دراسة في مستوى الكلوبيولينات المناعية IgG و IgM ومستوى التحول اللمفي باستخدام المشطرات PHA و ConA لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن CLL

lymphocytes transformation level by using PHA, Study in level of the immunoglobulins IgG, IgM and ConA in the patients of chronic lymphocytes Leukemia

م.م. عماد هادي حميد
كلية العلوم للبنات / جامعة بابل

الخلاصة :

تضمنت هذه الدراسة قياس مستوى الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة عند مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن CLL متمثلة بالكلوبيولينات المناعية IgG في مرحلة ما قبل العلاج ومرحلة إدامة العلاج ومجموعة السيطرة وقد وجد ان هنالك انخفاضا معنويا ملحوظا في مستوى الكلوبيولين المناعي مقارنة بمجموعة السيطرة .كما درس مستوى الكلوبيولين المناعي IgM للمرضى المصابين وقد وجد أن هنالك انخفاضا معنويا ملحوظا في مرحلة ما قبل العلاج ومرحلة ادامة العلاج بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

كما شملت الدراسة قياس مستوى الاستجابة المناعية الخلوية والنسبة المئوية للتحول اللمفي للمرحلتين ومجموعة السيطرة وباعتماد نوعين من المشطرات هما Phytohaemagglutinin (PHA) بثلاث تراكيز PHA = (250 100 , 150,) مايكروغرام/مللتر والمشطر الثاني هو Concanavalin A (ConA) تركيز 200 مايكروغرام/مللتر وقد تبين من الدراسة إن هنالك انخفاضا معنويا ملحوظا $P<0.05$ في استجابة الخلايا اللمفية لهذه المشطرات مقارنة بمجموعة السيطرة.

Summary:

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

المقدمة Introduction:

السرطان Cancer: يعد مرض السرطان من أهم المشاكل الصحية الهامة التي تواجه المرضى والأطباء في العالم إذ يسبب السرطان (3 .4) مليون حالة وفاة سنويا ، اذ يفيد التقرير الذي نشرته منظمة الصحة العالميةWHO لسنة (1990) أن الأمراض السرطانية تأتي بالمرتبة الثانية في عدد حالات الوفيات بعد أمراض القلب ، ويطلق مصطلح السرطان (Cancer) على أنواع مختلفة من الأورام الخبيثة(Neoplasm ,Tumor, Malignant) ويشمل الورم الخبيث الخلايا التي تغزو مجموعات قريبة من الخلايا والأنسجة وتحطيم الخلايا الطبيعية ، والأورام الخبيثة تسبب ألاماً وتتدخل في الوظيفة الطبيعية ، ولها القابلية على الانتشار إلى أجزاء أخرى من الجسم ، وهي لهذا تتميز عن الورم الحميد(Benign tumor) الذي لا ينتشر إلى أجزاء أخرى من الجسم .(Edwards & Bouchier, 1991) والأمراض السرطانية في جملتها أمراض غير معدية، وهي تتباين فيما بينها تباينا كبيرا في سرعة غزوها لأنسجة الجسم وفي مدى خطورتها، فبعضها سريع الانتشار في أجزاء الجسم بحيث تصعب السيطرة عليه، وبعضها الآخر يظهر بشكل أورام محدودة في مواضع معينة، ويتقدم فيها ببطء شديد يمكن السيطرة عليه ولو بإزالة الجزء المصاب (Muir, 1981) .

مسببات السرطان: تختلف أنواع أمراض السرطان باختلاف مسبباتها إذ يعد عامل الوراثة من العوامل المهمة لأنواع مختلفة من السرطانات، بينما تلعب العوامل البيئية دورا مهما في التسبب في أنواع أخرى منه ومن أهم العوامل المسببة للسرطان هي:1. التلوث النووي: هو اخطر أنواع التلوث في الوقت الحاضر وهو في تزايد مستمر بسبب التفجيرات النووية التي تحدث عند إجراء التجارب النووية وبسبب التسرب الإشعاعي الذي يحدث في المفاعلات التي تتسابق الدول

على إنشائها وخصوصا عندما تصاب هذه المفاعلات بأي خلل يؤدي إلى انفجارها أو احتراقها أو تسرب الإشعاعات النووية منها (Zwiebel and Cheson,1998) 2. تلوث المياه والخضراوات والفواكه بمختلف المواد الكيميائية الناتجة عن استخدام المبيدات الحشرية والأسمدة الكيميائية وكذلك تلوث المواد الغذائية المحضرة وخصوصا المعلبات ببعض المواد الكيميائية التي تضاف إليها كمواد حافظة وبعض العناصر التي تكسبها من العلب(Zwiebel and Cheson,1998).3. التدخين وتعاطي الكحول إذ يعد التدخين من أهم أسباب سرطان الرئة والحنجرة والبلعوم والمريء والمثانة، كما تعد الكحوليات من أهم أسباب سرطان المريء والبلعوم والكبد (Damle, et al.1999) .4. التعرض للإشعاع الشمسي المباشر حيث تساعد الأشعة فوق البنفسجية (Ultra Violet) على الإصابة بسرطان الجلد والشفاه وأكثر الناس تعرضا لها هم الفلاحون وعمال الطرق (Damle, et al.1999) .5. تلوث الهواء بالمواد الكيميائية المسرطنة التي تبعث من مناطق التعدين والمصانع المختلفة وخصوصا الصناعات الكيميائية مثل صناعة الأسمدة والمبيدات والبتروكيمياويات وصناعة الأسمنت ومحطات صهر المعادن وبالرغم من إن خطر تلوث الهواء في الإصابة بسرطان الرئة صغير جدا الاانه يمكن أن يساهم في إحداث الإصابة. (Muir, 1981) . النظام اللمفي Lymphoid System : النظام اللمفي ونظام تخليق خلايا الدم في نقي العظم بعلاقة وثيقة جدا .معظم الخلايا اللمفاوية تكون موجودة في العقد اللمفاوية وفي اجزاء اخرى من النظام اللمفي كالجلد والطحال واللوزتين والعقد اللمفاوية الخاصة(Damle, *et al*.1999).الخلايا اللمفاوية تدور من خلال قنوات Channels لمفاوية مرتبطة بالعقد اللمفاوية الموجود في الجسم تلتقي هذه القنوات مع بعضها مكونة القناة اللمفاوية الكبيرة . (Watson and Leonard , 1986 و Burruti , *et al*.1999) هنالك ثلاثة انواع من الخلايا اللمفاوية هي الحلايا اللمفاوية التائية اصل نشأتها من الثايموس Thymus يعبر عنها بـ T-lymphocyt . من وظائفها الأساسية مساعدة الخلايا البائية في إنتاج الاضداد Antibodies ضد البكتيريا او الفيروسات او غيرها من المايكروبات (Kee, 1998) .تنشأ الخلايا اللمفية البائية في نقي العظم Bone marrow ويعبر عنها بـ B- lymphocyt (Bacchus *et.al*1980) .وظيفتها تكمن في مسؤوليتها عن الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة حيث تنتج الأضداد Antibodies المهمة في معادلة الأجسام (الانتيجنات) الغريبة الداخلة للجسم .

هنالك نوع آخر من الخلايا اللمفية هي الخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer Cells والتي تهاجم الخلايا المصابة بالفيروس كوظيفة طبيعية دون مشاركة الأضداد أو وسائل أخرى.(Bauer , 1974) .

مرض ابيضاض الدم اللمفاوي Lymphocytes Leukemia :يقسم على نوعين :- الأول: ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد Acute Lymphocytes Leukemia (ALL)الثاني: ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن Chronic (CLL) Lymphocytes Leukemia (Danishefskey , 1980)

مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن :- Acute Lymphocytes Leukemia (CLL)مرض ينتج من ضرر وراثي في المادة الوراثية DNA في خلية مفردة في نقي العظم (Kiremidian ,2000) .

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

هنالك عدة عوامل تزيد من خطورة الإصابة بهذا المرض منها التعرض لجرعات إشعاعية عالية (High doses irradiation) كالذي حصل بعد تفجير القنبلة الذرية في اليابان مما سبب في ارتفاع معدلات الإصابة بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد (Crabtee ,2000). كما تلعب التجمعات السكانية الكثيفة في الدول المزدحمة على رفع معدلات الإصابة بهذا المرض. يتحدد مرض ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد بالمظاهر المناعية inmunophenotype والتشوهات الوراثية chromosomes abnormalities ، وقد وجد ان90% من المظاهر المناعية في الحالات المشخصة بابيضاض الدم اللمفاوي التي تحمل العلامات السطحية surface markers مشابهه لتلك الموجودة على سطح الخلايا البائية الطبيعية . بينما وجد أن 10% من تلك الحالات المشخصة بابيضاض الدم اللمفاوي الحاد تحمل العلامات السطحية الموجودة على سطح الخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية . (.Kumar , 2003) .

الهدف من الدراسة :

1. دراسة مستوى الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن CLL متمثلة بالكلوبيولين المناعي IgG .
2. دراسة مستوى الاستجابة المناعية الخلطية المتخصصة عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن CLL متمثلة بالكلوبيولين المناعي IgM .
3. قياس مستوى الاستجابة المناعية الخلوية والنسبة المئوية للتحول اللمفي للمرحلتين ومجموعة السيطرة وباعتماد نوعين من المشطرات هما (PHA)و (ConA) .
4. قياس مستوى الاستجابة المناعية الخلوية والنسبة المئوية للتحول اللمفي للمرحلتين ومجموعة السيطرة وباعتماد نوعين من المشطرات هما (PHA)و (ConA) .

المواد و طرائق العمل Materials and Methods:

العينات : جمعت خلال فترة البحث53 عينة كانت33 عينة مشخصة إصابتها بالسرطان من قبل أطباء أخصائيين حصل عليها من ردهة الأورام في مستشفى مرجان التخصصي في الحلة مقابل 20 عينة كمجموعة سيطرة وقد قسمت العينات إلى مجموعتين :المجموعة الاولى :شملت العينات المرضية التي تم جمعها من غرف ردهة الأورام وصنفت إلى مرحلتين حسب فترة المرض وطبيعة العلاج إلى مجموعتين المجموعة الأولى: عينات مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن قبل العلاج والبالغة (13) عينة .المجموعة الثانية: عينات مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن مع العلاج الكيميائي شملت (20) عينة .

المجموعة الثانية :وهي مجموعة عينات السيطرة جمعت من أشخاص أصحاء و شملت (20) عينة.

الفحص المختبري للتحول اللمفي Lymphocyte transformations في عينات دم مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد :تحضير المواد:حضرت المواد اللازمة للفحص حسب ما جاء في (Virag, 1988)

أولاً: تحضير محلول المضادات الحياتية Antibiotics solution

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

ثانياً: محلول واطئ التوتر Hypotonic solution:

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

ثالثاً: تحضير محلول حامض الكلوتامك L-glutamic acid:

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

رابعاً: تحضير محلول المثبتFixative solution:

حضر بمزج حجوم من الكحول المثيلي المطلق 99% مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي وحفظ في قناني لحين الاستعمال.

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

طريقة العمل:

وقد أجريت حسب طريقة (Virag, (1988 المحورة.

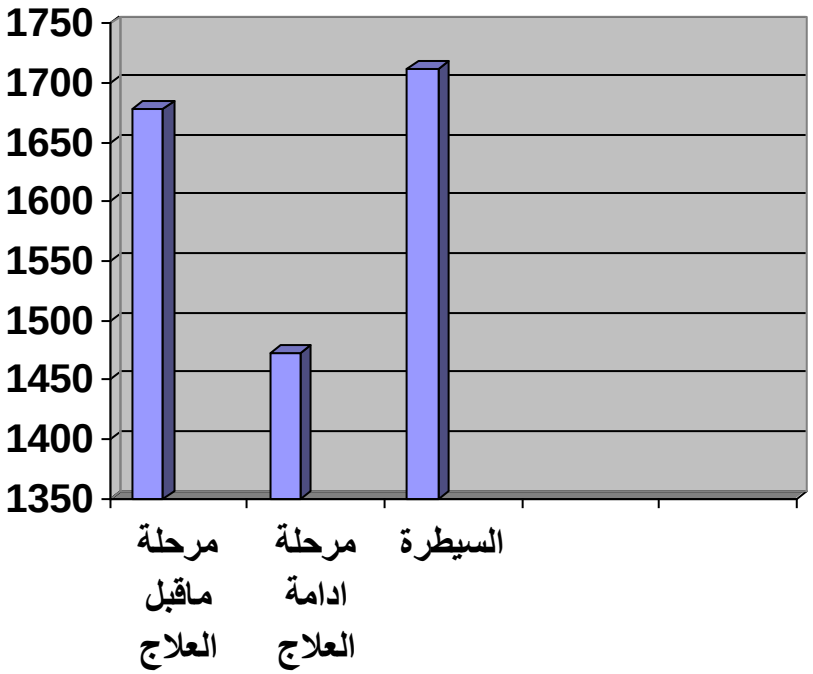
- سحبت عينات الدم الوريدي بمحقنة معقمة سعة 10مل ووضع 1مل في أنابيب زجاجية معقمة حاوية على مانع التخثر ليثيوم هيبارين Lithum heparin.
- وضع حجم 0.25مل من الدم في أنابيب الزرع النسيجي Silicon tubes الحاوية على 2.5مل من الوسط الزرعي مع 0.25مل من المشطر (PAH) بتركيز 100 و 150 و 250 مايكروغرام/مل و (ConA) بتركيز 200 مايكروغرام/مل.
- رجت الأنابيب بهدوء ووضعت في الحاضنة بدرجة 37م لمدة 72 ساعة.
- أخرجت الأنابيب من الحاضنة ورسبت الخلايا باستعمال جهاز المنبذة المركزي بسرعة 3000دوررة/دقيقة لمدة 5دقائق.
- أهمل الراشح تحت ظروف معقمة وأضيف للخلايا المترسبة 5مللتر من المحلول الواطئ التوتر بالتدريج ورجت الأنابيب برفق ثم أعيدت للحاضنة بدرجة حرارة 37م ولمدة 50دقيقة.
- أجريت بعد ذلك عملية النبذ المركزي بسرعة 3000دورة/دقيقة للأنابيب بعد إخراجها من الحاضنة وأهمل الراشح بظرف معقم بعدها أضيف المثبت بكمية 5مللتر لكل أنبوب بالتدرج ثم وضعت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4م لمدة 15دقيقة.
- رسبت الخلايا بالمثبت نفسه 3-4 مرات إلى أن تكون راسب عديم اللون ثم أضيف اليه مقدار 0.5 مل من المثبت إلى الخلايا المترسبة حضر منه عالق وبواسطة ماصة باستور تم اسقاط (4-5)قطرات من عالق الخلايا ووضعت على شريحة زجاجية وذلك على ارتفاع 60سم وتركت لتجف على صحيفة حارة (Hot plate) بدرجة حرارة 50م.
- صبغت الخلايا بصبغة كمزا لمدة 15دقيقة وغسلت بالماء المقطر وتركت لتجف في درجة حرارة الغرفة.
- فحصت الشرائح الزجاجية باستخدام المجهر الضوئي تحت قوة تكبير × 100 ثم حسبت 100خلية لمفاوية منها ارومات لمفاوية Lumphoblast ومنها خلايا لمفاوية في طور السكون حيث تم حساب النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية المتحولة

فحص الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد Single Radioactive Immunodiffution assay:

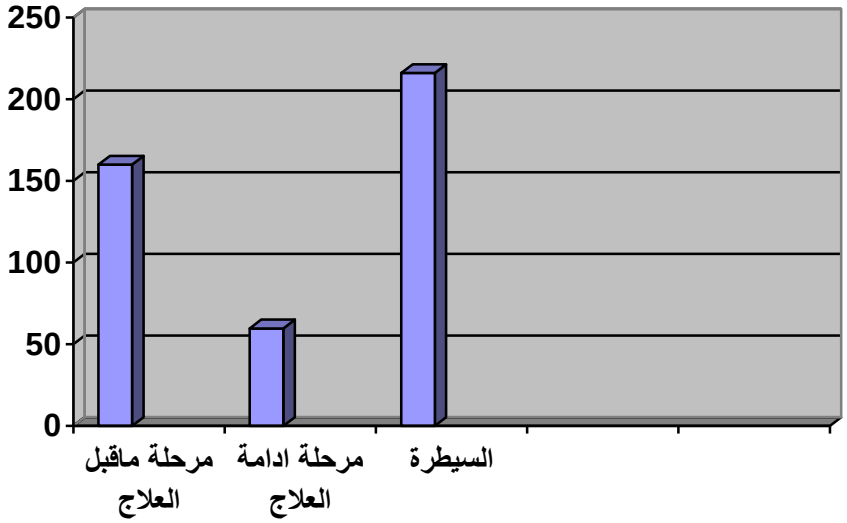
استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد لتقدير مستوى الكلوبيولينات المناعية IgA, IgM, IgG والمتمم C4,C3 وصفت باختبار منسيني Mancini test.

1. سحبت عينات الدم الوريدي بحقنة معقمة ثم وضع الدم في أنابيب معقمة غير حاوية على مانع تخثر.
2. سحب المصل بوساطة ماصة باستور معقمة وحفظ في الثلاجة بعبوات معقمة بدرجة حرارة -20م.
3. وضع 5مايكروليتر من عينات المصل في حفر الأطباق المرقمة من 1-12 والحاوية على الـ Agaros، 0.15% من Sodium Azide والمصل المضاد أحاديالتخصص Monospecific Anti-serum.
4. أغلقت الأطباق جيداً ووضعت في الثلاجة بدرجة 4م لمدة 72 ساعة في حالة IgM, IgA و 48 ساعة في حالة IgG.
5. تم إخراج الأطباق من الثلاجة وبعدها تم قياس قطر حلقة الترسيب المتكونة حول كل حفرة بوساطة المسطرة الخاصة للقياس.وقد تم استعمال الجدول المرفق مع عدة الفحص المجهزة من الشركة لإيجاد قيمة التركيز المقابلة لقطر حلقة الترسيب مباشرة وقد تم تسجيل النتائج بوحدة mg/dL.

النتائج والمناقشة Result and Discussion :

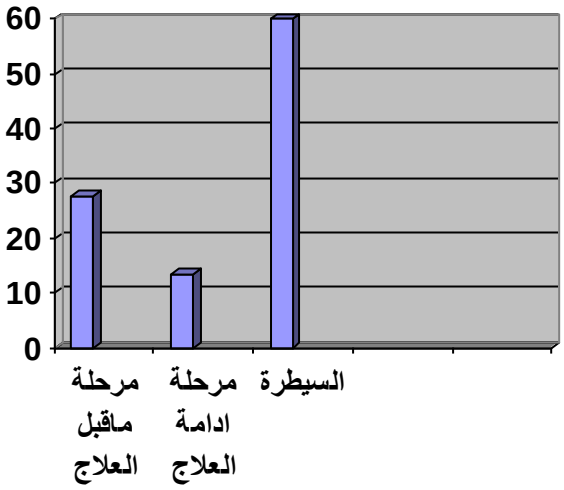


شكل (1) : معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgG لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمنCLL ومجموعة السيطرة.



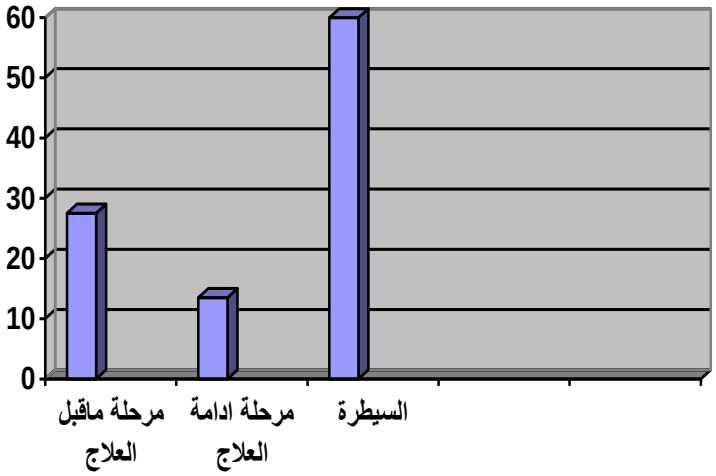
شكل (2) : معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمنCLL ومجموعة السيطرة.

ان مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (CLL) ورم خبيث يصيب الخلايا اللمفاوية المناعية يتميز بوجود كمية قليلة من الكلوبيولينات المناعية حيث ان مستوى هذه الكلوبيولينات المنخفض هو الاضطراب الاكثر ملاحظة في المناعة الخلطية ..(Hamblin, *et al* 2002) وتم التحري عن مستوى الاضداد في مصول مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (CLL) في مرحلة ما قبل العلاج ومرحلة العلاج ومقارنتها مع مجموعة السيطرة . حيث وجد ان مستوى الكلوبيولين المناعي IgG كان 1678.45±106.92 لمرحلة ما قبل العلاج و 1472.032±168.63 لمرحلة إدامة العلاج مقارنة 1712.5±61.14 لمجموعة السيطرة . كما تم التحري عن مستوى الكلوبيولين المناعي IgM للمرحلتين ومجموعة السيطرة حيث سجل 160.50.4 و 59.71±12.16 و 216.06±8.52 على التوالي . شكل (2) .وقد أظهرت هذه النتائج انخفاض معنوي واضح $P<0.05$ في مستوى هذين الكلوبيولين المناعيين بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .ان تركيز الكلوبيولينات المناعية المتناقص لوحظ في معظم المرضى حيث ان هذه التركيز الواطئ مرتبط مع علامات المرض مثل تضخم الكبد والطحال ونقص الأقراص الدموية وفقر الدم. ..(Hamblin, *et al* 2002)إن مستويات الكلوبيولينات المناعية تقل كلما طالت الفترة الزمنية للمرض ومع تقدم المرحلة السريرية حيث ان الاضطراب الذي يحدث في وظيفة الخلايا اللمفية البائية يؤثر مباشرة على عملية تصنيع الكلوبيولينات المناعية . (Kiremidian 2000).



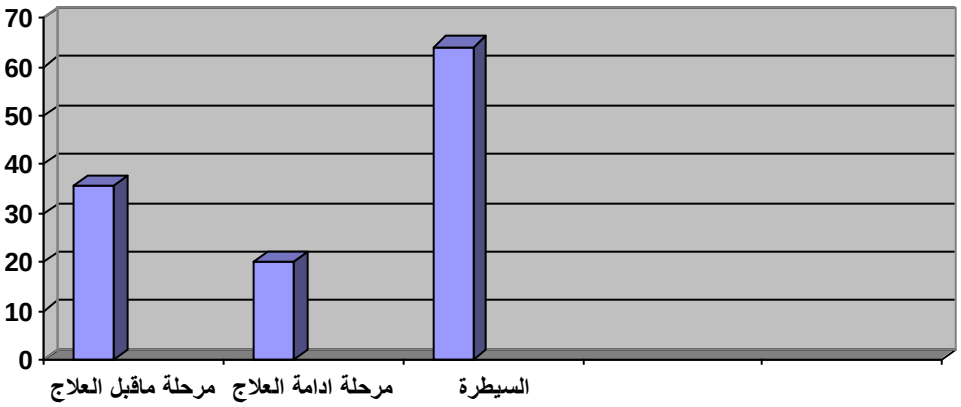
شكل (3) : النسبة المئوية للتحول اللمفي Lymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمنCLL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرPhytohaemagglutinin (PHA))بتركيز 100 مايكروغرام \ ميللتر .

تم اختبار التحول اللمفي Lymphocytes Transformation في عينات دم مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (CLL) وللمرحلتين مع مجموعة السيطرة وباستخدام المشطر النباتي Phytohaemagglutinin بتركيز PHA =100مايكروغرام/مللتر حيث سجلت نسبة التحول اللمفي لمرحلة ما قبل العلاج 21.75±4.15 ولمرحلة إدامة العلاج 11.83±2.11 ولمجموعة السيطرة 59.26±8.40 وقد تبين إن هنالك انخفاض معنوي واضح P<0.05 للمرحلتين بالمقارنة مع مجموعة السيطرة . في مرض الاعتلالات المناعية مثل ابيضاض الدم اللمفاوي تكون استجابة الخلايا اللمفاوية إلى المشطرات ضعيفة أو واطئة نتيجة لعوامل عديدة مثل الخلل الحاصل بفعل التثبيط أو الكبح الذي يحصل بواسطة الخلايا غير الكابحة مثل الخلايا وحيدة النواة أو العوامل التي تفرزها تلك الخلايا مثل البروستوكلاندثيات أو نتيجة الخلل في الخلايا اللمفاوية المناعية الأولية. (شرف، عبد العزيز طريح 2000)

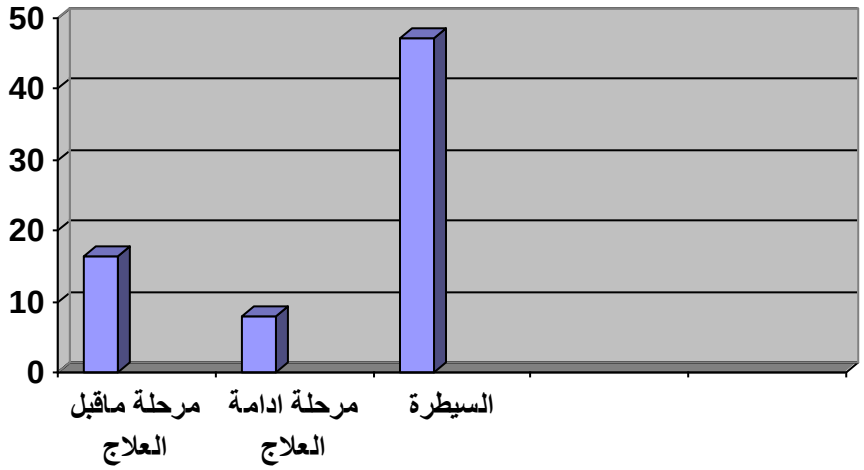


شكل (4) : النسبة المئوية للتحول اللمفيLymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمنCLL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرPhytohaemagglutinin (PHA)بتركيز 150 مايكروغرام \ ميللتر .

كما تم اختبار التحول اللمفي Lymphoma Transf في عينات دم مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (CLL) وللمرحلتين مع مجموعة السيطرة وباستخدام المشطر النباتي بتركيز PHA =150مايكروغرام/مللتر سجلت نسبة التحول للمرحلتين ولمجموعة السيطرة 35.49±5.3 و 19.9±3.4 و 64.12±9.1 على التوالي. وقد جاءت هذه النتائج موافقة للنتائج التي توصل إليها الباحثان (Crespo and Bosch 2003) فقد وجدا انخفاضا واضحا في في النسبة المؤية لتحول الخلايا اللمفية عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد والمزمن وبزيادة تركيز المشطر تزداد هذه النسبة.



شكل (5) : النسبة المئوية للتحول اللمفيLymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمنCLL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرPhytohaemagglutinin (PHA)بتركيز 250 مايكروغرام \ ميللتر .



شكل (6) : النسبة المئوية للتحول اللمفيLymphocytes Transformation لمرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمنCLL ومجموعة السيطرة باستخدام المشطرConA Concanavalin)بتركيز 200 مايكروغرام \ ميللتر .

كما تم اختبار التحول اللمفي Lymphoma Transf في عينات دم مرض ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن (CLL) وللمرحلتين مع مجموعة السيطرة وباستخدام المشطر النباتيConcanavalinA (ConA)بتركيز 200 مايكروغرام \ ميللتر .سجلت نسبة التحول للمرحلتين ولمجموعة السيطرة 16.44±2.03 و 7.98±0.5 و 47.15±6.3 على التوالي. وقد جاءت هذه النتائج موافقة للنتائج التي توصل إليها الباحثان (Crespo and Bosch 2003) فقد وجدا انخفاضا واضحا في في النسبة المؤية لتحول الخلايا اللمفية عند مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي الحاد والمزمن وبزيادة تركيز المشطر تزداد هذه النسبة.

References :

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

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

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

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

4-Crespo M,and Bosch F(2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. ;348:1764–1775.

5-Damle R., Wasil T. Fais F(1999). chronic lymphocytic leukemia. Blood.;94:1840.

6-D6-Danishefskey ,I.(1980) ."Biochemistry for medical sciences" 1st .ed. Little , Brown and company , Inc. , USA .

Edwards and Bouchier(1991). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1975;46:219.

7-Hamblin TJ, Orchard JA, and Ibbotson RE(2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood.;99:1023–1029.

8-Kee, J.L.(1998). "Hand book of laboratory diagnostic test " , 3rd ed ., Appeleton & lange , USA .

9-Kiremidian , S.L. ; Roy , M. ; Glickman , R. ; Schneider , K. ; Rothstein , S. ; Cooper , j. ; Hochster, H. ; Kim , M and Newman , R. (2000) . "Selenium and Immunocompetence in patients with head and neck cancer". Biol . Trace . Elem.Res, 73 (2):79-111 .
10-Kumar ,V. ; Cortran , R.S and Robibins , S.L .(2003). "Basic Pathology",7th .ed , W.B. saunders Company , USA
11-MuirC.(1981). Bone marrow histologic pattern—the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia 329 cases. Blood. 64:642
12-Virag (1988) . Cellular immune response against viral infections.*2*:1-13
13-Watson , R.R.and Leonard , T.K. (1986) . " Selenium , vitamin A , E and C : Nutrients with cancer prevention properties" .J. Am. Diet . Assoc. 86 (4) : 505 –510.
14-Zwiebel JA, Cheson BD (1998) Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. Semin Oncol.;25:42.