

## دراسة قابلية الخلايا للمفاوية التائية على التحول و الأنقسام في المرضى المصابين بألتهاب المفاصل الرثوي و داء الذئب الأحمراري

\*سناء رحمن، \*غنيمة صادق و \*\*هناء رحمن

\* قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد.

\*\* دائرة صحة الكرخ.

### الخلاصة

ان عملية التحول و الأنقسام للخلايا للمفاوية التائية هي احد مظاهر الاستجابة المناعية الخلوية لذلك تم دراسة قابلية هذه الخلايا على التحول و الأنقسام للمرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid Arthritis RA) ومرضى داء الذئب الأحمراري (Systemic Lupus Erythematosus SLE) بأستعمال المشطر (PHA) Phytohaemagglutinine إذ اظهرت النتائج وجود انخفاضاً معنوياً  $P < 0.001$  في نسبة الخلايا التائية المنقسمة لمرضى RA قياساً بمجموعة السيطرة (الأصحاء) في حين لم يكن الانخفاض معنوياً قياساً بمرضى (Osteo arthritis O.A) اما في حالة مرضى SLE قد كانت نسب الخلايا للمفاوية المنقسمة اقل انخفاضاً قياساً بمجموعتي السيطرة (الأصحاء والمرضى O.A)  $P < 0.001$ . كما اظهرت النتائج ان لشدة المرض كونه فعال (active) او غير فعال (non-active) تأثير في اختلاف استجابة الخلايا للمفاوية للمشطر PHA إذ كانت اعلى نسبة في حالة المرضى ذوي الحالات غير الفعالة. لوحظ في هذه الدراسة وجود علاقة بين مدة العلاج بأستعمال العقارين (Methotrexate, Chloroquine) وتأثير ذلك في الاستجابة المناعية الخلوية إذ وجد انه كلما زادت مدة العلاج ادى الى انخفاض معدل النسب المئوية لعملية التحول و الانقسام للمفاوي لمجموعة مرضى RA بدلائل احصائية معنوية و علاقة غير معنوية بالنسبة لمرضى SLE.

### المقدمة

73.6 كذلك اشار Naylor وجماعته عام 1989 الى خلل الاستجابة التكاثرية للخلايا للمفاوية التائية لمرضى RA بأستخدام PHA حيث يتم الاستدلال عليه من قلة جريان ايون الكالسيوم الذي يدل على خلل مسالك التأشير (Signaling pathways) للتعبير عن انتاج الأنترلوكين 2 (IL-2) [3].

### المواد وطرائق العمل

#### - جمع النماذج

- تم جمع نماذج الدم من المرضى المراجعين لكل من العيادة الاستشارية لمستشفى بغداد التعليمي شعبة المفاصل و دار التمريض الخاص خلال المدة من الأول من حزيران و لغاية الأول من كانون الأول عام 2004 و شملت الدراسة المجاميع الآتية:

#### - مجموعة مرضى RA

شملت 61 مريضاً 52 اناثاً تراوحت اعمارهم 13-70 سنة و 9 ذكور تراوحت اعمارهم 30-65 سنة، وتم

استخدم فحص التحول و الأنقسام للمفاوي بأستخدام المشطرات لأول مرة من قبل Nowell 1960 وهو احد طرائق تقدير الخلايا للمفاوية في تحديد نسبة تكون الأرومات للمفاوية او تحديد معامل الأنقسام الخيطي (Mitotic Index) [1] او من قياس النيوكليوتيدات المشعة مثل (Tritiated thymidine) التي تضاف للوسط اذ تندمج بالحامض النووي الرايبوزي RNA كما في اليوراسيل (3H) [2]. استخدم هذا الفحص لتقييم احد مظاهر الاستجابة المناعية الخلوية لمرضى التهاب المفاصل الرثوي (RA) (Rheumatoid Arthritis) و داء الذئب الأحمراري (Systemic Lupus Erythematosus) (SLE) ان الخلايا للمفاوية التائية لمرضى SLE غير المتعالجين تظهر استجابة ضعيفة لمشطر (PHA) (Phytohaemagglutinin) اذ كان متوسط الاستجابة للمرضى  $57.9 \pm 5.7$  في حين الأصحاء  $5.2 \pm$  ،

-اضيف لأحدى الأنويتين (0.25) مليلتر من المشطر PHA و تركت الأخرى بدون مشطر بوصفها سيطرة ثم حضنت الأنابيب بدرجة (37) م لمدة (72) ساعة. رسبت الخلايا بأستخدام جهاز النيد المركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.

-اضيف لكل انبوبة 5 مليلتر من محلول ناقص التوتر hypotonic solution (0.58 غم من كلوريد البوتاسيوم في 100 مل ماء مقطر) بهدوء الى الراسب مع الرج برفق لتجنب تحطم الخلايا ثم حضنت بدرجة (37)م لمدة 30 دقيقة.

رسبت الخلايا مرة اخرى بنفس الطريقة اهمل الراشح بعناية بوساطة ماصة باستور ثم اضيف بضع قطرات من المحلول المثبت الى الخلايا المترسبة مع الرج برفق و اكمل بأضافة (5) مل من المثبت على شكل قطرات مع الرج المستمر، ثم وضعت الأنابيب في الثلجة لمدة 15 دقيقة.

رسبت الخلايا بالطريقة نفسها و اهمل الراشح و غسلت الخلايا بالمحلول المثبت مرة اخرى أُعيد غسل الخلايا من 3-4 مرات حتى يصبح الراشح شفافاً عديم اللون. اهمل الراشح و اضيف بضع قطرات من المثبت الى الراسب مع الرج.

تم اسقاط من 5-7 قطرات من عالق الخلايا بوساطة ماصة باستور على شريحة زجاجية سبق تركها في محلول الكروميك لمدة 3 ايام، ثم غسلت جيداً ووضعت في الكحول الأتيلي لمدة نصف ساعة، تركت قطرات الخلايا تجف في الهواء.

غمرت الشريحة بصبغة كمزا لمدة (15) دقيقة ثم فحصت الشريحة وحسبت 200 خلية لمفاوية في اطوار مختلفة من الأنقسام واستخرجت نسبة الخلايا للمفاوية المتحسسة اعتماداً على المعادلة الآتية:

$$\frac{\text{عدد الخلايا للمفاوية المتحسسة} \times 100}{\text{الخلايا للمفاوية المتحسسة} \%} = (200) \text{ خلية لمفاوية متحسسة وغير متحسسة}$$

تشخيص حالات الالتهاب (active) وغير الالتهاب (non-active) من قبل الطبيب المختص.

#### -مجموعة مرضى SLE

شملت 31 مريضاً 27 اناثاً تراوحت اعمارهم بين 14-48 سنة و 4 ذكور اعمارهم (13-51) سنة.

#### -مجموعتي السيطرة

كان الأصحاء ظاهرياً 21 شخصاً 13 اناث و 8 ذكور تراوحت اعمارهم (13-55) ومجموعة المصابين بالتهاب الفصال العظمي (Osteo Arthritis) عددهم 8، 4 اناث و 4 ذكور تراوحت بين (45-70).

#### -اختبار قابلية الخلايا للمفاوية على التحول و الأنقسام

اجري هذا الأختبار بالأعتداد على كل من ناصر 1997 و Shubber 1985 [5,4].

#### -تحضير وسط Rose Park Memorial Institute (RPMI)

-تم تحضير الوسط الزراعي الكامل RPMI 1640 بأدابة (10.4) غم من مسحوق الوسط مع (2)غم من بيكاربونات الصوديوم النقية في (1000) مليلتر من الماء المقطر الخالي من الأيونات عقم بالترشيح بمرشحات milipore filter ذات تقوب (0.22µm).  
-اضيف (100) مليلتر من مصل جنين البقر و 10 مليلتر من محلول حامض الكلوتاميك 25% و 10 مليلتر من محلول مضاد الحياة (1) غم من سلفات الستربتومايسين مع مليون وحدة عالمية من البنسلين البلوري في (100 مليلتر) ماء مقطر و 10 مليلتر من دارئ هيبس.

-حضن الوسط بدرجة (37)م لمدة 24 ساعة لغرض التأكد من عدم تلوثه.

#### -طريقة اجراء الفحص

تم جمع نماذج الدم في انابيب حاوية على الهيبارين بتركيز 20 وحدة عالمية/مليلتر دم.

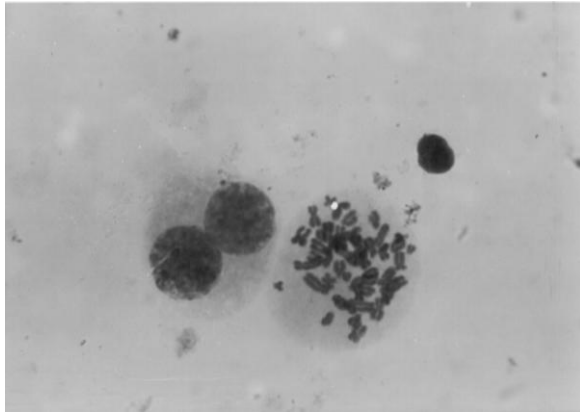
استخدمت انبوتان لكل نموذج دم حاويتان على (2.5) مليلتر من الوسط الزراعي الكامل ثم اضيف لكل انبوبة 0.25 مليلتر من الدم.

## النتائج والمناقشة

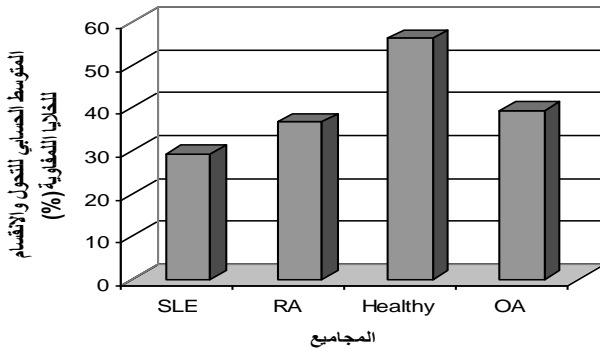
## -مرضى التهاب المفاصل الرثوي RA

فحصت الشرائح الزجاجية بالمجهر الضوئي ثم حسبت الخلايا للمفاوية المتحسسة (الأورمات للمفاوية lymphoblaste) وغير المتحسسة (lymphocyte) للمجميع شكل (1)، فظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في نسبة الخلايا المنقسمة لمرضى RA ( $P<0.001$ ) قياساً بمجموعة السيطرة (الأصحاء) في حين لم يلاحظ ذلك قياساً بمجموعة مرضى التهاب الفصال العظمي OA (شكل 2) وكان لشدة المرض كونه (active) او (non-active) تأثير في اختلاف استجابة الخلايا للمشط PHA إذ كانت اعلى نسبة للمرضى ذوي الحالات غير الفعالة (non-active) كما موضح بالجدول (1) وهذه

النتائج تتفق مع نتائج دراسات عديدة اشارت الى وجود انخفاض معنوي في معدل تحفيز وانقسام الخلايا للمفاوية للمرضى المصابين بـ RA [7,6] كما اشار Emery عام 1988 الى انخفاض قابلية الخلايا للمفاوية لمرضى RA على انتاج المحرك الخلوي IL-2 عند تحفيز الخلايا إذ ان عدد الخلايا الكلي المعبرة لمستقبلات IL-2 (IL-2R) يكون طبيعياً لكن عدد المستقبلات لكل خلية لمفاوية [7] يكون قليلاً لاسيما لدى مرضى RA بحالته الفعالة (active) وهذا يقلل انتاج IL-2 ثم تضاعف الخلايا للمفاوية كذلك اظهرت النتائج ان العقاقير التي يتناولها المرضى (Methotrexate, Chloroquine) لها دور كبير في انخفاض نسبة استجابة الخلايا للمفاوية للانقسام [9,8]، بينت الدراسة الحالية وجود علاقة خطية عكسية بين مدة العلاج الطويلة التي امتدت بين (5-20) سنة ومتوسط النسب المئوية لعملية التحول والانقسام وكان معامل الارتباط  $r=0.371$  عند مستوى دلالة  $P=0.01$  شكل(3).



شكل (1) صورة فوتوغرافية لخلية لمفاوية ساكنة على اليمين وكروموسومات خلية لمفاوية منقسمة في طور الانقسام الخيطي في الوسط ولأرومة لمفاوية على اليسار، الصبغة المستخدمة هي صبغة كمزا، قوة تكبير 1000.



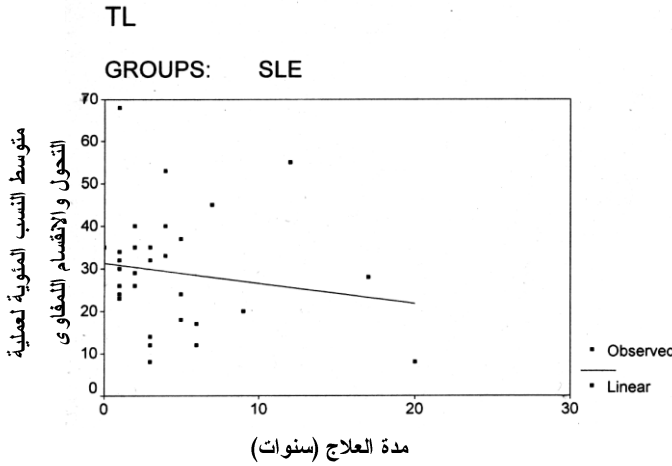
SLE : Systemic lupus Erythematosus.  
R.A : Rheumatoid Arthritis.  
O.A : Osteo Arthritis.

شكل (2): يوضح متوسط النسب المئوية للتحويل والانقسام للخلايا للمفاوية لمجميع المرضى والسيطرة.

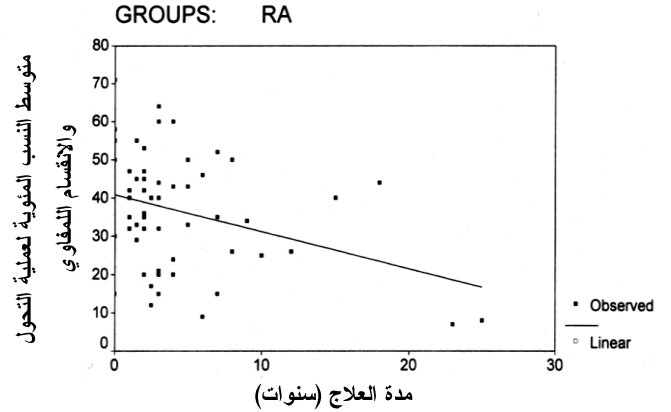
## جدول (1)

تأثير فعالية المرض (disease activity) في انقسام الخلايا للمفاوية باستخدام المشطر PHA لمرضى RA.

حالة المرض	العدد	المتوسط والانحراف المعياري
Active	37	33.6±14.4
Non active	24	49.4±12.4



شكل (4) نقاط الانتشار والاتجاه العام الذي يمثل العلاقة بين مدة العلاج وعملية التحول والانقسام للخلايا للمفاوية لمرضى SLE.



شكل (3) نقاط الانتشار والاتجاه العام الذي يمثل العلاقة بين مدة العلاج وعملية التحول والانقسام للخلايا للمفاوية لمرضى RA.

#### -مرضى داء الذئب الأحمراري SLE:-

- اظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في قابلية الخلايا للمفاوية على الأقسام لمرضى SLE قياساً بمجموعتي السيطرة  $P < 0.001$  وهذه النتائج متفقة مع دراسات عديدة [10,11,12] اوضحت الدراسة الحالية ان متوسط نسب انقسام الخلايا للمفاوية لمرضى SLE اقل من مرضى RA لكن بفروق غير معنوية، ان انخفاض قابلية هذه الخلايا على التحول والانقسام لمرضى SLE قد يعود لاسباب عديدة منها:

- مصول المرضى قد تكون حاوية على اضرار ذاتية تثبط ارتباط الأنترلوكين 2 IL-2 الى المستقبلات الخاصة به في الخلايا التائية (IL-2R) [12, 13].

وجود انخفاض في الأحداث المبكرة لعملية تنشيط الخلايا للمفاوية التائية مثل جريان ايون الكالسيوم وتنشيط بروتين Kinase A وتوليد الأدينوسين الحلقي احادي الفوسفيت [14, 15, 16]. اظهرت الدراسة وجود علاقة خطية عكسية ضعيفة بين مدة العلاج وعملية التحول والانقسام للمفاوي لهؤلاء المرضى وذلك لأن اغلب مرضى SLE في هذه الدراسة يتعاطون العلاج لمدة ليست طويلة (شكل 4).

#### References

- [1] B.M.Al-Allak, "Response of human blood lymphocyte to chemical and physical mitogen", Fourth Scientific Conference Research. Vol. 5, part 2, 1986, pp.876-888.
- [2] D.W.Paty, and D.Hughes, "Lymphocyte transformation using whole blood cultures: Analysis of responses", J. Immunol. Metho.,Vol. 2, 1972, pp. 99-117.
- [3] W.G.Naylor, S.P.Yeang, G.D.Kitas, and P.A. Bacon, "Abnormal calcium signaling pathway in lymphocyte from patients with RA", Arthritis & Rheum., (suppl.), Vol.32, No.4, 1989,pp. C 117.
- [4] اسم محيسن ناصر، "تأثير تركيز وجاهزية الزنك على الاستجابة المناعية في الفئران"، اطروحة ماجستير. كلية الزراعة-جامعة بغداد، 997.
- [5] E. K. Shubber, and B. M. A. Allak, "Spontaneous chromosomal aberrations in human lymphocytes", I. Effect of culture condition, The nucleus. Vol.29, No.3, 1985,pp.92-98.
- [6] F.Ponchel, A.W.Morgan, S.J.Bingham, M.Quinn, M.Buch, R.J.Verburg, P.Emery, "Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with RA", Blood, Vol.100, No.13, 2002, pp.4550-4556 (Abst.).

Rheumatology, 5<sup>th</sup> edition. Vol. 3 W.B. Saundery Company, 1997, pp.1015-1027.

[16] M. P.Nambiar, C.V. Fisher, V.G. Warke, S.Krishnan, J.P. Mitchel, N.Delaney, G. C.Tsoko, "Recoinsition of deficient T-cell receptor zeta chain restores T-cell signaling and augments. T-cell receptor CD3- induced interleukin-2 production in patients with SLE", Arthritis & Rheum., Vol.48, 2003, 1948-1955.

### Abstract

T-Lymphocytes transformation is considered one of the cellular immune response aspects for that we studied this process in patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) by using phytohaemagglutinin (PHA) as mitogen, the results was showed asignificant reduction ( $P < 0.001$ ) in the mean of stimulation and division of T-Lymphocytes in the patients with RA compared with healthy control group, while there was no significant differences compared with patients with osteoarthritis (OA). Also the results showed that is the lymphocytes transformation of SLE patients were more decreased compared with that of control groups ( $P < 0.001$ ). The results showed that disease activity (active or non-active) had an effect on T-lymphocytes transformation by using PHA, the mean of division in patients with non-active disease was higher than active disease. The study examined the relationship between long term treatment (Methotrexate, Chloroquine) and effect of this on cellular immune response, we found that the prolonged period of treatment cause decrease in lymphocytes transformation for RA patients, on the other hand the study showed that patients with SLE have no significant relationship between long term treatment on T-lymphocytes transformation.

[7] P.Emery, N.Wood, K.Gentry, A.Stockman, I.R. Machay, O. Bernard, "High-affinity interleukin-2 receptor on blood lymphocyte are decreased during active RA", Arthritis & Rheum., Vol.31, 1988, pp. 81-1176.

[8] P.E. Lipsky, and M.Ziff, "The effect of D-penicillamine on mitogen induced human lymphocyte profileration synergiste inhibition by D-pencillamine and copper salt", J. of Immuno. Vol.120, 1978, pp.1006-1013.

[9] A.H.Gerards, S. de Lathonder, E.R.de Groot, B.A.C.Dijkams, and L.A.Aarden, "Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with RA", Rheumatology ,Vol.42,2003, pp. 1189-1196.

[10] وحيد احمد زيدان، "دراسة الاستجابة ال مناعية والانواع العامة لفقر الدم لمرضى داء الذئب الاحمراري" اطروحة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد. 2002.

[11] D.A.Horwitz, W.Stohl, "T-lymphocytes, cytokines, and immune regulation", in "SLE", D J Wallace, B H Hahn (eds.), Dubois "lupus Erythematosus" 4<sup>th</sup> ed., Lea & febiger, Philadelphia:,1993 pp. 83-96.

[12] T.Tanaka, O.Saiki, S.Negoro, T. Jgarashi, T. Kuritani, H. Hara, M. Suemura, S.Kignimoto, "Decreased expression (p 70/75) in T-cell from patients with systemic lupus erythematosus", Arthritis & Rheum., Vol. 32,1989,pp.552-558.

[13] J.B.Winfield, T.Mimur, P.D. Femsten, "Antilymphocyte autoantibodies" In Wallace D J, Hahn B H (eds.)" Dubois' Lupus Erythematosus. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993.pp.254.

[14] P.Hesler, A.L. Schultz, and G.M. Kammer, "Defective CAMP. dependent phosphorylation of intact T-lymphocyte in active SLE", Arthritis & Rheum., (suppl.)Vol.32,No.4,1989,pp.C5.

[15] B. H. Hahn, "Pathogenesis of systemic lupus erythematosus" In Kelley W, Harris E D, Ruddy S and Sledge C D (eds,)