دراسة مستوى الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة ومستوى التحول اللمفي عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (ALL)

المدرس المساعد
عماد هادي حميد
جامعة بابل / كلية العلوم للبنات

دراسة مستوى الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة ومستوى التحول اللمفي عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (ALL)

المدرس المساعد
عماد هادي حميد
جامعة بابل / كلية العلوم للبنات

Study in level of the Humoral immunoglobulins and lymphocytes transformation level in patients of chronic lymphocytes Leukemia

الخلاصة :

تناول البحث دراسة الاستجابة المناعية لاحد الامراض السرطانية الخبيثة وهو مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد وقد تضمن :

دراسة مستوى الاستجابه المناعية الخليطة المتخصصة حيث شملت نوعين من الكلوبيولينات المناعية وهما IgM, IgG في مراحل المرض الثلاثة مرحلة ماقبل العلاج ومرحلة ادامة العلاج ومرحلة قطع العلاج ومجموعة السيطرة فقد وجد ان هنالك انخفاض معنويا طفيفا في مستوى الكلوبيولينات في مرحلة ما قبل العلاج بينما كان الانخفاض معنويا وواضحا في مرحلتي العلاج وقطع العلاج مقارنة بمجموعة السيطرة.

كما تم دراسة مستوى التحويل اللمفي لمراحل المرض الثلاثة وباعتماد نوعين من المشطرات النباتية Phytohaemagglutinin بثلاثةتراكيز (250 , 150 , 100) مايكروغرام/مللتر، والمشطر Concanavaline A (ConA) بتركيز 200 مايكروغرام/مللتر.

وقد وجد ان هنالك انخفاضا معنويا ملحوظا $P<0.05$ في استجابة الخلايا اللمفية لهذه المشطرات مقارنة بمجموعة السيطرة .

المقدمة واستعراض المراجع: النظام اللمفي Lymphoid System :

النظام اللمفي ونظام تخليق خلايا الدم في نقي العظم بعلاقة وثيقة جدا.

معظم الخلايا اللمفاوية تكون موجودة في العقد اللمفاوية وفي أجزاء أخرى من النظام اللمفي كالجلد والطحال واللوزتين والعقد اللمفاوية الخاصة.

الخلايا اللمفاوية تدور من خلال قنوات Channels لمفاوية مرتبطة بالعقد اللمفاوية الموجود في الجسم تلتقي هذه القنوات مع بعضها مكونة القناة اللمفاوية الكبيرة .

Watson , R.R. & Leonard , T.K. 1986, ١٩٩٩ *et al*., **Burruti A.**

هنالك ثلاثة انواع من الخلايا اللمفاوية هي الحلايا اللمفاوية التائية اصل نشأتها من الثايموس Thymus يعبر عنها بـ T-lymphocyt . وظيفة الخلايا التائية تكمن في مساعدها للخلايا البائية في انتاج الاضداد Antibodies ضد البكتيريا او الفيروسات او غيرها من المايكروبات (Kee, J.L. 1998) .

والخلايا اللمفية البائية اصل نشأتها من نقي العظم Bone marrow ويعبر عنها بـ B- lymphocyt (Bacchus , R.et.al1980) .

الخلايا اللمفاوية البائية مسؤولة عن الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة حيث تنتج الاضداد Antibodies المهمة في معادلة الاجسام (الانتيجنات) الغريبة .

النوع الثالث من الخلايا اللمفية هي الخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer Cells والتي تهاجم الخلايا المصابة بالفيروس كوظيفة طبيعية دون مشاركة الاضداد او وسائل اخرى.

(Bauer , J.D 1974) .

مرض ابيضاض الدم اللمفاوي Lymphocytes Leukemia:

مرض سرطان الدم ونقي العظم Cancer Of Marrow And Blood ومرض ابيضاض الدم اللمفاوي يقسم على نوعين :-

الاول ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد Acute Lymphocytes (ALL) Leukemia

الثاني ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن Chronic Lymphocytes (CLL) Leukemia

(Danishefskey ,I. 1980)

مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد:

(ALL) Acute Lymphocytes Leukemia

مرض ينتج من ضرر وراثي في دن المادة الوراثية DNA في خلية مفردة في نقي العظم

(Kiremidian , S.L٢٠٠٠) .

ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد يحدث على الأغلب بعد الولادة وتزداد تأثيراته مع العمر .

هنالك عدة عوامل تزيد من خطورة الاصابة بهذا المرض منها التعرض لجرعات اشعاعية عالية (High doses irradiation) كالذي حصل بعد تفجير

القنبلة الذرية في اليابان مما سبب في ارتفاع معدلات الاصابة بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (Crabtee , T.D٢٠٠٠).

كما ان الدول او المدن ذات المجاميع البشرية الكبيرة يمكن ان تكون فيها معدلات الاصابة بهذا المرض مميزة .

مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد يتحدد بـ المظاهر المناعية inmunophenotype والتشوهات الوراثية chromosomes abnormalities ، فالمظاهر المناعية مثلا 90% من الحالات المشخصة بابيضاض الدم اللمفاوي تحمل العلامات السطحية surface markers هي نفسها تلك الموجودة على سطح الخلايا البائية الطبيعية . بينما 10% من تلك الحالات المشخصة بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد تحمل العلامات السطحية الموجودة أصلا على سطح الخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية .

اما التشوهات الوراثية *Chromosomes abnormalities* الكروموسومية فيمكن وصفها بالضرر الكروموسومي او تغير كروموسومي (Kumar ,V.٢٠٠٣).

المواد وطرق العمل:

العينات: تم الحصول عليها من مرضى مشخصين من قبل أطباء أخصائيين في ردهة الأورام في مستشفى مرجان التخصصي شملت (٤٢) عينة وقد قسمت العينات الى مجموعتين :

المجموعة الاولى: شملت العينات المرضية التي تم جمعها من غرف ردهة الأورام وقد تم تصنيفها الى ثلاثة مراحل حسب فترة المرض وطبيعة العلاج وهي:

المرحلة الاولى: عينات مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد قبل العلاج وقد شملت (٦) عينة.

المرحلة الثانية: عينات مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد مع العلاج الكيميائي وقد شملت (١٥) عينة.

المرحلة الثالثة: عينات مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد بعد قطع العلاج الكيميائي وقد شملت (٦) عينة.

المجموعة الثانية : وهي مجموعة عينات تم جمعها من أشخاص أصحاء وقد شملت (١٥) عينة.

الفحص المختبري للتحول اللمفي *Lymphocyte transformations* في عينات دم مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد :

تحضير المواد: (Virag, 1988)

أولاً: تحضير محلول المضادات الحياتية Antibiotics solution

حضر هذا وحدة دولية من البنسلين البلوري 1000000 I.U. injection 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 100 مل ويكمل الحجم الى 500مل 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 المثبت*Fixative 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 0.25مل من الدم في أنابيب الزرع النسيجي Silicon tubes الحاوية على 2.5مل من الوسط الزرعي مع 0.25مل من المشطر (PAH) بتركيز 100 و 150 و 250 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 3000دوررة/دقيقة لمدة 5دقائق.

- أهمل الراشح تحت ظروف معقمة وأضيف للخلايا المترسبة 5مللتر 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 5مللتر لكل أنبوب بالتدرج ثم وضعت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4م لمدة 15دقيقة.
- رسبت الخلايا بالمثبت نفسه 3-4 مرات إلى أن تكون راسب عديم اللون ثم أضيف اليه مقدار 0.5 مل من المثبت إلى الخلايا المترسبة حضر منه عالق وبواسطة ماصة باستور تم اسقاط (4-5)قطرات من عالق الخلايا ووضعت على شريحة زجاجية وذلك على ارتفاع 60سم وتركت لتجف على صحيفة حارة (Hot plate) بدرجة حرارة 50م.
- صبغت الخلايا بصبغة كمزا لمدة 15دقيقة وغسلت بالماء المقطر وتركت لتجف في درجة حرارة الغرفة.

- فحصت الشرائح الزجاجية باستخدام المجهر الضوئي تحت قوة تكبير × 100 ثم حسبت 100خلية لمفاوية منها اورمات لمفاوية Lumphoblast ومنها خلايا لمفاوية في طور السكون حيث تم حساب النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية المتحولة كما في المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المتحولة} = \frac{\text{عدد الاورمات اللمفاوية}}{\text{العدد الكلي (الاورمات اللمفاوية + الخلايا اللمفية)}} \times ١٠٠$$

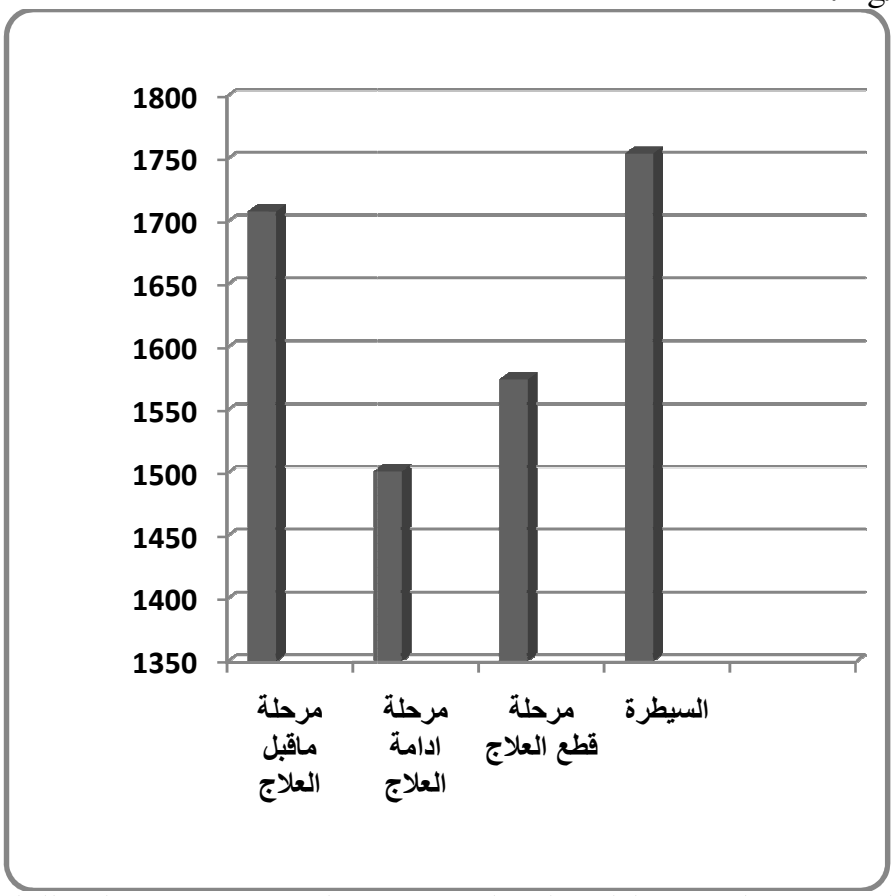
فحص الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد Single Radioactive Immunodiffution assay:

استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد لتقدير مستوى الكلوبيولينات المناعية IgA, IgM, IgG والمتمم C4,C3 وصفت باختبار منسيني Mancini test.

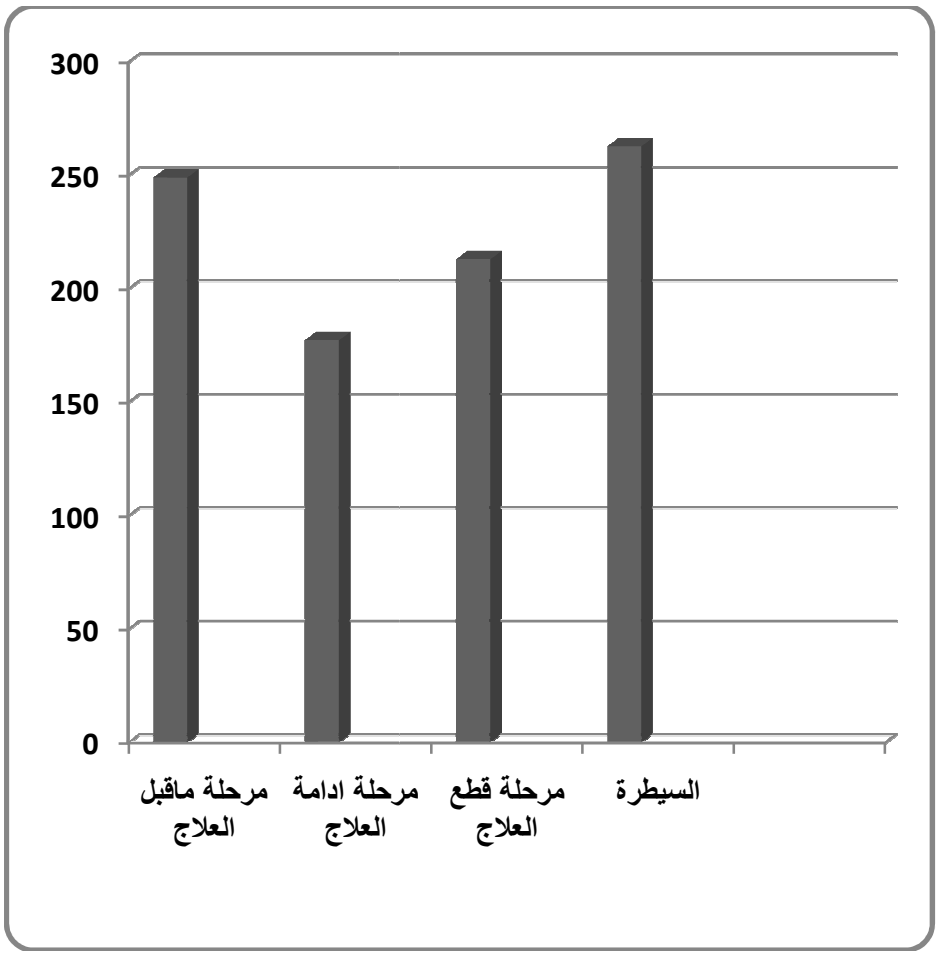
١. سحبت عينات الدم الوريدي بحقنة معقمة ثم وضع الدم في أنابيب معقمة غير حاوية على مانع تخثر.
٢. سحب المصل بوساطة ماصة باستور معقمة وحفظ في الثلاجة بعبوات معقمة بدرجة حرارة -20م.

٣. وضع 5مايكروليتر من عينات المصل في حفر الأطباق المرقمة من 1-12 والحاوية على الـ Agaros، 0.15% من Sodium Azide والمصل المضاد أحاديالتخصص Monospecific Anti-serum.
٤. أغلقت الأطباق جبيداً ووضعت في الثلاجة بدرجة 4م لمدة 72 ساعة في حالة IgM, IgA و 48 ساعة في حالة IgG.
٥. تم إخراج الأطباق من الثلاجة وبعدها تم قياس قطر حلقة الترسيب المتكونة حول كل حفرة بوساطة المسطرة الخاصة للقياس.

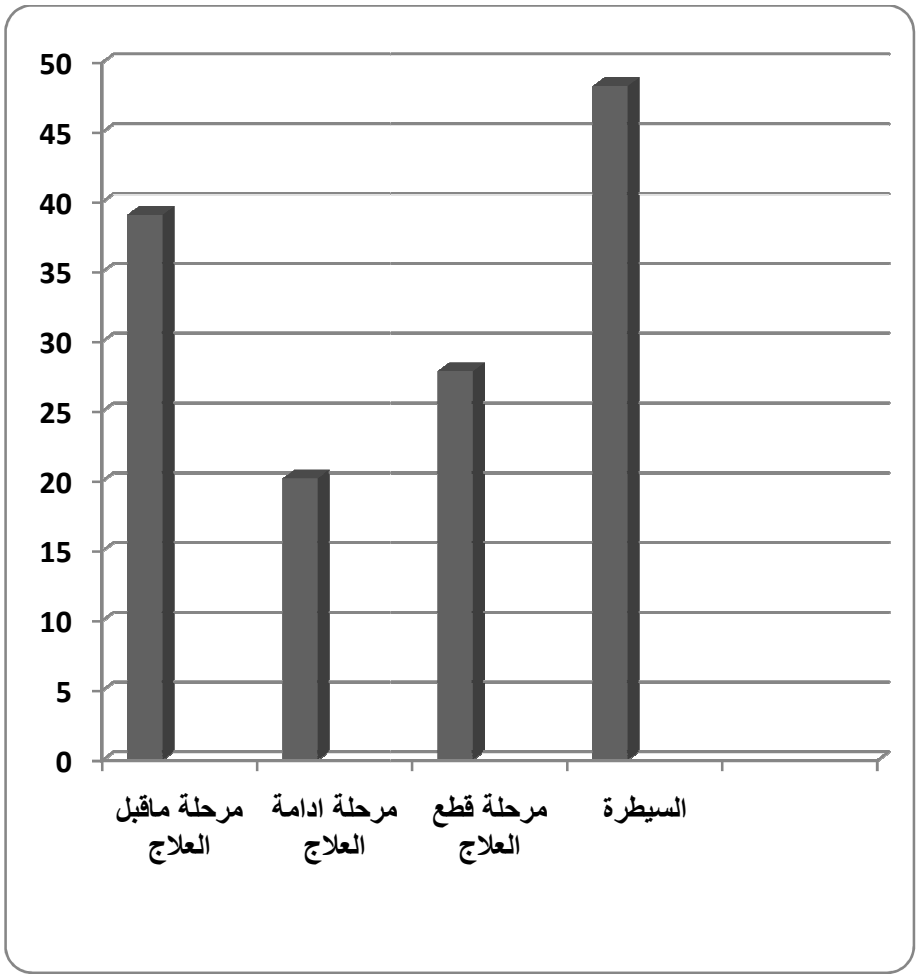
وقد تم استعمال الجدول المرفق مع عدة الفحص المجهزة من الشركة لإيجاد قيمة التركيز المقابلة لقطر حلقة الترسيب مباشرة وقد تم تسجيل النتائج بوحدة mg/dL.



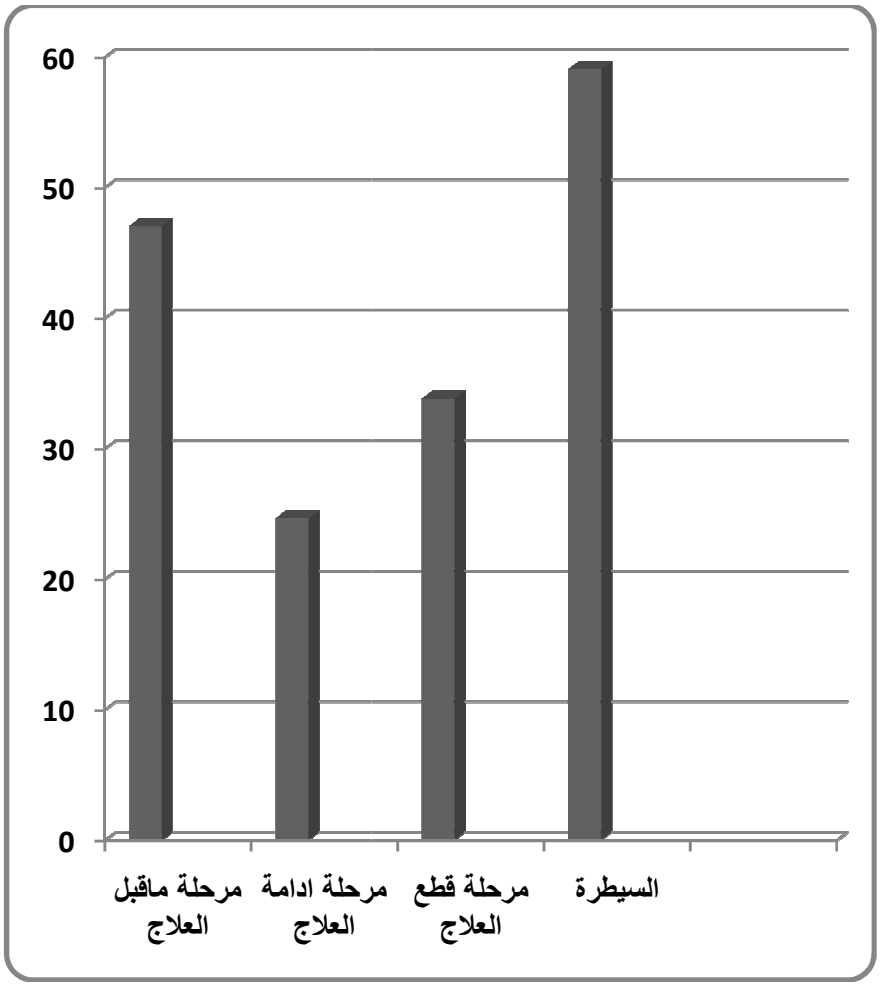
شكل (١) : معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgG لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ALL ومجموعة السيطرة.



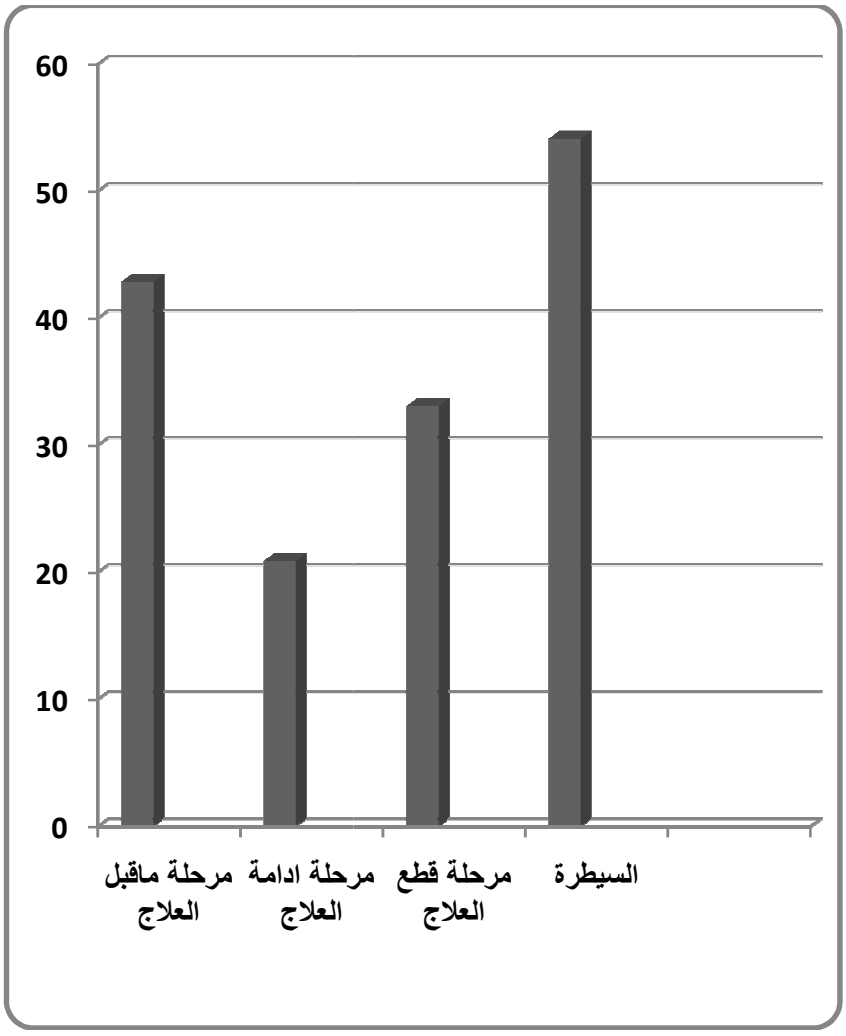
شكل (٢) : معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحادALL ومجموعة السيطرة.



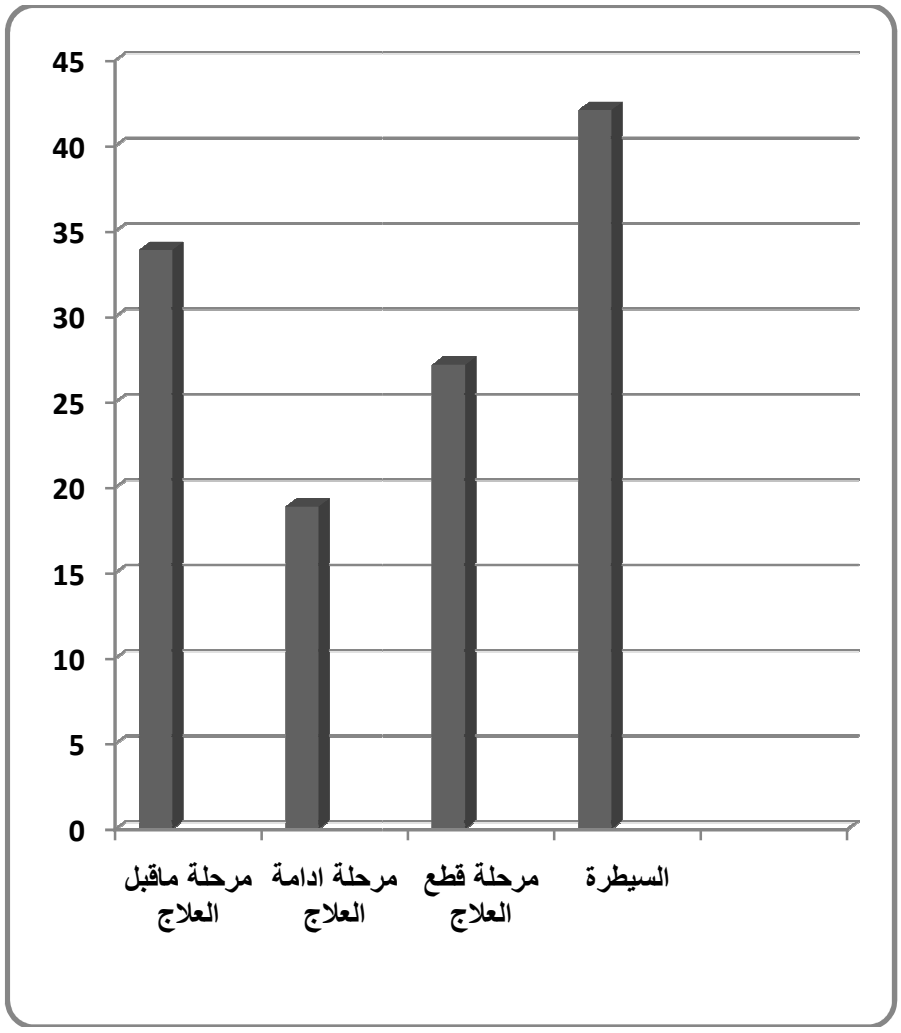
شكل (٣) : النسبة المئوية للتحول اللمفي Lymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحادALL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرPhytohaemagglutinin (PHA) بتركيز ١٠٠ مايكروغرام \ ميللتر .



شكل (٤) : النسبة المئوية للتحول اللمفي Lymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحادALL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطر Phytohaemagglutinin (PHA) بتركيز ١٥٠ مايكروغرام \ ميللتر .



شكل (٥) : النسبة المئوية للتحول اللمفي Lymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحادALL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرPhytohaemagglutinin (PHA)بتركيز ٢٥٠ مايكروغرام / ميللتر .



شكل (٦) : النسبة المئوية للتحول اللمفيLymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحادALL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرConcanavalinA (ConA)بتركيز ٢٠٠ مايكروغرام \ ميللتر .

مناقشة النتائج :

مستوى الكلوبيولينات المناعية في مصول مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد ثم التحري عن مستوى الاضداد في مصول المرضى المصابين بابيضاض الدم

اللمفاوي الحاد باستخدام طريقة الانتشار المناعي الاشعاعي المنفرد Radial immune Diffusion او ما يسمى باختبار ما نسيني Mancini Test حيث تم قياس مستوى الاضداد في ثلاثة مر احل وهي مرحلة ما قبل العلاج ومرحلة ادامة العلاج ومرحلة قطع العلاج فعند التحري عن مستوى الكلوبيولين المناعي IgG كان 1708.4±67.13 و 1501.33±39.24 و 1574.7±45.34 و 1754.48±118.74 على التولي في المراحل الثلاثة وقد اظهرت هذه النتائج انخفاض معنوي واضح $P<0.05$ في مستوياتها مقارنة مع مجموعة السيطرة شكل(١).

كما تم التحري عن المستوى الكلوبيولين المناعي IgM وللمراحل الثلاثة المذكورة مع مجموعة السيطرة فكانت: 22.6±262.85 و 9.53±213.1 و 6.07±177.9 و 17.65±249.1 وقد اظهرت هذه التنائج انخفاض معنوي واضح $P<0.05$ في مرحلة إدامة العلاج ومرحلة قطع العلاج مقارنة بمجموعة السيطرة بينما لم يلاحظ أي خرق معنوي $P<0.05$ في مرحلة ما قبل العلاج مقارنة بمجموعة السيطرة شكل (٢) .

هنالك العديد من الدراسات التي أشارت الى مستوى الكلوبيولينات المناعية في مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (Acute Lymphocyte Leukemia) وهنالك اختلاف في هذه الدراسات حول تركيز الكلوبيولينات المناعية فالبعض منها يشير الى المستوى الطبيعي في تركيز الكلوبيولينات المناعية والبعض الاخر يشير الى وجود انخفاض في مستوى الكلوبيولينات المناعية IgG و IgM عند تشخيص المرض وقد أظهرت نتائج دراستي هذه ان الانخفاض في تركيز الكلوبيولينات المناعية يبدأ بعد شهر من البدء بمرحلة تحفيز الشفاء باستخدام Prednisone و Vinerstine وهذا يشير الى تأثير العقارين السلبي على الاستجابة المناعية الخلطية .

وقد اشار بعض الباحثين الى ان النقصان في تركيز الكلوبيولينات المناعية يكون حالة ثانوية ناتجة عن الخلل الذي يحدثه مرض ابيضاض الدم أي انه يعكس الخلل الناجم من المرض وتأثيره على عملية تصنيع الكلوبيولينات المناعية بصورة طبيعية (Crabtee , T.D.2000).

كما اكدت بحوث اخرى ان العلاج الكيميائي والتشعيع الفحصي يؤثر على الخلايا البلازمية الفارزة للكلوبيولينات المناعية وعلى الخلايا اللمفاوية التائية حيث ان هذه الخلايا تنخفض بعد البدء باستخدام العلاج الكيميائي او الاشعاعي او كليهما (Dissanayake, C.D.,1999) (Frezet , M.M.,1999).

وفي هذه الدراسة تم اختبار التحول والانقسام اللمفاوي Lymphocytes Transformation في عينات دم مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد وللمراحل الثلاثة مع مجموعة السيطرة وباستخدام المشطر النباتي Phy to haemagg

lutinin (PHA) بتركيز PHA =١٠٠مايكروغرام/مللتر حيث سجلت نسبة التحول اللمفي ماقبل العلاج 2.1±39.1 ولمرحلة ادامة العلاج 0.3±20.2 ولمرحلة قطع العلاج 0.9±27.89 ولمجموعة السيطرة 2.6±48.32 وقد وجد انخفاض معنوي واضح $p<0.05$ في مرحلتي إدامة العلاج وقطعه مقارنة مع مجموعة السيطرة شكل(٣).

وعند استخدام المشطر النباتي Phytohaemagglutinin بتركيز PHA =150مايكروغرام/مللتر حيث سجلت نسبة التحول اللمفي لمرحلة ما قبل العلاج 2.6±42.87 ولمرحلة ادامة العلاج 0.39±20.9ولمرحلة قطع العلاج 1.5±33.07 ولمجموعة السيطرة 3.9±54.13 شكل (٤).

بيتما عند استخدام التركيز PHA =٢٥٠مايكروغرام/مللتر من المشطر النباتي PHA سجلت النسبة المئوية للتحول اللمفي للمراحل ومجموعة السيطرة 1.4±33.84 و 0.46±24.76 و 3.1±47.05 و 4.5±59.08 على التوالي شكل(٥).

كما تم في هذه الدراسة البحثية اختيار التحول والانقسام اللمفاوي في عينات دم مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (ALL) باستخدام المشطر Concanavalin A (ConA) بتركيز ConA =200مايكروغرام/مللتر وقد سجلت النسبة المئوية للتحول اللمفي للمراحل ومجموعة السيطرة 1.7±33.92 و 0.7±18.9 و 1.1±27.2 و 2.1±42.11 على التوالي شكل (٦).

ان الخلل في استجابة الخلايا اللمفاوية الى المشطرات في دم مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد يكون نتيجة او اشتراك العديد من العوامل منها العلاج الكيميائي حيث ان العقاقير المستخدمة للسيطرة على ابيضاض الدم لها تأثيرا سلبيا على مناعة الجسم

(Watson , R.R.and Leonard , T.K. ,1986).

Abstract

This study included measuring of specific humeral immune response in the patients of Acute lymphocytes Leukemia by Study in level of the immunoglobulins IgG before treatment stage , during treatment stage and the control group .it was found significant decrease in the immunoglobulins levels comparison with control groups . Study of the immunoglobulins IgM level found significant decrease before treatment stage , during treatment stage comparison with control groups. this study included measured level of cellular immune response and lymphocytes transformation before treatment stage , during treatment stage and the control group by using Phytohaemagglutinin in three concentrations PHA=(100,150,250) and Concanavalin A The analysis appeared significant decrease in the cellular immune response comparison with control groups.

References:

(1) **Bacchus , R. ; Kilshaw , B.H . ; Mad kour , M. ; AL- Bassam , M.S. and AL-Farhan , C.B. (1980) "Preliminary students on reference range for saudi Arabian males : (1) serum uric acid saudi" . Med. J. , 1 (3) :160-162.**

(2) **Bauer , J.D.; Achermann , P.G . and Toro, G. (1974) "Clinical laboratory methods" 8th .ed , The C.V. Mosby company , USA.**

(3) **Burruti , A. ; Dogliotti a , L. ; Gorzegno , G. ; Torta , M. , Tampellin , M. ; Tucci, M. ;Cerutti , S. ; Frezet , M.M. ; Stivanello , M. ; Sacchetto , G. and Angeli , A. (1999) . "Differential patterns of bone turnover in relation to bone pain and disease extent in bone in cancer patients with skeletal metastases" . Am. Ass .for Clin. Chem., Inc. 45 : 1240-1247**

(4) **Crabtee , T.D. ; Foley , E.F. and Sawyer , R.G .(2000) . "Board review series surgical specialties" Lippin cott williams &kiessling . USA .**

(5) **Danishefskey ,I.(1980) ."Biochemistry for medical sciences" 1st .ed. Little , Brown and company , Inc. , USA .**

(6) **Dissanayake, C.D. and Chandrajith , R. (1999) . "Medical geochemistry of tropical enviroments" . Ear . Sci . Rev. , 47 : 219- 258.**

(7) **General Information About Small Cell Lung Cancer . http://www.cancer.gov/cancertopic /pdq/treatment/small cell/ lung/ patient/ p 1.**

USA.National Institutes of Health.

(8) Kiremidian , S.L. ; Roy , M. ; Glickman , R. ; Schneider , K. ; Rothstein , S. ; Cooper , j. ; Hochster, H. ; Kim , M and Newman , R. (2000) . "Selenium and Immunocompetence in patients with head and neck cancer". Biol . Trace . Elem.Res, 73 (2):79-111 .

(9) Kumar ,V. ; Cortran , R.S and Robibins , S.L .(2003). "Basic Pathology",7th .ed, W.B. saunders Company , USA .

(10) Treatment Option Overview .

(11) http://www.cancer.gov/cancertopic/pdq/treatment/smallcell/lung/ patient/ p 4. USA.National Institutes of Health.

(12) Watson , R.R.and Leonard , T.K. (1986) . " Selenium , vitamin A , E and C : Nutrients with cancer prevention properties" .J. Am. Diet . Assoc. 86 (4) : 505 – 510.