دراسة النسبة المئوية للتحول اللمفي باستخدام المشطرات ConA و PHA في دم مرضى الكلى الصناعية المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي

المدرس المساعد
عماد هادي حميد
المدرس المساعد
صالح عبد المهدي كاظم
جامعة بابل / كلية العلوم للبنات

دراسة النسبة المئوية للتحول اللمفي باستخدام المشطرات Con A وPHA في دم مرضى الكلى الصناعية المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي

المدرس المساعد
عماد هادي حميد
المدرس المساعد
صالح عبد المهدي كاظم
جامعة بابل / كلية العلوم للبنات

الخلاصة:

اشتملت هذه الدراسة على المتبرعين بالدم ومرضى الكلى الصناعية المصابين بالتهاب الكبد الفايروسي.

وكانت النسبة المئوية للتحول اللمفي لمرضى الكلية الصناعية المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة باستخدام تراكيز مختلفة من PHA (250, 150, 100) مايكروغرام / ميللتر. عند المصابين بالتهاب الكبد الفايروسي HBV بمعدل 27.28±4.5 , 33.45±2.8 , 45.75±2.8 على التوالي وبانخفاض معنوي ملحوظ t=7.88, p<0.05, t= 6.67, p<0.05, t=7.66, p<0.05 على التوالي بين المصابين ومجموعة السيطرة. عند مرضى التهاب الكبد الفيروسي Anti-HCV بمعدل 28.16 + 3.8 ,32.25+3 , 42.2+2.9 على التوالي وبانخفاض معنوي t= 8.40, p<0.05. t=8.46, p<0.05 , t= 7.33, p<0.05 على التوالي بين المصابين ومجموعة السيطرة.

كما تم حساب نسبة التحول اللمفي لمرضى الكلية الصناعية المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي ومجموعة السيطرة باستخدام تراكيز مختلفة من Concavalin A بتركيز 200 مايكروغرام / ملليتر. حيث كانت عند مرضى التهاب الكبد الفيروسي HBV بمعدل 22.8+2.7 وبانخفاض معنوي ملحوظ p<0.05 , t=1.95 بين المصابين ومجموعة السيطرة حيث كانت عند مرضى Anti-HCV بمعدل 18.6+2.4 وبانخفاض معنوي t=4.2, p<0.05 بين المصابين ومجموعة السيطرة .

المقدمة واستعراض المراجع:

يعد فيروسي التهاب الكبد نمطي B وC من الفيروسات الخطرة التي تهدد العالم لما يسببه من مشاكل صحية واجتماعية وسرعة في الانتشار (Rafael R., 1996; Shapero et.al., 1995). تمكن خطورة الإصابة بالفيروس نمط B والفيروس نمط C في عدم ظهور أعراضهما إلا بعد فترة حضانة طويلة يبدو خلالها المريض سليما معافى. فضلاً عن ذلك فان الإصابة بهما يمكن أن تحدث في عمليات

نقل الدم وعن طريق الاتصال الجنسي ومن الأم إلى الجنين حيث أن كليهما يسبب الإصابة عند دخولهما مجرى الدم (Shafritz D et.al., 1992).

يعد فيروس التهاب الكبد بأكثر عدوى من فيروس نقص المناعة المكتسبة الذي يسبب مرض الإيدز (Williams M., 1999).وانه ٩٥% من المرضى يشفون شفاء تاما وبدون مضاعفات جانبية اما البقية يستمر الالتهاب لديهم لفترة أطول من ستة أشهر ويصبح مزمنا وقد يتطور المرض إلى تليف الكبد (Cirrhosis) وسرطان الكبد، والموت (Satish,M. et.al 1986;). في الأطفال فان ٩٥% منهم يصبحون حاملين للمرض بصورة مزمنة وعلى المستوى العالمي يكون الأطفال هم أكثر عرضة للإصابة بهذا النوع من الالتهابات. ومن الممكن منع الإصابة بهذا الفيروس اللقاح المضاد له (Scott; et.al 1989;).

يصيب فيروس التهاب الكبد نمط C: ١٧٠ مليون إنسان على مستوى العالم تقريباً ويقدر عدد الذين يموتون سنويا بهذا الوباء ١٠.٠٠٠ إنسان كما أن ٨٥% من المرضى الذين تعرضوا لفيروس التهاب الكبد C حاملون للمرض بصورة مزمنة (Pawlotsky J.M., 1995).

يؤثر فيروسي التهاب الكبد B وC في خلايا الكبد المصاب ويؤدي ذلك إلى خلل في وظائف الكبد منها نقص في تكوين عناصر تخثر الدم وهذا بدوره يسبب فقر الدم وهبوط ضغط الدم وقلة ايصال الاوكسجين والمواد الغذائية إلى خلايا الجسم. أن اكثر المجاميع تعرضاً للاصابة هم مرضى الثلاسيميا وهو مرض وراثي شائع في منطقة شرق البحر المتوسط الشرق. وهو معروف بعمليات متكررة في نقل الدم وقد تجرى لهم عمليات استئصال الطحال (Lamballeris X et.al., 1996; Dienstage E, et.al 1980) .

كما أن مرضى الكلية الصناعية من مجاميع الاختطار هم أكثر عرضة للإصابة بفيروسين (Karhol,H. et.al 1995). وكذلك يصيب الفيروس مرضى السكري حيث أن الإصابة الفيروسية قد تحطم جزرا لانكر هانز بصورة غير مباشرة عن طريق تكوين أضداد ذاتية Autoantibodies (Mazaoleini et.al, 1994). أما مرضى السرطان المعالجون بالمواد الكيميائية فتكبح فيهم الاستجابة المناعية مما يؤهلهم للإصابة بكل من الفيروسي HCV وHBV .

فيروس التهاب الكبد نمط بـ HBV:

شكل الفيروس وتركيبه:

بينت دراسات المجهر الالكتروني Electron Microscope والتألق المناعي Immune Fluorescence ان فيروس HBV عبارة عن جسيم معقد حجمه

42 نـانوميتر محـاط بغـلاف مـزدوج وبداخلـه محفظـه اللـب Nucleocapsid والتـي تحيط بالحـامض النـووي DNA المزدوج السلسـة (Ockenga J et al., 1997). المستضـد الموجـود فـي لـب الفيـروس يشـار اليـه بالمستضـد اللبـي للفيـروس HBcAg وهذا المستضد يظهر فقط في نواة خلايـا الكبـد Hepatocytes خـلال الاصـابة الحـادة من HBV واضداد المستضد اللبي تتولد مبكراً في المرحلة الحـادة وبعد فتـرة قصـيرة مـن ظهـور الاعـراض (Rogers A. et al., 2003). أمـا المستضـد الموجـود علـى سطح الفيروس فيسمى بالمستضد السطحي للفيروس HBsAg .,, وهذا المستضـد ذو ثلاثة اشكال مظهرية هي:

- جسيم كـروي كبيـر قطـره 42 نـانوميتر ويعـرف بجسـيم دان وهـو يمثـل الفيـروس نفسه وتواجده يعكس الاصـابة بالفيروس.
- جسيم مستدير قطره 22 نانوميتر.
- جسـيم أنبـوبي Tubular قطـره 22 نـانوميتر وطولـه يتـراوح بـين 50-200 نانوميتر .

(Herk, et al 2000; kibbyT et al., 1999; woodruff B. et al, 2001

وقد تم تشخيص مستضد آخر يرتبط بالمكونات اللبية لفيروس HBV يشار له بـ HBeAg وان وجـود هـذا المستضـد فـي المرضـى الحـاملين للمستضـد السـطحي HBsAg يدل على ان الاصابة فعالة وحادة وبقاءه له علاقة وثيقة بالقدرة الامراضـية للفيـروس أمـا وجـود اضـداد هـذا المستضـد (Anti-HBe Ag) فهـذا يـدل علـى ان الاصابة اصبحت بسيطة ومرحلة التضاعف للفيروس بدأت بالانحدار Bradley D. . et al, 1988)

طور التضاعف والطور التكميلي لفيروس التهاب الكبد نمط بـ HBV :

يمـر فيـروس التهـاب الكبـد HBV بطـورين : الطـور الاول طـور التضـاعف امـاالطور الثـاني فيسمى بالطور التكميلـي وكـل طـور يتضـمن مـرحلتين. (William M., 1999; Gonsalves, 1993)

الطور الأول : طور التضاعف Replication Phase:

المرحلة الأولى First Stage:

تتميز هذه المرحلـة بالتحمل المنـاعي Immune tolerance عند البـالغين، وفترة الحضـانة تستغرق حوالي (2-4) أسابيع مقارنـة بإصـابة حديثي الولادة .وفي هذه المرحلة يستمر تضاعف الفيروس بشكل فعال.

المرحلة الثانية Second Stage:

تتميز هذه المرحلة بتطور وتحسن الاستجابة المناعية وهذا يؤدي إلى حث الخلايا لانتاج السايتوكينات Cytokinsوالتحلل المباشر للخلية وفي هذه المرحلة مستوى الدنا DNA لفيروس التهاب الكبد B يهبط في المصل كما أن عدد الخلايا المصابة ينخفض.

وفي المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي الحاد Acute HBV هذه المرحلة تستغرق حوالي (٣-٤) اسابيع. أما المصابون بالتهاب الكبد الفيروسي المزمن Chronic HBV. فانها تستغرق أكثر من ١٠ سنوات مؤديا بذلك إلى حالة تشمع الكبد cirrhosis .

الطور الثاني : الطور التكميلي Integrative phase :

ويتمثل بالمرحلتين الثالثة والرابعة:

المرحلة الثالثة Third Stage:

تبدأ هذه المرحلة بنهاية تضاعف الفيروس (Viral Replication) مع اختفاء المستضد HBeAg e وظهور أضدادها Anti-HBeAg. وفي هذه المرحلة يبقى المصابون حاملي المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد HBsAg، والسبب في ذلك يعود إلى تداخل Sgene في المادة الوراثية للخلية الكبدية.

المرحلة الرابعة Fourth Stage:

تختفي عندهم المستضدات السطحية لفيروس التهاب الكبد B (HBsAg) وفي هذه المرحلة تبدأ ظهور الاجسام المضادة للمستضد السطحي Anti-HBsAg وكذلك نلاحظ ظهور Anti-HBe واختفاء المادة الوراثية للفيروس. (Shishido, W et al., 1999).

الامراض المناعية لفيروس التهاب الكبدالفيروسي نمط ب HBV:

تؤكد الدراسات ان تلف خلايا الكبد خلال الحالات الحادة والمزمنة في التهاب الكبد الفيروسي HBV يحدث بسبب المناعة ونتيجة التغير في الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية عند الاصابة بالفيروس.

الاستجابة المناعية الخلوية دورا كبيرا في الامراضية، حيث ترتبط الخلايا اللمفية التائية السامة Cytotoxic Tcells بمعقد التوافق النسجي MHCI الحاوية على المستضد اللبي لفيروس التهاب الكبد HBcAg والموجود على سطح الخلية الكبدية hepatocytes والتي تكون هدفا مباشرا لتلك الخلايا عندها يبدأ موت الخلية المبرمج (programmed cell death) apoptosis بواسطة السايتوكينات cytokines والبرفورين perforin (William M., 1999; Chisar Fand Fiaccadori., 1997). أما مستضدات فيروس التهاب الكبد في البلازما فتؤخذ من

قبل البلاعم الكبيرة Macrophage عندها ترتبط ببتيدات فيروس HBV بالمقعد التوافق النسجي MHCII وتقدم للخلايا التائية المساعدة Helper T cells CD4 ونتيجة لذلك يزداد انتاج السايتوكينات وبالتالي يزداد عدد جزيئات المعقد التوافق النسجي MHCI على سطحوح الخلايا الكبدية ويقل تضاعف الفيروس. (Chisari F.V., 1997). أما دور الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response فانها تسبب جزء من التلف بسبب تفاعل اضداد المستضد اللبي مع المستضدات الموجودةعلى سطوح اغشية خلايا الكبد مما يؤدي إلى حدوث مناعة ذاتية (Autoimmunization) (Sallberg M.and Maruyama, 2000) .

المظاهر السريرية للاصابة Clinical Manifestations of HBV:

أ. فيروس التهاب الكبد نمط B الحاد Acute HBV :

التهاب الكبد الفيروسي الحاد عادة يكون مرضا سليم العاقبة ويتم الشفاء والتخلص منه في اكثر من ٩٠% من الحالات ويتطور في (0.1-1%) من الاصابات إلى الحالة المزمنة (Stroffolini T. et al, 1989; Bonanni P et al, 1990). في مرحلة الالتهاب الحاد من الاصابة يكون المصل موجبا للمستضد السطحي HBsAg والمستضد "e" HBeAg للفيروس ومستوى عاليا من الأجسام المضادة IgM للمستضد اللبي (Stroffolini T et al, 1993)

ومن الأعراض المتقدمة للإصابة بالتهاب الكبد الحاد هي : حمى، غثيان، تقيؤ، فقدان الشهية واليرقان حيث ظهرت في 75% من المرضى المصابين. ومعظم المصابين البالغين يشفون تماما من الفيروس نتيجة لفعالية خلايا الجهاز المناعي (Dardanoni L. et al, 1988).

ب.فيروس التهاب الكبد B المزمن Chronic HBV :

يتميز التهاب الكبد الفيروسي المزمن بوجود المستضد السطحي لفيروس التهاب HBsAg في المصل لاكثر من ستة اشهر حيث يحدث بنسبة (5-10%)في البالغين، 30% في الاطفال، 90% في المولودين حديثا (Brook M. et al., 1989) .

فيروس التهاب الكبد نمط C (HCV):

يعد من الفيروسات المغلفة بالشحوم Lipid envelope ويمتلك شريط RNA مفرد يحوي تقريباً 10,000 نيوكليوسايد بقطر 50-60 نانوميتر (Sakugawa et al., 2001).

وبائية فيروس التهاب الكبد Epidemiology of HCV

يعد فيروس التهاب الكبد نمط C من أهم المشاكل الصحية في العالم،حيث تم تشخيصه عام 1988 (Smith D. et al., 1997).وبيّنت الإحصائيات أن نسبة

انتشار الـ HCV في الولايات المتحدة الأمريكية. كانت 18% أي ان هنالك 3.9 مليون من السكان مصابون بالـ HCV و 2.7 مليون إصابة مزمنة (Goldstein and Willam, 2002).

أعلى نسبة انتشار للـ HCV كانت بين الأشخاص الذين يتعرضون لعمليات نقل الدم المستمرة و (10%) بين مرضى الكلى الصناعية، وأقل نسبة انتشار كانت بين العاملين بالصحة، ومن الأم المصابة إلى الجنين خلال فترة الحمل حيث بلغت 1% (Frangeul L et al. , 1992). %(50-80) من مستخدمي الأدوية بالحقن يكونوا معرضون للإصابة بالـ HCV (Ruiz J et al., 1992). خطورة الإصابة تزداد إذا تزامنت مع الإصابة بفيروس العوز المناعي (HIV) (Choo Q. et al, 1989).

المظاهر السريرية للإصابة Clinical Manifestation of HCV:

أ. فيروس التهاب الكبد نمط C الحاد Acute hepatitis:

التهاب الكبد الفيروسي الحاد نادراً ما يُميّز كظاهرة سريرية .ومن أهم الأعراض والعلامات السريرية لالتهاب الكبد الفيروسي نمط C الحاد تتضمن مستوى عالياٍ من انزيمات الاميفوترانسفيريز aminotransferase، ويرقانا وتعب وفتور وألم في الجهة اليمنى العليا من البطن (Brettler D.B., 1990).

يقدر مجال حدوث التهاب الكبد الفيروسي C الحاد في فرنسا بـ 5000-6000 حالة سنوياًوان 16.6% منها فقط ترافقها أعراض مرضية (Kasper CK, 1993). حالياً معظم حالات التهاب الكبد C الحاد تعود إلى الأدوية المستخدمة عن طريق الوريد أو التعرض للإصابة من المستشفى (Nosocomial expossure) (Liang T. et al., 1991)

فقد وجد أن معدل انتقال الإصابة بين مستخدمي الأدوية عبر الوريد intravenous Drug uses عالية جداً تصل 10% سنوياً (Nagamin T et al., 1996).وان %(50-90) من المصابين بالتهاب الكبد الفيروسي C الحاد تتطور إلى الحالة المزمنة عند غياب المعالجة (Abuaf N. et al, 1993).

ب. فيروس التهاب الكبد نمط C المزمن Chronic Hepatitis:

يعد التهاب الكبد الفيروسي نمط C المزمن أكثر أسباب حدوث التهابات الكبد المزمنة، تشمع الكبد (Cirrhosis)، سرطان الكبد في البلدان الصناعية (McHutchison J.G., 1998). وقد وجد أن %(30-70) من المصابين بسرطان الكبد والوفيات المرتبطة بمضاعفات التهاب الكبد هم مصابون بفيروس التهاب الكبد HCV. (Lashner B. et al., 1988; Hayllar K. et al., 1991).

استخدام الأدوية المأخوذة عن طريق الوريد هي الأكثر في نقل الإصابة وعلى الأكثر بين الأشخاص الذين تقل أعمارهم عن 40 سنة (Chretein , 1992). وقد أشار (Alberti, 1982)الى أن معدل الإصابة المزمنة بالفيروس HCV حسب العمر كانت 75% بين البالغين، 55% في الأطفال.

وبشكل عام كانت مضاعفات الإصابة المزمنة بالتهاب الكبد الفيروسي C تحدث بعد السن (10-20) سنة من بدء نشوء الإصابة (Martini E et al., 1988) وأن %(15-40) من المصابين بالتهاب الكبد C المزمن يتقدم بهم المرض إلى حالة تشمع الكبد Cirrhosis وقد يؤدي تقدم المرض إلى حدوث سرطان الكبد .

وعند تفاقم هذه الحالة فانها تؤدي إلى التشمع (Cirrhosis) إذا تركت بدون علاج ولو أن بعض الحالات تتراجع هذه تلقائيا ومن المعروف أن التهاب الكبد المزمن هو أكثر شيوعا عند الذكور والحالة تحدث بصورة رئيسة بين العشرين والخمسين عاما .

ومن أهم اعراض هذا الالتهاب: اوجاع المفاصل وطفح جلدي وقلة الصفيحات الدموية وكريات الدم البيض وبيلة بروتينية تعزى إلى آفات كبيبية وقد يعاني بعض المرضى من اعراض التهابية مزمنة والتهاب درقي مزمن وأمراض أخرى يحتمل ان تكون أسبابها امراض المناعة الذاتية (Auto immune disease) (Edward L.and Kramitt , 1998) .

المواد وطرق العمل

تحديد نماذج الدراسة:

تم جمع نماذج دم من الاصحاء ومرضى الكلى الصناعية وعلى الشكل التالي:

(27) نموذج دم من الكلى الصناعية تراوحت أعمارهم من (15-45) سنة تضمنت (17) نموذج دم ذكور و(10) نموذج دم إناث .

(24) نموذج دم من الاصحاء تراوحت أعمارهم من (1-40) سنة تضمنت (16) نموذج دم ذكور و(8) نموذج دم إناث .

جمع العينات:

تم تقويم نماذج الدراسة حسب الجنس والفئة العمرية فقد نظمت استمارات خاصة للمرضى تحتوي على الاسم والعنوان والجنس والمعلومات السريرية والمختبرية. استمارة لمرضى الكلى الصناعية، استمارة لمرضى الكلية الصناعية واستمارة لمرضى الأورام واستمارة لمرضى السكري. تم سحب (5مل دم) من المرضى بوساطة محقنة طبية معقمة ويوضع في أنبوبة اختبار معقمة ومحكمة الغلق وفصل المصل بنبذه بسرعة 500 دورة /دقيقة ونقل إلى أنبوبة اختبار معقمة وحفظ

بدرجة 20-م بعد تثبيت المعلومات حول كل عينة لحين تهيئة الفحص المختبري. تم اخضاع كل نموذج في الفحوص المستخدمة في الدراسة مرة واحدة واعيد اختبار العينات الموجبة .

المواد:

١. **العدد التشخيصية:**

Hepanostika HBsAg Microelisa System:
مزود من شركة Teknika Organon يحتوي على:

Coated strips	8-well strips
Enzyme Tracer	1 viaL, 0.7ml
Negative control	1 viaL, 1.3ml
Positive control	1 viaL, 1.2ml
Tracer diluent	1 viaL, 30ml
Washer buffer	1 viaL, 40ml
Chromogen	1 viaL, 9ml
Substrate	1 viaL, 9ml
Blocking reagent	1 viaL, 30ml

٢. **العدد التشخيصية:**

Anti-HCV Enzyme Immuno Assay Kit
مزود من شركة Teknika Organon يحتوي على:

Coated strips	24 8-well strips
Enzyme Tracer	1 viaL, 0.7ml
Negative control	1 viaL, 1.3ml
Positive control	1 viaL, 1.2ml
Tracer diluent	1 viaLs, 14ml
Washer buffer	2 viaLs, 30ml
Chromogen	2 viaLs, 40ml
Substrate	2 viaLs, 9ml
Blocking reagent	1 viaL, 30ml

طرائق العمل :

تشخيص المستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد (ب) HBsAg باستعمال طريقة المقايسة المناعية الانزيمية ELISA:

١. تم اضافة 100 مايكرومل من كل نموذج إلى جميع حفر الأشرطة Microelisa strips عدا السيطرة.
يضاف (100) مايكرومل من Positive control في حفرة.
يضاف (100) مايكرومل من negative control في حفرة
٢. تم تغطية الأشرطة بغطاء لاصق.
٣. ثم تحضن بدرجة 37م ولمدة ساعة.
٤. يزال الغطاء وتغسل أربع مرات بجهاز الغسل الأوتوماتيكي وباستعمال دارئ الغسل ويجفف جيداً.
٥. يضاف (100) مايكرومل من الـ Conjugate [أضداد نوعية معلمة بالإنزيم anti-HBS-HRP] في كل حفرة من النماذج والسيطرة.

تحضير الـ conjugate:

عدد الأشرطةNo. of strips	1	2	4	6	8	10	12
Conjugate diluent (ML)	1	2	4	6	8	10	12
Conjugate concentration (ML)	20	40	80	120	160	200	240

٦. تحضن بدرجة 37م ولمدة ساعة.
٧. يغسل أربع مرات بوساطة جهاز الغسل الأوتوماتيكي وتجفف جيداً.
٨. يضاف (100) مايكرومل من المادة الركيزة substrate في كل من السيطرة والنماذج.

تحضير المادة الركيزة substrate:

عدد الأشرطةNo. of strips	1	2	4	6	8	10	12
Substrate solution (ML)	1	2	4	6	8	10	12
Chromogen concentration	20	40	80	120	160	200	240

٩. تحضن بدرجة 37م ولمدة نصف ساعة.
١٠. يضاف (100) مايكرومل من حامض الكبريتيك (1M H2SO4) لكل حفرة.

تشخيص الأجسام المضادة لفيروس التهاب الكبد C (Anti-HCV) باستخدام طريقة المقايسة المناعية الإنزيمية ELISA:

١. تم اضافة 200 مايكرومل من Diluent de Muesters في كل حفرة + 10 مايكرومل من المصل.
٢. ثم أضفنا (200 مايكرومل) من Positive contrl، أضف (200 مايكرومل) من Negative control كل منها في حفرة.
٣. تغطى الأشرطة بالغطاء اللاصق.
٤. تحضن لمدة ساعة كاملة وبدرجة 37م.
٥. يزال الغطاء اللاصق وتغسل أربع مرات بجهاز الغسل الأوتوماتيكي وباستعمال دارئ الغسل ويجفف جيداً يضاف (100) مايكرومل من الـ Conjugate في كل حفرة من النماذج والسيطرة .
٦. تحضن بدرجة 37م ولمدة ساعة.
٧. يغسل أربع مرات بوساطة جهاز الغسل الأوتوماتيكي وتجفف جيداً.
٨. يضاف (100) مايكرومل من المادة الركيزة substrate في كل من النماذج والسيطرة.
٩. تحضن في الحاضنة 37م ولمدة نصف ساعة.
١٠. يضاف (100) مايكرومل من حامض الكبريتيك (1M H2SO4) لكل حفرة.

الفحص المختبري للتحول اللمفي Lymphocyte transformations في مصول مرضى التهاب الكبد الفيروسي:

تحضير المواد (Virag, 1988)

أولاً: تحضير محلول المضادات الحياتية Antibiotics solution

حضر هذا المحلول بإذابة مليون وحدة دولية من البنسلين البلوري 1000000 I.U. injecton crystalline penciline مع واحد غرام من سلفات الستربتومايسين Streptomycin sulphate في 100مللتر من الماء المقطر المعقم في قناني صغيرة سعة 10مل وحفظ في المجمدة بدرجة حرارة (-20)م لحين الاستعمال.

ثانياً: محلول واطئ التوتر Hypotonic solution:

حضر هذا المحلول بإذابة 2.85غرام من كلوريد البوتاسيوم KCL في 100مل ويكمل الحجم الى 500 مل من الماء المقطر المعقم.

ثالثاً: تحضير محلول حامض الكلوماتك L-glutamic acid:

حضر هذا المحلول بإذابة 25غرام من حامض الكلوماتك في 100مللتر من الماء المقطر ووزع في قنان بسعة 10مل وحفظ في المجمدة لدرجة حرارة (-20)م لحين لاستعمال.

رابعاً: تحضير محلول المثبتFixative solution:

حضر بمزج حجوم من الكحول المثيلي المطلق 99% مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي.

خامساً: تحضير الوسط الزرعي :

تم تحضير الوسط الزرعي بإذابة 1.04غرام من مسحوق الوسط الزرعي (RPMI-1640) مع 0.2غرام بيكاربونات الصوديوم النقية في 100مل من ماء ثنائي التقطير الخالي من الأيونات ثم أضيف 1مل من محلول المضادات الحياتية، 1مل من محلول الهيبس، 1مل من محلول الكلوتامك بعدها أضيف 10مللتر من مصل جنين الأبقار (FCS) وتم ترشيح الوسط خلال مرشح معقم ذي فتحة قياس 0.22 ماكروميتر وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4م لحين الاستعمال.

طريقة العمل:

وقد أجريت حسب طريقة (Virag, 1988) المحورة.

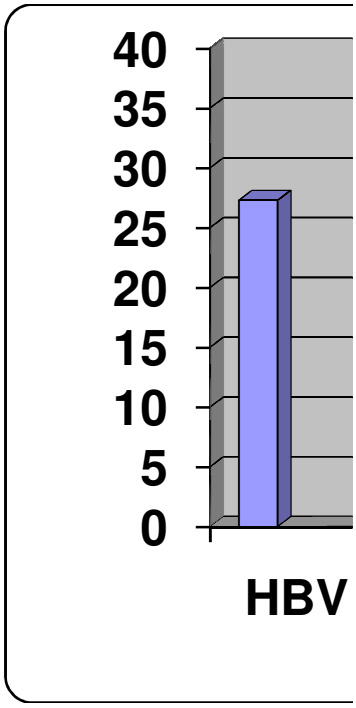
- ✓ سحبت عينات الدم الوريدي بمحقنة معقمة سعة 10مل ووضع 1مل في أنابيب زجاجية معقمة حاوية على مانع التخثر ليثيوم هيبارين Lithum heparin.
- ✓ وضع حجم 0.25 مل من الدم في أنابيب الزرع النسيجي Silicon tubes الحاوية على 2.5 مل من الوسط الزرعي مع 0.25 مل من المشطر (PAH) بتركيز 100 و150 و250 مايكروغرام/مل و (ConA) بتركيز 200 مايكروغرام/مل.
- ✓ رجت الأنابيب بهدوء ووضعت في الحاضنة بدرجة 37م لمدة 72 ساعة.
- ✓ أخرجت الأنابيب من الحاضنة ورسبت الخلايا باستعمال جهاز المنبذة المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5دقائق.
- ✓ أهمل الراشح تحت ظروف معقمة وأضيف للخلايا المترسبة 5 مللتر من المحلول الواطئ التوتر بالتدريج ورجت الأنابيب برفق ثم أعيدت للحاضنة بدرجة حرارة 37م ولمدة 50دقيقة.
- ✓ أجريت بعد ذلك عملية النبذ المركزي بسرعة 3000دورة/ دقيقة للأنابيب بعد إخراجها من الحاضنة وأهمل الراشح بظرف معقم بعدها أضيف المثبت بكمية 5 مللتر لكل أنبوب بالتدرج ثم وضعت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4م لمدة 15دقيقة.

لـى أن تكـون راسـب عـديم اللـون ثـم
الخلايـا المترسبة حضـر منـه عـالق
رات من عالق الخلايا ووضعت على
وتركت لتجف علـى صـحيفة حـارة

غسلت بالماء المقطر وتركت لتجف

الضوئي تحت قوة تكبير × 100 ثم
فاويـة Lumphoblast ومنهـا خلايـا
سبة المئوية للخلايا اللمفاوية المتحولة

100 ×



ى الكلى الصناعية المصابين بالتهاب
تخدام المشطر PHA بتركيز
/ ميللتر