



A Study on Some Cancer Antigens In Breast Cancer

A Thesis Submitted By

Kassiem Abood Faleh Al-Maleky

**To the Council of the College of Science
University of Babylon**

**In Partial Fulfillment of the Requirements for
The Degree of Master of Science in
Biology / Microbiology / Immunology**

Supervised by

Prof. Ibrahim M.S. Shnawa, Ph.D.

October - 2007

Shawal -1428



دراسة عن بعض المستضدات السرطانية في
سرطان الثدي

رسالة مقدمة من
قاسم عبود فالح المالكي
إلى مجلس كلية العلوم - جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم
في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية/ المناعة

بإشراف
أ.د إبراهيم محمد سعيد شناوه

شوال-1428

تشرين الأول-2007

الإهداء

إلى روح زوجتي الغالية.....

ويتم اطفالي.....

اهدي جهدي المتواضع.....

قاسم

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله والحمد حقّه كما يستحقّه، حمداً كثيراً، والصلاة والسلام على خير خلقه وسيد أنبيائه وأشرف رسله أبي القاسم محمد، وعلى آله الطيبين الطاهرين.

يسرني ويشرفني وأنا في نهاية هذا المشوار الطويل من البحث أن أنتهز هذه الفرصة لأعبر عن شكري وامتناني للأب والأسناذ الفاضل الدكتور ابراهيم محمد سعيد شناوه المحترم لاقتراحه موضوع البحث ودعمه العلمي المتواصل. وأدعو الله سبحانه وتعالى أن يحفظه من بين يديه ومن خلفه من كل سوء وأن يوفقه لكل خير في الدنيا والآخرة انه سميع مجيب.

كما أتقدم بالشكر والعرفان إلى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لإعطائهم الفرصة لي لإكمال دراسة الماجستير.

ولا يسعني إلا أن أتقدم بالشكر الخاص إلى الدكتورة هدى ظاهر المرسومي في مركز البحوث الطبية جامعة النهرين لمساعدتها لي في توفير بعض متطلبات الدراسة العملية.

ولا يفوتني أن اشكر الأخوة والأخوات زملائي في قسم علوم الحياة وأخص منهم الأخ فاخر مكطوف وشاكر حماد ومهند جواد كاظم.

Summary

Some tumor antigens (markers) occupied clinical important as diagnostic and prognostic probes for malignant tumors, on this basis, this study was planned and conducted in Biology Department Laboratory Babylon University and Medical Research Laboratory in Al-Nahrin Medical College.

In which 35 blood samples were collected from breast cancer women and 15 blood samples collected from apparently normal subject women.

The total leukocyte count, the absolute lymphocyte count as well as determination of CD4 and CD8 ratio were carried out.

The total leukocyte counts were within the lower limit of normal range in breast cancer women and of normal levels in normal subject women.

Carcinoembryonic antigen was studied by gamma counter system, while the CA 15-3 was studied by ELISA for both breast cancer women and normal subject women, the level of both of those markers was of clinical significance positive in breast cancer women subject and normal among normal women subject. Thus on conclusion, one may recommend the use of these markers for diagnostic of breast cancer in women.

الخلاصة

تكتسب بعض المستضدات الورمية اهمية تشخيصية لوصفها مؤشراً عن حالة الورم وبناءً عليه أجريت هذه الدراسة في مختبرات كلية العلوم-جامعة بابل ومختبرات مركز البحوث الطبية –جامعة النهريين، اذ اشتملت الدراسة على فحص 50 عينة دم منها 35 عينةً من نساء مريضات بورم الثدي و15 عينةً من نساء طبيعيات.

تم حساب عدد خلايا الدم البيض الكلي وعدد الخلايا اللمفاوية الكلي ثم جرى التحقق من عدد الخلايا التائية المساعدة CD₄ والخلايا التائية السمية CD₈. اظهرت النتائج أن عدد خلايا الدم البيض المحسوبة بالنسبة للمريضات كانت ضمن الحد الادنى من المعدل الطبيعي.

تم دراسة مستويات المستضد السرطاني المضغي CEA بطريقة عداد كاما Gamma counter ومستضد ورم الثدي CA 15-3 باستخدام طريقة ELISA ولكلٍّ من مريضات ورم الثدي والنساء الطبيعيات فتبين أن مستوى كلا المستضدين أعلاه يؤشر حالة مرضية في مريضات ورم الثدي مقارنةً بالنساء الطبيعيات وبناءً على هذه النتائج يمكن التوصية باستخدام هذين المستضدين في تشخيص ورم الثدي في النساء.

بسم الله الرحمن الرحيم

توصية الأستاذ المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة عن بعض المستضدات السرطانية في سرطان الثدي) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية / المناعة.

التوقيع:

المشرف: د. إبراهيم محمد سعيد
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: 2008/ /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى توصية الأستاذ المشرف أعلاه، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراساتها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. كريم حميد رشيد
المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: 2008/ /

بسم الله الرحمن الرحيم

قرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (دراسة عن بعض المستضدات السرطانية في سرطان الثدي) المقدمة من قبل (قاسم عبود فالح) وقد ناقشناه في محتوياتها، وفيما له علاقة بها، ووجدنا أنها جديرة لنيل درجة ماجستير بتقدير (امتياز) في علوم الحياة – الأحياء المجهرية / المناعة.

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. جعفر كاظم النعمه

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الطب/ جامعة الكوفة

التاريخ: / / 2008

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. نصير جواد المختار

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الطب/ جامعة بابل

التاريخ: / / 2008

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. علاء جواد حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل

التاريخ: / / 2008

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

المشرف: د. إبراهيم محمد سعيد شناوه

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل

التاريخ: / / 2008

مصادقة عمادة كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه.

التوقيع:

الاسم: د. عباس نوري الشريفي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: عميد كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ: / / 2008

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَقُلْ أَعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولَهُ وَالْمُؤْمِنُونَ ﴾ (105)

صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ

سُورَةُ التَّوْبَةِ

الآيَةُ (105)

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
أ	الخلاصة باللغة العربية	
ب	قائمة المحتويات	
ز	قائمة الجداول	
ح	قائمة الصور	
د	قائمة المصطلحات	
1	الفصل الأول: المقدمة	1
3	الفصل الثاني: استعراض المراجع	2
3	ما هو الورم	1-2
4	التسمية Nomenclature	2-2
5	مسببات السرطان	3-2
6	ورم الثدي Breast Cancer	4-2
6	المرض	1-4-2
7	التغيرات المرضية	2-4-2
8	الجنس Gender	1-2-4-2
8	العمر Age	2-2-4-2
8	خطورة العوامل الوراثية Genetic risk factors	3-2-4-2
9	تاريخ العائلة Family history	4-2-4-2
9	التعرض المبكر للإشعاع Earlier Breast Radiation	5-2-4-2
9	العلاج بالهرمونات Hormone replacement therapy	6-2-4-2
10	الفايروس والتغيرات الوراثي	5-2
11	وصف التغيرات الحيوية المرافقة للورم	6-2
11	سلوك الخلية المتحولة	1-6-2
13	الغشاء البلازمي والسلوك الاجتماعي	2-6-2
13	النسيج الورمي	3-6-2
15	التغيير النووي	4-6-2
16	وصف التغيرات الوراثية في الورم	7-2
16	وراثة الورم	1-7-2
17	التغيير الجيني	2-7-2
23	وصف التغيرات المناعية المرافقة للورم	8-2
23	تمهيد	1-8-2
23	التغيرات المناعية المرافقة للنمو السرطاني	2-8-2
24	دور عناصر المناعة العفوية في رصد التغيرات المناعية	3-8-2
24	البلاعم الكبيرة غير المحفزة	1-3-8-2
25	الخلايا الطبيعية القاتلة (NK cell) Natural Killer cell	2-3-8-2
26	المراقبة المناعية Immune Surveillance	3-3-8-2
27	دور عناصر المناعة التكيفية في رصد التغيرات المناعية	4-8-2
27	الخلايا اللمفية السمية	1-4-8-2
30	الخلايا البلعمية المنشطة activated macrophages	2-4-8-2
31	الأضداد Antibodies	3-4-8-2

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
31	واسمات الأورام وأهميتها الطبية	9-2
33	المستضد السرطانيّ المضغّيّ (CEA) Carcinoembryonic antigen	1-9-2
35	مستضد ورم الثدي Cancer antigen 15-3(CA15-3)	2-9-2
37	الفصل الثالث/ المواد وطرائق العمل	3
37	المحاليل المستخدمة	1-3
37	الأوساط الغذائية	2-3
38	الملونات	3-3
38	الأمصال القياسية	4-3
38	الخلايا التائية المساعدة CD ₄	1-4-3
38	الخلايا التائية السمية CD ₈	2-4-3
39	مستضد السرطانيّ المضغّيّ CEA	3-4-3
39	مستضد ورم الثدي CA15-3	4-4-3
39	الأجهزة والأدوات النيّذة	5-3
40	المريضات Patients	6-3
41	منوال الدراسة	7-3
41	جمع العينات وحفظها Specimen Collection and storage	8-3
42	طريقة تعداد الخلايا البيض الكليّ Total White blood cell count	9-3
43	طريقة تعداد الخلايا اللمفية	10-3
44	طرائق تعداد ودراسة CD ₄ و CD ₈	11-3
44	طريقة عزل الخلايا اللمفية	1-11-3
45	طريقة عد الخلايا اللمفية المساعدة	2-11-3
46	طريقة عد الخلايا اللمفية السمية	3-11-3
47	دراسة المستضد السرطانيّ المضغّيّ Human Carcinoembryonic Antigen determination (hCEA (I ¹²⁵) IRMA kit	12-3
48	الأساس العملي للطريقة Principle of method	1-12-3
48	طريقة العمل Assay procedure	2-12-3
49	دراسة مستضد ورم الثدي Breast Cancer Antigen 15-3 Enzyme Immuno Assay	13-3
49	جمع النماذج وتحضيرها Specimen collection and preparation	1-13-3
50	الأساس العملي للاختبار Principle of the test	2-13-3
50	طريقة العمل	3-13-3
53	السيطرة النوعية للمستضد السرطانيّ المضغّيّ ومستضد ورم الثدي	14-3
54	التحليل الإحصائيّ	15-3
55	الفصل الرابع/ النتائج	4

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
55	دراسة التعداد الكلي للخلايا البيض والخلايا اللمفية	1-4
55	التعداد الكلي في المريضات	1-1-4
56	التعداد الكلي في النساء السويات	2-1-4
57	دراسة المؤشرات السطحية للخلايا اللمفية التائية (صور)	2-4
58	المؤشرات السطحية في النساء المريضات (جدول)	1-2-4
59	المؤشرات السطحية في النساء السويات	2-2-4
60	نسب المؤشرات السطحية CD_8 / CD_4 في الخلايا اللمفية التائية	3-4
60	النساء المريضات	1-3-4
61	النساء السويات	2-3-4
61	المعالم الإحصائية	4-4
61	المعالم الإحصائية للفروق بين المريضات والسويات في تعداد الخلايا والمؤشرات السطحية	1-4-4
63	دراسة واسمات الورم	5-4
63	دراسة المستضد السرطاني المضغي ومستضد ورم الثدي في مريضات ورم الثدي	1-5-4
64	دراسة المستضد السرطاني المضغي ومستضد ورم الثدي في السويات	2-5-4
65	السيطرة النوعية Quality Control	6-4
67	الفصل الخامس / المناقشة	5
67	خلايا الدم البيض	1-5
68	تعداد الخلايا اللمفية	2-5
69	قلة اللمفاويات Lymphopenia	1-2-5
70	الخلايا التائية المساعدة CD_4 والخلايا التائية السمية CD_8	2-2-5
73	مستضد السرطاني المضغي Carcinoembryonic antigen	3-5
74	مستضد ورم الثدي Cancer antigen 15-3	4-5
76	السيطرة النوعية	5-5
78	الاستنتاجات	
79	التوصيات	
80	المصادر	
A	الخلاصة باللغة الإنكليزية	

قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
55	تعداد الخلايا البيض الكلي والخلايا اللمفية الكلي في مريضات ورم الثدي	1
56	تعداد الخلايا البيض الكلي والخلايا اللمفية الكلي في السويات (مجموعة السيطرة).	2
58	المؤشرات السطحية CD_8 و CD_4 في مريضات ورم الثدي	3

الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
59	المؤشرات السطحية CD ₄ و CD ₈ في السويات	4
60	نسبة المؤشر السطحي CD ₄ إلى نسبة المؤشر السطحي CD ₈ في مريضات ورم الثدي للأفراد ومجتمعاً بالمعدل	5
61	نسبة المؤشر السطحي CD ₄ إلى نسبة المؤشر السطحي CD ₈ في السويات للأفراد ومجتمعاً بالمعدل	6
62	المعالم الإحصائية للفروق بين المريضات والسويات في تعداد الخلايا والمؤشرات السطحية	7
63	المستضد السرطاني المضغيّ ومستضد ورم الثدي في مريضات ورم الثدي	8
64	المستضد السرطاني المضغيّ ومستضد ورم الثدي في السويات	9
65	السيطرة النوعية لمستضد السرطاني المضغيّ CE Antigen	10
66	السيطرة النوعية لمستضد ورم الثدي CA15-3 Antigen	11

قائمة الصور

الصفحة	عنوان الصورة	رقم الصورة
57	المؤشر السطحي CD ₈ تحت المجهر الفلورسيني، قوة التكبير 400X	1
57	المؤشر السطحي CD ₄ تحت المجهر الفلورسيني، قوة التكبير 400X	2

قائمة المصطلحات

المصطلح باللغة الانكليزية	المصطلح باللغة العربية
Antibody dependent mediate cytotoxicity	القتل المعتمد على توسط الضد
Apoptosis	موت الخلايا الفسلجيّ المبرمج
Axillary's lymph nodes	العقد اللمفية الابطية
Benign tumor	ورم حميد
Breast cancer gene 1 (BRC1)	مورثة سرطان الثدي الأول
Breast cancer gene 2 (BRC2)	مورثة سرطان الثدي الثاني
Cancer	سرطان
Cancer antigen 15-3 (CA15-3)	مستضد سرطان الثدي
Carcino embryonic antigen (CEA)	المستضد السرطاني المضغي
Carcinogenic agent	مادة مسرطنة
Carcinoma	السرطان الغدي
Chronic Myelocytic Leukemia (CML)	ابيضاض الدم النخاعي المزمن
Cluster of differentiate (CD)	المؤشرات السطحية
Cytokines	وسائط
DNA fragmentation	تجزء الدنا

Dormant	كامنة
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	فحص الأليزا
Family tendency	الميل الأسري
المصطلح باللغة الانكليزية	المصطلح باللغة العربية
Fluorescence microscope	المجهر الوامض
Gender	الجنس
Genetic susceptibility	نزوع وراثي
Genotype	الطراز الجيني
Giant cells	الخلايا العملاقة
Grad (G1-G2-G3)	مرحلة (الأولى-الثانية-الثالثة)
Hepatitis type B virus	التهاب الكبد الفايروسي نوع ب
Hepatitis type C virus	التهاب الكبد الفايروسي نوع ج
Hereditary nonpolyposis colon (HNPC)	سرطان القولون الوراثي
Human papilloma virus (HPV)	فايروس الورم الحليمي البشري
Hyperchromatic	اصطباج مفرط
Immortalization	الخلود
Immune surveillance	المراقبة (الترصد) المناعية
Infiltration	متغلغل
Latency period	فترة كمون
Lymphomas	الورم اللمفي
Major histocompatibility complex (MHC)	معقد التوافق النسيجي
Malignant tumor	ورم خبيث
Melanomas	ورم سحاميني (متعلق بالميلانين)
Metastasize	انبثاث-انتشار - نقائلي
Metastatic potential	قابلية الانبثاث
المصطلح باللغة الانكليزية	المصطلح باللغة العربية
Monoclonal antibody	الضد وحيد النسيلة
Multiplenuclei	متعدد الأنوية
Neoplasm	نمو جديد

Neonate	حديث الولادة
Neoplastic state	الحالة السرطانية
Neoplastic transformation	التحول إلى النمو السرطاني
Neovascularization	عملية تكوين الأوعية الدموية
Oncofetal antigen	مستضد الورم الجنيني
Oncogene	المورثة الورمية
Oncoprotein	البروتين الورمي
Osteosarcoma	سرطان العظام
Immobilization Phase	الطور المتحرك
Phenotype	الطراز المظهري
Platet derived growth factors (PDGF)	عوامل النمو المشتقة من الأقراص الدموية
Post menopausal	انقطاع الطمث (سن اليأس)
Proto oncogene	المورثة الورمية الأولية
Recurrence	المعاودة (الرجوع)
Retinoblastoma	سرطان العيون
Reverse transcribed	الارتداد العكسي
Sarcoma	سرcoma (ورم لحمي)
Systemic therapy	علاج جهازى
المصطلح باللغة الانكليزية	المصطلح باللغة العربية
Thrombus	خثره
Topoinhibition	مرحلة توقف نمو النسيج المزروع
Transformation cell	خلايا متحولة
Transforming growth factors (TGF)	عوامل تحول النمو
Tumor	ورم
Tumor angiogenesis factor (TAF)	عوامل تكوين الأوعية الدموية في الورم
Tumor associated antigen (TAA)	مستضد المرافق للورم
Tumor markers	واسمات الأورام
Tumor necrosis factors (TNF)	عوامل نخر الأورام
Tumor node metastasis (TNM)	مدى انتشار الورم للعقد

Tumor specific antigen (TSA)	مستضد الورم النوعي
Tumorigenicity	القابلية الورمية

1- المقدمة

تعد الاورام السرطانية Cancers أحد أهم أربعة أمراض تهدد حياة الانسان بالوفاة () (Playfair & Chain, 2001) ويرى متخصصو حياتية الاورام أن الورم ظاهرة مرضية متعددة الأسباب فمنها ما هو مستحصل من البيئة (المحيط) Environmental ومنها ما هو وراثي genetics (Klassen *et al.*, 1986) ويفسر الوراثةيون genetists حصول الاورام بحدوث حدثين طفريين Two-mutation hits يؤديان الى حل الفعل المثبط لجين تثبيط الجين المسرطن، في جينوم الانسان مما يؤدي الى حصول تغييرات حيوية اذ تبدو الخلية المتحولة وكأنها جنينية، تفتقد لخصائصها المناعية وتتغير وظائفها الفسلجية الاخرى اضافة الى التغييرات الوراثة التي تنعكس بالتغيير على الشكل والحجم والسلوك الاجتماعي والمناعي (Parslow *et al.*, 2001).

ويعد سرطان الثدي من الاورام الشائعة في الاناث من البشر الذي يعتقد ان فيه ميلاً اسرياً family tendency، اذ تزداد مخاطر الاصابة بالمرض عند النساء اللواتي يكون احد افراد العائلة (الام) مصاباً بسرطان الثدي (Mesko *et al.*, 1990) ، ونزوعاً وراثياً Genetic susceptibility فقد وجد أن هنالك جينات تشفر لظهور سرطان الثدي مثل جين BRCA1 وجين BRCA2 اذا تعرضت الى تغييرات جينية او طفرة وراثية () (Nokad & Ghedirian, 2005) لذلك تم التركيز على بعض التغييرات في الخلايا البيض ومؤشرات الخلايا اللمفية التائية وبعض الواسمات المستضدية السرطانية المتعلقة بالخلايا اللمفية التائية في مرضى سرطان الثدي مقارنة بالسويّيات من اناث البشر.

الهدف من الدراسة :

1. دراسة التغييرات في التعداد الكلي للخلايا البيض
2. دراسة تغيرات تعداد الخلايا اللمفية الكلي
3. دراسة تناسب الخلايا اللمفية المساعدة CD₄ إلى الخلايا السمية CD₈ في المريضات مقارنة بالسويّيات
4. دراسة المستضدات CEA و CA 15-3 بوصفها واسمات ورمية
5. التحقق الاحصائي للواسم المناعي الأمثل في التحري عن سرطان الثدي

2- استعراض المراجع Literatures review

1-2- ما هو الورم

تعرف الأورام بأنها نمو غير طبيعيّ وعشوائيّ لمجموعة من الخلايا مكونة كتلة lump غير منتظمة ناتجة عن قدرة تلك الخلايا العالية على الانقسام بوتيرة خارجة عن السيطرة free of homestatic control بسبب أو أكثر قد يكون داخلياً أو من البيئة (Rao,) (2000).

تؤثر تلك الأسباب في المادة الوراثية DNA للخلية منتجة خلية مختلفة ذات خواصّ جديدة عن خلايا الأنسجة الطبيعية، تقسم الأورام إلى نوعين: الأورام الحميدة Benign tumors والأورام الخبيثة (السرطانية) malignant tumors، وهذا التفريق ناتج من التباين بالموصفات والتأثير، فالأورام الحميدة هي التي تنمو بالتوسع expansion إذ يضغط الورم أو يحتل حيزاً محيطاً بالأنسجة ويكون نموّ الخلايا بطيئاً وتكون الخلايا متشابهة والانوية فيها طبيعية ويكون تأثيره موضعياً locally ولا يغزو موقعاً آخر، ومشابهاً للأنسجة الطبيعية ويمكن أن يكون نسيجاً متميزاً بشكل جيد well differentiated tissue ولا ينتقل إلى مكان آخر إذ يكون محاطاً بمحفظة، قد يسمى السرطان neoplasm والتي تعني النمو الجديد new growth وتستعمل متناوبة مع الورم tumor لتشير إلى خباثة النمو، أما الورم السرطانيّ أو الخبيث فيكون النمو فيه متغيراً بشكل كبير، وتكون الخلايا ذات اشكال ووظائف مختلفة عن الخلايا السوية والحميدة ويكون هذا الورم غير محاطاً بمحفظة (Liotto & Clair, 2000).

تظهر الأورام الشائعة في الأنسجة الظهارية الحاوية على خلايا قادرة على الانقسام تعوض باستمرار تلك التي تخرج عن الخدمة كما يحصل في القناة الهضمية والجلد وباقي مسالك الجسم وتسمى تلك الأنواع من الأورام بـ Carcinoma، وتظهر الأورام أيضاً في الأنسجة العضلية وتسمى هناك بـ Sarcoma، ولا تستثني الأورام مكاناً بعينه فتصيب الغدد والعظام والغضاريف والأنسجة الأخرى، وتأتي أهمية الأورام السرطانية من تأثيرها المدمر في الأنسجة الاعتيادية بغزوها متغلغلاً infiltration منعكساً ذلك على تعطيل وظيفة النسيج كاملاً وتدمير العضو المصاب، أما تأثير الأورام الحميدة فيكون مغايراً إذ يمكن أن يضغط على الأعصاب والأوعية الدموية التي قد توصل بعض المواد الحيوية مثل الهرمونات التي قد تدفع إلى تغيير وظيفة العضو المستهدف، يختص الورم السرطانيّ بالانتقال metastasize من خلال القنوات اللمفية والأوعية الدموية إلى عضو معين أو مكان آخر يمكنه أن يؤسس ورماً جديداً، فمعرفة الفرق بين الورم الحميد والروم الخبيث مهمة للإجراءات الطبية (Robert & Dan,) (2005).

2-2- التسمية Nomenclature

يوجد نظام خاص لتسمية الأورام لتسهيل انتقال المعلومات بين الأطباء والعاملين في الحقل الباثي والبيولوجي، كذلك لاختيار العلاج المناسب لأنواع السرطانية الكثيرة، وتستعمل لذلك المعلومات النسجية المتوفرة لوصف الرتبة Grading والمرحلة Staging للورم، إذ الأول يعني البعد عن النسيج الطبيعي ومدى التغيير الحاصل لحالة الورم وعلى ذلك فإن الرتبة الأولى G1 أقل حدة من الثانية G2 وأيضاً من الثالثة G3، أما مرحلة Staging فتظهر من خلال انتشار الورم spread، يعد نظام TNM النظام الأكثر استعمالاً إذ T ترجع إلى كلمة Tumor وتشير N إلى مدى انتشار الورم ووصوله إلى العقد اللمفية lymph nodes، وتعني M الانتشار إلى مناطق أخرى من الجسم ولمسافة أبعد (Rubin, 1973). يصيب السرطان كلا الجنسين وبجميع الأعمار وكل الأنسجة تقريباً وتتقدم نسبة الإصابة بالأورام كلما تقدم العمر وقد يعود السبب إلى ضعف مناعة الجسم أو لطول مدة كمون المرض لحين ظهور العوارض latency-period التي قد تطول إلى 20-30 سنة، فسرطان الثدي عند النساء يزيد فوق سن الخمسين عاماً إلى أعلى من 70% وسرطان البروستات عند الرجال يكون فوق سن الأربعين أكثر ظهوراً (Silverberg & Luberia, 1986).

2-3- مسببات السرطان

تزداد المخاوف من الأورام السرطانية لكثرة العوامل التي تعجله أو المسببات وانتشارها الواسع في البيئة environmental (William, 1992). كما يحدث مع الأشعة المتأينة التي قد يكون مصدرها طبيعياً أو صناعياً أو من مصادر طبية كما يحدث في التصوير الشعاعي X-ray (UNSCEAR, 1994). وقد تكون الأشعة الشمسية من خلال تكوينها الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet سبباً رئيسياً لسرطان الجلد (Lehihosh et al., 2003). إضافة إلى كل من التلوث pollution (Adami et al., 1995) وبيئات العمل (vineis et al., 1995) فأن نمط المعيشة وبعض العادات للغذاء (Willett, 1989) وكذلك التدخين (Copas & shi, 2000) والكحول (Paolo, 2006) لها أثر في زيادة نسبة الإصابة ببعض أنواع السرطانات.

إن للعوامل الأحيائية مثل الطفيليات والبكتريا والفيروسات أثراً واضحاً باصابات الأورام السرطانية فمثلاً تزداد نسبة الإصابة بالأورام السرطانية عند الإصابة بالطفيليات كما يحدث في البلهارزيا (Plsani et al., 1997). أما ما يتعلق بالبكتريا فمثلاً *Helicobacter pylori* وهي بكتريا حلزونية سالبة لصبغة كرام G-Negative spiral التي تستعمر الخلايا الظهارية للقناة المعدية epithelial gastric محدثة تقرحاً ulcer

ليتطور إلى adenocarcinoma of the stomach (Nyren, 1998). أما ما يتعلق بالفيروسات فالعلاقة أوسع وذلك بسبب التأثير المباشر للفيروسات ان كان نوع DNA أو RNA في جينوم الخلية المضيف host cell genome فمثلاً فايروس HBV و HCV تسبب من 10-20% من سرطانات الكبد (Tsukama et al., 1993). ولفايروس Human papillomaV أهمية طبية وذلك لإصابته الكثير من أعضاء الجسم كما يحدث في الأعضاء الجنسية لكلا الجنسين والفم ولسان المزمار ويتسبب البروتين الورمي HPV oncoprotein بعدم انتظام الانقسام الخلوي وإيقاف عمل البروتين الكابح للورم في المضيف host tumor suppressor protein (Bosch & DeSanjose, 2003).

4-2- ورم الثدي Breast Cancer

4-2-1- المرض

يعد سرطان الثدي من الأمراض الشائعة الخطيرة في العالم التي تصيب النساء ويمثل 18% من مجموع الأورام التي تصيب النساء ويعد المرض الثالث من حيث الانتشار عالمياً (Clinton et al., 2003). ويكون سبباً للوفاة بين سن 35-55 سنة فمثلاً في المملكة المتحدة هنالك 150 ألف حالة وفاة سنوياً بسبب سرطان الثدي وحوالي 25000 إصابة تشخص سنوياً، تحدث أكثر من 50% من الإصابات في سن 50-64 سنة، وتختلف الإصابة عالمياً حسب الموقع الجغرافي فالبلدان الغربية لها أعلى المعدلات بالإصابة لكنها تقل في آسيا وأفريقيا وقد ترجع إلى خطورة العوامل البيئية (Michael & Harry, 1986)، وفي الولايات المتحدة تكون النسبة أكثر رعباً إذ ان امرأة من بين كل ثماني نساء تشخص سرطان الثدي في فترة من حياتها، أما على النطاق العالمي فيعد هذا المرض أكثر الأمراض سبباً في وفاة النساء وتشخص حوالي مليون حالة جديدة كل عام، ان هذه الأرقام المخيفة جعلت العلماء يبحثون عن طرائق مؤكدة لتشخيص المرض ولمنعه وعلاجه ودراسة العوامل والأسباب التي تؤدي إلى انتشاره (Pamela, 2004).

4-2-2- التغييرات المرضية

يبدأ سرطان الثدي Breast Carcinoma من خلايا الثدي ويصيب النساء في الغالب، إذ كل 150 إصابة تقابلها إصابة واحدة في الرجال، يتكون الثدي أساساً من فصوص أو غدود lobules وهي مسؤولة عن تصنيع الحليب و قنوات ducts أيضاً التي تربط الفصوص مع الحلمة nipple، وكذلك الأنسجة الدهنية والضامة fatty and connective tissues والأوعية الدموية واللمفية (Michael, 2004). يمكن أن يظهر سرطان الثدي من الطبقة الظهارية لنظام

القنوات وفي أي مكان منها مبتدئاً من حلمة الثدي nipple إلى آخر منطقة متصلة بالفصوص، يعد سرطان القناة ductal carcinoma هو الأكثر شيوعاً من الذي يصيب الغدد lobular carcinoma إذ يعد الأخير أقل شيوعاً وقد يصل إلى أعلى من 10% قليلاً من مجموع حالات سرطان الثدي، على العموم تكون درجات التمايز لهذا الورم على ثلاثة مستويات three grades هي التمايز الجيد well differentiated والتمايز المعتدل moderately differentiated والتمايز الفقير poorly differentiated، ولما كان الثدي حاوياً على الكثير من الأوعية اللمفية lymph vessels التي تكون حاوية على الخلايا المناعية والنواتج الأيضية فإنها تنتهي بعقد لمفاوية تكون في الإبط axillary lymph nodes وعند وصول الخلايا السرطانية إليها عن طريق اللمف تتورم swell ومن هنا يمكن للمرض أن ينتشر في أعضاء أخرى ممكنة (Russell et al. 1987).

Gender الجنس 1-2-4-2

يصيب سرطان الثدي الاناث والذكور على السواء ولكن بنسب متغايرة، إذ ان كل إصابة في الرجال يعادلها 150 إصابة في النساء 1:150 وقد تختلف هذه النسبة حسب الموقع الجغرافي في العالم (Marc, 2005).

Age العمر 2-2-4-2

تتناسب زيادة الإصابة بسرطان الثدي طردياً مع العمر، إذ ان معدل الإصابة لكل 10 نساء مصابات هنالك 8 فوق سن الخمسين وتكون هذه النسبة شائعة في البلدان المتطورة (Hermann & Timo, 2004).

Genetic risk factors خطورة العوامل الوراثية 3-2-4-2

يرتبط ما يقارب 5-10% من اصابات سرطان الثدي مع تغيرات جينية بصورة طفرة وراثية mutation، وتوجد جينات شائعة يحصل فيها التطفير ومنها BRCA1 و BRCA2، وقد ترتفع نسبة الإصابة بسرطان الثدي إلى 80% في النساء اللواتي يحملن تغيراً في تلك الجينات خلال فترة حياتهن، وقد جرت العادة حديثاً بالتحري عن تلك الجينات لارتفاع نسبة الإصابة لدى حاملها والتحري المبكر عنها يقلل من احتمال الإصابة بسرطان الثدي لدى حاملها (Nokad & Ghedirian, 2005).

4-2-4-2- Family history تأريخ العائلة

يكون خطر الإصابة بسرطان الثدي أعلى في النساء اللواتي يكون أحد أفراد العائلة (أقارب من الدرجة الأولى) مصاباً بهذا المرض وقد تزيد النسبة إلى الضعف في حالة الأم والبنات، يمكن أيضاً أن تزيد مخاطر الإصابة بأحد أنواع السرطانات الإصابة بسرطان الثدي (Mesko et al., 1990).

5-2-4-2- Earlier Breast Radiation التعرض المبكر للإشعاع

يكون معالجة الصدر مبكراً بالإشعاع ذات تأثير مباشر في زيادة نسبة الإصابة بسرطان الثدي، وتعد كمية الجرعة ومدة التعرض ونوعية الإشعاع المتأين كذلك وقت التعرض بالنسبة للعمر لها علاقة مباشرة بالإصابة بسرطان الثدي (Cecile et al., 2005).

6-2-4-2- Hormone replacement therapy العلاج بالهرمونات

استعمال بعض الأدوية ولفترة طويلة يمكن أن تدخل عاملاً محفزاً لزيادة مخاطر الإصابة بسرطان الثدي، وقد وجد أن الاستعمال الطويل للهرمونات خاصةً estrogen وكذلك progesterone معاً لعدة سنوات يكون عاملاً مؤثراً في زيادة مخاطر الإصابة، وكذلك استعمال Hormones growth factor يعطي دفعا لتسارع المرض نحو الانتشار Metastasis (Susan et al., 2004). وهناك علاقة مؤكدة بين نمط الحياة life style ومعدلات الإصابة بسرطان الثدي أيضاً، إذ أشارت التقارير إلى أن تجنب السمنة يقلل من مخاطر الإصابة بسرطان الثدي عند النساء في مرحلة ما بعد سن اليأس post menopausal وأن زيادة الوزن التي تحدث فوق سن 18 سنة بمقدار 40 باوند تزيد من نسبة الإصابة إلى 40% تقريباً (Zhiping et al., 1997).

ومن الواضح أيضاً أن الحمل في سن مبكرة والرضاعة الطبيعية لأكثر من طفل عن طريق الثدي تقلل الإصابة وعلى العكس من ذلك فإن الحمل في وقت متأخر قد يزيد من نسبة الإصابة (Anne & Barbara, 2000). وقد تساعد بعض التمارين الرياضية البسيطة والمستمرة على تقليل نسب الإصابة بسرطان الثدي (Bernstein et al., 1994).

5-2- الفايروس والتغير الوراثي

يكون التغيير الحاصل في المادة الوراثية بسبب أو أكثر وفي الأغلب يكون فيروسياً أو عاملاً بيئياً آخر محولاً الخلية إلى neoplastic transformation يكون هو البداية initiation أو المقدمة للتغيرات التي تتدرج إلى neoplastic state وهنا قد تم التغيير في الترتيب الكروموسومي الطبيعي للخلية chromosome rearrangement الذي تنتج منه خلايا ذات صفات جينية مختلفة تؤسس للانقياد نحو promotion and progression فتحمل تلك الخلايا صفات نوعية سرطانية غير قابلة للاعادة irreversible change التي تسمى خلايا متحولة transformation cells (Russell, 1998). وتمتلك بعض الخلايا السرطانية مواصفات وظيفية أخرى metastatic potential لاكمال ضراوتها ولتصبح قادرة على الغزو والانبثاق invasive ability (Sherbet, 1982). يمكن أن تبقى الأورام كما في Carcinoma كامنة dormant لعدة سنوات ولكن تطور المواصفات التي تحملها تبدي توافقاً مع متطلباتها الجديدة كإنتاج بعض الإنزيمات بوفرة كالتي تحتاجها لتصنيع الحامض النووي وإنزيمات أخرى حاله للبروتين protease وعوامل مساعدة للنمو والانبثاق كذلك تقوم الخلايا السرطانية بإنتاج الكثير من الحركيات الخلوية مثل عوامل تكوين الاوعية السرطانية Tumor Angiogenesis Factors (TAF) (shing et al., 1984) وعوامل تحول النمو (Transforming Growth Factors TGF) (Sporn & Robert, 1985) وإنتاج عوامل النمو المشتقة من الأقراص الدموية أيضاً (Platelet Derived Growth Factors PDGF) (Betsholtz et al., 1986) وغيرها لتمكنها من انجاز مهمات خاصة بتلك الخلايا. ويتم أيضاً إنتاج بعض واسمات الأورام كما يحصل مع المستضدات المرتبطة مع الأورام Tumor associated antigens ومنها Alpha-fetoprotein وكذلك Carcinoembryonic Ag. (Sahin et al., 1997).

2-6- وصف التغيرات الحيوية المرافقة للورم

2-6-1- سلوك الخلية المتحولة

يبدأ السرطان بخلية مفردة أغلب الأحيان ومن نسيج له القدرة على التجدد renewal وتمتلك هذه الأنسجة خلايا مولدة لها القابلية على الانقسام، وتدخل الخلايا الجديدة في مرحلة التمايز differentiate إلى خلايا وظيفية وإلى النضج إذ تصبح متميزة كلياً وتصل عندها إلى عمر معين أو من خلال فعاليات أخرى تدخل مرحلة الموت، ويتغير السلوك الطبيعي لهذه الخلايا عند التعرض إلى مادة مسرطنة interactive carcinogenic agent (Raymond, 1987). ويحدث تغييراً في السلوك الحياتي لتلك الخلايا ممتلكة خواص لا نجدها

في الخلايا السوية أهمها التحول المظهريّ transformed phenotype والديمومة immortality وكذلك القابلية الورميّة tumorigenicity إذا نقلت إلى حيوان مختبريّ ملائم (Macswen & Whaley, 1997). وتتوضح تلك الخواص في المختبر in vitro من خلال زرع الخلايا غير السرطانيّة non-neoplastic cells في أوعية لتتقسم الخلايا حتى تملأ الفراغ السطحي لأوعية الزرع ويصل الزرع إلى حد معين ويتوقف عن النمو حتى لو عززنا الخلايا بعوامل نمو growth factors، إذ تبقى الخلايا مستقرة في طور التمهيدويّ G0 وتسمى تلك المرحلة topoinhibition ويكون نمو الخلايا متوازياً، أما الخلايا الورميّة tumor cells فأنها تستمر في النمو والانقسام وتفشل في الوصول إلى مرحلة topoinhibition وتكون منقسمة بصورة غير متوازية وغير طبيعية وتنمو بأشكال مختلفة دون ترتيب غير معتمدة على إضافة عوامل النمو وتسمى تلك الظاهرة بالنمط المظهريّ المتحول transformation phenotype، وتنمو تلك الخلايا أوراًماً إذا نقل بعض منها إلى حيوانات مختبرية مضعفة مناعياً أي إن لها القابلية الورميّة tumorigenicity (Hanahan, 1988)، وتصل الخلايا الحية (الطبيعية) إلى نقطة التوقف Ceases بعد 30-50 serial passage إذا نقلت إلى وسط زرعّي أقل تركيزاً وتسمى تلك النقطة hayflick limit نسبة إلى مكتشفها (Hayflick & moohead, 1961)، أما الخلايا السرطانيّة فلا تتوقف وتبقى مستمرة في الانقسام ولا تظهر Ceases وتسمى هذه الظاهرة immortality (Benjamin, 2004). بعد التغير الذي يحصل في المادة الوراثية DNA والذي ينتج منه خلية متحولة transforming cell تمتلك صفات مظهرية ووظيفية مختلفة عن الخلايا اللبونة السوية وقد يكون التغير الشكليّ حتى في نفس خلايا النسيج الواحد (Macswen & Whaley, 1997).

2-6-2- الغشاء البلازمي والسلوك الاجتماعيّ

يرافق عملية التسرطن تغير في الغشاء البلازميّ plasma membrane للخلايا السرطانيّة الذي يقوم بدور مهمّ في السلوك (الاجتماعي) لتلك الخلايا في التواصل مع الخلايا الأخرى في الحركة والهجرة والالتصاق adherence مع خلايا وتراكيب نسيجية أخرى كذلك في التعامل مع البيئة الجديدة من أجل الحصول على المواد الغذائية والتحول لتجنب الجهاز المناعيّ للجسم يطال التغير في مكونات الغشاء البلازميّ في glycoprotein وأيضاً glucolipids والعمل على إخفاء معقد التوافق النسيجيّ الأول MHC1 (Larber, 1984)

2-6-3- النسيج الورمي

تبقى الكتلة الورمية للأورام الصلبة في موقعها وتستمر بالتوالد غير المسيطر عليه وقد تبقى شهوراً أو سنوات ولكن بعد أن تكمل الخلايا السرطانية متطلباتها الانزيمية تبدأ بالعمل على تزويد نفسها بشبكة الأوعية الدموية من خلال وظيفة عوامل تكوين الأوعية الدموية Tumor Angiogenesis Factors (TAF) التي لها القابلية على حث الأوعية الدموية على تكوين شعيرات دموية capillaries خارجة صوب الورم بعملية neovascularization لادراك المتطلبات الغذائية حتى تتمكن من الوصول إلى مرحلة الغزو invasive أو الانبثاث metastatic (Flokman, 2005). تنمو الكتلة الورمية وتضغط لتدخل بعض الخلايا إلى النسيج وتدخل أخرى الفسح بين الخلايا intercellular space ويرافق ذلك فعالية انزيمية تمكن الخلايا الورمية من اختراق الغشاء القاعدي basement membrane ويتكون هذا من إفرازات معقدة ناتجة من خلايا epithelial and mesenchymal cells ويعمل دعامةً لأغلب الأنسجة حسب وظيفة النسيج إذ يتركز collagen 1 في الأنسجة الظهارية في الجلد أما بالنسبة للغضاريف والأربطة فهناك خمسة أنواع من collagen والألستين elastin تحدد قوة ومطاطية النسيج، أيضاً تدعى المنطقة السدى خارج خلوي Extra cellular matrix (ECM) مرتبطة عادة مع الخلايا الظهارية بوساطة بروتين Lomnin تلك المنطقة تعد حاجزاً للخلايا السرطانية ويجب أن تجتازها لتنتشر عبر الدم أو اللمف لتؤسس لورم ثانٍ بعيد عن الأول ويمكن لبعض الأورام السرطانية الانتشار بطريقة أخرى إذ يمكن أن تنفصل بعض الخلايا كما في سرطان المبيض إلى التجويف البريتوني وتنمو لتكون ورماً جديداً، تبدأ عملية اختراق ECM بربط الخلايا السرطانية attachment عبر مستقبلات على الغشاء البلازمي خاصتها مع glycoprotein في خلايا ECM وكذلك تقوم بإفراز الانزيمات الحالة hydrolytic enzymes أو تحث خلايا المضيف على المساعدة بطرح الانزيمات كما يحصل في إفراز collagenase الذي له دور مهم في حل collagen IV المكون الأساس للـ ECM (Little et al., 1983). وكذلك البروتينات التي تتأثر بانزيم protease وانزيمات أخرى تعمل على السكريات glycosidase وبذلك يمكن ان تخرق الغشاء القاعدي وكذلك الأنسجة للوصول إلى الأوعية الدموية والأقنية اللمفية، وتتحرك الخلايا السرطانية بعد دخولها إلى الأقنية اللمفية لتصل إلى العقد اللمفية إذ تستقر بعض الخلايا لتكون نمواً مهاجراً metastatic growth، ويمكن لتلك الخلايا السرطانية أن تنتقل إلى عضو آخر وتؤسس لورم جديد أما التي تدخل مجرى الدم فلا تنجو منها الا تقريباً 0.1% من الخلايا وتبدأ تلك الخلايا بالتفاعل مع مكونات الدم كما يحدث مع

الأقراص الدموية platelets أو مع الخلايا اللمفاوية أو العدلات مكوناً كتلة lump تستقر في الأوعية الدموية وتلتصق مع البطانة وتحرك تكوين سدى ليفي fibrin matrix منتجة تخثراً thrombus (Lance & Elise, 1992). وتحدث أضراراً damage بجدران الأوعية الدموية إذا كان العضو مناسباً للانتشار مؤدياً إلى تجمع العدلات neutrophils التي قد تخترق المجال بين الخلايا البطانية وتفتح قناة تستغلها الخلايا السرطانية للعبور وتستعمر مكاناً جديداً في ذلك العضو، أما الأقراص الدموية التي تتجمع في موقع الخثرة thrombus فتطرح وسائط مثل histamine الذي يحرك نفاذية الأوعية الدموية capillary permeability الذي يسمح بهجرة الخلايا من خلال الأوعية إذ تدخل الخلايا المرحلة الأخيرة لتكون مستعمرات خلوية في موقع ثانٍ وعندها يصبح المرض خطيراً جداً ويصعب التخلص منه وتكون نهاية مأساوية تنتهي بقتل المضيف (Robert & Dan, 2005).

4-6-2- التغير النووي

يبدأ التغير في النمط الجيني (النووي) genotype ويأخذ شكلاً في التعبير عن النمط المظهري phenotype وتظهر النواة أكبر حجماً والكروماتين أكثر اصطباغاً hyperchromatic وقد تكون الخلية الورميّة حاوية على أكثر من نواة واحدة multinuclei والخلايا متغايرة في الشكل والحجم pleomorphic in size and shape وتظهر أيضاً الخلايا العملاقة giant cells والخلايا الصغيرة في النسيج الورمي الواحد (Macswen & Whaley, 1997). يكون الانقسام الخلوي mitosis أكبر في خلايا الأنسجة الورميّة من الأعتيادية فهناك أكثر من 20 انقساماً أكبر من المعدل (et al., 1982).

7-2- وصف التغيرات الوراثية في الورم

1-7-2- وراثية الورم

افترض Boveri (1914) علاقة للوراثة بالسرطان من خلال نظرية الطفرة الوراثية في الخلية الجسمية المولدة للسرطان Somatic mutation hypothesis of origin of the cancer التي أشارت الى أن أصل الخلية السرطانية ناتج من خلال خطأ في مكونات المعقد الكروموسومي في الخلايا الجسمية وينتقل هذا الخطأ إلى كل أجيال الخلية أما في عام 1960

فعرف أول كروموسوم غير طبيعي يرتبط مع السرطان في الإنسان وسمي Philadelphia chromosome من قبل العالمين (1960) Hungeford & Nowell في مرضى ابيضاض الدم (CML) chronic myelocytic leukemia. ولاحظ Kndson (1971) أن أشكال السرطان الوراثي وغير الوراثي تشترك فيها نفس الأحداث من التبدل الجيني والفرق بينهما هو ان الطفرات في النوع الوراثي تنتقل من الآباء بينما النوع غير الوراثي يكتسب نفس الطفرات خلال فترة الحياة والجين المستهدف في كلتا الحالتين وأحد. وقد أدى ذلك إلى اكتشاف كثير من الجينات الملائمة لنوع من السرطانات دون غيره كما يحدث مع الجين BRC1 الموجود على كروموسوم 17 الذي يعد بوصفه مورث الاستعداد inherited susceptibility genes إلى سرطان المبيض والثدي وإذا تعرض هذا الجين إلى التطهير يرفع نسبة الإصابة وتطور سرطان الثدي إلى 85%، كذلك الجين BRC2 الذي يرفع نسبة الإصابة بسرطان الثدي (Claus *et al.*, 1996). ولهذا فقد عرف السرطان بأنه مرض جيني genetic disease لمستوى الخلية المفردة، وتكون بعض أنواع السرطانات وراثية heritable وتحدث أغلب الطفرات المؤثرة في الخلايا الجسمية وقد تكون بخطاء ذاتي عند تضاعف DNA أو حدوث تحفيز induce نتيجة التعرض لمادة مسرطنة (Robert & Dan, 2005).

يطرأ تغييران مهمان في الجينوم genome للوصول إلى الحالة السرطانية في الخلايا أولهما تراكم الطفرات الجسمية accumulation of somatic mutations ويتأثر فيه الجين المسؤول عن اصلاح الضرر في DNA إذ يحدث تثبيط لهذا الجين وينتج عنه ضعف في امكانية اصلاح DNA والتغير الثاني تطور عدم الاستقرار الجيني genetic instability الذي ينتج عنه تغير في عدد الجينات في الخلايا ويكون بسبب التضاعف القليل small duplication أو بالحذف deletion أو الانتقال translocation لبعض المادة الوراثية من كروموسوم إلى آخر (Leob, 2001).

2-7-2- التغيير الجيني

لأجل فهم الطبيعة الجزيئية للسرطان لابد من فهم عمل تلك الجينات التي تعد في الوقت الحاضر ذات مسؤولية مباشرة في أحداث تكوين السرطان ومن أهم الجينات الرئيسة التي لها تأثير مباشر في أحداث السرطان هي:-

1. الجينات الورمية Oncogenes

عرفت أولاً أنها جينات موجودة في طيف واسع من الفايروسات تسبب transformation للخلايا الطبيعية قد تكون تلك الفايروسات RNA أو DNA، وتكون فايروسات RNA ومنها Retrovirus ذات قابلية الأرتداد العكسيّ reverse transcribed لتحويل نفسها إلى خيط دنا مفرد single stranded DNA وتضاعفه إلى خيط دنا مزدوج double stranded DNA ليتمكن أخيراً من التداخل مع جينوم genome خلايا المضيف ويبدل بعض أجزاء الجينوم الفايروسيّ viral genome مع الكروموسوم الخلويّ وهنا يجب أن يكون ذلك الجزء حاوياً جيناً محفزاً للنمو growth promoting gene ليصبح الفايروس ذا قدرة ورمية (Martin, 2002). أما فايروسات DNA فيصنع بروتيناً يسمى T-antigen في بداية إصابة الخلايا كما يحدث في polyomavirus وسمي كذلك لوجوده في الخلايا الورميّة T-cells وله وظيفة حاله lytic function وكذلك النشاط التحولي transforming activity من خلال قدرته على التفاعل مع البروتين الخلويّ وله أهمية أيضاً في البدء بتصنيع DNA الفايروسي (Hanahan, 1985). شخّصت تقريبا 100 نوع من الجينات الورميّة ودرجت تحت أنواع من المجاميع وظيفتها تنشيط البروتينات الناقلة في الغشاء البلازميّ transmembrane protein وكذلك عوامل الاستنساخ transcription factors (Mark & Rapp, 1984). وتتكون مجاميع الجينات على شكل عائلة كبيرة تضم عدداً من الجينات، وتسمى تلك الجينات الموجودة على الفايروسات التي لها القابلية على تحويل الخلايا الطبيعية إلى سرطانية بالجينات الورميّة Oncogene، وقد أطلق عليه V-onc أي انه من أصل فايروسيّ إذ وجد أن له نظيراً في الخلايا الطبيعية عرف بـ proto-oncogene وله وظيفة في الانقسام الخلويّ والتمايز وقد أطلق عليها تسمية الجينات الورميّة الخلويّة (C-onc) cellular oncogene لتميزها عن الأخرى (Pierotti et al., 2000). ومن خلال بعض الآليات ذات التأثير المنشط activate على الجينات الورميّة الأولية cellular proto-oncogene لتحويلها إلى جينات ورمية ومن هذه الآليات هي:-

أ- الطفرة النقطية Point mutation

تكون الطفرة الوراثيّة مهمة وغالباً ما تكون نقطية في قاعدة نيتروجينية واحدة تؤثر في الجين الورميّ الأولي وتحوّله إلى الجين الورميّ oncogene وهذا النوع شائع في الأورام الصلبة مؤدية إلى تنشيط جين من أفراد عائلة vas- genes مثل Harvey Kirsten murine sarcoma virus (K- ras) أو murine sarcoma virus (H-ras)

الذي يعد ما نسبته 85% من سرطان البنكرياس و 15% من مجموع سرطانات الإنسان (Lowy, 1993).

ب- تضخيم الدنا DNA Amplification

هي إحدى آليات تنشيط الجين الورميّ الأولي proto-oncogene بالاستهداف الذاتيّ إذ تُضخم منطقة في الكروموسوم حاوية على ذلك الجين مما يؤدي إلى زيادة في عدد نسخ DNA يرتد بالتغيير السايولوجيّ على الخلايا ويلاحظ من خلال اظهار المنطقة الكروموسومية المتضخمة في تقنية التصبيغ (HSRS) Homogeneously staining regions أو يكون التضخم خارج كروموسوميّ من خلال double minute (dmns)، وقد شخص عدد من الجينات في أمراض سرطان الثدي والأعصاب وأغلب الأورام الصلبة، وكان أول جين شوهد في سرطان الدم التحللي Human promyelocytic leukemia هو C-myc gene وكذلك قد تحقق من تضخيم ذلك الجين في سرطان القولون colon carcinoma وكذلك في أحد أنواع سرطان الرئة small cell lung carcinoma (SCLC) وأظهر ازدياد عدد الجين بنسبة 20-76 مرة (Little et al., 1983).

ج- إعادة ترتيب الكروموسوم Chromosome rearrangements

يظهر في هذه الحالة الكروموسوم غير طبيعيّ من خلال التبادل الموقعيّ بين الجينات وهنا يكون أحد الجينات المتبادلة بعملية التبادل العكسيّ reciprocal translocation هو proto oncogene في الكروموسوم مؤدياً إلى تنشيط الجين الورميّ الأوليّ كما يحدث في ورم الخلايا البائية B-cell Tumor عندما يبدل الجين الورميّ على الكروموسوم الثامن (C-myc gene) مع كروموسوم 14 الذي يحمل موقع الكلوبولين المناعيّ Ig locus أو في حالة ورم الخلايا التائية T-cell tumor الذي يشترك أيضاً كروموسوم 8 وكذلك 14 الذي يحمل موقع مستقبلات الخلايا التائية TCR locus ونتيجة لهذا التبادل بالمواقع يحدث استنساخ عوامل تؤدي إلى الحيود عن الوظيفة الطبيعية في النمو والانقسام مثل بروتين cell cycle regulatory cell cycle regulatory cylin protein أو bcl 2 cell death Protein regulate (Adams & Cory, 1991).

2- الجينات الكابحة للورم Tumor suppressor genes

لهذه الجينات دور مهم في عملية النمو والانقسام والتمايز الخلوي للخلايا الطبيعية وكذلك في إيقاف النمو أو تحديده وقد تسمى مجازاً anti-oncogene لأهميتها في كبح الأورام (Fearon & Vogelstein, 1994). يتعرض ذلك الجين إلى فقدان كلا الأليلين both alleles في أغلب السرطانات الوراثية من خلال الأبوية germ line فتظهر الحالة الورمية أو عند فقدان أحد الأليلين يبقى الجين ذا وظيفة طبيعية ولكن تظهر الحالة الورمية أيضاً عند تعرض الأخير إلى الطفرة ، وان من أهم الأمثلة على الجينات الكابحة للورم هو الجين المسبب لسرطان العيون في الأطفال RB-genes الذي يشفر إلى RB protein والأخر P53 gene الذي يشفر إلى P53 protein (Levine, 1997). تظهر أهمية RB protein في سرطان العيون الذي يصيب الأطفال retinoblastoma عند فقدان ذلك البروتين أما بفقدان الجين فتظهر أنواع أخرى من السرطانات كالذي يصيب العظام osteosarcoma والذي يصيب الرئة small cell lung cancer، أهمية RB protein بخصوصية ارتباطه بكثير من البروتينات المهمة في عملية الانقسام الخلوي مثل ما يحصل مع ارتباط RB protein مع البروتين الحاوي مجموعة عوامل الاستنساخ E2F الذي يعني تثبيط قدرة E2F على تنشيط الاستنساخ إذ يمنع (Blocks) بروتين RB protein الجين المعتمد على E2F من التعبير expression وبهذه العملية غير المباشرة يمنع RB protein الخلية من الدخول في s-phase كذلك فإن (R.B-E2F complex) قد يكبح بعض الجينات بصورة مباشرة (Marshall, 1991). أما P53 فيعد أهم جين كابح للأورام في الإنسان ويتسبب بأكثر من (50%) من سرطانات الإنسان عند فقدان P53 protein أو حصول طفرة في الجين، P53 هو عبارة عن فوسفو بروتين نووي Nuclear phosphoprotein- اكتشف أصلاً في الخلايا الورمية المتحولة بسبب فايروس simian virus 40 (SV 40) على أنه بروتين مرتبط بمستضد الورم Tumor antigen-associated protein الذي يكون T-antigen (Jenkins et al., 1984). تحتوي الخلايا الطبيعية مستوى واطناً من P53 وعند حدوث ضرر مباشر في DNA الخلية بسبب اشعاع أو بعض الأدوية تزيد كمية P53 من خلال ذلك التنشيط، ومعالجة الضرر الحاصل يكون بطريقتين إذ يمكن إيقاف النمو بقدر نقطة السيطرة check point والسماح بتصليح الضرر قبل دخول مرحلة s-phase ولكن إذا استمرت الخلية بالانقسام قبل التصليح يقدح الموت المبرمج apoptosis وانهاء الخلية (Vogelstein et al., 2000). إن فقدان P53 يجعل الخلية تنجو من الموت وتستمر بالانقسام وتدخل immortalization وقد يحدث هذا من خلال ارتباط T-antigen وهو (Tumor forming protein polyomavirus) مع P53 للخلايا المضيف، إذ تفشل الخلية بالسيطرة على كبح الانقسام أو موت الخلايا لفقدانها وظيفة P53 الذي يكون

ضروريا إلى عملية الموت المبرمج، وقد يتأثر P53 gene أو إنتاجه من البروتين P53 protein بكثير من الفيروسات أو مستضداتها antigens مما يؤدي إلى تعطيل وظيفته الطبيعية (Maser & Dappinho, 2002).

3- جينات اصلاح الدنا Mismatch repair genes or DNA repair genes

تمتلك كل الخلايا نظام حماية ضد الضرر الذي يصيب DNA والذي قد يكون ذاتياً أو من البيئة خلال عملية التضاعف الذي يستنسخ فيها ما يقارب 6 ملايين زوج قاعدة نيتروجينية وتزال جميع الأخطاء بذلك النظام، وان أحد الأسباب الرئيسية في زيادة عدد الطفرات في الخلايا السرطانية هو تثبيط بعض مكونات جهاز الإصلاح repair system ولعل ذلك يرجع إلى التطفير الذي يحصل في mutator gene (مجموعة الجينات التي تكون جهاز الإصلاح) مثل الجين المسؤول عن إنتاج إنزيم DNA polymerase أو عن repair enzyme والتأثير الأهم هو ما يحدث من تجميع الطفرات accumulation of mutations في جينات مهمة مثل oncogene وكذلك Tumor suppressor genes الذي يعني تطفيرها ظهور السرطان بقوة (Kinzler & Vogelstein, 1996). ويعد الورم الوراثي Hereditary non- polyposis colon (HNPCC) هو أحد سرطانات القولون الذي يكون مثلاً جيداً لتلك السرطانات الناتجة من خلل في أحد الجينات الأربعة المسؤولة عن اصلاح الأخطاء mismatch repair genes ومن أهم الجينات MSH2 و MLH1 (Fishel et al., 1993).

8-2- وصف التغيرات المناعية المرافقة للورم

8-2-1- تمهيد

ان مناعة الأورام تعني دراسة

1- الخصائص المستضدية للخلايا السرطانية

2- الاستجابة المناعية للمضيف ضد الخلايا الورمية

3- السلوك المناعي للمضيف لنمو الخلايا السرطانية الخبيثة

4- وسائل الجهاز المناعي التي تُعدّل وتُحوّر لتمييز الخلايا الورمية وتتحرك لقتل الأورام

(Philip, 1997).

كما سيوضح في الفقرات الآتية:

8-2-2- التغيرات المناعية المرافقة للنمو السرطاني

قد تكون أهم وظيفة مناعية للجسم ضد الأورام هي منعها ابتداءً من النمو والتكاثر وتكون هذه الوظيفة عملياً معطلة إذا ما تمكن الورم السرطاني من النمو والانقسام لما يسلكه من مواصفات يتجاوز فيها الجهاز المناعي للمضيف (Philip, 1997). من أهم تلك الآليات هي أن هنالك فرقاً بسيطاً تظهره خلايا الأورام عن الأنسجة الطبيعية الأخرى عند تحولها إذ طورت مستضداً ورمياً Tumor Ag أقل غرابة وأكثر شبيهاً للأنسجة الطبيعية (Chen et al., 1992) ، وتقوم باعاقبة تكوين جزيئات MHC على سطوحها وكذلك جزيئات أخرى مطلوبة لعملية التقديم Ag presentation (Cohen & Kim, 1994). و تتفادى أيضاً قدرة T-specific Tumor-cells من خلال عدم اظهار الجزيئات الضرورية لفعالية تلك الخلايا (Schwartz, 1990). أما إنتاج الخلايا السرطانية وإفراز بعض الوسائط cytokines المثبطة للاستجابة المناعية (Ranges et al., 1987). والتي تعيق معرفة الخلايا الورمية (الهدف) من قبل الخلايا المناعية كما يحدث في Transforming growth factor β (Anthony, 2005). ومن الممكن ان يفشل الجهاز المناعي للمضيف بأحداث فعالية مضادة للسرطان Anti-tumor بسبب الاستجابة الضعيفة التي يظهرها مستضد الخلايا الورمية بسبب تحمل Tolerance خلايا Tumor-reactive T-cell لتلك المستضدات الورمية (Yee et al., 1996). كذلك يمكن لتلك الخلايا تجنب فعالية المراقبة المناعية Immune surveillance بواسطة تكوين غطاء من الالياف mucin بوساطته تتجنب الاتصال المباشر مع الخلايا المناعية.

2-3-8-3- دور عناصر المناعة العفوية في رصد التغيرات المناعية

2-3-8-3-1- البلاعم الكبيرة غير المحفزة

تشابه هذه الخلايا مع الخلايا القاتلة الطبيعية في قابلية حلّ الخلايا الورمية من خلال قابليتها على إفراز بعض الانزيمات الحالة lysosomal enzymes التي تؤثر في الخلايا الورمية، وكذلك فانها تمتلك مستقبلات Fc receptor التي تمكنها من التعرف على الخلايا الورمية المغطاة بالأضداد antibodies وتستهدفها لتبدأ عملية تحللها بواسطة الانزيمات المحللة وكذلك من خلال فعالية (ROI) Reactive oxygen intermediate (Ivan & Arther, 2000).

2-3-8-3-2- الخلايا الطبيعية القاتلة (NK cell) Natural Killer cell

تكون هذه الخلايا تقريباً 15% من الخلايا اللمفية في الدم المحيطي، 3-4% من الخلايا اللمفية في الطحال، وتوجد في الرئة وفي المخاطية المعوية أيضاً intestinal mucosa، تختلف الخلايا الطبيعية القاتلة عن الخلايا اللمفية القاتلة بان لها حبيبات كبيرة large

granular حاوية أيضاً على perforin و granzymes، وأكدت الدراسات على الحيوانات المختبرية In Vivo قدرة الخلايا الطبيعية القاتلة على قتل الخلايا الورمية وكذلك الخلايا المصابة بالفايروس، جاءت التسمية NK لأنها تدافع ذاتياً في الجسم وقد وجدت في دم الأشخاص الذين لم يتعرضوا إلى مستضد بخلاف الخلايا اللمفية القاتلة التي تحتاج إلى وجود المستضد، كذلك فإنها تعد مناعةً مكتسبة طبيعية ضد الأورام وتستعمل نفس آليات القتل للخلايا اللمفية القاتلة ولكنها لا تترجم مستقبل المستضد السطحي للخلايا التائية T-cell Ag- receptor ، وتقتل الخلايا الهدف بدون الارتباط مع معقد التوافق النسيجي MHC. يُحث النشاط القاتل لخلايا NK ضد الأورام عن طريق الوسائط cytokines مثل interferon ، TNF α ، IL-12 كذلك IL-2 ، ويكون نشاط NK متزامناً مع التحفيز الذي تتلقاه الخلايا البلعمية macrophages والخلايا التائية T-cell التي بدورها تفرز الوسائط cytokines، الأهمية القصوى لـ NK هي قدرة هذه الخلايا على معالجة الخلايا الورمية التي تتجنب الخلايا اللمفية القاتلة بإخفاء معقد التوافق النسيجي الأول MHC I (John, 1997). يكون سلوك خلايا NK في الدفاع عن الأورام في الإنسان غير واضحة، ولكن وجد في الفئران المختبرية أن الأورام الناتجة من طفرات وراثية ذاتية تكون قليلة نسبياً حتى إذا كانت نسبة T-cell قليلة ويرجع ذلك إلى نشاط خلايا NK، كذلك وجد عند الأشخاص الذين لديهم نقص في نسبة خلايا NK تكون لديهم القابلية على الإصابة بمرض Epstein-Barr virus (EBV) Associate lymphoma (Ritz, 1989). وكذلك فإن دور خلايا NK في المراقبة المناعية Immune surveillance وضد الخلايا المصابة بالفايروسات والخلايا السرطانية وتكون فعاليتها غير مرتبطة مع معقد التوافق النسيجي الأول MHC I (Colonna et al., 2000).

2-3-3-3- المراقبة المناعية Immune Surveillance

اطلق Pual Erlich مصطلح immune surveillance في بداية 1950 على فعالية الجهاز المناعي بالبحث المستمر عن الخلايا غير الطبيعية ومستضداتها والعمل على تدميرها قبل ان تنمو على شكل ورم أو قد يتمكن الجهاز المناعي من قتلها عندما تؤسس للورم، وتوسع العالم Burnet في عام (1970) في شرح هذه النظرية وأوضح أن الجهاز المناعي يقوم بدور هام في افشال النمو أو يمنع التأسيس (الإنشاء) للأورام وتم جمع الكثير من الدلائل لدعم تلك النظرية منها:-

1- post mortal data واقترحت بان هنالك العديد من الأورام قد تكون أكثر من التي تظهر سريريا.

2- نلاحظ lymphoid cell infiltration في كثير من الأورام الصلبة دليلاً على وجود الخلايا المناعية في الورم كاستجابة مناعية.

3- قد يحدث كبح ذاتي للورم spontaneous regression of tumor

4- يكون حدوث الأورام أكثر شيوعاً مع تقدم العمر وكذلك لدى الاطفال حديثي الولادة neonate عندما يظهر الجهاز المناعي قدرة ضعيفة على الاستجابة المناعية وقد أثبت حديثاً بأن كثيراً من مرضى زرع الكلى المثبتين مناعياً يصابون بأنواع كثيرة من الأورام خاصة تلك التي يكون سببها فايروسياً ومرادفاً لذلك فان المصابون بالنقص المناعي الوراثي غالباً ما يصابون بالورم اللمفي lymphomas نتيجة للإصابة بفايروس EBV وقد وجد بأن هذه الفعالية تكون أكثر تأثيراً في الفايروسات من الأورام في الحيوانات المختبرية (Rao, 2000).

2-8-4- دور عناصر المناعة التكيفية في رصد التغيرات المناعية

قد تم دراسة كل من تأثير المناعة الخلوية (الوراثية الجزيئية) humoral والخلوية cellular في قتل خلايا الأورام في المختبر وكذلك الطرق الرئيسية التي يتبعها المضيف بعد أن تعجز المراقبة المناعية immune surveillance عن عرقلة نمو الخلايا الورمية (Warren, 2004).

2-8-4-1- الخلايا اللمفية التائية

تكون الخلايا اللمفية التائية T-cell دون ادنى شك ذات مسؤولية أولى للاستجابة المناعية للسيطرة على نمو خلايا الأورام أما بوساطة الخلايا التائية السامة T cytotoxic cells بالقتل المباشر أو تنشيط باقي مكونات الجهاز المناعي من قبل الخلايا المساعدة التائية T helper cells للعمل ضد الأورام (Knutson & Disis, 2004).

وتعكس مسؤولية الخلايا اللمفية التائية T-cell أهمية الارتباط مع معقد التوافق النسيجي الثاني MHC Class II والتي تكون في الأغلب الخلايا المساعدة Th والتي تعبر عن CD₄ والتي لا يكون تأثيرها مباشراً ضد الأورام وإنما بإفراز الوسائط cytokines التي تساعد على الاستجابة المناعية ضد الأورام من خلال خلايا وآليات أخرى (Knutson & Disis, 2004).

، وأهمها تطور الخلايا اللمفية القاتلة CTL كذلك فإنها تقوم بإفراز Tumor necrosis factor (TNF) وكذلك Interferon-gamma (IFN γ) عندما تنشيط بوساطة Tumor antigen وبالمقابل قد يزيد من ترجمة الخلايا الورمية لمعقد التوافق النسيجي الاول MHC Class I الذي يقدم تلك الخلايا للهلاك بوساطة الخلايا اللمفية السامة (Norcross, 1984).

وقد ظهر مبدأ قتل الخلايا الورمية بواسطة الخلايا القاتلة في المختبر واضحاً إذ إن استعمال مادة مسرطنة للحيوانات المختبرية أو DNA-virus الذي يسبب الأورام فإن مسؤولية المراقبة المناعية تكون من نصيب الخلايا اللمفية القاتلة التي تتمكن من قتل الخلايا الورمية بواسطة التعرف عليها من خلال الببتيدات peptides التي يعبر عنها الجين الخلوي المطفر mutant cellular genes في بعض البروتينات الفيروسية المسرطنة oncogenic viral proteins الذي تقدم مع جزيء معقد التوافق النسيجي الأول (Allison *et al.*, 1995) ومهما يكن من شيء فإنه يمكن عزل الخلايا اللمفية القاتلة من الحيوانات المختبرية أو من إنسان مصاب بأحد الأورام وتكون فعالة ضد الورم عينه كما في الورم الاحشائي melanomas وكذلك فقد عزلت خلايا أحادية النواة mononuclear cells من بعض الأورام الصلبة كسرطان الثدي والورم اللمفي Lymphoma وقد أطلق عليها الخلايا اللمفية المتغلغلة في الورم Tumor infiltrating lymphocytes (Abul *et al.*, 2003). كذلك يمكن للخلايا الورمية ومستضداتها أن تهضم من قبل الخلايا المقدمة للمستضد Antigen presenting cells (APCs) وغالباً يكون نوع الخلايا شجيرية dendritic cells وهنا تعالج الخلايا الورمية أو من خلال مستضدات الورم Tumor antigen داخل هذه الخلايا ومن تلك الفعالية يتكون peptide أو المشتق من تلك المستضدات يظهر ارتباطاً مع معقد التوافق النسيجي الأول الذي يمكن أن يميز من قبل CD₈ وقد تكون هذه الفعالية هي الإشارة التي تحتاجها CD₈ للتمايز لتكوين خلايا مضادة قاتلة للورم وقد تترجم جزيء معقد التوافق النسيجي الثاني الذي بدوره ينشط الخلية التائية المساعدة CD₄ وهذا المنحني يمكن أن يسمى التقديم العرضي cross-presentation أو العرضي الابتدائي cross primary وقد جرت محاولات لتوظيف تلك العملية للتوصل إلى علاج مناعي لسرطان الثدي باستعمال الخلايا الشجيرية مع المستضد من خلايا سرطانية من نوع B-cancer (Berad *et al.*, 2004). كذلك وجد Nava وجماعته (2000) أن جمع APCs مع المستضدات و CD₄ T-cell يمكن أن يحث استجابة مناعية للخلايا القاتلة ضد الورم CD₈ mediate anti tumor response كذلك فإن اكتشاف المستضد المقترن بالورم Tumor associated Ag (TAA) أوضح أن الخلايا الورمية اللمفية خاصة يمكن أن يتعرف عليها الجهاز المناعي وأظهر كثير من البحوث والنظريات أن أغلب الأورام إن لم تكن جميعها يمكن أن تترجم وتظهر المستضد الذي يمكن أن يهاجم من قبل CTL (Renkvient *et al.*, 2001). وقد وظفت تلك العملية لتطوير اللقاحات خاصة لتلك السرطانات التي تظهر كميات من المستضدات كما يحدث في السرطان اللمفي ذات الخلايا الكبيرة plastic large cell lymphoma (Lorena *et al.*, 2002). وبعد التعرف على الخلية الهدف وقد

تكون خلية ورمية أو خلية مصابة بفايروس أو قد تكون خلايا لعضو منقول غير مطابق في نفس الجنس إذ يمكن أن تنتج خلايا cytotoxic أيضاً تسمى Cytolytic T-cell (CTLs) خاصةً تلك التي تترجم Class I MHC إذ تفرز أو تطرح perforin و granzymes و TNF وهذا يقوم بتنشيط صنع البروتين (Richard, 1999).

وقد أثبتت دراسة المجهر الالكتروني أن الخلية القاتلة CTL تأخذ مكاناً قريباً من الخلية المستهدفة (الضحية) وتتجمع الحبيبات في المنطقة القريبة المقابلة لها وتندفع باتجاهها (Henkart & Henkart, 1982)، فيطمر perforin نفسه ويتبلمر في الطبقة الدهنية لجدار الخلية ليفتح ثقباً يخرج منها سايتوبلازم الخلية، أما granzyme فهو مجموعة من استرات السيرين Serine esterase مع إنزيم nuclease يؤدي الخلية الهدف بتدمير الجزيئات الرئيسية الكبيرة في الخلية (Simon *et al.*, 1989). يفتح perforin ثقباً في الجدار البلازمي بقطر 10-20 نانومتر، هذه الفتحات غير كافية لقتل الخلية لأنه يمكنها من إصلاح العطب في الغشاء البلازمي plasma membrane حتى تتجنب التحلل الازموزي ولكن هنالك فرصة لدخول granzyme إلى الخلية وحثها على الموت المبرمج apoptosis أو تجزء الدنا DNA fragmentation أو إنتاج الأحماض الدهنية fatty acid production (Russell, 1983).

2-4-8-2- الخلايا البلعمية المنشطة activated macrophages

التحفيز الذي تتلقاه الخلايا البلعمية ناتج من الوسائط التي تطرحها الخلايا التائية المساعدة T-helper cell وفي الأغلب يكون Tumor necrosis factor (TNF) وكذلك interferon gamma (IFN γ) وعند التحفيز تصبح لها القابلية على إفراز TNF α الذي يكون ذا نشاط قاتل للخلايا الورمية Tumor cidal (Morahan *et al.*, 1988). وتؤثر TNF α بطريقتين: الأولى الارتباط المباشر مع المستقبلات السطحية surface receptor الذي يكون مفعوله سميماً للخلايا السرطانية ويقوم أيضاً على حث إنتاج الجذور الحرة free radicals التي يمكنها التسبب بقتل الخلية الورمية وعدم الإضرار بالخلية الطبيعية لان الأخيرة تستطيع إنتاج إنزيم superoxide dismutase استجابة ضد TNF α الذي يتمكن من تثبيط هذه الجذور الحرة، أما الخلايا السرطانية فتفتشل في إنتاج ذلك الإنزيم وتكون عرضة للهلاك والطريقة الثانية تقوم TNF α بنخر necrosis للخلايا السرطانية وتمكنه من مهاجمة الأورام الاحشائية vascularized tumor خاصة الأوعية الدموية vessels الذي يعمل تنخراً فيها محدثاً النخور النزفية hemorrhagic necrosis (Philip, 1997).

Antibodies الأضداد 3-4-8-2

يمكن لجسم المضيف إنتاج أضداد متخصصة ببعض الأورام كما يحدث في مرضى E.B.V associated lymphoma الذين يمتلكون أضداداً متخصصة بخلايا الورم اللمفي activating Lymphomas cells ، قد تقتل الأضداد الخلايا الورمية بتنشيط المتمم complements بأحداث ثقب pore في الخلايا أو بوساطة القتل المعتمد على وساطة الأضداد Antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) وتشارك في تلك العملية الخلايا المناعية التي تمتلك Fc receptor مثل الخلايا البلعمية وكذلك الخلايا القاتلة الطبيعية NK التي تستقبل (IgG) Fc portion of antibody الذي يطرح من قبل الخلايا البلازمية plasma cells الذي يرتبط مع المستضد على سطوح الخلايا الورمية وبتلك الحلقة قد تقتل الخلايا الورمية وقد شوهدت تلك الملاحظات بشكل واسع في المختبر ولكن هنالك أدلة قليلة لتأثير المناعة الخلطية في الأورام (Abul et al., 2003).

9-2- واسمات الأورام وأهميتها الطبية

تدعى واسمات الأورام Tumor markers في المحاضرات والاستعمالات العلمية بالمستضدات Antigens، جاءت هذه التسمية من الطرق المناعية في التحري والتشخيص لواسمات الورم، كما وأن أساس دراسة الظواهر المناعية للأورام تشترك بالواسمات (Janis., 1985)، بعض هذه الواسمات تعبير جيني في مراحل التطور الجنيني وتكون في الحقيقة مستضداً ضعيفاً لا تستطيع أن تحث في المضيف أي استجابة مناعية، كذلك هناك أنواع كثيرة من هذه الواسمات قد تختلف اختلافاً بسيطاً فيما بينها (Klavins, 1982b) و تختلف عند العلماء تقسيمات الواسمات فمنهم من يقسم هذه المواد على أساس الاستجابة المناعية للجسم المضيف ضدها (Ivan & Arther, 2000). ويمكن أن تقسم على أساس التعبير الجيني فان المستضد الذي تعبر عنه خلية سرطانية معينه (لنوع واحد من الأورام) يمكن أن يسمى Tumor specific Antigen، وقد تكون خصيصة مفردة بالأشخاص المصابين ولا يمكن للخلايا الطبيعية أن تنتج (تعبير عنه)، والثاني يمكن أن يشارك فيه أنواع من الأورام ويمكن أيضاً للخلايا الطبيعية أن تعبر عنه بكميات قليلة ومحسوبة قياسياً وتسمى Tumor associated Antigen وأفضل مثال على ذلك Oncofetal Ag (Klavins, 1982a)، ويمكن القبول بتقسيم Klavins إذ قسم Tumor marker إلى ثلاث مجموعات هي Oncofetal و Tumor specific و associated ويمكن أن تقسم كل مجموعة إلى مجموعات ثانوية Sub

divided وهي الواسمات الشاملة Universal- markers و الواسمات ذات التوزيع المحدود Tumor marker with limited distribution (Klavins, 1982b). واسمات الأورام Tumor markers موادّ بايولوجية تصنع وتطرح من خلايا سرطانية أو هي مواد يمكن أن ينتجها جسم المضيف استجابةً لنسيج سرطانيّ، ويمكن أيضاً أن تنتج في الجسم بكميات قليلة جداً ومحسوبة في بعض الأنسجة الجنينية وكذلك بعض الأنسجة الطبيعية وتوجد هذه المواد البايولوجية في الدورة الدموية وسوائل الجسم وتجويفه وغشاء الخلية أو في النواة وتختلف Tumor marker عن تلك المواد التي تنتجها خلايا الجسم الطبيعية كماً ونوعاً، ويمكن الاستفادة من تلك الواسمات بإحدى التطبيقات الآتية:-

1- الكشف عن المرض في المجموعات البشرية المعرضة لخطر الإصابة

2- تشخيص المرضى الذين يحملون أعراضاً سرطانية

3- تأشير حجم الورم

4- عامل مساعد لاختيار نوع العلاج

5- مراقبة الاستجابة للعلاج

6- مراقبة تقدم المرض

7- التشخيص المبكر لعودة المرض مرة ثانية.

(Anthony *et al.*, 2000)

2-9-1- المستضد السرطانيّ المضغّيّ (CEA) Carcinoembryonic antigen

عرف أول مره من قبل Freedman & Gold في عام (1965) على أنه مستضد ورمي متخصص Tumor specific Ag موجود في مستخلص النسيج للقناة الهضمية لمرضى السرطانة الغُدّيّة adenocarcinoma وتبين أن وجوده في الخلايا الظهارية للقناة الهضمية في الأجنة الطبيعية، وقد اشتق الاسم بوجوده في الحالات السرطانيّة وكذلك في الأجنة الطبيعية، كذلك وجوده في أنواع أخرى من السرطانات حتى في بعض الأورام الحميدة، CEA عبارة عن عائلة ضخمة من glycoproteins يظهر في سطوح الخلايا مع محدد مستضدي يظهر في الجزء البروتينيّ يحتوي poly-peptide chain مفردة حاوية على 30 حامضاً أمينياً amino acids، ينضم تحت هذه العائلة أكثر من 35 بروتين سكري ذات وزن جزيئيّ بين 160-300 كيلو دالتن الذي يتضمن من 45-57% كاربوهيدرات وتختلف نسبة وجود البروتين إلى الكاربوهيدرات لأنواع مختلفة من الأورام (Anthony *et al.*, 2000). وأمكن التحقق من وجود CEA في أنواع أخرى من الأورام مثل الثدي breast و

pancreas و hepatobiliary وكذلك في Sarcoma حتى في بعض الأورام الحميدة وفي أمراض أخرى مثل التهاب القولون التقرحيّ (Kathleen) Ulcerative colitis (& Timothy, 2001).

يمكن الاستفادة من هذا المستضد في السرطان Metastatic cancer الناتج من إصابة أولية ذات موقع غير معروف في الجسم أو في بعض الأعراض المبهمة (Hainsworth & Gerco, 2000).

ارتبط CEA عند اكتشافه مع الجهاز الهضمي خاصة القولون وهو مفيد كثيراً في هذا المرض، وإن الزيادة المعنوية الملموسة في سرطان القولون Colorectal cancer جعلته أحد Tumor marker الجيدة للمرض (Kljima et al., 2003).

ويمكن أيضاً الاستفادة من CEA بعد إجراء العمليات لإزالة الأورام في القولون إذ يمكن أن يراقب تحسن استئصال الورم بناءً على زيادة مستوى CEA في المصل لمرضى سرطان القولون بعد إجراء العملية (Sener et al., 1989).

وقد استعمل CEA في أهمية اكتشاف عودة المرض recurrent في مرضى سرطان القولون بعد الشفاء ويكون أكثر حساسية في مدى معرفة الانتشار metastasis لمرضى القولون (Beart & O'comell, 1983)، الذي غالباً ما يطلق عليها post operation follow up ومن هنا بات واضحاً أن CEA يمكن أن يترجم بكثير من الأورام غير أورام القولون كالثدي والبنكرياس والمثانة والغدة الدرقية thyroid و neurotastoma، ومن المفيد استعمال أكثر من Tumor marker مع CEA لبيان توضيح أكثر لنوع معين من الأورام كما في استخدام CEA مع CA 15-3 في سرطان الثدي (Nicolini et al., 2003). كذلك استخدم CEA منفرداً مع سرطان الثدي والاستفادة منه في التشخيص (Halter et al., 1982). كذلك في معرفة الاستجابة للعلاج medical therapy لمرضى سرطان الثدي (Palazzo et al., 1984).

2-9-2- مستضد ورم الثدي (CA 15-3) Cancer antigen 15-3

هو عبارة عن بروتين سكري مخاطي glycoprotein mucin ذي وزن جزيئي عالي يوجد في الظهارية اللبنية mammary epithelium يعرف بـ episialin (Michal et al., 2000). طورت إحدى طرائق الروز المناعي الإشعاعي RIA methods لتحقق من وجود CA 15-3 باستعمال الأضداد ضد كلايكوبروتين موجود في

Human مستخلص الأغشية لخلايا سرطان الثدي البشري أو ضد
(Kufe *et al.*, 1984) milk fat globule membrane .
يزداد مستوى CA 15-3 في حالة Metastatic breast والبنكرياس والرئة والمستقيم
وسرطان الكبد وكذلك يمكن أن يزداد في بعض الأورام الحميدة كما في الثدي والكبد، وضّحت
الكثير من الدراسات أن CA 15-3 يزداد في أقل من 33% في مرضى سرطان الثدي للمراحل
I و II (Werner *et al.*, 1993). يرتفع CA 15-3 في أكثر من 79-92% من المرضى
المصابين بسرطان الثدي المتقدم ويكون استخدامه مفيداً جداً لمعرفة تلك المرحلة ويكون
انخفاضه بسيطاً بالنسبة للعلاج الناجح ولذلك يحتاج فترة للتحقق من الهبوط الملموس للمستضد
(Tondini *et al.*, 1991). يكون مستوى CA 15-3 في مصل المريض متعلقاً بحجم الورم إذ
كلما كان كبيراً ازدادت نسبته وكذلك فإنه يكون أكثر حساسية إلى عودة المرض disease
recurrence من CEA (Safi *et al.*, 1991).
كما يمكن استعمال CA 15-3 مجتمعاً مع CEA لمراقبة العلاج لمرضى سرطان الثدي الذين
يعالجون جهازياً systemic وتكون حساسية CA 15-3 أكثر من CEA عشرين مرةً لكن
الاستعمال الثنائي يعطي توضيحاً أكثر من حيث فعالية العلاج بالنسبة للمرضى المعالجين فترات
طويلة (Alison, 2003). وقد استعمل CA 15-3 مع CEA لمراقبة المراحل المختلفة
لسرطان الثدي وكذلك أعطى الفكرة بإيقاف العلاج غير المؤثر الذي يعطي نتائج عكسية
(Soletormos *et al.*, 2004). كما يمكن استخدام CA 15-3 مع CA 125 مجتمعاً للتحري
المبكر عن عودة سرطان المبيض ovarian cancer (Litnicker *et al.*,)
(1991).

3. المواد وطرائق العمل

3-1- المحاليل المستخدمة

1- محلول عد خلايا الدم البيض WBC Count Solution المجهز من معهد المصول واللقاحات. بغداد

2- محلول دارى الفوسفات الملحيّ (PBs) Phosphate buffer solution الذي يكون ذا حامضية (7.2) pH . وحضر بإذابة الكميات القياسية التالية في 1000 مل من الماء المقطر المعقم.

NaCl .A 80 ملغم

KCl .B 0.20 ملغم

Na₂HPO₄ .C 0.15 ملغم

KH₂PO₄ .d 0.20 ملغم

3- المثبت Fixative

المحلول المستعمل هو الأسيبتون المجهز من قبل الشركة السويسرية والمستخدمة في تثبيت الخلايا اللمفية بعد عزلها

4- الكلسيرين Glycerin المجهز من معهد المصول واللقاحات. بغداد ويستخدم عند قراءة CD4 و CD8 في المجهر الفلوروسيني

3-2- الأوساط الغذائية

وسط عزل الخلايا اللمفية وقد استعمل الوسط Lymphocyte Separation medium المجهز من شركة (Irvine) Flow Lab Org. لعزل الخلايا اللمفية من الدم المحيطي للمرضى والأسوياء قيد الدراسة.

3-3- الملونات:

الصبغة البسيطة (صبغة الليشمان) وحضرت الصبغة بإذابة 0.15 ملغم من البلورات الصبغية (Leishman powder) في 133 مل من الايثانول ورجت جيداً لإذابة البلورات بعد ذلك رشحت في ورق ترشيح عادي ذو حجم (150mm φ) ملي بور مجهز في شركة (Schleicher & Schuell) الألمانية وحفظت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ثم رشحت مرة ثانية لتصبح جاهزة للاستعمال (Ramink, 1987)

3-4- الأمصال القياسية:

تم استخدام الأمصال القياسية المجهزة من قبل شركات عالمية والمجهزة على شكل عدد Kits جاهزة وكما يأتي:-

1-4-3- الخلايا التائية المساعدة CD₄:

Mouse anti-human CD4 FITC Conjugate Monoclonal Antibody

Anti-human-CD₄ Kit

مجهز من قبل شركة CHEMICON EURPE

2-4-3- الخلايا التائية القاتلة CD₈:

Mouse anti-human CD8- FITC Conjugate Monoclonal Antibody

Anti-human CD₈ Kit

مجهز من قبل شركة CHEMICON EURPE

3-4-3- المستضد السرطاني المضغّي CEA:

عبارة عن Kit مجهز من قبل شركة Institute of isotopes LTD Budapest لقياس

كمية CEA في المصل البشري.

hCEA [I¹²⁵] IRMA Kit

4-4-3- مستضد ورم الثدي CA15-3:

يكون على شكل عدة مجهزة من قبل شركة Biocheik-inc.,UK

Breast Cancer Antigen CA 15-3 Enzyme Immuno assay test Kit

Enzyme Immuno assay for Quantitative Determination of breast Cancer

Antigen 15-3 in human serum.

5-3- الأجهزة والأدوات النبيدة:

المنشأ	الشركة المجهزة	اسم الجهاز
U.K	Chilipsim	Centrifuge
Germany	Universel 16A	cooling Centrifuge
Germany	Organon techniq	ELISA

Finland	Wallk Wizard	Gamma Counter
Japan	Olympus	Light microscope
Japan	Olympus	Fluorescent microscope
Switzerland	Precisa	Sensitive balance
U.K	Gallen Kamp	pH meter
Germany	Koffer maner	Distiller
Germany	Memmert	Incubator
Germany	Mermmert	Oven
Germany	WETEG	Neubauer chamber
U.K	Oxford	Micropipette

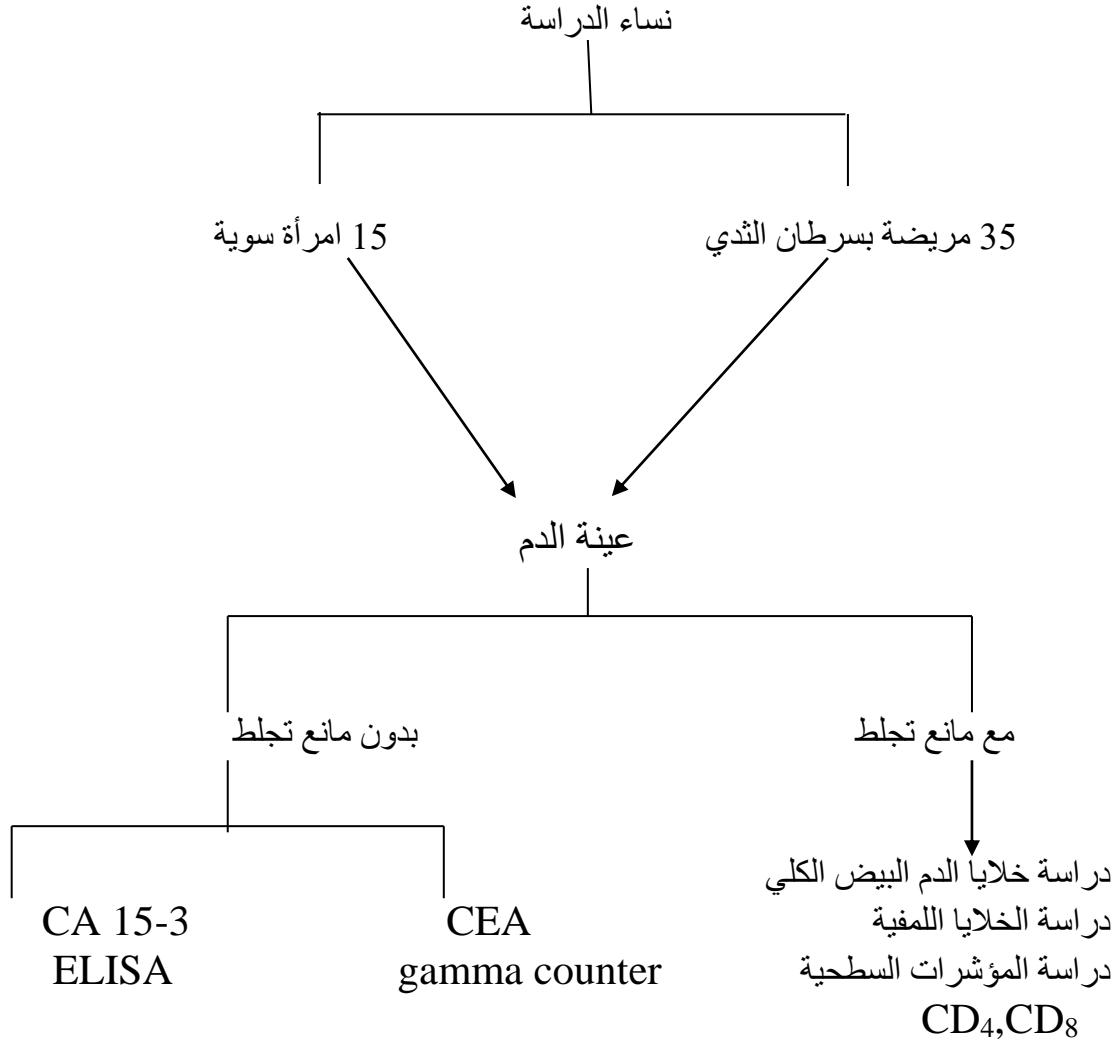
كذلك استخدم الكثير من المواد النبوذة

1. سرنجات نبيذية سعة 5 مل.
2. أنابيب بلاستيكية غير حاوية على مانعة للتخثر Plain tube.
3. أنابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر (الهيبارين).
4. أنابيب زجاجية معاملة بالسيلكون Siliconized tube.
5. ماصات قياسية.
6. ماصات باستور Pasteure pipette.
7. شرائح خاصة ذات فضاءات محددة.
8. ورق شمعي (البرافين).

6-3- المرضى Patients

كانت عينة المرضى المدروسة نساءً مصابات بسرطان الثدي من مراجعي شعبة الأورام في مستشفى الكاظمية التعليمي تتراوح أعمارهن ما بين 35-65 سنة ذات مستويات ثقافية متفاوتة يتلقون العلاج الكيماوي وفي الأغلب من نوع Tamoxifen الذي يعطى مع المحاليل القياسية مثل الكلوكوز أو المحلول الملحي. وقد شملت عينة الدراسة على 35 مريضة مصابة بسرطان الثدي و 15 مريضة غير مصابة بسرطان الثدي مجموعة سيطرة.

7-3 - منوال الدراسة :-



8-3 - جمع العينات وحفظها Specimen Collection and Storage:

جرى جمع نماذج الدم من المرضى المراجعين إلى مستشفى الكاظمية التعليمي.

- 1- جمع 5 مل من الدم المحيطي إذ استخدم 2.5 مل لغرض عزل المصل serum في أنابيب بلاستيكية نبيذه غير حاوية على مادة مانعة للتخثر plain tube واستخدمت الطريقة الروتينية لعزل المصل المتبعة بالمختبرات الطبية، إذ وزع المصل في ثلاثة أنابيب الأولى لقياس CEA والثانية لقياس CA 15-3 والثالثة للاحتياط.

ويمكن حفظ المصل لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة التلاجة 2-8 م° ويمكن حفظ المصل مدةً أطول في حالة Freezing condition ويجب تجنب تحلل الدم عند جمع النماذج وفصل المصل.

2- تم جمع 2.5 مل من الدم المحيطي في أنابيب حاوية على مادة EDTA أو الهيبارين لغرض عزل الخلايا اللمفية وكذلك عد خلايا الدم البيض الكلي و عد خلايا الدم البيض التفريقي لاستخراج عدد الخلايا اللمفية، إذ نقل 0.02 مل من الدم إلى محلول عد الخلايا البيض وحضر للعد وتم تحضير مسحات دموية على شرائح عادية لأجل عد الخلايا اللمفية بعد تصبيغها (Ramink, 1987)

9-3- طريقة تعداد الخلايا البيض الكلي Total White blood cell count

يستفاد من معرفة عدد خلايا الدم البيض في المساعدة على تشخيص الأمراض بالتوافق مع تحاليل أخرى. وتتم هذه العملية على النحو الآتي:-

- 1- أضيف 0.02 مل من الدم إلى 0.38 مل من مزيج المحلول المخفف diluting fluid الذي حضر من 1.5 مل Glacial acetic acid والذي يعمل على تحلل كريات الدم الحمراء RBC و 1 مل من ملون الجنشن بتركيز 1% aqueous solution of gentian violet والذي يعمل على تلوين أنويه الخلايا البيض، و 97.5 مل من الماء المقطر المعقم. وتم إضافة القليل من thymol لمنع نمو الفطريات.
- 2- مزج المحلول أعلاه بلطف ونقل جزء منه إلى Counting chamber بعد أن وضع cover slip على منطقة العد.
- 3- حسبت الخلايا البيض في أربعة مربعات (كل واحد حاوي على 16 مربعاً صغيراً) ومن ثم جمعت هذه المربعات بعد ذلك ضربت $\times 50$ واستخرج عدد الخلايا البيض الكلي في (cm^3) وباستعمال عدسة التكبير الصغرى low power (Ramink, 1989).

10-3- تعداد الخلايا اللمفية بالعد التفريقي Differential count

بعد أن حضرت الشرائح بالطرائق الاعتيادية المتبعة في المختبرات الطبية وذلك بوضع قطرة دم صغيرة وفرشها على الشرائح الزجاجية وصبغها بعد أن تجف بواسطة ملون الليشمان البسيط Leishman stain وتمت طريقة التصبيغ وحسب الطريقة المذكورة في (Ramink, 1987) على النحو الآتي:-

- 1- غطيت الشريحة المجهرية كاملة بواسطة الصبغة مدة دقيقتين.

- 2- خففت الصبغة بالماء المقطر مدة عشر دقائق.
- 3- تم غسل الشريحة للتخلص من الصبغة ثم تركت الشريحة لتجف
- 4- فحصت الشريحة بالعدسة الزيتية وتم عد الخلايا اللمفية بالعد التفرقي لأنواع الخلايا البيض واستخرجت النسبة المئوية للخلايا اللمفية من بين أنواع الخلايا البيض.

11-3- طرائق تعداد ودراسة CD₄ و CD₈:

1-11-3- طريقة عزل الخلايا اللمفية:

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل شركة Flow laboratories الانجليزية في عزل الخلايا اللمفية وقد تضمنت الخطوات الآتية:-

- 1- استخدمت أنابيب اختبار زجاجية معاملة مع السليكون siliconized tubes .
- 2- خففت نماذج الدم المجموعة في أنابيب heparin tube بمقدار 50:50 مع محلول الفوسفات الدارى buffer phosphate solution ذات pH_{7.2} وذلك لسرعة ترسيب RBC وتسهيل عملية تجميع Lymphocytes في أنابيب siliconized .
- 3- أضيف 2 مل من الدم على حافة الأنبوبة الحاوية على 4 مل من وسط عزل الخلايا اللمفية، وبعناية تامة حتى يمنع حدوث تمازج الدم مع الوسط، إذ تكون طبقة الدم بالأعلى والوسط للأسفل.
- 4- وضعت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي المبرد cooling centrifuge مدة 30 دقيقة في سرعة 1000 دورة /دقيقة وبدرجة 18 م°. إذ تكون الخلايا اللمفية بعد هذه العملية طبقة رمادية Grey-Colour layer موجودة بين البلازما plasma ووسط الفصل separation medium والكريات الدموية الحمر في أسفل الأنبوبة. .
- 5- سحبت الطبقة الرمادية الحاوية للخلايا اللمفية بوساطة ماصة باستور pasteur pipette ووضعت في أنبوبة اختبار وأضيف إليها P.B.S في الأقل ثلاثة أضعاف.
- 6- وضعت الأنابيب مرة أخرى في جهاز الطرد المركزي Centrifuge في سرعة 1000 دورة/دقيقة مدة 10-15 دقيقة لغرض غسلها.
- 7- طرح الراشح وأعيدت الفقرة السابقة على الأقل مرتين لتصبح الخلايا المغسولة جاهزة للحفظ أو التصبيغ.
- 8- وضعت الخلايا (الموجودة في الراشب بعد الغسل) على شريحة خاصة حاوية لفضاءات تستعمل للقراءة في المجهر الوامض.

- 9- حضرت شريحة لقراءة CD₄ وشريحة أخرى لقراءة CD₈، إذ تم وضع 10 µ من الخلايا المحضرة في الفضاءات.
- 10- جففت الشرائح بدرجة حرارة الغرفة وتم معاملتها مباشرة مع الصبغة الفلورسينية المباشرة و حضرت للقراءة أو تثبتت الخلايا fixative بوساطة محلول الأسيتون وذلك بوضع 10 µ من الأسيتون على كل فضاء وتركت لتجف لغرض حفظها.
- بعد تلاشي الأسيتون تكون الشريحة جاهزةً للخرن إذ تلف برفق بوساطة ورق البرافين paraffin paper وحفظت deep freezing بدرجة -20 م لحين الحاجة إليها.

3-11-2- طريقة عد الخلايا اللمفية المساعدة (T. Helper cells)

باستخدام mouse Anti-Human CD₄ FITC conjugate monoclonal Ab Kit تم التعرف على CD₄ بوساطة الصبغة الفلورسينية المباشرة direct immuno fluorescence staining واستخدمت الطريقة المعتمدة من قبل شركة Chemicon international الألمانية في صبغ وتعداد Lymphocyte CD₄ وذلك على النحو الآتي:-

- 1- غسلت الشرائح المحضرة التي حضنت بدرجة حرارة الغرفة وتم استعمالها مع الصبغة الفلورسينية وهذه الشرائح الحاوية للخلايا اللمفية بمحلول PBS لإزالة آثار Fixative وكذلك لتنشيطها.
- 2- أضيف 10 µ من Mouse Anti-Human CD₄ وهو عبارة عن ضد وحيد النسيلة monoclonal Antibody يتفاعل مع المستضد السطحي اللمفي lymphocyte-surface Antigen الذي يعود إلى CD₄ والذي يعمل مستقبلاً إلى MHC class II.
- 3- حضنت الشرائح بدرجة حرارة 37 م مدة ساعتين في أطباق زرع حاوية لقطن مبلل لمنع جفاف الشرائح.
- 4- غسلت الشرائح بمحلول PBS برفق و حضرت للقراءة بالمجهر الفلورسيني fluorescence microscope وتم تفريق CD₄ عن باقي الخلايا اللمفية حسب اللون (البريق) الناتج من تفاعل الصبغة مع CD₄ markers الموجود على نوع الخلايا بعينه.

3-11-3- طريقة عد الخلايا اللمفية السمية (T. Cytotoxic cells)

باستخدام Mouse Anti-Human CD₈ FITC conjugate monoclonal Ab Kit
يمكن التعرف المباشر على CD₈ بوساطة الصبغة الفلورسينية وتمت العملية بنفس خطوات تحضير وصبغ CD₄ ولكن باستعمال Mouse anti-human CD₈ وأيضا باستخدام الطريقة المتبعة من قبل شركة Chemicon international الألمانية.
في كلتا الحالتين احتوى المحلول المجهز على الصبغة الفلورسينية fluorescent
isothiocyanate (FITC) ، بشكلها الكيماويّ الفلورسينيّ التي ترتبط تساهمياً مع البروتين في الوسط القاعديّ الذي يكون امتصاص الصبغة الأعلى في طول موجيّ 490-495 نانومتر وينبعث عنها لون أخضر، تتفاعل الأضداد وحيدة النسيلة الموجودة في الصبغة مع المستضد الموجود على سطح الخلية اللمفية أكان المساعدة CD₄ أو القاتلة CD₈ إذ في الصبغة الخاصة CD₄ هنالك أضداد وحيدة النسيلة تتفاعل مع المستضد Ag الموجود على سطح الخلية فقط الحاوية لذلك المستضد. وهكذا في حالة CD₈ فإن الصبغة حاوية لأضداد وحيدة النسيلة خاصة ترتبط مع المستضدات الموجودة على سطح CD₈ فقط إذ يمكن تمييزها بسهولة دون غيرها لألفة الارتباط بين الاثنين وخصوصيته وهذا الارتباط التساهميّ يمكن أن يبعث لونها غالباً ما يكون أخضر في الحالتين يمكن أن يميز الخلايا دون غيرها.

12-3- دراسة المستضد السرطاني المضغي Human Carcinoembryonic Antigen determination (hCEA (I¹²⁵) IRMA kit

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل شركة IZO top الهنغارية لدراسة المستضد الجينيّ الورميّ. من خلال التفاوت بين النسب الطبيعية الواطنة وغير الطبيعية العالية أثبت نظام hCEA (I¹²⁵) IRMA قدرته في تحديد كمية المستضد في مصل الدم البشريّ.

1-12-3- الأساس العمليّ للطريقة Principle of method

تعتمد التقنية المستخدمة (IRMA) immuno radiometric assay على الألفة العالية لاتحاد نوعين من monoclonal Antibody مع CEA إذ يرتبط ¹²⁵I labeled signal
Antibody إلى epitope خاصّ به يختلف عن ذلك الذي يرتبط به biotin-capture Ab النوعان من Ab يتفاعل مع المستضد Ag الموجود في samples أو standards الذي يشير أيضاً إلى تكوين sandwich أو (المعقد المناعيّ) الذي هو عبارة عن

(Capture Ab-Ag-Signal complex) يتفاعل خلال ساعتين من الحضان مع الاهتزاز مع surface streptavidin coated test بعد طرح مواد التفاعل وغسلها يبقى ما تفاعل ملتصقاً بالأنايب الذي يمكن أن تقاس قيمة التفاعل بعد ذلك في جهاز gamma counter من خلال الفعالية الإشعاعية radio activity للمستضد مع المواد المتفاعلة معه بنتائج رقمية.

2-12-3- طريقة العمل Assay procedure

حضر مصل الدم للعينة تحت البحث بالطرائق الاعتيادية المتبعة في المختبرات العامة. ويمكن حفظ المصل بدرجة حرارة 2-8 م° لمدة 24 ساعة أو يمكن حفظه بالتجميد -20 م° لفترات أطول على أن لا يكون نموذج الدم متحلاً ويكون المصل غير رائق ويجب تجنب إذابة النموذج وإرجاع تجميده مرات عديدة وعندما تكون العينة بدرجة حرارة أعلى من تراكيز جميع standards يجب تخفيفه وإعادة فحصه.

- 1- تم رفع درجة حرارة المصل والمحاليل إلى درجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال.
- 2- رجت المحاليل والمصل بلطف لتجنب الرغوة
- 3- علم اثنان من الأنايب للسيطرة control واثنان لـ standard لكل تركيز وكذلك لنماذج الاختبار الأخرى.
- 4- أخذ 50 µ من standard و control و samples بواسطة automatic pipette مع تجنب ملامسة قعر أنبوبة الاختبار مع pipette tips
- 5- أضيف مقدار 200 µ من tracer solution لكل الأنايب
- 6- ختمت الأنايب بواسطة plastic foil ووضع rack الحاوي للأنايب في shaker plate وحضن مدة ساعتين مع الرج بدرجة حرارة الغرفة.
- 7- غسلت الأنايب بواسطة diluted wash buffer بمقدار 2 مل لكل أنبوبة اختبار بعد ذلك طرح المحلول وقلبت الأنايب على ورق ترشيح مدة دقيقتين.
- 8- كررت عملية الغسل ثلاث مرات أخرى.
- 9- قرأة النماذج جميعاً بجهاز gamma counter مدة 60 ثانية لكل نموذج
- 10- سجلت النتائج المتوقعة expected values نسبة مئوية للناس الأصحاء أكثر من 95% يكون أقل من 3.0 ng/ml أما بالنسبة للأصحاء المدخنين فتكون أقل من 5.0 ng/ml.

13-3- دراسة مستضد ورم الثدي Breast Cancer Antigen 15-3

Enzyme Immuno Assay for the Quantative Determination of Breast Cancer Antigen CA 15-3 in Human Serum

3-13-1- جمع النماذج وتحضيرها Specimen collection and Preparation

جمع الدم الوريدي وفصل المصل بالطرائق المختبرية الاعتيادية بدون أية إضافات.

3-13-2- الأساس العملي للاختبار Principle of the test

The CA 15-3 test in ELISA based on the principle of solid phase enzyme-linked immunosorbent assay

نظام القياس هذا يستعمل الأضداد وحيدة النسيلة monoclonal Antibody ضد محدد مستضدي antigenic determinate موجود على جزيئة CA 15-3 Ag مستعملاً solid phase immobilization الموجود في micro titer wells.

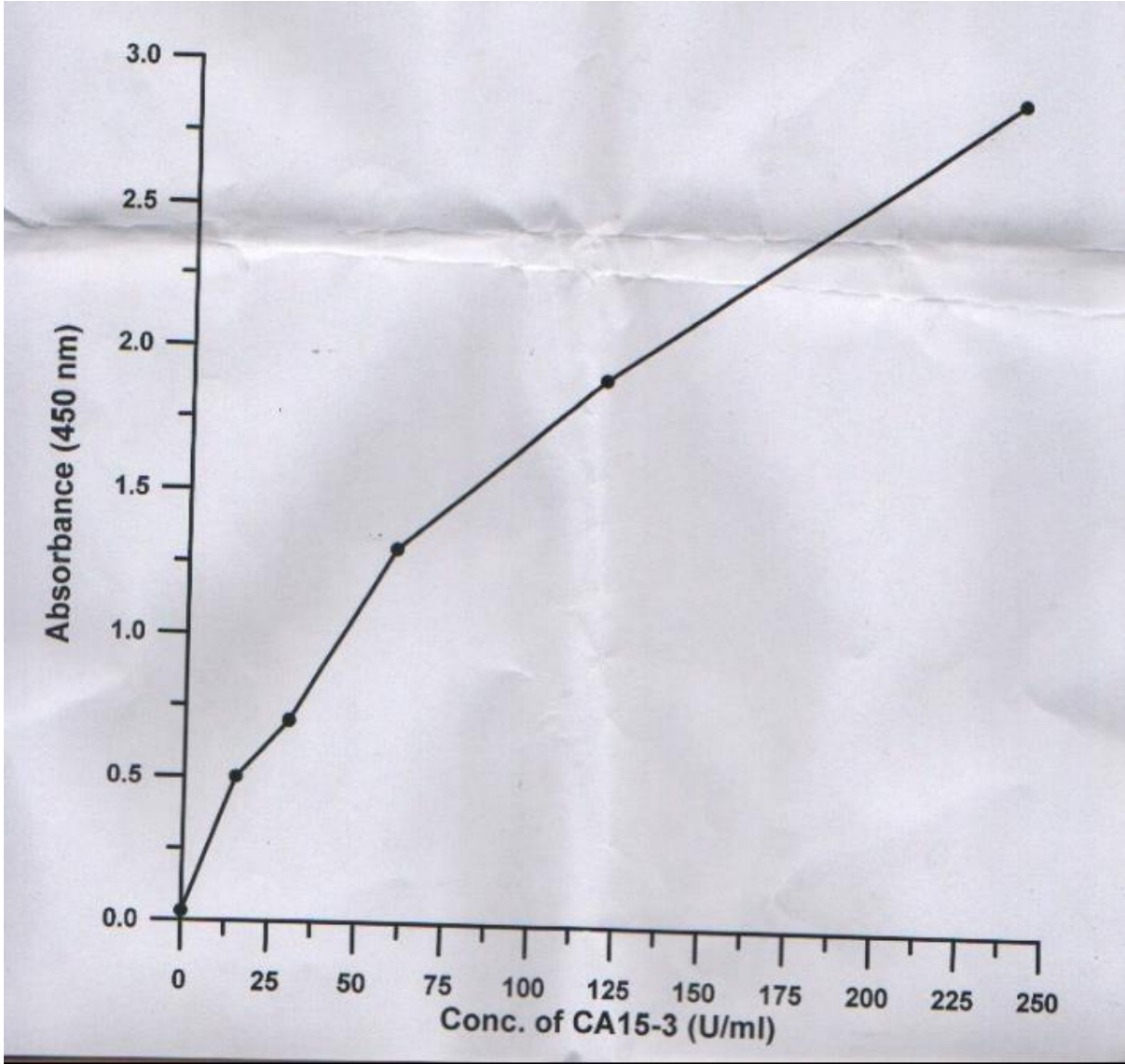
يتحد Anti-CA 15-3 antibody المأخوذ من الأرانب مع horseradish peroxidase (HRP) في محلول conjugate solution الذي هو بالأصل عبارة عن Ab-enzyme conjugate بإضافة النماذج يحدث تفاعل يؤدي إلى تكوين المعقد (sandwiched) الذي يكون بين جزيئة مستضد ورم الثدي CA 15-3 ونوعين من الأضداد الذين يكونان عبارة عن الطور الصلب solid phase والإنزيم enzyme المرتبط (solid phase and enzyme-linked antibody). وبعد الحضانة مدة ساعتين بدرجة 37 م وإزالة المعلم غير المرتبط (المتفاعل) يظهر اللون TMB reagent الذي يتطور إلى اللون الأزرق بالحضانة. والذي يمكن قراءته من خلال الامتصاص Absorbance في جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer على طول موجي 450 نانومتر محددين قيمة المستضد في النماذج.

3-13-3- طريقة العمل

1- بعد أن أخذت نماذج المصول والمحاليل درجة حرارة الغرفة 18-25 م خففت النماذج إلى 51 مرة وذلك بأخذ 20 مايكرو لتر من المصل وخفف في 1 مل من sample diluent
2- أخذ في حفر الصفيحة 200 Plate Wells مايكرو لتر من النماذج المخففة ونماذج المستضد القياسية CA 15-3 standard وكذلك نماذج السيطرة المخففة diluted control المحضر سابقاً.

3- مزجت النماذج كلاً على حده مدة 10 ثوانٍ وحضنت مدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 م

- 4- تم إزالة المحاليل المحضنة من الحفر.
- 5- غسلت الصفيحة خمس مرات بالماء المقطر المعقم للتخلص من بقايا المحاليل العالقة.
- 6- تم إزالة ما تبقى من ماء وذلك بقلب الصفيحة بحده على ورق ترشيح للتخلص من بقايا الماء.
- 7- أضيف 200 مايكرو لتر من Enzyme conjugate reagent ومزجت بلطف مدة 10 ثوانٍ.
- 8- حضنت النماذج مدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 37 م°.
- 9- تم إزالة محتويات الحفر wells وغسلت النماذج خمس مرات أخرى.
- 10- أضيف 100 مايكرو لتر من TMB reagent لكل حفرة well ومزجت بلطف وحضن plate بدرجة حرارة الغرفة مدة 20 دقيقة.
- 11- تم إيقاف التفاعل بإضافة 100 مايكرو لتر من stop solution لكل well ومزجت بلطف لمدة نصف دقيقة مع ملاحظة تغير اللون الأزرق إلى الأصفر.
- 12- تم قراءة أفضل كثافة optimal density على طول موجي 450 نانو متر في 15 دقيقة بجهاز microtiter plate reader
- 13- حسبت النتائج بعمل منحي للمحور السيني والصادي يكون أحدهما تركيز مستضد ورم الثديي concentration of CA15-3 وقيمه U/ml والأخر امتصاص الضد Ab Absorbance المقاس عن 450 نانو متر وضبطت النتائج على منحي لاستخراج قيم النماذج samples ثم بوبت النتائج في جدول تمثل قيم المستضد CA15-3.



Stander curve

14-3- السيطرة النوعية للمستضد السرطاني المضغي ومستضد ورم الثدي

بعد أن تم الحصول على نتائج كلا المستضدين CEA و CA15-3 جرى التحقق من مدى حساسية وخصوصية المعدات والاختبارات وحسب نظرية Predictive Value theory (Daniel et al., 1987) إذ تم حساب النتيجة الحقيقية (فوق المعدل الطبيعي) والكاذبة (ضمن المدى الطبيعي) بالنسبة إلى 15 عينة دم من المرضى لكلا المستضدين والنتيجة

الحقيقية (ضمن المدى الطبيعي) والكاذبة (فوق المدى الطبيعي) بالنسبة لمجموعة الأسوياء، وحسبت قيمة التنبؤ الموجبة Positive Predictive Value وهي نسبة النتائج غير الطبيعية التي تمثل وجود المرض وكذلك قيمة التنبؤ الكاذبة وهي نسبة النتائج الطبيعية التي تمثل غياب المرض حسب النظرية أعلاه وبعد ذلك تم حساب الحساسية Sensitivity وهي نسبة القيم الموجبة الحقيقية True Positive للمرضى إلى مجموع المرضى Total Present والخصوصية Specificity وهي نسبة القيم السالبة الحقيقية للأسوياء True Negative إلى مجموع الأسوياء Total Absent حسب المعادلات الآتية:-

$$\text{قيمة التنبؤ الموجب} = \frac{\text{النتائج الحقيقية الموجبة}}{\text{مجموع النتائج الموجبة}}$$

$$\text{قيمة التنبؤ السالب} = \frac{\text{النتائج الحقيقية السالبة}}{\text{مجموع النتائج السالبة}}$$

$$\text{الحساسية} = \frac{\text{النتائج الحقيقية الموجبة}}{\text{مجموع المرضى}}$$

$$\text{الخصوصية} = \frac{\text{النتائج الحقيقية السالبة}}{\text{مجموع الأسوياء}}$$

حللت نتائج التجارب باستخدام اختبار t- test وتم الاستعانة بجدول النسب المثلثية عند مستوى احتمالية (0.05) N.S.P وتبين بأنه ليس هنالك فروقات معنوية لعدم وجود انحراف معياري لقيمتي (t) المحسوبة والجدولية (الراوي وخلف الله، 2000).

4- النتائج

4-1- دراسة التعداد الكلي لخلايا الدم البيض والخلايا اللمفية

جرى دراسة التعداد الكلي للخلايا البيض والخلايا اللمفية وكان متوسط أعدادها 5475 و1703 خلية/مل على التوالي (الجدول 1). وتجدر الإشارة إلى أن هناك اختلافات فردية غير معنوية في هذه التعدادات كما بينه قيمة المدى لكل منهما.

4-1-1: التعداد الكلي في المريضات

الجدول (1): تعداد الخلايا البيض والخلايا اللمفية الكلي في مريضات ورم الثدي.

Lymphocytes	Total WBCs	ت
1798	6200	1
2210	8500	2
1980	6000	3
1280	4000	4
1230	3800	5
1470	4200	6
2340	6500	7
1540	5500	8
1485	4500	9
1500	5000	10
1720	5400	11
1218	4200	12
1320	4000	13
1440	4500	14
1445	4250	15
1680	6000	16
1922	6200	17
1920	6400	18
1750	5000	19
1500	5000	20
1248	5200	21
1440	4500	22
1134	4200	23
1450	5000	24
1680	6000	25
2280	6000	26
1650	5000	27
1430	6500	28
1204	4300	29
2700	7600	30
1650	5500	31
2145	6000	32
1488	4800	33
2640	8000	34
2720	8000	35
1703 c/ml	5475 c/ml	المعدل
1540	5200	الوسيط
2720-1134	8500-3800	المدى

الطبيعي لـ

WBC طبيعي لـ Lymphocytes من 1000-7600 4000 خلية/مل (Marshall et al., 2003)

11000

المدى

الطبيعي لـ

-4000

خلية/مل

التعداد

النساء

2-1-4:

الكلي في

السويات

تم دراسة فحوصات تعداد الخلايا البيض الكلي في النساء السويات وكان معدل الخلايا البيض 7413 خلية/مل كذلك أمكن إجراء التعداد الكلي للخلايا اللمفية وكان المعدل 2379 خلية/مل والمدى 3200-1440 (الجدول 2).

الجدول (2): تعداد الخلايا البيض والخلايا اللمفية الكلي في السويات (مجموعة السيطرة).

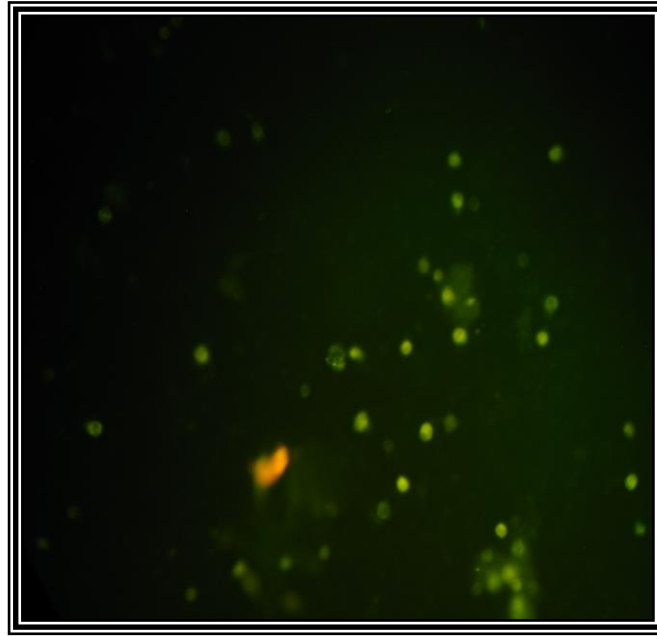
Lymphocytes	Total WBCs	ت
2625	7500	1
2100	7500	2
2550	8500	3
2560	8000	4
1875	7500	5
2015	6500	6
3120	8000	7
2970	9000	8
2600	6500	9
2300	7000	10
3200	8200	11
1540	8500	12
1820	7000	13
2975	8500	14
1440	6000	15
2379	7413	المعدل
2390	7500	الوسيط
3200-1440	9000-6000	المدى

المدى الطبيعي لـ WBC من 4000-11000 خلية/مل
المدى الطبيعي لـ Lymphocytes من 1000-4000 خلية/مل (marshall *et al.*, 2003)

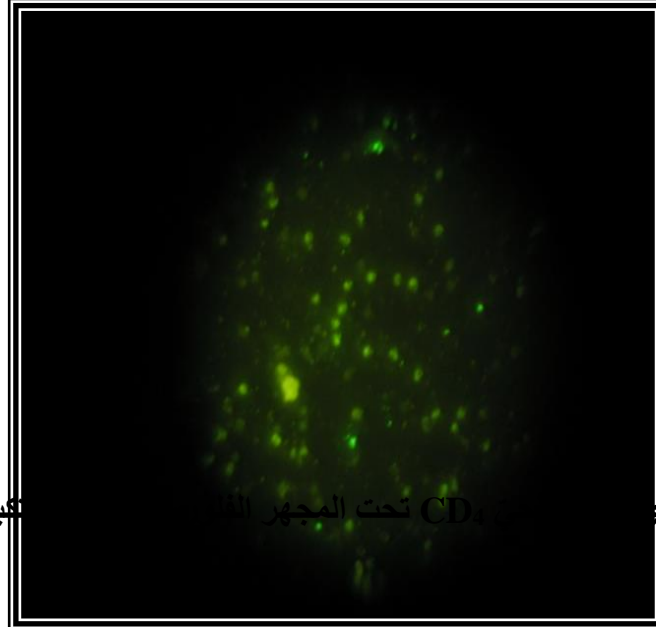
4-2- دراسة المؤشرات السطحية للخلايا اللمفية الثانية:

4-2-1: المؤشرات في النساء المرضيات

أمكن التحري عن المؤشرات السطحية CD_4 و CD_8 وتم الحصول على صورة من خلال المجهر الفلورسسيني لكل من المؤشرين السطحيين CD_4 و CD_8 كما هو مبين في (الصورة 1 و 2). وتبين أن معدل CD_4 هو 732 خلية/مل ومعدل CD_8 529 خلية/مل (الجدول 3).



الصورة (1) المؤشر السطحي CD₈ تحت المجهر الفلورسيني، قوة التكبير 400X



المؤشر السطحي CD₈ في الثدي.
400X تكبيرات

الصور (3): المؤشر السطحي CD₄ مريضات ورم

CD ₈	CD ₄	ت
611	737	1
795	861	2
495	1069	3
409	641	4
356	500	5
396	735	6
819	889	7
492	631	8
504	697	9
465	735	10
639	768	11
353	572	12
435	554	13
460	518	14
462	505	15
487	705	16
538	980	17
595	633	18
525	665	19
480	615	20
386	561	21
403	734	22
306	476	23
449	638	24

474	638	25
638	934	26
528	792	27
414	729	28
383	481	29
918	1242	30
528	594	31
600	1072	32
446	654	33
924	1003	34
816	1080	35
529.4	732.514	المعدل
487	697	الوسيط
924-306	1242-476	المدى

2-2-4: المؤشرات السطحية في النساء السويات
 تم دراسة نفس المدعى الطبيعي لـ CD₄ من 1500-600 خلية/مل (السيطرة) إذ كانت المؤشرات السطحية CD₄
 بمدى الطبيعي لـ CD₈ من 300-1000 خلية/مل (Kathleen & Timothy, 2001) (الجدول 4).

الجدول (4): المؤشرات السطحية CD₄ و CD₈ في السويات.

ت	CD ₄	CD ₈
1	1050	787
2	798	588
3	1326	663
4	1254	793
5	806	506
6	967	584
7	1684	729

846	1518	8
832	1404	9
642	1118	10
1082	1279	11
446	646	12
546	837	13
925	1338	14
475	633	15
696.266	1110.533	المعدل
663	1118	الوسيط
1082-446	1684-633	المدى

المدى الطبيعي لـ CD₄ من 1500-600 خلية/مل
المدى الطبيعي لـ CD₈ من 1000-300 خلية/مل

3-4: نسب المؤشرات السطحية CD₈ / CD₄ في الخلايا اللمفية الثانية 1-3-4: النساء المريضات

تم استخراج نسبة المؤشر السطحي CD₄ إلى المؤشر السطحي CD₈ في مريضات ورم الثدي كلاً على حدة وكانت النسبة أكبر من واحد (<1) واستخراج النسبة بين المؤشرين مجتمعةً وتبين أن النسبة أكبر من واحد (<1) وكانت هذه النسبة طبيعية (الجدول 5).

الجدول (5): نسبة المؤشر السطحي CD₄ إلى نسبة المؤشر السطحي CD₈ في مريضات ورم الثدي للأفراد مجتمعاً بالمعدل.

ت	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈
1	737	611	1.206
2	861	795	1.0830
3	1069	495	2.159
4	614	409	1.501
5	500	356	1.404
6	735	396	1.856
7	889	819	1.085
8	631	492	1.282
9	697	504	1.382
10	735	465	1.580
11	768	639	1.201
12	572	353	1.620

1.273	435	554	13
1.126	460	518	14
1.093	462	505	15
1.350	7691	10385	مجتمعة

4-3-2: النساء السويات

جرى دراسة نسبة المؤشر السطحي CD₄ إلى المؤشر السطحي CD₈ في السويات للأفراد كلاً على حدة وكانت النسبة أكبر من واحد (<1) وأمكن التحقق من النسبة بين المؤشرين مجتمعاً وتبين أن النسبة أيضاً أكبر من واحد (<1) (الجدول 6).

الجدول (6): نسبة المؤشر السطحي CD₄ إلى نسبة المؤشر السطحي CD₈ في السويات للأفراد مجتمعاً بالمعدل.

ت	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈
1	1050	787	1.334
2	798	588	1.357
3	1326	663	2.0
4	1254	793	1.581
5	806	506	1.592
6	967	584	1.655
7	1684	729	2.310
8	1518	846	1.794
9	1404	832	1.687
10	1118	642	1.741
11	1279	1082	1.182
12	646	446	1.448
13	837	546	1.532
14	1338	925	1.446
15	633	475	1.332
مجتمعة	16658	10444	1.544

4-4: المعالم الإحصائية

4-4-1: المعالم الإحصائية للفروق بين المريضات والسويات في تعداد الخلايا والمؤشرات السطحية

جرى احتساب معدلات الخلايا البيض والمؤشرات السطحية للمريضات والسويات. وتم كذلك احتساب الخطأ المعياري والانحراف المعياري بعد ذلك قورنت المعدلات والخطأ المعياري لكل هؤلاء المريضات والسويات حيث أظهرت النتائج أن هنالك فرقاً غير معنوي N.S $p > 0.05$ في أعداد الخلايا البيض الكلي مقارنة مع السويات، كذلك أظهرت النتائج أن هنالك فرقاً غير معنوي N.S $p > 0.05$ من خلال احتساب معدلات الخلايا اللمفية والخطأ المعياري والانحراف المعياري للمريضات مقارنة بالسويات. كما تم احتساب المعالم الإحصائية بالنسبة للمؤشرات السطحية CD₄ و CD₈ على التوالي حيث تبين أن هنالك فرقاً غير معنوي N.S $p > 0.05$ ، كما هو في النتائج الظاهرة لدينا. جرى احتساب التباين في معدلات الخلايا البيض والمؤشرات السطحية للنساء السويات ومريضات ورم الثدي، حيث أظهرت النتائج أن هنالك فرقاً غير معنوي N.S $p > 0.05$ بين النتائج على التوالي بين المجموعتين (الجدول 7).

الجدول (7): المعالم الإحصائية للفروق بين المريضات والسويات في تعداد الخلايا والمؤشرات السطحية.

				95% confidence interval of the difference		t	df	Sig (2 tailed)
	Mean	St. Deviation	St. Error Mean	Lower	Upper			
Pair1 WBC1-WBC2	25500000	1712.0372	442.0461	1601.9054	3498.0946	5.769	14	.000
Pair2 Lymph1-Lymph2	791.0667	519.2814	134.0779	503.4982	1078.6351	5.900	14	.000
Pair3 (CD4)1-(CD4)2	416.4000	291.6925	75.3147	254.8661	577.9339	5.529	14	.000
Pair4 (CD8)1-(CD8)2	183.5333	190.4925	49.1850	78.0421	289.0246	3.731	14	.002

Pair1: WBC1: كريات الدم البيض للمريضات WBC2 : كريات الدم البيض للسويات
 Pair2: Lymph1: الخلايا اللمفية للمريضات Lymph2 : الخلايا اللمفية للسويات
 Pair3: (CD4)1: المؤشر السطحي للمريضات (CD4)2 : المؤشر السطحي للسويات
 Pair4: (CD8)1: المؤشر السطحي للمريضات (CD8)2 : المؤشر السطحي للسويات

5-4: دراسة واسمات الورم

5-4-1: دراسة المستضد السرطاني المضغي ومستضد ورم الثدي في مريضات ورم الثدي
 هناك العديد من واسمات الأورام وتكون طبيعة أغلبها مواد مستضدية أو مواد ممنعة. جرى اختبار المستضد السرطاني المضغي ومستضد ورم الثدي بهذه الدراسة وكانت معدلات قيم المستضد السرطاني المضغي في المريضات 283.6-0.73 ng/ml ومعدلات مستضد ورم

الفصل الرابع النتائج

الثدي في المريضات 145-10 U/ml . وتبين أن هناك مدى للاختلافات الفردية بين المريضات لكل من المستضدين CEA وCA15-3 على التوالي ممثلة بالمدى كما في جدول 8
الجدول (8): المستضد السرطاني المضعي ومستضد ورم الثدي في مريضات ورم الثدي.

CA15-3	CEA	ت
20	1.4	1
14	0.73	2
70	137.2	3
39	5.8	4
12.5	0.79	5
145	283.6	6
10	1.1	7
30	1.95	8
19	2.7	9
17	2.36	10
16	1.4	11
61	5.5	12
30	3.3	13
137	203.9	14
17	1.35	15
37	1.7	16
63	5.2	17
12.5	2.5	18
12	1.6	19
15.5	1.9	20
62	14	21
13	1.7	22
13.5	1.3	23
12	1.9	24
62	2.4	25
12	2	26
12	1.4	27
18	3.1	28
19	6.4	29
13	2.2	30
10	1.3	31
18	3.2	32
62	8.1	33
16	2.5	34
25	1.6	35
32.71	20.54	المعدل
18	2.2	الوسيط
145-10	283.6-0.73	المدى

4-5-2- دراسة المستضد السرطاني المضعي ومستضد ورم الثدي في السويات
المدى الطبيعي لـ CEA أقل من 3 ng/ml في الأصحاء وأقل من 5 ng/ml في المدخنين وكانت
جيري جانتار المستضد السرطاني المضعي ومستضد ورم الثدي بهذه الدراسة وكانت
المدى الطبيعي لـ CA15-3 من 35-5 U/ml (Anthony et al., 2000) ومعدلات مستضد ورم
معدلات قيم المستضد السرطاني المضعي في السويات 2.5-0.8 ng/ml ومعدلات مستضد ورم
الثدي في السويات 31-9 U/ml.

الجدول (9): المستضد السرطاني المضعي ومستضد ورم الثدي في السويات.

CA15-3 (U/ml)	CEA (ng/ml)	ت
9	0.8	1

10	0.88	2
31	2.12	3
16	0.92	4
13	0.98	5
16	1.3	6
29	2.5	7
15	0.8	8
16	1	9
19	1.4	10
12	1.9	11
12	2.1	12
9	1.6	13
15	1.1	14
10	1.3	15
15.46	1.38	المعدل
15	1.3	الوسيط
31-9	2.5-0.8	المدى

المدى الطبيعي لـ CEA أقل من 3 ng/ml في الأصحاء وأقل من 5 ng/ml في المدخنين
المدى الطبيعي لـ CA15-3 من 35-5 U/ml

4-6: السيطرة النوعية Quality Control

الدراسة المناعية شأنها شأن الدراسات الكيموحيوية والفلسجية عندما يتطلب استخدام اختبار معين ينظر في تطبيق الاختبار لمعرفة مدى تخصصه ومدى حساسيته بمؤشري التخصص والحساسية. وهناك معادلات خاصة مشار إليها في الطرائق والمواد تم تطبيقها لمعرفة مدى دقة هذه العدد في تشخيص الورم.

وفي هذه الدراسة جرى التحقق من جدوى استخدام المستضد السرطاني المضغّي ومستضد ورم الثدي في تشخيص ورم الثدي إذ كانت قيمة التنبؤ الموجب وقيمة التنبؤ السالب للمريضات (وقد أخذت 15 نتيجة عشوائياً) والسويات 1 و 0.6 على التوالي في حين كان مؤشر الحساسية ومؤشر التخصص للمريضات والسويات 0.3 و 1 على التوالي حسب نظرية Predictive Value Theory (الجدول 10 و 11).

الجدول (10): السيطرة النوعية لمستضد السرطاني المضغّي CE Antigen.

Total status	Disease status		Total
	Present	Absent	
Positive	5	Zero	5

	True positive	False positive	
Negative	10	15	25
	False negative	True negative	
Total	15	15	30

$$\text{Positive Predictive Value} = \frac{\text{True Positive}}{\text{Total Positive}} = 5/5=1$$

$$\text{Negative Predictive Value} = \frac{\text{True Negative}}{\text{Total Negative}} = 15/25= 0.6$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True Positive}}{\text{Total Present}} = 5/15= 0.3$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True Negative}}{\text{Total Absent}} = 15/15= 1$$

الجدول (11): السيطرة النوعية لمستضد ورم الثدي CA15-3.

Total status	Disease status		Total
	Present	Absent	
Positive	5 True positive	Zero False positive	5
Negative	10 False negative	15 True negative	25
Total	15	15	30

$$\text{Positive Predictive Value} = \frac{\text{True Positive}}{\text{Total Positive}} = 5/5=1$$

$$\text{Negative Predictive Value} = \frac{\text{True Negative}}{\text{Total Negative}} = 15/25= 0.6$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True Positive}}{\text{Total Present}} = 5/15= 0.3$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True Negative}}{\text{Total Absent}} = 15/15 = 1$$

5- المناقشة Discussion

1-5- خلايا الدم البيض

تشكل خلايا الدم البيض في الأسوياء عناصر المناعة العفوية (الطبيعية) في حين تعد هذه الخلايا في المرضى عناصر مهمة في المناعة المكتسبة، وتقسّم الخلايا البيض من الناحية الوظيفية إلى خلايا بيض بلعمية غير متخصصة أحادية الأنوية غير محببة ومتعددة الأنوية محببة وخلايا لمفية متخصصة منها ما ينتج الأضداد ومنها ما ينتج الساييتوكاين (cytokine) (Ivan & Arther, 2000). يعدّ تعداد الخلايا البيض مؤشراً للصحة والمرض ويكون التعداد الطبيعيّ للأسوياء $4-11 \times 10^3$ خلية/مل دونه تعدّ حالة مرضية تعرف بقلة الخلايا البيض Leucopenia وتكون أقل من 4×10^3 خلية/مل أما إذا كانت أكثر من 11000 خلية/مل فتعرف بزيادة الخلايا البيض Leucocytosis وتعدّ كل من Leucopenia و Leucocytosis حالات مرضية، وتمثّل زيادة الخلايا البيض مؤشراً للالتهاب والنخر والكدم والأورام الدموية والأورام الصلبة في الأنسجة وتتأثّر زيادة الخلايا البيض في الغالب بالأورام من زيادة العدلات وزيادة اللمفاويات كما في أورام الخلايا الدموية والأورام الصلبة في الأنسجة ولا يرافق زيادة ملحوظة في تعداد الخلايا البيض الكلية حالات السرطانات ذات القابلية على إخفاء مستضداتها أو قد يحدث انخفاض واضح في تعداد الخلايا البيض في الأورام التي تعالج بالأشعة أو بالعلاج الكيماويّ (الذي يعمل على إيقاف أو كبح نمو الخلايا السرطانية من خلال التأثير على الفعالية الأيضية للخلايا السرطانية) (Sporn & Lippmans, 2000) بعدها تعود لمعدلاتها السوية عند إيقاف العلاج وهذا ينطبق في حالة المرضى قيد الدراسة إذ كانت نتائج التعداد بين 3800 و 8000 خلية/مل (الجدول 1) وأظهرت أغلب نتائج هذه الدراسة أدنى مستويات الحدود الطبيعية وذلك يعزى إلى العلاج بـ Tomaxifen الذي يؤدي إلى قلة الخلايا البيض (George, 1992).

2-5- تعداد الخلايا اللمفية

الخلايا اللمفية هي المكون الخلوي المناعيّ التي تساعد الخلايا البلعمية Phagocytes في الدفاع عن الجسم، وأصلها كباقي مكونات الدم من الخلايا الجذعية Pluripotents في نقي العظم ويمكن أن تقسم إلى نوعين الخلايا التائية T-cell وتكون أهميتها في المناعة الخلوية cellular immunity والخلايا البائية المتخصصة بالمناعة الخلوية humoral immunity المسؤولة عن إنتاج الأضداد وتكون نسبة الخلايا اللمفية ما بين 20-40% من مجموع النسبة المئوية للخلايا البيض في العد التفريقي (Marshell, 2003)، يصل عدد الخلايا اللمفية الكلي ما بين

1000-4000 خلية/مل وعندما تزيد تلك النسبة يحصل مرض زيادة اللمفاويات lymphocytosis كما يحدث في الأمراض الفايروسية كالحصبة measles والنكاف mumps وعندما تزيد الخلايا اللمفية أكثر من 10000 خلية/مل في العد الكليّ فان هنالك مؤشراً باحتمال وجود أحد أنواع سرطانات الدم، قد يحصل انحراف (زيادة في المعدل) بالخلايا اللمفية في الأطفال الرضع نتيجة لصد بعض الالتهابات، توكل هذه المهمة في البالغين للخلايا المتعادلة، وترتفع في بعض الأمراض نسب الخلايا اللمفية كما في داء المقوسات Toxoplasmosis وداء البروسلية Brucellosis وكذلك في داء السيلان Syphilis (Hoffbrand & Peltit, 1993). وليس هنالك إشارة إلى أن الأورام الصلبة يمكن أن تزيد من عدد الخلايا اللمفية كما في أعداد الخلايا اللمفية موضوع الدراسة بين الأسوياء ومرضى ورم الثدي، فان العد الكلي للخلايا اللمفية في مجموعة الأسوياء (السيطرة) كانت ما بين 1440-3200 خلية/مل أما النسبة في المرضى موضوع الدراسة فكانت 1134-2720 خلية/مل وهذا يعني أن العد الكلي للخلايا اللمفية في المجموعتين ضمن المدى الطبيعيّ وليس هنالك فروقات معنوية (الجدول 1 و 2).

5-2-1- قلة اللمفاويات Lymphopenia

عندما تقل نسبة الخلايا اللمفية عن المستوى الطبيعيّ (أقل من 1000 خلية/مل) وتكون في الأغلب ناتجة عن نقص في CD₄ T-helper لأنها تكون أكثر من نصف الخلايا اللمفية، تكون عندها قلة اللمفاويات Lymphopenia وهنالك الكثير من الأسباب المؤثرة في ذلك ولعل أهمها فشل نقي العظم في إنتاج الخلايا الذي يتزامن مع أخذ بعض المثبطات المناعية للعلاج immune suppressive therapy أو بعض الستيرويدات ولعل الأهم ما يحدث في نقص المناعة المكتسبة (العوز المناعيّ)، وقد تترافق مع الأورام الصلبة حالة قلة اللمفاويات نتيجة للعلاج الكيماويّ الذي يؤثر في مجموع الخلايا البيض وينعكس على أنواعها عن المعدلات الطبيعيّة ومستوياتها عن الأصحاء ويمكن العودة إلى مستوياتها الطبيعيّة عند زوال المؤثر ويظهر من النتائج أن الخلايا اللمفية في المرضى موضوع الدراسة تميل إلى أدنى المستويات الطبيعيّة في الأغلب بسبب تأثير العلاج ولكن تبقى ضمن المدى الطبيعيّ ومن المتبع في أغلب دول العالم إيجاد معدلات الخلايا اللمفية ومجاميع الخلايا اللمفية الثانوية sub clones واعتمد أساساً مصدراً معلوماتياً للمعدلات الطبيعيّة reference range لاختيار المعدل الطبيعيّ ولاختبار الميول بالانحراف عن النسب الطبيعيّة ومقارنتها مع أمراض خطيرة منتشرة عالمياً تزيد أو تقل فيها الخلايا اللمفية كما في الايدز وسرطان الدم و سرطان الغدد اللمفية lymphoma فعلى سبيل المثال في السعودية يكون معدل الخلايا اللمفية من 1507-2941 خلية/مل (Al-Qouzi, et al.,)

Uppal *et al.*, 2002). ويكون المعدل عند الأشخاص الأصحاء في الهند 2114 خلية/مل (Uppal *et al.*, 2003). ويلاحظ أن ليس هنالك اختلاف في الخلايا اللمفية بين الأسوياء والمرضى وقد يرجع ذلك إلى المدى الواسع للعد الطبيعي ما بين 1000-4000 خلية/مل (Kathleen & Timothy, 2001). ولا توجد أيضا فروقات معنوية ناتجة من المكونات الأساسية للخلايا اللمفية تعكس التغير في العد الكلي للأساس للخلايا في سرطان الثدي (Seveikova *et al.*, 2000).

2-2-5- الخلايا التائية المساعدة CD₄ والخلايا التائية السمية CD₈

تقسم الخلايا اللمفية إلى نوعين رئيسيين هما الخلايا التائية T-cells و الخلايا البائية B-cell ويختلفان بالوظيفة المناعية إذ تتطور الخلايا البائية لتتمكن من طرح الأجسام المضادة أما الخلايا اللمفية التائية (سميت كذلك لمكان نضجها)، التي يمكن أن تدير المناعة الخلوية فتقسم أيضاً إلى مساعدة helper وقاتلة cytotoxic وتحمل الخلايا اللمفية التائية مستقبلات سطحية على غلافها الخارجي تميز بوساطتها المستضدات الغريبة التي على شكل بروتينية Protein fragments (peptide) ترتبط مع جُزءٍ معقد التوافق النسيجيّ major histocompatibility complex molecule (MHC) (Carol & Alan, 2000).

الخلايا المساعدة التي تسمى CD₄ أو T-helper والخلايا القاتلة CD₈ T-cytotoxic التي يمكن التمييز بينهما من خلال المستقبلات المساعدة Co-receptors وتفرقهما بالارتباط مع معقد التوافق النسيجيّ إذ ترتبط الخلايا التائية المساعدة مع معقد التوافق النسيجيّ الثاني MHC II وأما الخلايا التائية القاتلة فترتبط مع معقد التوافق النسيجيّ الأول MHC I (Robey, 1994). كما أن الخلايا التائية المساعدة CD₄ يمكن أن تقسم إلى نوعين بالاعتماد على إنتاجها من الوسائط cytokines (Carter & Dutton, 1996). ومن خلال ذلك تتبين أهمية النوعين من الخلايا اللمفية في تحريك دفاعات الجسم المتخصصة إذ أصبح متعارفاً دراسة الاثنين متلازمين لتأثير الخلايا التائية المساعدة CD₄ المباشر في الخلايا التائية القاتلة CD₈ وما للخلايا القاتلة من تأثير في الخلايا اللمفية (Allison *et al.*, 1995)، وتكون نسبة الاثنين من مجموع الخلايا اللمفية أكثر من 75% في الأشخاص الأسوياء وإكمالاً بما أنجز في دول العالم بتوثيق نسبة الخلايا اللمفية جرى التحقق أيضاً لإيجاد معدلات الخلايا اللمفية الفرعية subgroup وأكثرها أهمية الخلايا التائية المساعدة CD₄ والخلايا التائية القاتلة CD₈ والخلايا المناعية الأخرى بسبب إصابة مرضية لنوع معين من الخلايا كما يحدث في الإيدز باستهداف فيروس HIV للخلايا المساعدة وكذلك لمعرفة قدرة تلك الخلايا على التعامل مع الأمراض والأورام ومدى استجابتها

الطبيعية ومدى الاستفادة منها في التحوير والتحفيز الذي تتلقاه عن طريق العلاجات واللقاحات ومؤشراً قوياً للاستجابة المناعية المتخصصة ضد مرض بعينه، ويعد المعدل الطبيعي للخلايا التائية المساعدة CD₄ ما بين 600-1500 خلية/مل ومعدل الخلايا التائية القاتلة CD₈ من 300-1000 خلية/مل (Kathleen & Timothy, 2001). ونسبة CD₄/CD₈ أكبر من واحد ($CD_4/CD_8 \text{ ratio} > 1$)، وقد أنجزت أغلب الدول معدلات قياسية خاصة بها فمثلاً في تركيا معدل الخلايا التائية المساعدة CD₄ في الأصحاء البالغين 764-1486 خلية/مل أما معدل الخلايا التائية القاتلة CD₈ فتكون بين 430-908 خلية/مل (Yaman *et al.*, 2005). أما في تايلاند فإن معدل CD₄ يكون ما بين 610-1210 خلية/مل وبالنسبة إلى CD₈ 320-1020 خلية/مل (Vithavasai *et al.*, 1997). أما في الهند فإن CD₄ ما بين 430-1740 خلية/مل و CD₈ ما بين 218-1396 خلية/مل (Uppal *et al.*, 2003). وفي إيطاليا أقترح Santagostino وجماعته (1999) أن يكون هنالك عدد من الدراسات لإيجاد عدة قراءات لكل منطقة ممكنة بسبب تنوع الأدوات والمختبرات وكذلك أشار Reichert وجماعته (1991) عند إيجاد المعدل القياسي للمؤشرات للقوказيين في كاليفورنيا من الجديدة أن تكون كل القياسات العالمية بنفس المواد والطرائق في كل الأماكن لتفادي الاختلافات. وقد وجد الباحث (Al-Hawurani, 2006) في دراسة له أن معدل CD₄ في الأسوياء من العراقيين 446-1713 خلية/مل في حين كان معدل CD₈ 322-1107 خلية/مل. وقد جرى التحقق من مجموعة الأسوياء موضوع الدراسة وقيس كل من CD₄ و CD₈ فكان معدل CD₄ 633-1684 خلية/مل و CD₈ 446-1082 خلية/مل. أما المعدلات لدى المرضى (ورم الثدي) موضوع الدراسة فكان بالنسبة إلى CD₄ من 476-1242 خلية/مل أما CD₈ فكانت ما بين 306-924 خلية/مل كما في (الجدول 3).

وقد تبين أنه لا توجد فروقات معنوية بين مجموعة المرضى والسيطرة وذلك لضعف الاستجابة المناعية للجسم ضد الأورام لما تملكه من آليات إخفاء مستضداتها وتقع جميع القيم ضمن المعدلات الطبيعية ويلاحظ انحدار بالمعدل العام للقيم في المرضى عن الأسوياء ولأقرب قيم طبيعية لدى المرضى لنزول المعدل العام للخلايا البيض كلها بسبب العلاج وقد اقترحت بعض الدراسات إعطاء المنشطات المناعية مع العلاجات الكيماوية لتعزيز قدرة الجسم المناعية لدى مرضى سرطان الثدي (Murta *et al.*, 2000). كذلك فقد أكد Seveikova وجماعته (2000) أنه ليس هنالك فرق معنوي بين المعدلات للمرضى بسرطان الثدي مقارنة بالأصحاء وأكد ذلك Wang وجماعته (2004) الذي أشار إلى عدم وجود فروقات معنوية بين مرضى سرطان الثدي والأسوياء بالنسبة لمعدل CD₈/CD₄.

3-5- مستضد السرطاني المضعي Carcinoembryonic antigen

هو أكثر واسمات المرض استعمالاً لإفرازه من أغلب الأورام (Zamcheck, 1981). يوجد في شكل كلايكوبروتين في الأنسجة الجنينية والأنسجة السرطانية الظهارية، وينذر الارتفاع المفرط للمستضد في أغلب الأحيان بعودة الأورام بعد الشفاء recurrence قبل أن يشخص ذلك سريريًا والارتفاع البسيط في مستواه يعني عودة الورم في موقع مفرد محدد والارتفاع العالي يعني الانتشار عند الكبد (Welech & Malt, hepatic metastasis, 1983).

يرتفع مستوى المستضد السرطاني المضعي في أغلب أنواع الأورام الحميدة والخبيثة وبضمنها أورام الثدي ويحافظ على مستواه بأقل من 3 ng/ml في الأشخاص الأسوياء غير المدخنين (Pathak, et al., 1996). وقد جرى التحقق من المستضد CEA في مجموعة الأسوياء ولم يؤشر ارتفاع فوق المعدل الطبيعي وكانت أعلى قيمة 2.5 ng/ml وهذا يعني أيضاً أن ليس هنالك في مجموعة السيطرة نتيجة موجبة كاذبة (الجدول 10).

أشار Repetto وجماعته (1993) إلى استعمال CEA مؤشراً لمعرفة تقدم سرطان الثدي (الورم). وقد جرى التحقق من مستوى CEA في مجموعة مرضى أورام الثدي تحت العلاج وتبين أن هنالك قيمة عالية فوق المعدل الطبيعي إذ يؤكدها Staab وجماعته (1980) أن الزيادة في مستوى CEA بأكثر من 10 ng/ml تعد مؤشراً على انتشار المرض وإن لم يشخص الانتشار سريريًا. كذلك فإن العلاج يجب أن يترافق نجاحه مع هبوط مستوى CEA بينما الزيادة تعني رجوع المرض وعدم استجابته للعلاج، وهذا يمكن أن يدلّ على أن بعض المرضى موضوع الدراسة تحت العلاج لم تؤشر استجابة وقت التحقق إذ يمكن أن يعاد التحقق من المستضد مرات أخرى، إذ يؤكد Paulick و Caffier (1988) أن مستوى CEA أعلى من 30 ng/ml بالنسبة إلى 91% من المرضى خلال خمسة أشهر أظهر عودة الورم أو انتشار المرض إلى أماكن أخرى، ونلاحظ أن هنالك نتائج موضوع الدراسة أعلى من 30 ng/ml (الجدول 8) يدلّ على عودة الورم أو انتشاره فيما إذا كان متأسلاً إذ يؤكد Ballesta وجماعته (1995) أن الزيادة المفرطة في مستوى CEA يعود إلى أن الورم قد انتشر Tumor metastasis كذلك فإن القيمة المؤكدة فوق 25 ng/ml على رأي Covency وجماعته (1996) تؤكد انتشار المرض.

4-5- مستضد ورم الثدي Cancer antigen 15-3

يرافق ورم الثدي طرح مستضد آخر هو CA 15-3 كما في أورام أعضاء أخرى غير الثدي كالبكرياس والرئة والكبد والمستقيم (Anthony *et al.*, 2000). وقد جرى التحقق من مستضد ورم الثدي في مجموعة الأسوياء وكانت النتائج جميعها سلبية أي ليس هنالك زيادة في مستوى المستضد وجميع القيم محصورة بالمعدل الطبيعي 5-35 وحدة/مل وأعلى قيمة كانت 31 وحدة/مل وأدنى قيمة 9 وحدة/مل كما هو مبين في (الجدول 9). ويكون مستضد ورم الثدي CA 15-3 من بين الكثير من واسمات الأمراض Tumor markers هو الأفضل في مراقبة المرضى (Clinton *et al.*, 2003). يستعمل CA 15-3 مترافقاً مع CEA لتأكيد خصوصية الورم في الثدي لوجود الأخير في طيف واسع من الأورام (Omar *et al.*, 1988). ويستعمل كلا المستضدين بعد إجراء العمليات لتشخيص عودة الورم أو فيما إذا كان الورم حميداً أو خبيثاً ويكون CA15-3 أكثر تخصصاً من CEA في الأورام الحميدة في الثدي والتحقق من معدله بعد إجراء العمليات أكثر من مرة follow-up ويرتفع مستوى مستضد ورم الثدي مبكراً عند عودة الورم من المستضد السرطاني المضغي (Colomor *et al.*, 1989). وقد جرى التحقق من قياس مستوى مستضد ورم الثدي في مصل مجموعة المرضى وقد تبين أن هنالك زيادة معنوية لبعض المريضات عن المعدل الطبيعي أي أكثر من 35 وحدة/مل علماً بأن جميع المرضى تحت العلاج ويؤكد Molina وجماعته (1995) أن مستوى المستضد لأكثر من 60 وحدة/مل لنسبة من المرضى 41% في مدة 2-6 أشهر يشير إلى عودة المرض. وجد أيضاً أن حجم الورم ومدى انتشاره إلى العقد اللمفية الإبطية وعمر المريض يمكن أن ينعكس على مستوى المستضد (Duffy *et al.*, 2004). ويؤكد Soletomos وجماعته (2004) أن الإحصائيات التي حصلوا عليها من خلال استعمال CEA و CA 15-3 كانت مفيدة في مراقبة العلاج وإيقاف العلاج غير النافع من خلال تقدم مستوى المستضدين. وقد وجد De-Rocio وجماعته (2003) أن قيمة الوسيط للمستضد CA15-3 للمرضى في حالة غياب الانتشار 16.180 وحدة/مل أما في حالة الانتشار إلى العظم فكانت 164.2 وحدة/مل ولم تسجل لدينا أية حالة في ذلك المستوى وكذلك فإن مستوى المستضد يهبط عند رفع الثدي mastectomy في حين وجد Nishimura وجماعته (2003) الذين راقبوا مرضى من سنة 1986-2000 أن مستوى المستضد عند وقت عودة المرض (الورم) قد ازداد مستواه عند 56.9% من المرضى وبعد عودة المرض زادت النسبة إلى 76.8% في المرضى وهذا يدل على فائدة المستضد بالمراقبة الدورية للتأكد من عودة المرض بعد الاستئصال والمعالجة بواقع فحص دوري للمرضى. وبين Ebeling وجماعته (2002) في عملهم على عينه كبيرة من المريضات أن استعمال CA15-3 مناسب في الفحص الروتيني للتحقق من عودة المرض وكذلك

إدارة العلاج في مرحلة انتشار المرض. يفضل أن يترافق CA 15-3 مع واسم ورمي Tumor marker آخر في متابعة المرضى والورم (Kokko *et al.*, 2002). كذلك فإن الاستعمال المشترك لـ CA 15-3 و CEA قبل وبعد العمليات والمقارنة بين النتائج وجد أن هنالك انخفاضاً في مستوى المؤشران (Ebeling *et al.*, 2002). يبين الاستعمال المشترك لكلا المستضدين قبل وبعد العملية العلاقة بين طور الورم الخبيث stage of malignancy الذي وصل إليه الورم ومدى انخفاض المستضدين بعد إزالة الورم إذ يكون CA15-3 أكثر تحسناً للنزول بمستواه بعد 14 يوماً من إزالة الورم (Anton *et al.*, 2001). ومن هذا تبين أن عدم وصول مستوى المستضدين إلى المستوى الطبيعي مؤثر على بقاء حالة الورم المرضية وأن لا فائدة من استمرار العلاج عند المرضى موضوع الدراسة أو إيجاد السبب الحقيقي وراء بقاء مستوى المستضد مرتفع إذ يمكن أن يكون الورم قد عاد أو انتشر وهذا يوحي بإيجاد سبل علاجية أو جراحية أخرى تكون فعالة أكثر ويشير Tampellini وجماعته (2001) من خلال دراسة أعداد كبيرة من المرضى إلى أن الزيادة التي تدوم خلال العلاج قد يكون سببها الانتشار إلى الكبد أو التجويف البطني، ويؤكد Cheunge وجماعته (2001) أنه يمكن أن يستفاد من مستضد ورم الثدي بإيقاف العلاج غير النافع من خلال مراقبة مستوى المستضد.

5-5- السيطرة النوعية

للحصول على نتائج مختبريه مرضية هنالك بعض الاحتمالات لاستنتاج الأخطاء من خلال زيادة الإدراك الذي يقود مستقبلاً لاحتواء المشاكل وضبط العمل في الاختبار وذلك من خلال نظرية قيمة التنبؤ Predictive Value Theory التي طورت حديثاً لضبط الاختبارات لتعرف بنظرية القرار Decision Theory ويستفاد من هذه النظرية في معرفة مدى ملائمة ونقاوة العدد المستخدمة في الاختبارات وتعتمد هذه النظرية على فئتين تشخيصيتين تقسمان على أساس وجود المرض وعدم وجوده أو على الفحوصات المختبرية التي تكون طبيعية وغير طبيعية وتحدد قيمة التنبؤ الموجب والسالب كلاً من سلوك وانتشار المرض وكذلك تقدر احتمالية نتائج الاختبار للمرض، وعلى هذا الأساس تقسم الفئات إلى أربعة مجموعات الموجبة الحقيقية True Positive والسالبة الحقيقية True Negative والموجبة الكاذبة False Positive والسالبة الكاذبة False Negative وان وجود الموجبة الكاذبة والسالبة الكاذبة يقود إلى إيجاد الاستنتاجات الخاطئة، يستفاد من بعض المعادلات الإحصائية التطبيقية لتبيان مدى الاستفادة من بعض المواد والعدد المختبرية وطرائق عملها بالتحقق منها في نسب نجاحها في التشخيص لبعض الأمراض ومدى حساسية الاختبارات من خلال المقارنة بين النتائج الموجبة في عدد

معين من المرضى على أساس نتيجة موجبة حقيقية ونتيجة سالبة كاذبة، وبيان خصوصية الاختبارات في عدد معين من الأسوياء باستخراج النتائج الموجبة الكاذبة والنتيجة السالبة الحقيقية، وتعرف الحساسية أنها نسبة المرضى ذوي النتائج غير الطبيعية بينما تعرف الخصوصية أنها نسبة الأسوياء ذوي النتائج الطبيعية، تكشف الحساسية والخصوصية في بعض الأحيان عن الاختبار وتعطي معرفة سابقة عن حالة المرض وتعد صفةً نوعيةً للاختبار (Daniel et al., 1987). وقد استخرجت قيم التنبؤ الموجب والسالب والحساسية والخصوصية للعدد المستخدمة في قياس مستضد CEA ومستضد CA15-3 وكانت 1 و 0.6 و 0.3 و 1 على التوالي من عدد مرضى 15 (أخذ 15 نموذج عشوائي من المرضى) مقارنة مع 15 من الأسوياء.

الاستنتاجات Conclusions

من خلال نتائج الدراسة يمكن أن نستنتج بعض الأمور:

- 1- إن المعدل العام للخلايا الدموية البيض منخفض من تأثير العلاج مؤدٍ إلى ضعف المناعة العامة للجسم.
- 2- إن تأثير المناعة الخلوية في الأورام من خلال ملاحظة أعداد الخلايا اللمفية التائية المساعدة CD₄ والخلايا التائية السمية CD₈ لم تظهر بشكل واضح لبقاء أعداد تلك الخلايا طبيعية.
- 3- إن الاستعمال المشترك لكلا المستضدين الورميين أفضل من الاستخدام المفرد لتأكيد نتيجة أحدهما إلى الآخر.
- 4- إن مستوى المستضدين الورميين CA 15-3 و CEA في مصل مرضى ورم الثدي فوق معدلاتها يؤشر بقاء الورم.
- 5- إن بقاء مستوى CEA و CA 15-3 مرتفعاً بعد إزالة الورم يمكن أن يعني أن المرض قد يكون منتشرأً metastasis لدى بعض المرضى.
- 6- بالرغم من العلاج فقد بقي مستوى المستضدين ثابتاً أو مستمراً بالارتفاع مما يوجب إيقاف العلاج لعدم الاستفادة منه والبحث عن السبب المؤدي إلى ذلك أو ربما يدعو إلى تغيير العلاج بأخر.

التوصيات Recommendations

- 1- تحديد المستويات السوية لأعداد الخلايا اللمفية بأنواعها المختلفة في المجتمع العراقي لتكون دليلاً يفصل على أساسه الحالات السوية من المرضى.
- 2- استخدام مستضد متعدد الببتيد النسيجي واسماً للأورام البشرية.
- 3- استخدام واسمات الأورام ذات الطبيعة المستضدية لمتابعة حالة المريض من حيث التحسن أو التقهقر.
- 4- إيقاف العلاج الدوائي أو ربما جعله مزيجاً من العلاج الجراحي والإشعاعي والكيماوي معاً ومتابعة مستوى المستضدين بعد هكذا علاج .

المصادر العربية

- اتحاد الأطباء العرب (1978). المعجم الطبي الموحد. الطبعة الثانية، مطبعة المجمع العلمي العراقي، جامعة الموصل.
- الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد. (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية، دار الكتب للنشر. جامعة الموصل.
- حتي، يوسف (1982). قاموس حتي الطبي. انجليزي-عربي مع مسرد الفبائي عربي-انجليزي. الطبعة الرابعة، مكتبة لبنان، بيروت.
- منظمة الصحة العالمية WHO. (1983). دليل الطرائق المختبرية الأساسية. الإسكندرية

المصادر الأجنبية

- Abul, R.A.; Andrew, H.L.; David, L.B. & Alexandra, B. (2003). Cellular and molecular immunology. 5th ed., Csaunders Inc. Elsevier Science.
- Adami , H :o.; Lipworth ,L.; &Titus,E.(1995) . organochlorine compound and strogen-related cancer in women .J. cancer causes control 551- 66.
- Adams, J.M. & Cory, S. (1991). Transgenic models of tumor development. J. Science., **254**: 1161-1167.
- Al-Hawurani, K.M.F. (2006). Progression to AIDS and it's relation to some haemotological, immunology and biochemical markers in some Iraqi patients infected with human immuno defeciency virus (HIV). MSC. Thesis. Baghdad University.
- Alison, P. (2003). Significance of serum CEA and CA15-3 monitorne advanced breast cancer patients treated with systemic therapy. A large scale retrospective study. J. Breast Cancer. **10**: 44-133.
- Allison, J.R.; Hurwitz, A.A. & Leach, D.A. (1995). Monpulation of co-stimulatory signals to enhance anti tumor T-cell response. Curr. Opin. Immunol. **7**: 682-685.
- Al-Qouzi, A.; Al-Salamah, A.; Al-Rashced, R.; Al-Rasheed, R.; Al-Musalam, A.; Al-Khairy, K.; Rheir, Q.; Al-Ajali, F. & Hajeer, A. (2002). Immunophenotyping of peripheral blood lymphocyte in Saudi men. J. Clin. Dia. Lab. Immunol. **9**(2): 81-279.
- Anne, M.M. & Barbara, L.W. (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. J. NCI. **14**: 1126-1135.
- Anthony, S.F. (2005). Disorder of growth differentiation In: Dennis, L.R.; Danil, L.L.; Cugene, B.D. & Stephen, L.H.; Larry, L. (eds). Harrisons principle of internal medicine. M. Cancer. Hill. Inc. USA.

- Anthony, W.; Butch, H.; Nicole, A.; Massoll, S. & Alex, A. (2000). in clinical chemistry 4th: Michael, L.B & Edward, L.D. J. Tumor Marker.
- Anthony, W.B.; Nicole, A.; Alex, A.P.; Michal, L.B.; Janet, L.D. & Edward, P.F. (2000). Clinical chemistry. 4th ed., Lippincott Williams Wilkins Philadelphia.
- Anton, E.; Costachscu, G. & Costachoscu, G. (2001). CA15-3 and CEA markers prognostic factor in breast cancer. J. Nat. Lasi Med. Chir. Rev. **105**(1): 4-161.
- Ballesta, A.M.; Molina, R.; Filelia, X.; Jo, J. & Cimene, Z.N. (1995). Carcinoembryonic antigen is taging and follow up of patients with solid tumor. J. Tumor Bio. **16**(1): 32-41.
- Beart, R.J. & O'comell, M.J. (1983). Post operative fellow up of patient with carcinoma of the colon. Myo. Clin. Proc. **58** (6): 3-361.
- Benjamin, L. (2004). Tumor cells are immortalized and transformed in genes VIII Published perarson prentic Hall Pearson education Inc USA.
- Berad, E.N.; Berard, F.; Banchereau, J. & Palucka, A.K. (2004). Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor specific cytotoxic. J. Lymphocytic Breast Cancer Res., **6**: 322-328.
- Bernstein, L.; Henderson, B.E.; Hanisch, R.; Sullivan, H.J. & Ross, R.K. (1994). Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. J. Natl. Cancer. Inst. **86**: 8-1403.
- Betsholtz, C.; Johnsonc, A.; Heldini, H.; Westerman, B.; Lind, P.; Urdea, M.S.; Eddy, R.; Shows, T.B.; Philpot, K.; Mdlor, A.L.; Knott, T.J. & Scott, J. (1986). DNA sequences and chromosomal localization of

- human platelet derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell line. *J. Nature.*, **320**: 645.
- Bosch, F.X. & De Sanjose, S. (2003). Human papilloma virus. Cancer burdens and assessment of causality. *J. Natd. Ins.* **5**: 3-13.
- Boveri, T. (1914). Zur frage der Estehung maligner tumoren. *J. Jena. Fischer.* **22**: 1-2.
- Breast Cancer Antigen CA15-3 enzyme Immunoassay test. Kit, Biocheck Inc. 323 vintage park. Dr. Foster City. CA 9440: Te. (650) 573-1968. Fax. (650) 573-1969.
- Burnet ,f.m.(1971) : immunologic surveillance in neoplasia transplant rev. 7:3.
- Carol, C. & Alan, M.K. (2000). T-cells immunity in hematology principle and practice. 3rd ed., by: Ronald, H.; Edward, J.B.; Sanford, J.S.; Bruce, F.; Harvey, J.C. & Lucie, E.S. Philip. McGlave. Charchll Livingston USA.
- Carter, L.L. & Dutton, R.W. (1996). Type 1 & Type 2 fundamental dichotomy for all T-cell subset. *J. Curr. Opin. Immunol.* **8**: 336.
- Cecile, M.R.; Christine, A.E. & Charles, E.L. (2005). Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *J. breast cancer. Res.*, **7**: 21-32.
- Chen, L.S.; Ashe, W.A.; Bardy, I.; Hellstrom, K.E.; Ledbetter, J.A.; McGwan, P. & Linsley, P.S. (1992). Costimulation of anti tumor immunity by the B7 counter receptor of the T- lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *J. Cell.*, **71**: 1093.
- Cheunge, K.L.; Evans, A.J. & Robertson, J.F. (2001). The use of blood tumor markers in the monitoring of metastiatic breast cancer un assessable for response to systemic therapy. *J. Breast Cancer Res. Tract.* **67**(3): 8-273.

-
-
- Claus, E.B.; Schildrank, J.M.; Thompson, W.D. & Risch, N.J. (1996). The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *J. Cancer*. **77**: 18-24.
- Clinton, S.K.; Beason, R.L.; Bryant, S. & Johson, J.T. (2003). Comparative study of four serological tumor markers for the detection of breast cancer. *J. Bio. Med. Sci. Instrum*. **39**: 14-408.
- Cohen, E.P. & Kim, T.S. (1994). Neoplastic cell that express low level of MHC class I determination escape host immunity. *J. semin Cancer Biol*. **5**: 419.
- Cold, P. & Freedman, S.O. (1965). Specific Carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *J. E. P. Med*. **121**: 439.
- Colomer, R.; Ruibal, A.; Gendla, J. Rubio, D.; DelCampo, J.M.; Bodi, R. & Salvador, L. (1989). Circulating CA15-3 level in post surgical follow up of breast cancer patients and non malignant disease. *J. Breast Cancer Res. Treat*. **13**(2): 33-122.
- Colonna, M.; Moretta, A.; Vely, I. & Viver, E. (2000). A high resolution view of NK cell receptor, structure and function. *J. Immunol. Today*., **21**: 428-431.
- Copas, J.B. & Shi, J. (2000). Re analysis of epidemiological evidence of lung cancer and passive smoking. *B.M.J*. **320**: 417-418.
- Covency, E.C.; Geraghty, J.G. & Sherry, F. (1996). The clinical value of CEA and CA15-3 in breast cancer management. *Int. J. Biol. Markers*. **10**(1): 35-41.
- Daniel, P.S.; John.; Stobo, J. & Vaialan, W. (1987). *Basic clinical immunology 6th,ed., middle East Edition*. Appleton & Lange. USA.
- De-Rocio, E.; Shanche, Z.; Mireles, G.; Enriquez, M. & Valverde, C.N. (2003). Reliability of CA15-3 in the follow up of female patients with

- breast carcinoma and bone metastases. *J. Clin. Rev. Invest.* **55**(4): 8-412.
- Duffy, M.J.; Duggan, C.; Keane, R.R.; Hill, A.D.; McDermott, E.; Crown, J.O. & Higgins, N. (2004). High preoperative CA15-3 concentrations predict adverse outcome in node negative and node positive breast cancer study of 600 patients with histological confirmed. *J. B. Cancer Clin. Chem.* **50**(3): 63-589.
- Ebeling, F.G.; Stieber, P.; Untch, M.; Nagel, D.; Konecng, G.E.; Schmitt, U.M.; Fateh, M.A. & Seidd, D. (2002). Serum CEA and CA15-3 are prognostic factor in primary breast cancer. *J. B. Cancer.* **86**(8): 22-1217.
- Fearon, E.R. & Vogelstein, B. (1994). Tumor suppressor genes and cancer In: Holland, J.F.; Teri, E.J.; Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Morton, D.L. & Wichselbaum, R.R. (eds). *Cancer medicine 3rd ed.*, Lea & Febiger Philadelphia. Pp. 77-90.
- Fishel, K.; Lescone, M.K.; Rao, J.; Kane, M. & Kolodner, R. (1993). The human mutator genes homologues MSH2 and it's association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *J. Cell.*, **75**: 1027-1038.
- Flokman, J. (2005). An giogenesis In: Eugene by Stephen, L.H.; Anthony, S.F.; Dan, L.L.; Dennis, L.K. & Larry, J. Jamesone (eds) *Harrisons (16th) principle of internal medicine McGraw. Hill USA.*
- George, P. (1992). Miscellaneous disorders of leukocytes in text book of internal medicine,
- Hainsworth, J.D. & Gerco, F.A. (2000). A mangment of patients with cancer of an unknown primary site. *J. oncology.* **14**: 563.
- Halter, S.A.; Dupont, W.B. & Hartman, W.H. (1982). Tumor marker expression in interval breast carcinoma. *Lab. Invest.* **46**: 33 A.

-
-
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic B-cell tumors in transgenic mice expression recombinant virus 40 Oncogenes. *J. Nature.*, 316-461.
- Hanahan, D. (1988). Dissecting multistep tumor genesis in transgenic mice. *J. Ann. Rev. Genet.*, **22**: 479-619.
- Hayflick, L. & Moohead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell, Res.* **25**: 585-621.
- hCEA [¹²⁵I] IRMA Kit REF: RR-38CT institute of Isotopes Ltd. Web Site <http://www.Izotop.hu>.
- Henkart, M.P. & Henkart, P.A. (1982). Lymphocyte mediated cytolysin secretory phenomenon. *Adv. Exp. Med. Biol.* 146, 227.
- Hermann, B. & Timo, H. (2004). Are patients diagnosed with breast cancer before age 50 years ever cured? *J. Clin. Amer. Oncol.* **22**: 432-438.
- Hoffbrand, A.V. & Peltit, J.E. (1993). *Essential hematology*. 3rd ed., Oxford. Black Well Scientific Publish antigen.
- Ivan, R. & Arther, R. (2000). tumor Immunology in Really essential immunology., 151-195.
- Janis, V.K. (1985). *Tumor markers clinical and laboratory studies*. Alan. R. Liss. Inc. New York.
- Jenkins, J.R.; Rudge, K. & Carrie, C.A. (1984). Cellular immortalization by CDNH clone encoding the transformation associated phosphoprotein p53. *J. Nature.*, **312**:651.
- John, B.I. (1997). T-lymphocyte and natural killer cell. In: Daniel P. stites abbad .terr tristran G. parslow *Medical Immunology 9th.*, **10**: 134-145.
- Kathleen, D.P. & Timothy, J.P. (2001). *CEA in : diagnosis and laboratory test reference*. 5th ed ., Mosby. Inc. USA.

- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *J. cell.* **87**: 159-170.
- Klassen, C.D.; Amdur, M.O. & Doull, J. (1986). Toxicology In: Casarett & Doulls. Macmillan Publishing Co. New York, 11-32.
- Klavins, J.V. (1982a). Definition and classification of tumor marker. *J. Ann. Clin. Lab. Sci.*, **12**: 331-332.
- Klavins, J.V. (1982b). Classification of biochemical tumor marker. *Cancer Det. Prev.*, **5**: 88.
- Kljima, H.; Ueyama, Y. & Osamura, Y. (2003). Histopathology and tumor marker. *J. Med. Tumor.* **51**(12): 15-1203.
- Kndson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retino blastoma. *J. Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**: 3-820.
- Knutson, K.L & Disis, M.L. (2004). IL-12 enhances the generation of tumor antigen specific TH 1 CD₄ cell during ex vivo expansion. *Clin. Exp-Immunol.*, **133**(2): 9-322.
- Kokko, R.; Holli, K. & Hakama, M. (2002). CA15-3 in the follow up localized breast cancer: A prospective study. *Euro. J. Cancer.* **38**(9). 93-1189.
- Kufe, D.W.; Inghirami, G. & Abe, M. (1984). Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumor. *J. Hybridoma.* **3**: 223.
- Lance, L. & Elise, C.K. (1992). The biology of invasion and metastasis In: Kielley, W.N.; Vincent, T.D.; Herbert, L.D.; Edward, D.H; William, K.H. & Edward, W.H. eds. (2nd) Text book of internal medicine. J. B. Lippincott Com. USA.
- Larber, E. (1984). Cellular biochemistry of stepwise development of cancer with chemical CHA gloves. *J. Cancer Res.*, **44**: 5463.

-
-
- Lehihosh, M.; Ueda, M. & Budiyanto, A. (2003). UV-induced skin damage J. Toxicology. **189**: 21-39.
- Leob, L.A. (2001). A mutator phenotype in cancer. J. Cancer. Res., **61**: 3230-3239.
- Levine, A.J. (1997). P53 the cellular gate keeper for growth and division. J. cell. **88**: 323-331.
- Liotto, L.A. & Clair, T. (2000). Cancer checkpoint for invasion. J. Nature. **405**: 287-288.
- Litnicker, M.; Pavesi, F. & Scarabelli, M. (1991). Tumor associated antigen CA15-3 and CA125 in ovarian cancer. Int. J. Biology marker. **6**: 115.
- Little, C.D.; Nau, M.M.; Carney, D.N. Gazdar, A.F. & Minna, J.D. (1983). Amplification and expression of the C-myc oncogene in human lung cancer cell lines. J. Nature. 194-306.
- Lorena, P.; Antonio, S.; Carla, B.; Barbara, G.; Addotorata, M.; Coluccia, L.; Francois, A.; Lemonnier, K.K. & Cario, G.P. (2002). ALK as a novel lymphoma associated tumor antigen identification of 2HLA-AZ-restricted CD₈₊ T-cell epitopes. J. Blood, **99** (6): 2100-2106.
- Lowy, D.R. (1993). Function and regulation of Ras. J. Ann. Rev. Biochem., **62**: 851-891.
- Lymphocyte Separation Medium (Flow Laboratories) Limited Irvine Ayrshire KA12 BNB.
- Macsween, R.N.M. & Whaley, K. (1997). Muir's text book of pathology 13th ed., Oxford University Press Inc. New York USA.
- Marc, E.L. (2005). Breast cancer In: Denny, S.L.; Kasper, E.; Braunwald, A.S.; Fauci, D.L. & Lovgo, S.L. principles of internal medicine 15th ed., McGraw-Hill Inc. USA., 516-524.

-
-
- Mark, J.L. & Rapp, V.R. (1984). Primary structure of V-raf relatedness to the src family of oncogene. *J. Science.*, 224-285.
- Marshall, C.J. (1991). Tumor suppressor genes. *J. cell.* **64**: 313-326.
- Marshall, A.L.; Ernest, B.; Thomas, J.K. & William, J.W. (2003). *Manual of Hematology 6th ed.*, McGraw. Hill. Medical publishing Division.
- Martin, G.S. (2002). Identification of reteroviral transforming gene. [www.ergito.com/look up. Jsp? Expt, martin](http://www.ergito.com/look_up.jsp?Expt,martin).
- Maser, R.S. & Dappinho, R.A. (2002). Connecting chromosome crisis and cancer. *J. Science.*, **297**: 565-569.
- Mesko, T.W.; Dunlap, J.N. & Sutherland, C.M. (1990). Risk factor " Breast cancer". *J. B. Cancer.* **16**(11): 9-33.
- Michael, B. & Harry, S. (1986). *Breast cancer.* Health Press Oxford.
- Michal , L.B.; Janet, L. Duben ,E.: and Edward ,P.F.(2000). *Clinical chemistry (principles ,procedures . correlations)* 4th ed., (Lippincott Williams & Wlkins) .
- Michael, P.C. (2004). Breast anatomy and development In: Harris, J.Y.R.; Marc, L.; Monica, M. & Osborne, C.K. *Disease of the breast thirded.* Published. Lippincott William & Wilk Inc.
- Molina, R.; Zanon, G. & filelia, X. (1995). Use of serial Carcinoembryonic antigen CA15-3 assays in detecting relapses in breast cancer patients. *J. Breast Cancer Res. Treat.* **36**(1): 41-48.
- Morahan, P.S.; Volkman, A.; Melnikoff, M.G. & Dempsey, W.L. (1988). *Macrophage heterogeneity in: macrophage and cancer.* Hopper, G.H. & Fluton, A. Eds. CRC. Press, Boca Raton.

- Mouse anti-human CD4 FITC conjugate monoclonal antibody: CHEMICON international a division of serological a Corporation. CHEMICON EUROPE.
- Mouse Anti-human CD8 FITC conjugate monoclonal antibody: CHEMICON international a division of serological a Corporation CHEMICON EUROPE.
- Murta, F.F.; de Andrade, J.M.; Falcao, R.P. & Bighetti, S. (2000). Lymphocyte sub-population in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *J. Tumor.* **86** (5): 403.
- Nava, D.; Oliver, H.; Bathe, F. & Malek, T.R. (2000). Reversal of CD8+ T-cell ignorance and induction of anti-tumor immunity by peptide pulsed Apcs. *J. Immunology.*, **165**: 6731-6737.
- Nicolini, A.; Carpi, A.; Ferrari, P. & Pieri, L. (2003). Utility of a serum tumor marker panel in post operative follow up of breast cancer patients with equivocal conventional radiological examination. *J. Tumor. Biol.* **24** (6): 80-273.
- Nishimura, R.; Nagao, K.; Miyayama, H.; Matsnda, M.; Buba, K.; Mastsuoka, Y. & Yamashita, H. (2003). Elevated serum CA15-3 levels correlate with positive estrogen receptor and initial favorable outcome in patients who died from recurrent breast cancer. *J. B. Cancer.* **10**(3): 7-220.
- Nokad, J.A. & Ghedirian, P. (2005). Genetic and breast cancer. *J. Cancer research*, **21**(2): 80-175.
- Norcross, M.A. (1984). A synaptic basis for tumor lymphocyte activation. *J. Immunol.*, **35**: 113-134.
- Nowell, P.C. & Hungerford, D.A. (1960). Chromosome study on normal and leukemia human leukocyte. *J. Natl. Cancer Ins.*, **25**: 85.

-
-
- Nyren, O. (1998). Is *Helicobacter pylorus* really the cause of gastric cancer. J. Semin. cancer. Biol. **8**: 275-283.
- Omar, X.T.; Behbahan, A.E. & Al-Nagueeb, N. (1988). Carcinoembryonic antigen and CA15-3 in preoperative staging and postoperative monitoring of patients with cancer of breast. J. Biol. Marker. **3**: 12-20.
- Palazzo, S.L.; Lighori, V.; Molinari, B.; Greco, L.M. & Mancini, V. (1984). The role of carcinoembryon antigen in post mastectomy follow up of primary breast cancer and in the prognostic evaluation of disseminated breast Cancer. J. Tumori, **70**: 57-59.
- Pamela, N.M (2004). Cancer control. J. of moffitt B.C center, **11**:4.
- Paolo, B. (2006). Alcohol contributes substantially to cancer burden. International Journal of Cancer. **13**: 3-5
- Parslow, T.G.; Stites, D.P. Terr, A.J. & Imboden, J.B. (2001). Immunology load. Med. 19-39. Lang Medical Books McGraw Hill Medical Publishing Division, New York.
- Pathak, K.A.; Rhanna, R.R.; Khanna, H.D.; Rhanna, S.S. Gupta, S.S. & Khanna, N.N. (1996). Carcinoembryonic antigen: An invaluable marker for advance breast cancer. J. Post grad Med. **212**: 68-71.
- Paulick, R. & Caffier, H. (1988). Elevated serum CEA and prognosis of breast cancer patients. J. Cancer Detect Prev. **11**(3-6-6): 7-311.
- Philip, D.G. (1997). Mechanism of tumor immunology In: Dostimed, P.S.; Abba, I.T. & Tristram, G.P. (eds). Medical Immunology. B. C. Hall. Inc. USA.
- Pierotti, M.A.; Schichman, S.A. & Sozzi, G. (2000). Oncogenes In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.F.; Weichselboum, R.R.; Holland, J.F.;

- Ferri, E. & Ganster, T.E. Cancer medicine (5th ed) B. C. Decker. Inc. Canada.
- Playfair, J.H.L. & Chain, B.M. (2001). Immunology at a 7th ed., Blackwell Science Edinburgh, 8-9.
- Plsani, P.; Parkin, D.M.; Munoz, N. & Ferlay, J. (1997). Cancer and infection estimate of attributable ration 1990. J. Cancer. Epidem, of Biomarker, Prev. **6**: 387-400.
- Ramnik, S. (1987). Medical laboratory technology method and interpretations. New Delhi.
- Ramnik, S. (1989). Colour Atlas of practical pathology and microbiology. JAXPEE, BROTHERS, medical publishers New-Delhi-India.
- Ranges, G.E.; Figan, I.S.; Esperik, T. & Palladino, M.A. (1987). Inhibition of cytotoxic T-cell development by transforming growth factor β and reversed by recombinant tumor necrosis factor α . J. Exp. Med., 166-991.
- Rao, C.V. (2000). An introduction to Immunology-Narasa Publishing New Delhi.
- Raymond, W.R. (1987). Cancer Biology 2nd ed., Oxford University Press.
- Reichert, T.; DeBruvere, M.; Deners, V.; Totterman, T.; Lrdvard, P.; Yioksel, F.; Chapel, H.; Jewell. D.; Vanltove, L. & Linde, J. (1991). Lymphocyte subset reference range in adult Caucasians. J. immunopathol. **60**(2): 190-208.
- Renkvient, N.; Castell, C.; Robbinons, R.F. & Permiani, G. (2001). Alisting of human tumor Ag recognized by T-cell. J. Cancer Immunol. **50**: 3-15.
- Repetto, L.; Onetto, M. & Gardin, G. (1993). Serum CEA, Ca15-3 And MCA in breast cancer patients: A clinical evaluation. J. Cancer. Detect Perv. **17**(3): 414-415.

-
-
- Richard, M.H. (1999). Transplantation and tumor Immunology. Immunology 4th ed., 180-190 Inc Lippincots Wilians Wilkins USA.
- Ritz, J. (1989). The role of natural killer cells in immune surveillance. N. Eng. J. Med. **320**: 1748-1749.
- Robert, G.F. & Dan, L.L. (2005). Cell Biology of cancer in : Kasper, D.L.; Braunwal, E.; Fauci, A.S.; Hauser, S.L.; Longo, D.L. & Jameson, J.L. (eds) Harrisons principles of internal medicine 16th McGraw Hill. Inc. USA.
- Robey, E. (1994). Commitment to CD4 and CD8 lineage stochastic or instructive. J. semin. Immunol. **6**: 207.
- Romagnani, S. (1997). Th1/Th2 paradigm. J. Immunol. Today. **18**: 336.
- Rubin, P. (1973). A unified classification of cancer: An oncotaxonomy with symbols. J. cancer. **31**: 963.
- Russel, J.H. (1983). Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte induced large damage. Immunol. Rev. 72-97.
- Russell, P.J. (1998). Genetics 5th ed., The Benjamin cumming publishing company in men 10 part. USA.
- Russell, R.C.G.; Williams, N.S. & Bulstvode, C.J.K. (1987). Bailey & Loves Short practice of surgery 23 ed., Oxford University Press In New York.
- Safi, F.; Kohler, I. & Rottinger, E. (1991). The value of the tumor marker CA15-3 in diagnosis and monitoring breast cancer comparative study with CEA. J. Cancer., **68**: 574.
- Sahin , u.; tureci , o. and pfreundschuh, m .(1997). serological identification of human tumor Ag curr.opin immund .9: 709-716.
- Santagostino, A.; Garbaccio, G.; Pistorio, A.; Bolis, V.; Camisaseu, G.; Pagliaro, P. & Giretto, M. (1999). An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral

- blood lymphocyte subset in healthy adult. *J. Haematologia*, **84**(6): 449-504.
- Schwartz, R.H. (1990). Cell culture model for T- lymphocyte clonal energy. *J. Sciences.*, **248**: 1349.
- Scott, R.E.; Florine, D.L.; Wille, J.J.; Jr. & Yun, K. (1982). CD4 coupling of growth arrest and differentiation at distinct state in the G phase of the cell cycle. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**: 845.
- Sener, S.F.; Imperata, J.P. & Chmiel, J. (1989). The use of cancer registry data to study preoperative CEA level as indicator of survival in colorectal cancer. *J. Cancer.*, **39** (1): 50.
- Seveikova, L.; Hunakova, L.; Chorvath, B.; Turzovam, C. & Boljesiko, V. (2000). T-lymphocyte subset (CD₄/CD₈ ratio) in breast cancer patients. *J. Breast Cancer.* **12**: 23-25.
- Sherbet, G.V. (1982). *The biology of tumor malignancy*. Academic Press INC London.
- Shing, Y.; Folkman, J.; Sullivan, R.; Butterfield, C.; Murray, J. & Klagsbrum, M. (1984). Heparin affinity purification of tumor derived capillary endothelial cell growth factor. *J. Science.*, **223**: 1296.
- Silverberg, E. & Luberia, G. (1986). Cancer statistics 1986 CEA cancer J for Clinicans. 36-90.
- Simon, M.M.; Proster, M.; Rramer, M.D. & Fruth, D. (1989). An inhibitor specific for the mouse T-cell associated serine proteinase (TSP-1) inhibitor specific potential of cytoplasmic granules but not intact cytolytic T-cell. *J. Cell. Biochem.* **40**: 1.
- Soletormos, G.; Nielsen, D.; Scholer, V.; Moridsen, H. & Dombernowsky, P. (2004). Monitoring different stage of breast cancer using tumor marker CA15-3, CEA and TPA. *Eur. J. Cancer.*, **40**(4): 6-481.

- Sporn, M.B. & Lippmans, S.M. (2000). Chemo-prevention In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.F.; Weichselboum, R.R.; Holland, J.F.; Ferrill, E. & Ganster, T.E. (eds) Cancer medicine 5th ed., DcDecker Canada.
- Sporn, M.B. & Robert, A.B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *J. Nature.*, **313**: 745.
- Staab, H.J.; Ahemann, L.M.; Koch, H.L. & Andere, F.A. (1980). Serial Carcinoembryonic antigen (CEA) determination in the management of patients with breast cancer. *J. On coder Bio. Med.* **1**(3): 60-151.
- Susan, E.H.; Graham, A.C. & Walter, C.W. (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: The life long interplay of gene, life style and hormones. *J. Breast Cancer Re.*, **6**: 213-218.
- Tampellini, M.; Berruti, A.; Gorzegno, G.; Bitosis, R.; Botfini, A.; Durando, A.; Sarobba, M.G. Gastiglione, F. & Moro, G. (2001). Independent factor predict super normal CA15-3 serum levels in advance breast cancer patients at first disease relapse. *J. Tumor Biol.* **22**(6): 73-367.
- Tondini, C.; Hayes, D.F. & Gelman, R. (1991). Use of various epithelial tumor marker and stromal marker in assessment of cervical carcinoma obstet. *J. Gynecol.*, **77**:566.
- Tsukama, H.; Hiyama, T. & Tanaka, S. (1993). Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N. Engl. J. M.* **328**: 1797-1801.
- UNSCEAR. (1994). Sources and effects of Ionizing radiation. New York (USA) United Nation. Pub.
- Uppal, S.S.; Verma, S. & Dhot, T.S. (2003). Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subset in healthy Indian adult and the effects of sex, age, ethnically and smoking. *Cytometry. J. B. Clin. Cytom.* **52**(1): 6-32.

- Vineis , P.C.; contork ,G.C .; lynge ,E .; and vally , E .V.: (1995) occupational cancer in developed and developing contries .int .J . cancer 26:655-60.
- Vithavasai, V.; Sirisanthana, T.; Sakonwasun, C. & Suvanpivasiri, C. (1997). Follow cytometric analysis of tumor lymphocyte subset in adult Thais. Asian. Pac. J. Allergy Immunol. **15** (3): 6-141.
- Vogelstein, B.; Lane, D. & Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. J. Nature., **408**: 307-310.
- Wang, S.; Fam, F. & Wu, Z-Y. (2004). Lymphocyte sub-population in breast cancer. J. Zhonghua-Zhong-Liu-Za-Rhi. **26**(4): 2202.
- Warren, L. (2004). Tumor immunity In: medical Microbiology & immunology. Examination & Board Review 8th ed., McGraw-Hill Inc. USA.
- Welech, C.E. & Malt, R.A. (1983). Abdominal surgery "second of three part". N. Eng. J. Med. Rev. **308**(12): 95-685.
- Werner, M.; Faser, G. & Silverbery. (1993). Clinical utility and validation of emerging biochemical marker for mammary adenocarcinoma. J. Clin. Chem., **39**: 2386.
- Willett, w. c .(1989) The search for the causes of breast and colon cancer .J. nature . 338:382-94.
- William, A.B. (1992). Etiology and Epidemiology of malignant disease in: William, N.K.; Devta, V.T.; Dupont, H.L.; Harris, E.D. Hazz, W.R. & Holmes, E.W. (eds) Internal medicine 2nd. J.B. Lippicott Com. Philadephila.
- Yaman, A.; Continer, S.; Kibar, F.; Tasova, Y.; Sevdaoglu, G. & Dundan, I.H. (2005). Reference range of lymphocyte subset of healthy adult in Turkey. J. Med.prinpract. **14**(3): 93-189.

- Yee, C.; Gilbert, M.J.; Riddell, Brichard, V.G.; Atefer, J.A.; Thompson, T.B. & Greenberg, P.D. (1996). Isolation of Tyrosine-specific CD8 & CD4 T-cell clones from peripheral blood of Melanoma patients following in vivo vitro estimation with recombinant vaccine virus. *J. Immunol.* 159-4079.
- Zamcheck, N. (1981). The expanding field of colorectal cancer marker CE, the prototype cancer. *J. Bull.* **33**: 15-141.
- Zhiping, H.; Susan, E.H.; Golditz, C.A.; Stampfer, M.J.; Hunter, D.J.; Manson, J.E.; Hennekes, C.H.; Rasner, B.; Speizer, F.E. & Willett, W.C. (1997). Weight gain and breast cancer. *J. Amer. Association.*, **278**: 1407-1411.