study aimed at investigating the cytogenetic aberration in cancer cells(myeloblasts) isolated from blood samples for pre-tretment, Acute Myeloid Leukemia (AML) patients. And Study the division of myeloblasts, and division of lymphocytes from AML patients.

The results showed:

- AML cells had the ability to growth in tissue culture media supplemented with (20%) fetal calf serum.
- AML cells had no ability to replication and division or were had very slowly division.
- Lymphocyte cells from AML patients, lost the ability to divide with found PHA.
- The Mitotic Index for AML patients cells were very low, for one body was (0.52%), with had significant differences ($P<0.01$) compared with healthy control was (3.26%).
- Blood cells for some AML patients had chromosomal aberrations.

المقدمة :

إبيضاض الدم النخاعيني الحاد هو مرض خبيث ينشأ في الخلايا النخاعينية Myeloid cells (المسؤولة عن إنتاج الخلايا البيضاء المحببة) ، التي هي جزء من مكونات النسيج الدموي ضمن نخاع العظم، إذ تتكاثر أحد خطوط الخلايا (Cell lines) أو أكثر من خط بصورة غير طبيعية في مرحلة معينة؛ وذلك بسبب فقدانها الآلية التي تتحكم في السيطرة على نموها ونضجها فيزداد عددها بصورة هائلة ومستمرة ، ولاتموت تلك الخلايا عند إنتهاء دورة حياتها [1].

تنطلق الخلايا الأرومية الشاذة –التي عادة مايطلق عليها الـ (Myeloblast) بصورة عامة –إلى الدم ثم تغزو الانسجة الاخرى كالكبد والطحال والعقد اللمفاوية والجلد والدماغ وغيرها، مسببة تضخماً سرطانياً، كما ويزداد عددها داخل نخاع العظم مما يعيق عمله، ويسبب تثبيط إنتاج خطوط خلايا الدم الطبيعية الأخرى، والخلايا السرطانية الناتجة تكون غير ناضجة ولا تتمكن من أداء وظيفتها الطبيعية، فضلاً عن إنها لا تستطيع التمايز والوصول إلى مرحلة النضج [2].

يصيب الـ AML عادةً البالغين من كبار السن ممن تجاوزت أعمارهم الخمسين عاماً، كما ويصيب الشباب مابين سن(20–15) سنة، أما الأطفال فنسبة الإصابة قليلة أو نادرة بينهم [3] . ويعدّ الـ AML من الأمراض الخطيرة؛ لأنه يسبب الموت خلال أسابيع قليلة بل وحتى خلال أيام، ويصاب المريض بفقر دم ونزف دموي وتضخم الكبد والطحال والعقد اللمفاوية، فضلاً عن الإصابة بالممرضات :كالبكتيريا، والفطريات، والفايروسات؛ بسبب غياب خلايا العدلة (Neutrophiles)، وإن وجدت فلا تتمكن من القيام بوظيفة الحماية بصورة مثالية [4,5,6 ,7]. فضلا " عن استخدام العلاجات الكيميائية التي غالباً ماتكون سبباً في ظهور أنواع جديدة من ابيضاضات الدم ، لذا نجد ان السرطان ليس مرضاً بل هو مجموعة كبيرة من الأمراض تجتمع تحت عنوان واحد [8 ,9].

هدف الدراسة: التحري عن التغيرات الوراثية الخلوية في الخلايا السرطانية لعينات دم مرضى ابيضاض الدم النخاعيني الحاد ومدى قدرتها ع الانقسام والتكاثر.

طرائق العمل:

- **جمع عينات الدم**

تم الحصول على (30) عينة دم لمرضى AML بالغين في مرحلة التشخيص المبكر (Pre-treatment)، من مستشفى بغداد التعليمي. سحب الدم من الوريد بحجم يتراوح مابين (5-8) مل بوساطة محقنة معقمة حاوية على الهيبارين.

- **عزل الخلايا السرطانية**

عزلت الخلايا السرطانية (Myeloblast) من دم مرضى AML حسب الطريقة المتبعة من قبل الباحث Ogata [10] باستعمال محلول الـ Metrizamide متدرج الكثافة، ثم حُضر عالق الخلايا بتركيز 4×10^{6} خلية/مل بوسط RPMI-1640 المزود بـ20% مصل العجل الجنيني.

- **محاولة دراسة انقسام خلايا الدم السرطانية (Myeloblast) لمرضى (AML) ودراسة التغيرات الكروموسومية (CA) فيها**

أولاً- زرع الدم الكامل Whole Blood

تم اجراء هذه التجربة اعتماداً على الخطوات الأساسية نفسها المتبعة من قبل الباحثين Verma و Babu [11] في زراعة الدم(Blood Culturing) الاعتيادي من زرع ثم حصاد واخيراً التثبيت وتحضير الشرائح الزجاجية، مع وجود بعض الفروقات التي سنتطرق اليها وهي كالآتي:

1- زرع الدم الكامل للمريض بدون اضافة مادة الـPHA، وكمية الدم المزروعة اعتمدت على عدد كريات الدم البيضاء للمريض [12] ،الوسط الزرعي المستخدم هو(RPMI-1640 المزود بـ

بلازما AB) وآخر هو (RPMI–1640 المزود بـ 20% FCS)، علماً أن الأوساط مزودة بمادة (5–BudR) بتركيز (10) مكغم/مل، كما واستخدمت أوعية الزرع النسيجي من النوع ($25cm^2$) في التنمية.

2– مدة الزرع كانت (24، 48، 72) ساعة والحصاد تم قبل ساعتين من انتهاء كل مدة أي في الساعات (22، 46، 70) على التوالي وذلك بإضافة الكولجسين بتركيز نهائي قدره (10) مكغم/مل.

3– مؤشرات الوراثة الخلوية المفترض دراستها لهذه التجربة هي (SCE, CA, RI, CCP, MI).

ثانياً– زرع الخلايا السرطانية المعزولة Myeloblast

*** التجربة الاولى**

- حضرت الخلايا السرطانية بتركيز قدره (1×10^6) خلية/مل بعد أن تم عزلها من الدم ، إذ علقت بوسط RPMI–1640.

- زرعت الخلايا في أوعية الزرع النسيجي من النوع ($25cm^2$) الحاوية على (5) مل من وسط (RPMI–1640 + 20%FCS + 5–BrdU 10µg/ml)، بحجم مقداره (0.5) مل ، ثم حضنت الاوعية بدرجة حرارة (37)م لمدة (24، 48، 72) ساعة، بعدها أجريت عملية الحصاد والتثبيت وتحضير الشرائح الزجاجية.

*** التجربة الثانية**

- تم تنفيذها بالخطوات نفسها المتبعة في التجربة الاولى لكن دون اضافة المادة المعلمة (5-BrdU).

- حضنت أوعية المزارع الخلوية لمدة (3، 7، 14، 21) يوماً، بعد انتهاء كل مدة منها، أخذ حجم (0.2) مل من المزروع لفحص عيوشية الخلايا، كما وتم فرش (20) مايكروليتر من العالق الخلوي على شرائح زجاجية نظيفة، تركت لتجف بالهواء، ثم ثبتت بالكحول المثيلي لمدة (10) دقائق بعدها صبغة بصبغة كمزا.

- بعدها تم تفريغ العالق الخلوي لكل وعاء.

- بعدها حصدت الخلايا بالصورة الاعتيادية التي مر ذكرها، وثبتت وحضرت الشرائح الزجاجية منها وفحصت للتقصي عن وجود الانقسام الخلوي (MI).

* أجريت التجربة (1) و(2) على بعض عينات دم المرضى التي تمكنا من الحصول عليها والتي كانت نسبة الخلايا الارومية Myeloblast فيها لاتقل عن (70%).

محاولة دراسة انقسام الخلايا اللمفاوية لمرضى AML

تم اتباع خطوات التجربة نفسها الخاصة بزرع الدم الطبيعي (Blood culturing)، [11] وبوجود المادة المحفزة (PHA)، أما كمية الدم المضافة فاعتمدت على عدد كريات الدم البيض للمريض، حضنت لمدة (72) ساعة، ثم تم الحصاد والتثبيت وتحضير الشرائح الزجاجية، ثم صبغها لاستخراج (SCE, RI, CCP C,A, BI, MI) التي كان من المفترض التحري عنها.

النتائج والمناقشة:

- **الأنواع الثانوية لعينات مرضى إبيضاض الدم النخاعيني الحاد (AML)**

تم في هذه الدراسة جمع (30) عينة دم من مرضى إبيضاض الدم النخاعيني الحاد (AML) في مرحلة العلاج المبكر (ممن لم يتعاطوا أي علاجات سواءً كانت كيميائية أو ساندة). شملت العينات الأنواع الثانوية (M0, M1, M2, M3, M5a, Unknown AML) الموضحة في الجدول (1) والتي صنفت حسب النظام العالمي (FAB).

الجدول (1): الأعداد والنسب المئوية للأنواع الثانوية لمرضى AML

ت	نوع الـAML	عدد العينات	النسب المئوية (%)
1	M0	2	6.67
2	M1	4	13.33
3	M2	9	30
4	M3	8	26.67
5	M5a	1	3.33
6	Unknown AML	6	20
المجموع		30	100

تبين النتائج أن أكثر أنواع الـAML شيوعاً (حسب هذه الدراسة) هو الـ(M2)، ثم (M3)، وبنسب مقدارها (30 و26.67)% على الترتيب، أما الـ M5a فهو أقلها عدداً (1) وبنسبة (3.33%)، أما العينات التي لم يتمكن المختصون من تصنيفها فوضعت تحت صنف الـAML

بصورة عامة وعددها (6) فقط، وهي عادة تكون متطورة من أنواع أخرى من اللوكيميا مثل ALL و MDS،
[14,13,1] ، أو قد تكون ناتجة من طفرات بالجين (FLt_3) فلا يمكن تشخيص الحالة آنذاك (Poor prognosis) وأشارت أغلب الدراسات إلى أنها تنتشر في كبار السن بصورة أوسع من الشباب [16,15].

عند مقارنة نتائج هذه الدراسة مع أخرى، سيتبين أن هناك اختلافاً في هذا الجانب، وذلك بسبب قلة العينة المدروسة هنا، والسبب يعزى إلى صعوبة الحصول على عينات لمرضى غير معالجين، فضلاً عن إن هدف الدراسة هو الخلية السرطانية نفسها ، وليس التحري عن أنواع وأصناف المرض، أما الدراسات التي اهتمت بذلك فقد استمرت لسنوات طويلة تراوحت مابين (7-15) عاماً، وحصلت على أعداد كبيرة من المصابين تجاوزت أحياناً الألف مريض[19,18,17].

- **دراسة التغيرات الكروموسومية في خلايا الدم السرطانية (myeloblast) والطبيعية (lymphocyte) لمرضى (AML).**

تقع تحت هذا العنوان نتائج أربعة اختبارات، كان الهدف الرئيس منها هو التقصي عن إنقسام الخلايا السرطانية (myeloblast)، والخلايا اللمفاوية لمرضى إبيضاض الدم النخاعيني الحاد، ومن ثم دراسة التغيرات الكروموسومية فيها والتبادل الكروماتيدي الشقيق وتوالي دورة الخلية ومعامل تضاعفها، باعتبار خلية الـ(myeloblast) كأي خلية سرطانية تتمتع بقدرة على التضاعف، لاسيّما وهي أحد أنواع الخلايا الناشئة ضمن خطوط نشوء الخلايا الدموية في نخاع العظم من الخلية الجذعية (Stem cells) فهي أما (myeloblast أو promyelocyte أو myelocyte) حسب صنف الـAML الثانوي، إذ تتميز هذه الأنواع في الحالة الطبيعية بقدرة عالية على الانقسام، فضلاً عن قابلية التكاثر الذاتي [16,5].

وبناءً على ماسبق، تمّ زرع دم المريض الكامل بدون استعمال المادة المشطرة (PHA) ولفترات زمنية مختلفة شملت (24، 48، 72) ساعة باستخدام وسط التنمية RPMI-1640 المزود بالبلازما نوع (AB) تارةً وآخر مزود بمصل العجل الجنيني(20%) تارةً أخرى، لكن لم يتم الحصول

على خلايا في طور الانقسام (الطور الاستوائي/Metaphase) إلا في بعض الحالات وبنسب إنقسام قليلة (سيتم التطرق اليها لاحقاً).

ثم زُرع الدم الكامل بوجود المادة المحفزة على انقسام الخلايا اللمفاوية (PHA) على أمل أن يقوم الـ(PHA) بتحفيز الخلايا اللمفاوية للمريض والحصول على الطور الاستوائي، ومع ذلك لم ننجح إلا في بعض العينات وبنسب انقسام قليلة أيضاً (سيتم التطرق إليها لاحقاً).

كانت تلك النتائج إشارة لاحتمالية وجود معوقٍ ما في العمل، لكن لم يتم الكشف عنه، فهل إن الخلية السرطانية سريعة الانقسام جداً، ولم نستطع أن نحصل على خلايا الطور الاستوائي، أو هل إنها لاتنقسم أو إنها بطيئة الانقسام، وربما تختلف دورتها الخلوية وبذلك لم نتمكن من تحديد وقت إيقاف إنقسامها، وقد توجد مواد مثبطة للانقسام في الدم، ثم لماذا لاتستجيب الخلية اللمفاوية لمادة الـPHA، كل هذه الاحتمالات قادتنا لإجراء تجربتين أخرى.

زرعت في الاولى الخلايا السرطانية للمريض (myeloblast) بعد عزلها من الدم، وتحت ظروف زرع الدم الكامل (بدون PHA) نفسها، وبالرغم من ذلك لم نحصل على خلايا في طور الانقسام، ولأجله تم القيام بإجراء التجربة الثانية وهي زرع الخلايا لفترات زمنية أطول شملت (3، 7، 14، 21) يوم، وبعد نهاية كل فترة فحصت عيوشية الخلايا.

أظهرت النتائج أن حيوية الخلايا كانت عالية، تجاوزت الـ (95%) حتى بعد (21) يوماً من التنمية، أما بعد حصاد الخلايا فلم نحصل إلا على أعداد قليلة من الخلايا المنقسمة بعد اليوم الثالث والسابع من التنمية، وهي أقل مما تم الحصول عليه في تجربة زرع الدم الكامل، في حين بعد (14 و21) يوماً من التنمية، فلم توجد خلايا منقسمة، ولكن عند فحص الشرائح الزجاجية المفروشة قبل الحصاد والمصبوغة بصبغة كمزا وجدت أنواعاً من الخلايا اتخذت أشكالاً مختلفة عن الخلية السرطانية الأرومية (myeloblast) فظهرت تشبه الخلية البلعمية، كبيرة الحجم، ذات أذرع متعددة ونواة كبيرة غير منتظمة، ولم نجد هذه الحالة عند التنمية لفترة (3 و7) أيام. إن هذه النتائج تدل على حدوث تمايز (Differentiation) للخلايا السرطانية، وتحولها من أرومات (Blast) إلى خلايا

ناضجة (mature cells)، لذلك فهي لاتنقسم، وانما تنمو لتصل إلى مرحلة النضج الذاتي عند تنميتها في وسط زرعي غني بالمادة الغذائية.

*** نتائج زرع الدم الكامل:**

زرعت ثلاثون عينة دم لمرضى AML، أهملت نتائج عينتين فقط بعد الزرع لظهور تلوث بكتيري فيها سببه العينة نفسها (بعد الرجوع لفحوصات المرضى المايكروبايولوجية)، أحدهما ناتج من بكتيريا *Staphyllococcus epidermides* والتي تعد فلورا طبيعية في الجلد، أما الاخرى فهي لبكتيريا *E.coli* بسبب حدوث *Bacterimia* في الدم.

وقد أشار الباحثون إلى وجود فرصة كبيرة لإصابة مرضى السرطان بالممرضات الجرثومية كـ(البكتيريا والفطريات والخمائر والفايروسات) والذي يعزى إلى ضعف الجهاز المناعي لهؤلاء المرضى مسبباً تغلب الممرضات على دفاعات الجسم وحدوث الإصابة التي غالباً ماتسبب الموت [24,23,22,21,20,5].

معامل الانقسام الخيطي

من بين (28) عينة دم مزروعة، تمّ الحصول على (9) عينات زرع موجب أي بنسبة (32.14%)، نجحت منها (أربعة) عينات بوجود الـPHA وبدونه، ونجحت (أربعة) أخرى بدون الـPHA فقط، في حين عينة (واحدة) فقط أعطت إنقساماً مع الـPHA وفشلت بدونه.

أظهرت النتائج أن عمر المريض يعدّ أحد العوامل المهمة في نجاح عملية زرع الخلايا، فقد نجحت زراعة العينات للمرضى الذين تراوحت أعمارهم مابين (18–45) عاماً، بينما فشلت عينات الأعمار الكبيرة التي تجاوزت الخمسين عاماً، فيما عدا عينة واحدة فقط لمريضة في الستين. يوضح الجدول (2) مجمل نتائج زراعة دم المرضى للعينات موجبة الزرع.

كما مرّ ذكره، إن هناك عينات نجح زرعها مع وبدون الـPHA، وكانت نسبة الخلايا المنقسمة في الطور الاستوائي متقاربة لكلا النوعين، لذلك لايمكن الجزم أن هذه الكروموسومات تعود إلى خلية

سرطانية (myeloblast) أو إنها لخلية لمفاوية، لذلك تمّ أخذ معدل معامل الانقسام الخيطي للنوعين ومن المحتمل جداً ان الانقسام هو للخلايا السرطانية التي وصلت إلى مرحلة الطور الاستوائي فتوقفت عند استخدام الكولجسين.

تدل هذه النتائج على ان الخلايا السرطانية لمرضى AML غير المعالجين لاتتمكن من الانقسام، بمعنى آخر إنها فاقدة القدرة على الانقسام والتكاثر أو قد يكون انقسامها بطيء جداً، تأتي نتائج معامل الانقسام الخيطي لتدعم ذلك، إذ يبين الجدول ذاته (2) إن أعلى MI سجل هو (0.52%) للعينة رقم (9)، في حين بلغت قيمة السيطرة الموجبة للأصحاء (3.62%) وأكدت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية كبيرة ($P<0.01$) عند مقارنة قيم الـMI للمرضى التسعة مع قيمة السيطرة الموجبة، ثم تمت الاستعانة بنتائج اختبار توالي دورة الخلية (CCP)، ومعامل التضاعف (RI)، ليحسم الشك في الموضوع، فعند التحري عن قابلية الخلايا على التضاعف والمرور بالأطوار الانقسامية الثلاثة (M_1, M_2, M_3)، وجد ان الخلايا لم تتمكن من الارتباط بمادة (5-BudR) لذلك ظهرت الكروموسومات معتمة جميعاً عند التصبيغ بصبغة هوكست المتألقة ثم بكمزا، وهذا دليل على إن المادة الوراثية لتلك الخلايا لم تتضاعف، لذلك لم ترتبط المادة الواسمة بشريط الـDNA، بمعنى آخر إن الخلية لم تنقسم.

عزّزت النتائج ماتوصل اليه الباحث الشوك [25]، فقد وجد أن نسبة انقسام خلايا مرضى إبيضاض الدم ضئيلة جداً تراوحت مابين (0.4-0.9)%، مقارنةً بالاصحاء التي كانت (5-7.5)%. وجاءت النتائج متوافقة نوعاً ما مع ماتوصلت اليه الباحثة الكرخي[26] ، التي قامت بإجراء التحليلات الوراثية الخلوية إلى مرضى إبيضاض الدم، فقد فشلت الزراعة النسيجية لعينات الدم تماماً للمرضى غير المعالجين والتي تمت باستعمال مادة الـPHA وبذلك لم تستطع الحصول على نتائج اختبارات (SCE, CA, RI,CCP,MI)، في حين كانت نسبة فشل العينات المزروعة من قبلنا هي (67.68%).

من جانب آخر، كان هناك تناقضاً مع ماحصل عليه الموسوي [27] الذي تحرى عن التغيرات الوراثية في دم مرضى AML، فقد وجد أن النسبة المئوية لانقسام الخلايا (بوجود الـPHA)

تراوحت مابين (5.31–6.1)% مقارنة بسيطرة الأصحاء التي بلغت (2.9%)، وهي مرتفعة إذا ماقورنت بما أظهرته هذه الدراسة التي سجلت (0.52%) كأعلى نسبة انقسام.

إن إضافة مادة الـPHA (المحفزة على انقسام الخلايا اللمفاوية) إلى المزارع النسيجية لدم مرضى ابيضاض الدم النخاعيني الحاد بصورة خاصة، لايعد ذا فائدة مرجوة، فضلاً عن أن الخلايا الانقسامية الظاهرة في الطور الاستوائي لايمكن أن ننسبها إلى الخلايا اللمفاوية بصورة قاطعة لوجود أطوار انقسامية للخلايا السرطانية (الزراعة بدون PHA). وذكر الباحثان Nara & McCulloch، أن الخلايا السرطانية تقوم باستهلاك مادة الـPHA كمصدر غذائي، وهذا سوف يحرم الخلايا اللمفاوية من التحفيز والانقسام [28]. بينما أشار Ruddon إلى ان الخلايا السرطانية وبفعل التغيرات والتحويرات التي تطرأ عليها سوف تميل إلى التلازن (Agglutination) مع بعضها البعض بوجود الـ PHA [29] .

فضلاً عن ذلك، فإن استجابة الخلايا اللمفاوية لمرضى AML لمادة الـPHA تكون ضعيفة وتختلف حسب المريض، فقد وجدت هناك تغايرات كثيرة تتحكم بنجاح المزارع النسيجية تكون موجودة حتى بين أنواع الصنف الثانوي الواحد للمرضى ومن أهمها حالة المريض الصحية، وعمره، وجنسه. ومن المرجح أن السبب الرئيس في ذلك يمكن أن يعود إلى نوع الطفرات التي حصلت بالمادة الوراثية للمريض، وموقعها، والجين المتضرر المسؤول عنها [30,2].

أما الاستنتاج النهائي لكل ماسبق ذكره، هو إن الخلايا السرطانية (myeloblast) لمرضى AML فقدت القدرة على الإنقسام والتكاثر (حسب نوع المرض) والبعض الآخر منها يتمكن من الانقسام لكنه بطيء جداً، (فالأطوار الاستوائية التي تم الحصول عليها هي للخلايا التي وصلت بتلك الساعة إلى طور الإنقسام وتم إيقافها وليس لخلايا انقسمت لمرات عديدة خلال مدة الحضن)، أي إن وقت التضاعف (Generation time) لهذه الخلايا يكون طويلاً جداً، وهذا واضح من دراستنا والتجارب التي استمرت فيها التنمية إلى (21) يوماً دون حدوث الانقسام، فضلاً عن وجود عقبة أخرى وهي تمايز تلك الخلايا بدلاً من إنقسامها.

يعدّ الانقسام البطيء للخلايا السرطانية في الدم مهماً للمريض، فلو انقسمت تلك الخلايا بسرعة هائلة داخل الدم، كما يحدث لانقسام خلايا نخاع العظم لسبب موت المريض خلال ساعاتٍ معدودة، لكنها تهاجر في الدم وتستقر في مواقع أخرى كالوجه والعقد اللمفاوية وحتى الجلد لتنقسم هناك ببطء مسببةً أوراماً في تلك الأماكن ([2].

هناك العديد من الدراسات التي تعزز وتدعم وتفسر ما تم التوصل اليه من نتائج حول مدى قدرة الخلايا السرطانية لمرضى AML على الانقسام وكذلك التمايز والتي سيتم تناولها بشيء من التفصيل وكالآتي:

أكد ([31] إن الخلايا السرطانية بصورةٍ عامة ممكن أن تكون بطيئة الانقسام، في حين تمتلك الخلايا الطبيعية سرعة إنقسام مرتفعة مثل خلايا نخاع العظم والخلايا المبطنة للقناة الهضمية (المعدية، المعوية)، وأضاف أن وقت التضاعف (Doubling time) يختلف حسب نوع السرطان فهناك خلايا تنقسم خلال (24) ساعة مثل(Burkitt's lymphoma)، بينما تحتاج خلايا إبيضاض الدم إلى (اسبوعين) للتضاعف، في حين تستغرق خلايا سرطان الغدة اللبنية ثلاثة أشهر. وكان [32] قد أشار إلى أن خلايا اللوكيميا النخاعية لاتتمكن من النمو في الزجاج أو إنها قد تكون قليلة النمو، وبعض الأنواع تستغرق أربعة أيام للتضاعف وهذا ناتج من طول فترة طور التصنيع في الدورة الخلوية (S-phase) الذي يكون حوالي (3) مرات أطول مما هو عليه في الخلايا الطبيعية.

إن عملية إنتاج الخلايا الدموية النخاعينية في نخاع العظم يتضمن المرور بعدة مراحل للوصول إلى الخلايا الناضجة وتشمل:

myeloblast→promyelocyte→Myelocyte→Metamyelocyte→Band cells→Segmented cells

تمتلك الأنواع الثلاثة الأولى القدرة على الإنقسام والتكاثر بينما لاتتمكن الثلاثة الأخيرة من التضاعف، هذا مايحدث بالحالة الطبيعية [5 ,33,29] .

لكن الذي يحصل عند الإصابة بإبيضاض الدم النخاعيني الحاد AML هو فقدان خلايا النخاع (Myeloblast, Promyelocyte, Myelocyte) القدرة على الإنقسام وتبقى بطور السكون (arrest cells/ Go–phase)، وتم التوصل إلى ذلك من خلال دراسة الدورة الخلوية لتلك الخلايا، فوجد إن الخلايا الأرومية للمرضى لاتمتلك القدرة على تجديد نفسها ذاتياً (Self–renew)، وكان الاعتقاد سابقاً إن خلايا (Leukemic Stem Cells/LSC) تتمكن من التطور والنمو الذاتي، في حين أثبتت البحوث الحالية أن إنقسام هذه الخلايا يختلف حسب نوع الـAML الثانوي [16].

أما عن سبب ذلك فإنه يعزى للطفرات التي تحدث في جينات النمو، فطفرات الجين (FLt_3) المسؤول عن النمو والتكاثر والتمايز الطبيعي لخلايا نخاع العظم سوف تسبب منع تشفير مستقبل بروتين (FLt_3) على سطح تلك الخلايا وبذلك تفشل عملية تكاثر خلايا AML خارج الجسم الحي وحتى داخله، وقد دلّت نتائج التجارب المختبرية أن تفعيل مستقبل هذا الجين يسبب تحفيز تكاثر هذه الخلايا ويثبط الموت المبرمج لها [35,34,2].

من جانب آخر، فإن التعبير الخاطئ للجينات (AML1/ETO) سوف يسبب بقاء خلايا النخاع بمرحلةٍ معينة، إذ تستطيع النمو (Growth) لكنها لاتتمكن من التكاثر (Proliferation) وتبقى بطور السكون، والسبب يعود إلى المواد البروتينية المثبطة التي تنتجها تعبيرات الجينات الخاطئة هي التي تمنع نضج وتكاثر تلك الخلايا، أو إنها تسبب فقدان المستقبلات على سطحها [36,30]، وأضاف الباحث نفسه بأن الخلايا الجذعية الجنينية (Embryonic Stem Cells) تفشل بتكوين المستعمرات (Hematopoietic Colonies) عند الزرع خارج الجسم الحي فيما إذا كان هناك عطب أو خلل معين بالجين (MLL). أما [33] فذكر أن محددات النمو تزداد عند تنمية تلك الخلايا في الزجاج، مما يعيق من قدرتها على الإنقسام والتكاثر. لكن [38,37] أكدوا على إمكانية تحفيز تكاثر تلك الخلايا باستعمال عوامل النمو.

توصل الباحثان [28]خلال دراستهما التي أجريت للتقصي عن قدرة الخلايا الأرومية لمرضى AML على التضاعف إلى أن زمن التضاعف لهذه الخلايا يختلف من مريضٍ لآخر ومن نوعٍ لآخر، وعلى العموم يستغرق فترة طويلة امتدت (6) أيام عند التنمية في المزرعة السائلة قصيرة الأمد (Short term culture) وبوجود عوامل النمو، في حين كان أقلها مدةً (3) أيام وأطولها (9)،

أما عند التنمية لمدةٍ طويلة (Long term culture) ثم الزرع على الوسط شبه الصلب (Methyl cellulose) فقد وجد أن هذه الخلايا تفقد القدرة على الإنقسام وحسب نوع الخلايا المعزولة من المريض، فبعضها إنقسمت لمرةٍ (واحدة)، فقط وأخرى تمكنت من التضاعف (ثلاث) مرات، وخلايا مريضٍ واحد فقط تمكنت من الوصول إلى (عشرة) إنقسامات حيث استمرت تنميتها (70) يوماً.

أكد العديد من الباحثين أن تكاثر خلايا AML في الزجاج يحتاج لإضافة عوامل نمو خارجية، فذكر [39] أن هذه الخلايا تتمكن من الوصول إلى مرحلة النضج والتمايز خلال التنمية لفترة قصيرة، أما عند التنمية لفترة طويلة قد تدوم عدة أسابيع وبوجود عوامل النمو فربما تتمكن من الإنقسام. أما عن سبب تحفيز التكاثر فقد عزاه الباحث (Dombret) إلى إمتلاك تلك الخلايا مستقبلات متخصصة لعوامل النمو كالـG-CSF و GM-CSF مما يجعلها تستجيب لهذه العوامل وتتضاعف [40] . وقد حدد [41] قابلية الخلايا على التكاثر من خلال قياس وحدة تكوين المستعمرة (Colony forming unit/ CFU) بعد (10) أيام من التنمية مع دراسة التغيرات الخلوية المظهرية، فضلاً عن الواسمات السطحية.

وجاءت دراسة الباحثين ([43,42]] لتؤكد ماتوصل اليه الآخرون حول إختلاف قدرة أورمات مرضى AML على التكاثر اعتماداً على صنف المرض الثانوي والفرد نفسه، فالخلايا التي تتمكن من إنتاج السايتوكينات (IL-13, IL-10, IL-4) تستطيع التكاثر ذاتياً (Autonomous proliferation) في الزجاج أما التي لاتفرزها فإنها تحتاج إلى إضافتها للوسط حتى تتمكن من التضاعف. كما أكد [44] حاجة تلك الخلايا إلى السيرم ومواد غذائية أخرى كال (Insulin, Transferin, Cholesterol, Bovin serum albumin).

فضلاً عن كل ماتقدم، فقد وجد [45] أن أعداد خلايا AML تزداد بمقدار (2.14) مرة عند تنميتها بمزرعةٍ مزودة بمختلف عوامل النمو (Stem cell factor/SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-6)، في حين تتضاعف خلايا مزرعة نخاع العظم الطبيعي (169) مرة وتحت الظروف نفسها، بينما تزداد أعداد خلايا مرضى CML

(60) مرة، ومن خلال ذلك نستنتج أن خلايا AML تتمكن من الإنقسام لكن بسرعةٍ بطيئة. ثم جاءت دراسة [46] لتؤكد ذلك، فقد وجد أن هذه الخلايا تبقى في طور السكون (G_0) بعد تنميتها لفترةٍ قصيرة (72) ساعة دون إضافة عوامل النمو، لكن تتحفز على التكاثر عند التنمية لفترة طويلة بوجود (SCF, IL-3). وتوصل [47] إلى أن خلايا نخاع العظم الطبيعية تتمكن من التضاعف لـ(500-1000) مرة عند التنمية لفترة (15) يوماً، مقارنةً بخلايا مرضى AML التي تتمكن من التضاعف لـ (22) مرة فقط، وبوجود السايتوكينات. وأخيراً أشار [48] إلى أن الخلايا التي تحوي تغيرات كروموسومية شائعة تتمكن من التكاثر وبفروق معنوية مقارنةً بالتي تمتلك هيئة كروموسومية طبيعية أو تغيرات نادرة الحدوث.

فيما يخص حدوث التمايز الذاتي لخلايا AML التي تم زراعتها، فيمكن أن يعزى كذلك إلى الطفرات التي تحملها هذه الخلايا فتقود إلى النضج بدلاً من التكاثر، ومنها طفرات الجين (AML-1) التي تشفر لبروتينات الاستنساخ الطافرة ((Transcriptional proteins) [49]، فضلاً عن الجين (mdr-1) الذي يسبب تعبيره العالي ضعف قدرة الخلايا البدائية (Primitive cells) على التضاعف وتكوين المستعمرات، ويقودها إلى مرحلة النضج [50]، وكان الباحث [17] قد أشار إلى أن خلايا AML التي تتمكن من النضج في المزرعة النسيجية تتحول إلى خلايا ناضجة غير طبيعية.

تمتلك الخلايا السرطانية لمرضى AML مقاومة للعلاجات الكيميائية ذات السمية الخلوية، بل إنها تمتلك مقاومة مشتركة لأنواعٍ عدة منها فلا تستجيب لتأثيرها لذلك يتعرض المريض للإنتكاسة (relapse) ويموت، وعادةً مايحصل ذلك في كبار السن [53,51]. أما أسباب هذه المقاومة فهي عديدة، منها قلة تعبير مستقبلات الموت على سطح الخلايا مثل (TNF receptor, Fas/CD95)، أو إنتاج كميات كبيرة من البروتينات المضادة للموت المبرمج [53,33,2]. ومن الأسباب الاخرى هو وجود هذه الخلايا بطور السكون (G_0)، مما يجعلها مقاومة للعلاجات التي تعمل ضمن الدورة الخلوية [54,22]، لذلك يمكن أن تعتمد الطرائق العلاجية على اتجاهين، فالأول هو تحفيز تلك الخلايا على الإنقسام باستخدام عوامل النمو المختلفة لتمر الخلية بطوري الـ (M,S) وهنا تصبح حساسة للعلاجات فتتمكن من قتلها والقضاء عليها [33,22]، فضلاً عن أن بعض المواد العلاجية نفسها تتمكن من تحفيز إنقسام تلك الخلايا، ففي دراسةٍ أجراها [37] توصلوا إلى أن تعريض خلايا AML المعزولة

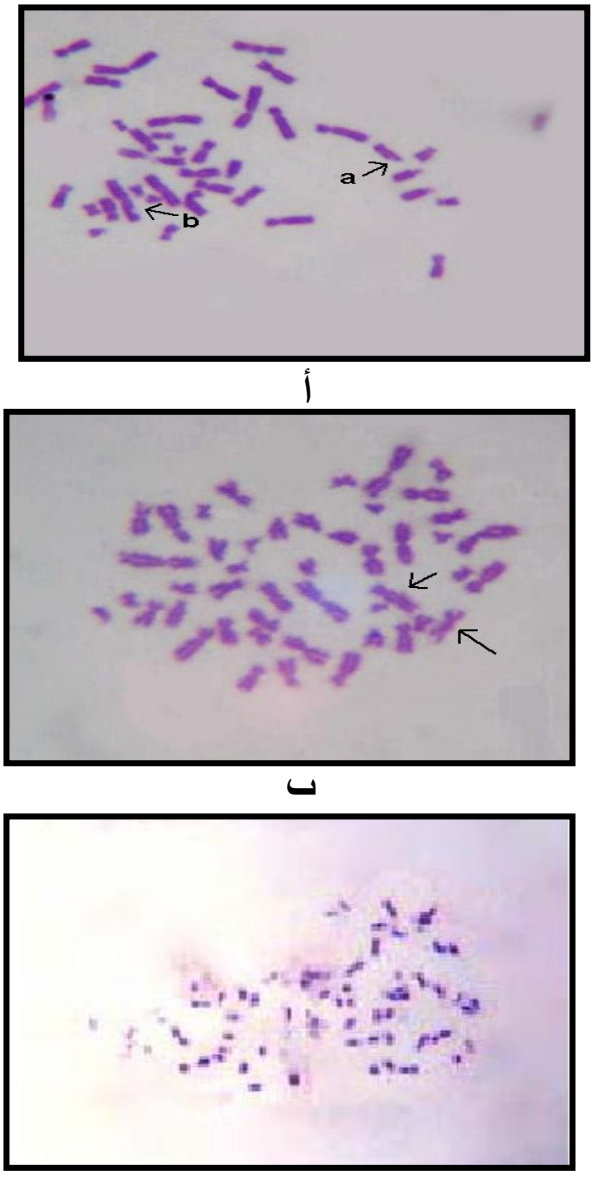
من المريض وهي بطور الـ(G_0) إلى المواد العلاجية (Arac) Cytosine-arabinoside و Daunorubicin، سوف يحولها إلى طور (S) من خلال تأثيرها في بروتينات الدورة الخلوية، وبالتالي تصبح حساسة للمواد العلاجية، لكن يعتمد ذلك على وقت التعريض والجرعة المستخدمة. أما الإتجاه الثاني فيستند على تحفيز تمايز تلك الخلايا للوصول إلى مرحلة النضوج، وعندئذٍ سوف تصل ذاتياً إلى مرحلة الموت المبرمج بسبب قصر عمرها، ويتم التخلص منها [55,22,13]، هناك الكثير من المواد التي تستخدم لهذا الغرض منها عوامل النمو وبعض المواد المستخدمة لعلاج السرطانات مثل Mt-C ومركبات أخرى كالـDMSO و PHA و BrdU-5 [56].

التغيرات الكروموسومية

يوضح الجدول (2) التغيرات الكروموسومية الناشئة في خلايا مرضى AML السرطانية، إذ يتبين أن هناك تغايرات عددية (Mosaic) ظهرت عند (3) فقط من المرضى، فقد كانت بعض خلاياهم تحمل (45) كروموسوماً، بينما وجد العدد طبيعياً (46) كروموسوم عند (5) آخرين، في حين لم نتمكن من قراءة العدد لمريض (واحد)، فقد وجدت كروموسوماته متجمعة (Clumb) وغير واضحة (Fuzzy) ومتقزمة، وقد يكون ذلك نتيجة خطأ ما في العمل أو بسبب العينة نفسها. أما التغيرات الأخرى فقد شملت ظهور الكروموسومات ثنائية المركز في (7) حالات مرضية، والكسور الكروموسومية والكروماتيدية مترافقة مع الكروموسومات ثنائية المركز في (4) عينات، أما إنفصال كروماتيدي الكروموسوم وظهور الكروموسومات الدقيقة فقد وجدت في حالة (واحدة) فقط،(شكل 1)، في حين ظهرت كروموسومات مريض آخر طبيعية والصورة (6) توضح بعض التغيرات الكروموسومية (CA) الظاهرة في عينات دم مرضى (AML). ظهرت النسب المئوية لهذه التغيرات مرتفعة جداً إذا ماقورنت بسيطرة الأصحاء التي بلغت (0.026) وبفروق معنوية كبيرة ($P<0.01$) فقد تراوحت مابين (5.67-15.78) وبمعدل قدره (7.38).

اهتم الكثير من الباحثين بدراسة التغيرات الكروموسومية في خلايا مرضى AML (عن طريق دراسة الهيئة الكروموسومية) والناتجة عن حدوث طفرات في جينات تلك الخلايا [57,16] . تنوعت هذه التغيرات مابين الشائعة وأخرى قليلة التردد، في حين ظهرت تغايرات نادرة جداً

[61,60,59,58,13]. ومع ذلك وجد باحثون آخرون أن هناك حالات إصابة كثيرة بمرض AML لكن ظهرت كروموسوماتهم ذات هيئة طبيعية (Normal Karyotype) ومنهم [63,62] الذي توصل إلى أن (41%) من المصابين ظهرت كروموسوماتهم بهيئة طبيعية، أما[48] فوجد هناك (38) حالة طبيعية من بين (91) مريضاً وبنسبة (42%)، في حين حصل [18]على (178) مريضاً يمتلك هيئة كروموسومية طبيعية من بين (368) حالة أي بنسبة (46.36%). وقد يعزى سبب ظهور هذه الحالة إلى حدوث طفرات بالجين (FLt_3) التي هي شائعة الحدوث في مرض AML ، إذ تسبب زيادة أعداد الخلايا البيضاء مع بقاء الهيئة الكروموسومية بحالة طبيعية [65,64,33,15].



الشكل(1): بعض التغيرات الكروموسومية (CA) الظاهرة في عينات دم مرضى AML: (Giemsa Stain X 1600)

أ- حالة الكسور الكروموسومية[b] وحذف قطعة من الكروموسوم[a]

ب- حالة الكروموسوم ثنائي المركز.

ج- حالة الكروموسومات الدقيقة.

References المصادر

1. Devine S.M. and Larson R.A., **1994**. *"Acute Leukemia in Adults: Recent Development in Diagnosis and Treatment"*, Cancer Journal for Clinicians, 44, pp 326-52.
2. Appelbaum F.R, Rowe J.M, Radich J and Dick J.E., **2002**. *"Acute myeloid leukemia. Hematology"*, American Society of Hematology: Education Program Book. pp. 62-86.
3. Jasmijn D. E. ; de Rooij, C.; Michel, Z. and Marry van den, H. **2015** *Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. J. Clin. Med ,4,127-149.*
4. Haen P.J., **1995**. "*Principles of Hematology*". WCB, Wm.C. Brown Publishers, Toronto.
5. Hoffbrand A.V., Pettit J.E. and Moss P.A., **2004.** "*Essential Haematology*" 4th ed., Blackwell Science.
6. Redaelli, M.; Botteman, J.; Stephens S.; Brandt, and Pashos C., **2004**. "*Economic burden of acute myeloid leukemia", a literature review*. Cancer-Treat-Rev., ,30, pp. 237-47.
7. Ter-Bals E.; and Kaspers G. **2005**. *"Treatment of childhood acute myeloid leukemia*", Expert. Rev. Anticancer Ther.,5, pp.917-29.
8. Mughal T.; and Goldman J. **1999**. "*Understanding Leukaemia and Related Cancers"*, Blackwell Science. London.
9. Ilyas,A. M. ; Ahmad, S. ; Faheem, M. ; Naseer,M. I. ; Muhammad, T. A.K. ; Al-Qahtani , H. ; Mamdooh Gari, M. and Ahmed, F.**2015**. Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis.BMC Genomics, 16(Suppl 1):S5
10. Ogata, K. (2001). A Simple Centrifugation Method for Harvesting Myeloblasts. International J. of Hematology, 74: 272-6.
11. Verma, R. and Babu, A. (1989). Human chromosomes: Manual of Basic Techniques. Pregramon Press, New York.
12. Rooney, D.E. and Czepulkowski, B.H. (1992). Human Cytogentics. Vol.II: Malignancy and Acquired Abnormalities, A practical approach. IRI Press at Oxford University Press, Oxford, New York and Tokyo.
13. Skalnik, D.G. (2002). Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. Gene, 284: 1-12.
14. Sato, N.; Nakazato, T.; Kizaki, M.; Ikeda, Y. and Okamoto, S. (2004). Transformation of myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia: a case report and review of the literature. Int. J. Hematol., 79: 174-51.
15. Roumier, C.; Eclache, V.; Imbert, M.; Davi, F.; Talmant, P.; Lai, J.; Valensi, F.; Arnoulet, C.; Pedron, B.; Berger, R. and Preudhomme, C. (2003). M0 AML, Clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH). Blood, 101: 1277-83.
16. Gilliland, D.G.; Jordan, C.T. and Felix, C.A. (2004). The Molecular Basis of Leukemia.Hematology, pp.80-97. American Society of Hem.: Education Program Book.
17. Kamada, N.; Dohy, H.; Okada, K.; Oguma, N.; Kuramoto, A.; Tanaka, K. and Unchio, H. (1981). *In vivo* and *In vitro* Activity of Neutrophil Alkaline Phosphatase in Acute Myelocytic Leukemia with 8; 21 Translocation Blood, 58: 1213-17.

18. Maryanne, G.; Andersen, K.; Vilhjalmur, R.; Hans, S. and Jens, P. (2000). Cytogenetics of myelodysplasia and acute myeloid leukemia in aircrew and people treated with radiotherapy. Lancet, 356: 2158-61.
19. Kumar, L.; Menon, H.; Sharma, A.; Kumar, R. and Kochupillai, V. (2004). Acute myeloid leukemia (AML): A study of 516 patients. J. of Clinical Oncology, 22: 610-23.
20. Lambert, B.; Ringborg, M., and Sten, M. (1979). The effects of DTIC, Melphalan, actinomycin and CCNU on the frequency of sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of melanoma patients. In: Adjuvant therapy of cancer II. Grune and Stratton, New York, pp.56-61.
21. Antonio, G.; Pio, T.; Teresa, D.M.; Beatriz, R.; Miguel, R. and Jan, R.T. (2001). Airborne outbreak of nosocomial scedosporium prolificans infection. Lancet, 357: 1267-74.
22. Stone, R.M. (2002). The Difficult Problem of Acute Myeloid Leukemia in the Older Adult. Cancer J. Clin., 52: 363-71.
23. Damaj, G.; Ivanov, V.; Le, B.; D'incan, E.; Doglio, M. and Gastaut, J. (2004). Rapid improvement of disseminated aspergillosis with caspofungin/voriconazole combination in an adult leukemic pateint. Ann. Hematol., 83: 390-3.
24. Obara, Y.; Nagai, T.; Mori, M.; Ohmine, K.; Komatsu, N. and Ozawa, K. (2004). Pseudomonas sepsis with ecthyma gangrenosum in an acute myeloid leukemia patient. Rinsho-ketsueki, 24: 1138-40.
25. الشوك، علي ثابت عباس (2000)، دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية لتحفيز انقسام الخلايا اللمفاوية البشرية، رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات، جامعة بغداد.
26. الكرخي، انتصار حسين علي (2000)، العلاقة بين مستوى حامض السياليك في كل من بلازما الدم وعلى سطوح خلايا الدم البيض مع دورة الخلية للمصابين بإبيضاض الدم وآخرين خاضعين للعلاج الكيمياوي، رسالة ماجستير، كلية التربية (ابن الهيثم)، جامعة بغداد.
27. الموسوي، رافد عبد الواحد عبد الكريم (2002)، دراسة التغيرات الوراثية المناعية لمرضى إبيضاض الدم النخاعيني الحاد عند البالغين بعد العدوان الثلاثيني الغاشم، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.
28. Nara, N. and McCulloch, E.A. (1985). The Proliferation in Suspension of the Progenitors of the Blast Cells in Acute Myeloblastic Leukemia. Blood, 65: 1484-93.
29. Ruddon, R.W. (1981). Cancer Biology. Oxford University Press, New York.
30. Hromas, R.; Busse, T.; Carrol, A.; Mack, D.; Zhang, D.; Nakshatri, H. and Richkind, K. (2001). Fusion AML1 transcript in a radiation-associated leukemia results in a truncated inhibitary AML1 protein. Blood, 97: 2168-70.
31. Rang, H.P.; Dale, M.M. and Ritter, J.M. (1999). Pharmacology. 4th ed. Charchill. Livingstone Edinburgh. pp.663-84.
32. Harmon, D.C. (1987). The Leukemias. In: Hematology, 4th ed. The MIT Press Cambridge, Massachusetts London, England.
33. Giles, F.J.; Keating, A.; Goldstone, A.H.; Avivi, I.; Willman, C.L. and Kantarjian, H.M. (2002). Acute Myeloid Leukemia. Hematology, pp. 73-110. American Society of Hem.: Education Program Book.

34. Drexler, H. and Quertmeier, H. (2004). FLt_3: receptor and ligand. Growth-Factors, 22: 71-3.
35. Naoe, T. and Kiyo, H. (2004). Normal and Oncogenic FLt_3. Cell Mol. Life Sci., 61: 2932-8.
36. Bernardin, F.; Kummalue, T.; Leijen, S.; Ravid, K. and Friedman, A. (2004). AML1/RUNX1 increases during G_1 to S cell cycle progression independent of cytokine-dependent phosphorylation and induces cyclin D_3 gene expression. J. Bio. Chem., 279: 15678-87
37. Radosevic, N.; Delmer, A.; Tang, R.; Marie, J.P. and Cymbalista, A. (2001). Cell Cycle Regulatory Protein Expression in Fresh Acute Myeloid Leukemia Cells and after Drug Exposure. Leukemia, 15: 559-66.
38. Zocchi, M.R.; Pellegatta, F.; Pierri, I.; Gobbi, M. and Poggi, A. (2002). Leucocyte-associated Ig-Like Receptor-1 Prevents Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor-Dependent Proliferation and Akt1/PKB Alpha Activation in Primary Acute Myeloid Leukemia Cells. Eur.J. of Immunology, 31: 3667-75.
39. Tien, H.; Chou, C.; Wang, C.; Chang, C. and Hsing, C. (1996). Putative normal counterparts of leukaemic cells from CD7-positive acute myeloid leukaemia can be demonstrated in human haemopoietic tissues. British J. of Haemotology, 94: 501-6.
40. Dombret, H. (1996). Granulocytic colony-stimulating factors in the management of patients with acute myeloid leukemia. Hematology and Cell Therapy, 38: 231-40.
41. Notario, A.; Mazzucchelli, I.; Rolandi, M. and Gossati, F. (1995). The *in vitor* activity of two urinary polypeptides respect to G-and GM-CSF and IL-3 on the peripheral CFU of normal and leukemic subjects. Int. J. of Immunopathology and Pharmacology, 8: 173-84.
42. Bruserud, O. (1998). IL-4, IL-10 and IL-13 in acute myelogenous leukemia. Cytokines cellular and molecular therapy, 4: 187-98.
43. Canizo, C.; Galende, J.; Almeida, J.; Mota, A. and Miguel, S.J. (1999). *In vitro* growth in acute myeloblastic leukemia: clinico-biological correlations. Leuk. Lymphoma., 36: 1-7.
44. Bruserud, O.; Gjertsen, B.T.; Foss, B. and Huang, T. (2001). New Strategies in the Treatment of Acute Myelogenous Leukemia (AML): *In vitro* Culture of AML Cells-the Present Use in Experimental Studies and the Possible Importance for Future Therapeutic Approaches. Stem cells, 19: 1-11.
45. Montesinos, J.J.; Flores, P.; Flores, E.; Martinez, G. and Mayani, H. (2000). *In vitro* proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cell from normal subjects and patients with hematologic neoplasias. Abstracts Experimental Hematology, 28: 95.
46. Guan, Y.; Gerhard, B. and Hogge, D. (2003). Detection, Isolation, and Stimulation of Quiescent Primitive Leukemic Progenitor Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). Blood, 101: 3142-49.
47. Martine, J.; Flores, G.; Montesinos, J.; Bautista, J.; de-Jesus, M. and Mayani, H. (2004). *In vitro* proliferation and expansion of hematopoietic progenitors present in mobillized peripheral blood from normal subjects and cancer patients. Stem cells Dev., 13: 382-9.

48. Jahns, S.; Braess, J.; Schoch, C.; Haase, D.; Binder C.; Buechner, T. and Hiddemann, W. (2001). Cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia differ in proliferative activity and response to GM-CSF. Leukemia Basingstoke, 15: 377-84.
49. Sakakura, C.; Yamaguchi, Y.; Satake, M.; Bae, S.; Ogawa, E.; Murakami, A.; Kamada, N. and Ito, Y. (1994). Growth Inhibition and Induction of differentiation of t(8;21) acute myeloid leukemia cells by the DNA-binding domain of $PEBP_2$ and the AML1/MTG8 (ETO)-specific anti sense oligonucleotide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 11723-27.
50. Demur, C.; Muller, C.; Cassar, C.; Laroche, M. and Laurent, G. (1998). Acute myeloid leukemia cells with low p-glycoprotein expression and high Rhodamine 123 efflux capacity display high clonogenicity. Leukemia, 12: 192-9.
51. Garrido, S,M.; Cooper, J.; Kopecky, K. and Banker, D. (2001). Blasts from elderly acute myeloid leukemia patients are characterized by low levels of culture and drug induced apoptosis. Leukemia Research, 25: 23-32.
52. Poeta, G.D.; Venditti, A.; Principe, M.; Maurillo, L.; Cox, M.C.; Bruno, A.; Masi, M. and Amadori, S. (2003). Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). Blood, 101: 2125-31.
53. Brouwer, R.E.; Hoefnagel, J.; Burg, B.B.; Barge, R.M.; Willemze, R. and Falkenburg, F.H. (2001). Expression of co-stimulatory and adhesion molecules and chemokine or apoptosis receptors on acute myeloid leukaemia high CD40 and CD11a expression correlates with poor prognosis. British Journal of Haematology, 115: 298-308.
54. Jedema, I.; Barge, R.; Frankel, A. and Willemze, R. (2004). Acute myeloid leukemia cells in G_0 phase of the cell cycle that are unresponsive to conventional chemotherapy are sensitive to treatment with granulocyte-macrophage cology-stimulating factor/diphtheria toxin fusion proteins. Exp. Hematol., 32: 188-94.
55. Xiang, B.; Li, S.; Zhou, J.; Mao, Y.; Yang, Y. and Liu, T. (2005). The T cells activated by dendritic cells derived from AML cells: a study of their cytotoxic effect on autologous AML cells: Sichuan-Da-Xue-Xue-Bao-Yi-Xue-Ban, 35: 784-7.
56. Sachs, L. (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia. Nature, 274: 535-9.
57. Nguyen, S.; Eblanc, T.; Fenaux, P.; Witz; F.; Lioure, B.; Fiere, D.; Socie, G. and Dombret, H. (2002). A white blood cell index as the main prognostic factor in t (8; 21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. Blood, 99: 3517-23.
58. Ju, J.; Zhang, X.; Fetni, R. and Drouin, R. (2001). Trispmy 8 and Monosomy 7 detected in bone marrow using primed in situ labeling, fluorescence in situ hybridization, and conventional cytogenetic analyses. A study of 54 cases with hematological disorders. Cancer Genetics and cytogentics, 125: 30-40.
59. Wang, E.; Maslak, P.; Cathcart, K. and Jurcic, J. (2001). Acute myeloid leukemia with t(5;18) (q35; q21). Cancer Genetics and Cytogenetics, 127: 71-3.
60. Marta, S.; Frances, S.; Blanco, E. and Lourdes, F. (2002). Pentasomy 21 with isochromosomes 21 in a case of acute myeloid leukemia without maturation. Cancer Genetics and Cytogenetics, 132: 71-3.

61. Wong, K.F. (2004). Trisomy 14 in Acute Myeloid Leukemia with Ringed Sideroblasts. Cancer Genetics and Cytogenetics, 152: 175-7.
62. Dean, N. and Compell, L.J. (1997). Cytogenetics of Acute Myeloid Leukemia in the Elderly. Cytogenet. Cell Genet., 77: 5-23.
63. Berman, E.; Maloy, M.; Devlin, S.; Jhanwar, S.; Papadopoulos, E. and Jakubowski, E. (2016). Stem cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia,normal cytogenetics, and the FLT3-ITD mutationEllin. Leukemia Research 40: 33–37.
64. Neben, K.; Schnittger, S.; Brors, B.; Tews, B.; Muller, J. and Hahn, M. (2005). Distinct gene expression patterns associated with FLt_3 and NRAS-activating mutations in acute myeloid leukemia with normal karyotype. Oncogene, 24: 1580-8.
65. Stone, R.; Deangelo, D.; Klimek, V.; Estey, F.; Clark, J. and Griffin J. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLt_3 respond to a small-molecule FLt_3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. Blood, 105: 54-60.