التشوهات التي تصيب الصبغيات خلال ابيضاض الدم اللنفاوي المزمن من نموذج B

د . مصطفى منلا
استاذ مساعد في كلية الطب
جامعة تشرين

لا تزال الابحاث قليلة جداً حول دراسة صبغيات المرضى المصابين بابيضاض الدم اللنفاوي المزمن الذي يصيب غالباً الخلايا اللنفاوية *B* ، وذلك لصعوبة الحصول على هذا النموذج من الخلايا في حالة تكاثر . وأنوه هنا بأنه يوجد نموذجان من الخلايا اللنفاوية : خلايا لنفاوية ⁄ *T* ⁄ الأكثر عدداً (٨٥٪ عند الأشخاص الطبيعيين) والخلايا اللنفاوية ⁄ *B* ⁄ الأقل عدداً بكثير .

وفي الواقع معظم الباحثين الذين اشتغلوا حول هذا الموضوع وهم قلة كما قلت يقولون بأن صبغيات المرضى المصابين بهذا المرض هي طبيعية .

ولكن نظراً للتقدم التقني الكبير الذي طرأ على طرق دراسة الصبغيات فقد أعدنا دراسة الموضوع مع مجموعة من الباحثين الفرنسيين الذين يعملون في مركز نقل الدم ـ مخبر الوراثة الخلوية التطبيقية ـ مونبيليه ـ فرنسا باستخدام :

- طرق تقنية حديثة للزرع التي تسمح بنمو جيد للخلايا اللنفاوية السرطانية ⁄ *B* ⁄ باستخدام مختلف محرضات تكاثر الخلايا اللنفاوية .
- طريقة وسم الخلايا اللنفاوية للتحقق من طبيعة ابيضاض الدم (من نموذج ⁄ *T* ⁄ أو ⁄ *B* ⁄)
- مختلف الطرق التقنية الحديثة لتلوين الصبغيات (أشرطة ⁄ *R* ⁄ و *C*) .

يؤخذ الدم من المرضى المصابين بابيضاض الدم المزمن المراجعين لمركز نقل الدم وكذلك من المرضى في المشافي الأخرى في مدينة مونبيلية ويحدد نموذج ابيضاض الدم اللنفاوي المزمن ⁄ *T* ⁄ أو ⁄ *B* ⁄ بوسم الخلايا اللنفاوية استناداً إلى الصفات المناعية (الغلوبولينات المناعية السطحية *Igs*) .

عزل الخلايا اللنفاوية :

يستند مبدأ الطريقة على حذف الكريات الحمر والبيض ووحيدات النوى من الدم دون أن نفقد كثيراً من الكريات اللنفاوية .

الطريقة الأكثر استعمالاً تشتمل على مزج الدم مع مادة ترسب الكريات الحمر وتزيد هكذا سرعة تثقلها . لا تتأثر الكريات البيض إلا قليلاً ويمكن بعد التثفيل Centrifugation أن تفصل عن القسم العلوي للانبوب وقد عدلت الطريقة قليلاً (Boyum 1968, 1969, 1977) كما يلي :

لا يمزج العامل المرسب بالدم ولكن بمادة ذات كثافة عالية : متريزوات الصوديوم Metrizoate de Sodium ، يتوضع الدم بدقة على سطح هذا المزيج وتترسب الكريات الحمر بين صفحتي المحلول ومن ثم تترسب في عمق الأنبوب . وتبقى أغلبية الكريات البيض في طبقة البلازما . وقد استعمل في المخبر مادة لمفوبريب Lymphoprep وهي مزيجة من متريزوات الصوديوم مع الفيكول Ficoll ذات كثافة ١٫٠٧٧ + ٠٫٠٠١ غ /سم .

ـ الأدوات والآلات المستعملة :

- ـ وسط هام ف ١٠ milieu Ham 10
- ـ ليفوبريب Lymphoprep
- ـ أنابيب مخروطة الشكل ٥٠ /سم معقمة .
- ـ ماصات معقمة ١٠ / سم

الطريقة :

يوضع الدم الممدد بمحلول الهام ف ١٠ بنسبة النصف على سطح حجم متساو من الـ Lymphoprep وبعد التثفيل ٣٠ /د بمقدار ١٥٥٠ / دورة في الدقيقة في درجة ١٨ /مئوية تجتاز الكريات الحمر والكريات البيض مادة الـ Ficoll وتتشكل حلقة من وحيدات النوى فوق مادة الـ Ficoll . وهذه الحلقة تحتوي بصورة أساسية الكريات اللنفاوية ووحيدات النوى . تنقل هذه الحلقة إلى انابيب مخروطية الشكل وتغسل الخلايا مرتين بوسط هام ١٠ المعقم . بعد ذلك تجرى عملية التثفيل لمدة ١٥ /د بمقدار ١٥٥٠ /دورة في الدقيقة في الدرجة /١٨ / مئوية وبعد ذلك توضع الكريات اللنفاوية مرة ثانية بحالة معلق وذلك بإضافة ٢ ـــ ٤ سم³ من وسط هام ف ١٠ حسب حجم الراسب .

بما أن دم الأشخاص المصابين بابيضاض الدم اللنفاوي المزمن غني بالكريات اللنفاوية وفقير جداً بوحيدات النوى والكريات الحبيبية والكريات الحمر لذلك يمكن اعتبار الكريات الأخيرة وكأنها غير موجودة هذا المحلول اللنفاوي جاهز للعد الخلوي وتهيئة مختلف المحاليل المعلقة Suspensions المرادة .

عد الكريات اللنفاوية :

مبدأ الطريقة هو عد الكريات البيض في حجم محدد بواسطة المجهر باستعمال عداد توماس Thomas .

دراسة نماذج الكريات اللنفاوية :

ينتج ابيضاض الدم المزمن اللنفاوي في ٩٥٪ من الحالات من تكاثر الكريات اللنفاوية B وتراكم هذه الكريات في الدم واجتياحها نقي العظم (Schved, 1980) . يوجد في الدم كما قلنا نوعان من الخلايا اللنفاوية B و T ودراسة نسبة هاتين الخليتين ضرورية لتشخيص ابيضاض الدم اللنفاوي المزمن ورغم وجود اختلافات شكلية فيما بين النوعين فهي غير ممكنة الكشف إلا بالمجهر الالكتروني وبالتالي للتمييز بينهما يلجأ إلى طرق أخرى يمكن جمعها تحت ثلاث مجموعات :

— مولدات الضد السطحية Antigènes de Surface
— المستقبلات السطحية recepteurs de Surface
— الجواب على محرضات التكاثر Réponse aux mitogènes

دراسة مولدات الضد السطحية :
ذلك بالطرق التالية :

ا — حادثة تشكيل الوردة بكريات دم الخروف :

بعد وضع معلق الكريات اللنفاوية للانسان مع كريات حمر لجنس حيواني مغاير يمكن أن نلاحظ صوراً على شكل وردة أي أن خلية لنفاوية واحدة تحاط بمجموعة كريات حمر . وهذه الحادثة لا تحدث إلا مع الكريات اللنفاوية / T / ومن هنا تأتي فائدة هذه الطريقة .

كلما كانت نسبة هذه الخلايا اللنفاوية / T / منخفضة فنسبة تشكيل حادثة الوردة تكون منخفضة (عدم تصنع الغدة التيموسية Aplasie thymique ، وابيضاض الدم المزمن من نموذج / B /). بالعكس تزداد نسبة تشكيل هذه الحادثة في حالة غياب غاماغلوبولين الدم Agammaglobulinémies وفي حالة غدة تيموسية طبيعية . وتتثبط هذه الحادثة بمصل مضاد لـ Serum anti) / T (T- .

والطريقة كما يلي :

غسل الكريات الحمر للخـروف : والهدف هو تخليص الكريات من المصل أو البلازما . ويتم بواسطة محلول ملحي معادل التوتر وذلك بوضع حجم واحد من معلق الكريات مع ٥ — ١٠ حجوم من المحلول الملحي المعادل التوتر . ويثفل ٥ /د بمقدار ٣٠٠٠ / دورة في الدقيقة في الدرجة /٤ مئوية ويطرح السائل الطافي فوق الراسب ، وتكرر هذه العملية ثلاث مرات ومن ثم توضع الكريات الحمر بمحلول معلق بمزج حجم واحد من راسب الكريات مع ٥٠ حجم من محلول هام. ف ١٠ .

يوضع معلق الكريات اللنفاوية مع كريات حمر الخروف الممدد (حجم من كل منهما) ويوضعان معاً ٣٠/د في الدرجة ٣٧ مئوية ومن ثم يثفل (٥ /د ، ١١٠٠ /دورة في الدقيقة بالدرجة ٤ مئوية) وبعد ذلك يوضع ٢٤ /ساعة في الدرجة ٤ مئوية . تلون الخلايا بالاكريدين البرتقالي ويفحص بالمجهر .

ب — تشكيل حادثة الوردة بعد معالجة الكريات الحمر للخـروف بمـادة : 2 - aminoéthylisothiouronium bromide hydrobromide

دراسة الغلوبولينات المناعية السطحية :

نعلم بأن الخلايا اللنفاوية تنشأ من خلية ورمية واحدة . إذن فالخلايا الورمية متطابقة فيما بينها وبالتالي الغلوبولينات المناعية متجانسة استناداً إلى هذه الخاصة نميز الخلايا اللنفاوية الطبيعية عن الورمية لأن الخلايا اللنفاوية عند الأشخاص الطبيعيين هي غير متجانسة .

فالخلايا اللنفاوية من نوع / B / هي الوحيدة التي تظهر على سطحها كميات كبيرة من الغلوبولينات المناعية الغشائية . فالغلوبولينات المناعية تتألف من بناء أساسي يشتمل على سلسلتين ثقيلة وسلسلتين خفيفة . في جميع اصناف الغلوبولينات المناعية نجد نفس السلاسل الخفيفة فهي إما كابا / K / أو لمبدا /λ/ . نميز عند الانسان خمسة اصناف من الغلوبولينات المناعية :

— ٥ — ٢٠٪ من الخلايا اللنفاوية تحمل IgM و ١ — ٧٪ تحمل IgM و ٥ — ١٠٪ تحمل IgD وأقل من ٥٪ تحمل IgE و IgA ذات أهمية قليلة. هذه الأصناف تحمل سلاسل ثقيلة تدعى بالتتابع : alpha (α), delta (δ) gamma (γ), mu (μ), epsilon (E) .

والطريقة كما يلي :

يوضع ١٠ ميكروليتر من معلق الكريات اللنفاوية خلال ٣٠/د بالدرجة ٤ مئوية في ١٠٠/ ميكروليتر من

الكاشف المضاد للغلوبولينات المناعية ذات السلاسل الخاصة المتحد مع الفليوريسيين Fluorescéine وتغسل الخلايا ثلاث مرات بمحلول ملحي معادل التوتر ومن ثم تمدد فوق شرائح زجاجية بواسطة الغليسرين الممزوج بمحلول ملحي معادل التوتر ٩ /حجم/٣ حجوم / . وتظهر الايجابية بوجود حبيبات من الـ fluorescences فوق غشاء الكريات اللنفاوية .

طريقة صيغة الصبغيات Caryotype :

الهدف هو الحصول على سلالات مستمرة من الخلايا اللنفاوية B بتحريضها بمحرضات خاصة لكي نستطيع دراسة صبغياتها ومقارنة هذه الصبغيات مع صبغيات الخلايا اللنفاوية /T/ .

المواد المستعملة لزراعة الخلايا :

- وسط هام ف ١٠ الحاوي ٢٠٪ من مصل العجل الوليد حديثاً
- ٥٠٠٠ وحدة من البنسلين
- ١٢٥ ملغ من الستربتوميسين
- المحرض الخلوي :

Phytahémagglutinine thérmique menageé
virus Epstein - Barr (virus EB)

- زجاجات للزرع بلاستيك معقمة ١٠ سم
- مرشحات
- محاقن وأبر معقمة
- فرن CO_2 (٥٪) و ٣٧°

تحريض الخلايا :

ثلاثة أنواع من الزرع الخلوي :

- مزرعة من معلق الخلايا اللنفاوية تنشط فيها تكاثر الخلايا اللنفاوية B باستعمال الـ virus EB .
- مزرعة معلق الخلايا اللنفاوية تنشط فيها تكاثر الخلايا اللنفاوية T باستعمال الـ Phytohémagglutinine
- مزرعة بدون محرض للمقارنة .

تجميع الانقسام الخيطي في المرحلة الثانية (Métaphase)

وذلك باستعمال الكولشيسين Colchicine .

احداث صدمة نقص التوتر باستعمال محلول كلور البوتاسيوم بهدف تحرير ونشر الصبغيات .

التثبيت بالميتانول وحمض الخل .

وأخيراً بعد التثفيل وإضافة المثبتات عدة مرات تضع نقطة من المعلق الخلوي فوق شرائح زجاجية (٦ شرائح عادة) . شريحة واحدة من هذه الشرائح تلون بطريقة جيمزا لمعرفة مقدار الانقسام الخيطي وأخذ فكرة عن عدد الصبغيات وتلون الشرائح الباقية بطريقة التشويه الحراري المعتدل :

Dénaturation thémique ménagee

للحصول على اشرطة R (Bandes) وهذه الطريقة الأخيرة هي التي تعطي فكرة حقيقية عن التشوهات الصغيرة التي تصيب الصبغيات .

وتجرى كما يلي :

توضع الشرائح الحاوية على الصبغيات ضمن حوض تلوين من البورسلان وهذا الحوض الحاوي على السائل الخاص يوضع في حمام مائي بدرجة ٨٧ لمدة ٨٥ ـ ٩٥ /دقيقة تغسل الشرائح فيما بعد بالماء الجاري ومن ثم تلون لمدة ١٥ /د بمحلول يحتوي على ٩٢/سم³ من الماء المقطر و ٤ سم³ من المحلول الواقي (PH = 6,7) و ٤ سم

من محلول .Giemsa R ومن ثم تغسل وتنشف وهي جاهزة للتصوير .

تبدى الصبغيات تناوب اشرطة قاتمة ونيرة وتؤخذ من /١٢ ــ ١٥ / صورة لكل شخص وإذا وجدت تشوهات يجب دراسة انقسامات خلوية أخرى .

النتائج والمناقشة :

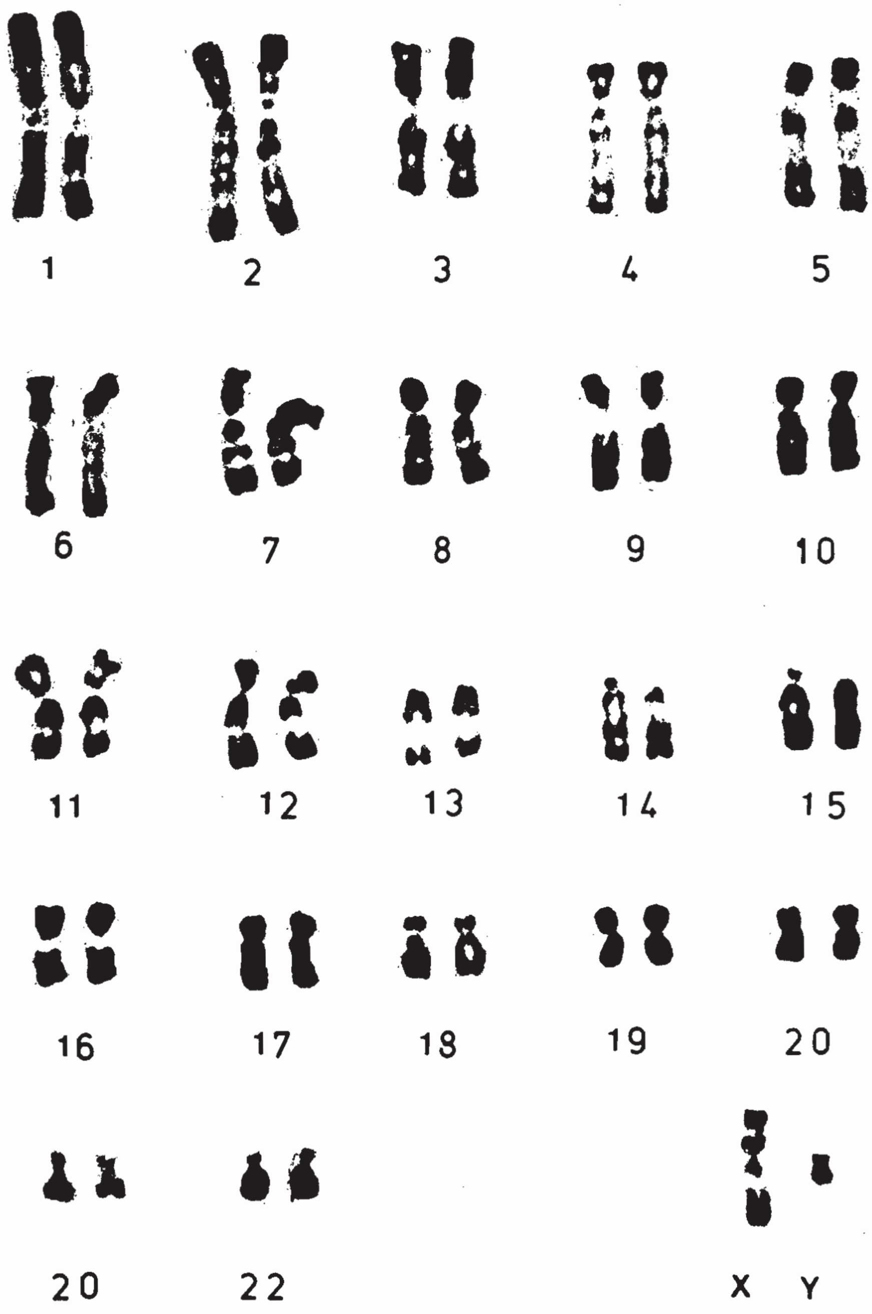
تدل النتائج الأولية بأن هناك اضطرابات تصيب بعض الصبغيات في ابيضاض الدم اللنفاوي المزمن من نوع / B / وأهم الصبغيات المصابة هي : ١٢، ١٧، ١٤ ، ٧ ، ١١ ، و ٦ .

وفيما يلي جدولاً يبين التشوهات التي تصيب الصبغيات خلال ابيضاض الدم المزمن من نوع / B / (LLC.B) وكذلك خلال أنواع أخرى من ابيضاضات الدم وفي أمراض سرطانية أخرى.

TABLEAU 12 - Comparaison des aberrations chromosomiques observées chez les patients atteints de LLC-B ainsi que dans d'autres leucémies et cancers d'après "catalogue of chromosome aberrations in cancer".

Anomalies	LLC-B	Autres cancers et leucémies		Total
Ch-1 : t(1;11)(q31;q22)	-	-		
Ch-2 : t(2;7)(p11;q22)	-	. ANLL	1	1
t(x;2)(q27;p11)	-	-		
Ch-3 : +3	3	. ALL	5	
		. ANLL	9	
		. LMC	6	
		. Leucémies lymphocytiques, type spécial	2	
		. Préleucémies	1	43
		. Carcinomes	8	
		. Lymphomes malignes	1	
		. Lymphomes non Hodgkin	6	
		. Lymphomes peu différenciées	5	
Ch-5 : t(5;13)(p13;q13)	-	. Carcinome	1	1
Ch-6 : del(6)(q13 q16)	-	-		
Ch-7 : t(2;7)(p11;q22)	-	-		-
t(7;11)	-	-		
Ch-8 : -8	2	. ALL	11	
		. ANLL	11	
		. LMC	8	35
		. Myélome multiple	2	
		. Leucémie prolymphocytique	3	
Ch-11 :t(11;14)(q13;q32)	6	. Myélome multiple	1	
		. Leucémie des cellules plasmatiques	1	9
		. Lymphomes	7	
t(7;11)	-	-		
t(1;11)(q31;q22)	-	-		
Ch-12 : +12	27	. ALL	9	
		. ANLL	11	
		. LMC	20	
		. Leucémie lymphoïde, type spécial	1	72
		. Carcinome	9	
		. Ménigiome	3	
		. Lymphomes	19	
Ch-13 :t(5;13)(p13;q13)	-	. Carcinome	1	1
Ch-14 :t(11;14)(q13;q32)	6	. Voir Ch-11	9	
del(14)(q23)	2	. ALL	1	13
		. ANLL	1	
		. Lymphome	2	
t(14;17)(q23;q25)	-	. -		
Ch-17 :i(17q)	3	. ALL	5	
		. ANLL	13	
		. LMC	143	172
		. Carcinome	7	
		. Lymphomes	4	
Ch-x : t(x;2)(q27;p11)	-	-		
Ch-y : yq+	-	-		

Note : ALL = leucémie aiguë lymphocytique
ANLL = leucémie aiguë non-lymphocytique
LMC = leucémie myéloïde chronique



صبغيات رجل طبيعي
باستعمال طريقة أشرطة R

بعض التشوهات التي تصيب الصبغيات خلال ابيضاض الدم اللنفاوي من نموذج B

A : t (1 ; 11) (q31 ; q 22), + 12, + 19 ; patient n °8

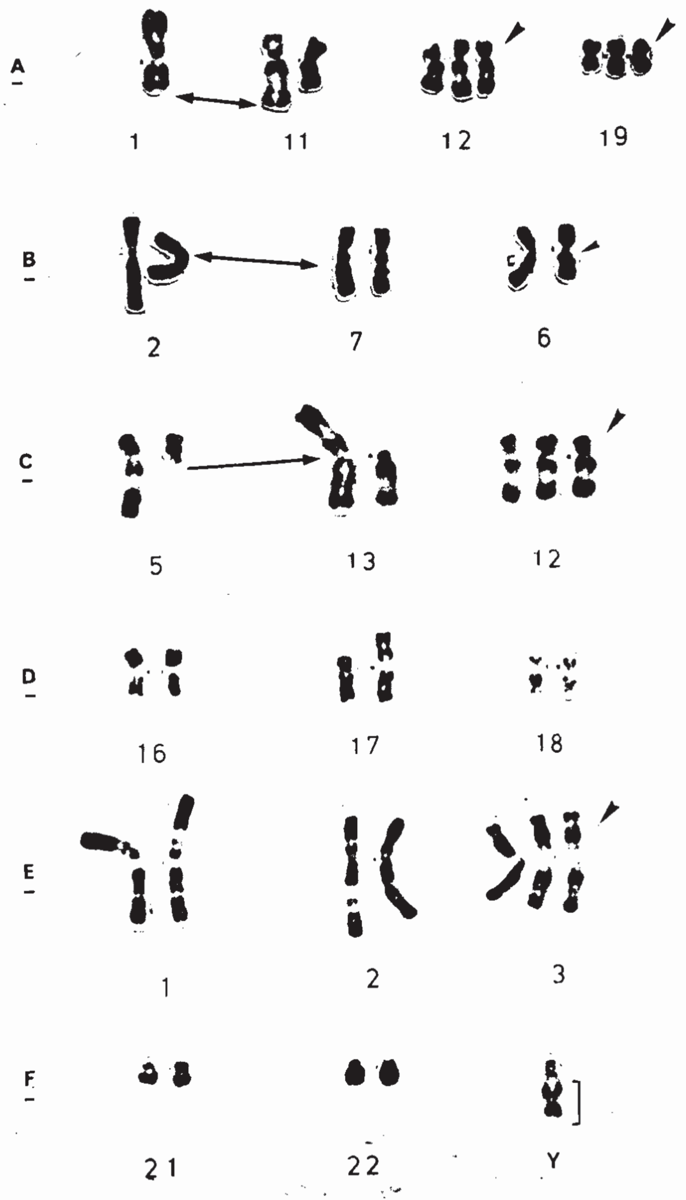
B : t (2 ; 7) (P 11 ; q 22) , del (6) (q13 q16) ; Patient n°1

C : t(5 ; 13) (P13 ; q13) , + 12 ; Patient n°17

D : i(17q) ; Patients n°9 et 10

E : + 3 ; Patient n°18

F : Yq+ ; Patient n°7



المراجع

1- Alimena G., Dallapiccola B., Gastaldi R., Moudelle F., Brandt L., Mitelman F.,. Nilsson P.G, 1982
Chromosomal, Morphological and chlinical correlations in blastic crisis of chronic myeloid leukemia, a study of 69 cases. Scand.J. Haematol., 28: 103 - 117

2- Autio K., Turunen O., Penttilä E., Erämaa E., Chapelle A., de la., Schröder J., 1979 - Human chronic lymphocytic leukemia : Karyotypes in different lymphocyte populations. Cancer Genet. Cytogenet., 1: 147 - 153

3- Bach J.F., 1979 - immunologie. Flammarion médecine - science, 2 ème édition, 807P.

4- Binet J.L., et coll. 1981 - A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate. survical analysis lancer, 48: 198 - 206

5- Boyüm A., 1969 - Isolation of mononucleareells and granulocytes from human blood. Scand. J., Clin. Lab. Invest., 21 Suppl. 97: 77 - 89

6- Boyüm A., 1977 - Separation of lymphocytes, lymphocytes sub-group and monocytes. A review lymphology, 10(2): 71 - 76

7- Broustet A., Meuge C., Legrand E., 1970 - Anomalies chromosomiques au cours de la leucémie lymphoïde chromique, des proessus lymphoréticulaires malins et de la maladie de Kahler. Nouv. Rev. Franc. Hemat., 10: 91 - 99

8- Dutrillaux B., Lejeune J., 1971 - Sur - une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain C.R. Acaa . Sci. (D) 272: 2638 - 2640

9- Dutrillaux B., 1973 Application to the normal Karyotype of R-band and G-Band techniques involving proteolytic digestion, in Caspersson T., Zech L., 1973

10- Dutrillaux B., 1973 - Sur la nature et origine des chromosomes humain L'expansion scientifique. 104P

11- Dutrillaux B., Couturier J., 1981 - La pratique de l'analyse chromosomique Masson, Paris, 87P.

12- Emberger J.M. Graafland H., Rossi D., Donadio M., Navarvo M., Izarn P., seigneurin J.M. 1981 - Etude du caryotype de lignée lymphoïdes au eours de huit leucémies lymphoïdes chromiques B. Nouv. Press. Med., 10: 2905 - 2906

13 — Falkoff R.M., Petevsm., Fanci A., 1982 Tcell enrichment and depletion of human peripheral blood mouonuclear cell preparation unexpected finolings in the stuoly of the Functiotional activities of the separated populations. j. Immunol. methods, 50 : 39-49

14 — Finan J., Daneler., Rowlands D., Nowell P., 1978-cytogenties of chroni Tcell leukemia Including two patients with a 14qt translocation virchows Arch-(cell. Path;) 29: 121-127

15 — Forman D., Rowley J., 1982- chromosome and cancer. Nature, 300 : 403-404

16 — Gahrton G., Zech L., Robert K.H., Bird A., 1979-cytogenetic evidenee for mitogenic stimulation of leukemia cells-cll-by Epstein-Barr virus New. Engl. J. Med., 301 : 438

17 — Gahrton G., Robert K.H., 1982 - chromosomal abberrations in chronic B - cell lymphocytic leukemia. Cancer Genet. cytogenet., 6 : 171-181

18 — Grouchy J. de Turleane., 1982, Atlas des maladies chromosomiques. 2eme edition, expansion scientifique Française, 489p.

19 — Hurley J. Fu s., Kunkel H., Chaganti R., German J., 1980 - Chromosome abnormalities in leukaemic B lymphocytes in chronic lymphocytie leukemia. Nature, 283 : 76-78

20 — Johnstone A.P., 1982 - Chronic lymphocytie leukaemia and its relationship to normal B lymphopoiesis. Immunology Today, 3(12) : 343-348.

21 — Katz R.L. cork A., coxl., Murphy S.G. Trujillo J.M., 1982 - A comparative studly of the effectiveness of diffeoent mitogens for karoo-typic analysis in chronic B-cel leukemia. leukemia Res., 6(2) : 183-195

22 — Larson R.A., yachnin s., 1983-cytochalasin B is a potent mitogen for chronic lymphocytic leukemia cell in vitro. J. clin. Invest., 72 : 1268-1276

23 — Levitt M.L., Barry W.E., Helfrich M.K., Kaisser-Mc Caw H.B., Henderson E.E., 1983-Caracterisation of Epstein-Barr virus carrying cell lines establ.ished from chronic lymphocytic leukemia. Camcer Res., 43: 1195-1203

24 — Madesen M. et coll 1980- Isolation of humanT and B lymphocytes by E-rosette gradient centrifugation, caracterization of the Isolated

Subpopu lation. S. Immunol. Methools, 33: 323-336

25 — Mitelman-lan F., 1983- Catalogue of ehromosome aberrations in camcer. camcer ger.et- cytogenet., 36 (1-2).

26 — Nowell p.c., Daniele R., Rowlands D., Finan J., 1980- cytogenetics of chronic B-cell and T-cell leukemia. Cancer genet- cytogenet., 1: 273.

27 — Nowell P.,shankey T.V., Finan J., Guerry D., Besa E.,1981- Proliferation, differentiation, and eytogenetics of chronic Leukemic B-Lymphoeytes culturedl with mitomycin-treated normal cell. Blood, 57(3) : 444-451

28 — Perri R.T., Kay N.E., 1982- Monoclonal llc B-cells may be induced to grow in an in vitro B-cell colony assay system. Blood, 59(2) : 247-249

29 — Rowley J.D., 1982- Identifieation of the constant ehromosome regions involved in human hematologic malignant disease- Science, 216 : 749-751

30 — Rowley J.D, 1983- Human oncogene locations and chromosome aberration. Naturo, 301(5898) : 290-291.

31 — Sadlamori T.N., Matsui s-l., Han T., Sandberg A.A., 1984- Comparative results with various polyclonal B-cell activators in aneuploid chronic lymphocytic lenkemia. Cancer Genet. Cytogenet., 11(1) : 25-30.

32 — Sadamori T.N., Ham T., Minowada J., Sandbery A.A., 1984- clinical significance of cytogenetic Findings-In-untreatred patients with B- cell chvonic lymphocytic leukemia. Cancer Genet. cytogenet., 11(1) : 45-52

33 — Schved J.F., 1980- Du pronostic des leucémies lymphoides chroniques. Thèse docteur en medecime

34 — Sonnier J.A., Buchanan G.R., Howardpeebles P.N., Rutledge J. Grahamsmith R., 1983-Chromosomal translocation involving the immunoglobulin kappa- chain and heavy-chain loci in a child with chronic lymploeytic leukemia.
New Engl. J. Med., 9 : 590-594

35 — Sumner A.T., 1982- The nature and mechanisms of chromosome banding.
Cancer Genet-cytogenet., 6 : 59-87.

36 — Vahdati M. Graafland H., Emberger J.M., 1983- caryotype analysis of B- lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus in 21 Patients with B-cell chronic lyhmphocytic leukemia. Hum. Genet. 63 : 327-331

37 — Yunis J.J., 1983- the chromosomal basis of human neoplasia.
Science, 221 : 227-236.