

دراسة عملية البلعمة في المرضى المصابين بالتهاب 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 البلعمة هي احد مظاهر الاستجابة المناعية لذلك تم دراستها في المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي Rheumatoid Arthritis (RA) و داء الذئب الأحمراري (SLE) Systemic Lupus Erythematosus (SLE) اذ ان هذين المرضين من امراض المناعة الذاتية التي تتصف بوجود خلل في الجهاز المناعي. تم تقييم قابلية الخلايا البلعمية على الألتهم بأستعمال عالق جرثومة *Staphylococcus aureus* إذ اظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في قابلية الخلايا الملتهممة للمكورات العنقودية الذهبية لمرضى RA قياساً بمجموعتي السيطرة $P < 0.001$ ، اما مجموعة SLE اظهروا انخفاضاً اعلى قياساً بمجموعتي السيطرة $P < 0.001$.

المقدمة

ضعف في النشاط البلعومي [1] ربما يعود ذلك الى التهام هذه الخلايا للمعدقات المناعية [4,5]. تكون هذه الخلايا هدفاً لبعض عقاقير مستخدمة لعلاج امراض المناعة الذاتية مثل RA ، SLE، كونها من الخلايا المشاركة بالالتهاب منها املاح الذهب و كذلك (NSAIDs Non steroid anti-inflammatory Drugs) التي تعمل على تثبيط افراز انزيم super oxide بنسبة 25% [6]. ايضاً فان عقار Methotrexate ، Leflumomide يعملان على تحوير استجابة الأنجذاب الكيميائي وذلك بالتأثير على مستقبلاته و التداخل مع آليات انتقال هذه المستقبلات [7] و هذا يفسر الأصابة بالأخماج (Infections) عند العلاج بهذين العلاجين لمدة طويلة اذ اشارت احدى الدراسات التي شملت مجموعة من مرضى RA ان نسبة الوفيات بسبب هذه الأخماج وصلت الى 14% من المعدل الكلي للوفيات بين هؤلاء المرضى [8].

تعد عملية البلعمة جزء من المناعة الخلقية (innate immunity) و قد اكتشف هذه العملية عالم الحيوان الروسي مچنكوف [1] Metchinkoff. هناك عوامل تدعى عوامل الأستساغة (opsonins) تسهل عملية البلعمة و تجعل الجسم الغريب هدفاً سهلاً من هذه العوامل الأضداد و المتمم، اذ ان معدل عملية البلعمة في حالة وجود ضد نوعي لمستضد ما يكون اكثر 4000 مرة مما في حالة غياب الضد [2]، بعد التهام الجسم الغريب يتم اصطياده في حوصلة تدعى Phagosome التي تلتحم مع الجسم الحال، تشمل الخلايا البلعمية انواع معينة من الخلايا البيض عديدة اشكال النوى (Polymorphonuclear) (PMN) والخلايا البلعمية وحيدة النواة [1].

الخلايا عديدة اشكال النوى PMN

- خلايا وحيدة النواة Monocytes هي من الخلايا الملتهممة في الدم الا ان قابليتها على الألتهم اقل من الخلايا العدلة اذ ان قابلية هذه الخلايا على التهام بكتريا *Staphylococcus aureus* تساوي 20% من قابلية الخلايا العدلة. في دراسة لوحظ ان الخلايا وحيدة النواة المحيطة لمرضى RA تظهر قابلية التهام للمكورات العنقودية الذهبية اعلى من الأصحاء، اذ كان معدل النسب

هي خلايا بلعمية متمثلة بالخلايا العدلة (neutrophil) بالدم اذ تعد خط الدفاع الأول ضد العوامل الخمجية (infectious agents) بشكل 60-70% من المجموع الكلي لكريات الدم البيض [3] هذه الخلايا غير منقسمة قصيرة العمر، قد تعاني في الدم المحيطي و السائل المفصلي لمرضى Rheumatoid Arthritis (RA) و Systemical pus Erythematosus (SLE) من

سنة رحمن

1. علوم الحياة-جامعة بغداد- و نميت على وسط الأغار المغذي، وحضنت عند درجة (37)م لمدة (24) ساعة. ثم جمع المستعمرات النامية بواسطة الناقل (Loop) في (10) ميليلترات من المحلول الفسيولوجي (normal saline) المعقم.
2. رُسبت الخلايا باستخدام جهاز النبذ المركزي بسرعة دوران 2000 دورة/ دقيقة و لمدة (10) دقائق. أهمل الراشح وغسل الراسب بالمحلول الفسيولوجي ثلاث مرات بالطريقة نفسها.
3. علقت الخلايا بالمحلول الفسيولوجي وبتركيز (1×10⁶) خلية/ ميليلتر.
4. وزع العالق في قنار معقمة بحجم (0.25) ميليلتر. ثم حفظت عند درجة (-20)م لحين استعمالها في فحص البلعمة مع تجنب إعادة تجميد واذابة العالق أكثر من مرة واحدة.

- اختبار فعالية البلعمة

اجري هذا الاختبار استناداً الى طريقة Further عام 1985 لتقييم قابلية الخلايا البلعمية على الألتهام وقد استخدم عالق جرثومة *Staphylococcus aureus* بوصفه مستضداً. وضع نموذج الدم مباشرة بعد جمعه في انابيب معقمة حاوية على مادة مانعة للتخثر (الهيبارين) مطلية بالسليكون لمنع ادمصاص الخلايا الملتهمة على الزجاج التي لها قابلية كبيرة على ذلك مما يؤثر على نتائج الاختبار. كذلك يجب مراعاة اجراء الفحص خلال (1-2) ساعة بعد جمع الدم لضمان فاعلية الخلايا الملتهمة.

- اجراء الأختبار

- مزج (0.25) مل من نموذج الدم الكامل مع (0.25) مل من عالق البكتريا المحضر بتركيز (1×10⁶) خلية/ مل في انبوبة الأختبار المعقمة والمطلية بالسليكون.
- اخذت قطرة من المزيج باستخدام ماصة باستور وضعت على شريحة زجاجية نظيفة قد تم غمرها بمحلول حامض الكروميك لمدة ثلاث ايام ثم غسلت وتركت بالكحول الأيثلي نصف ساعة ثم عملت مسحة وتركت لتجف في درجة حرارة الغرفة.

المئوية لعملية الألتهام للمرضى 35.8 و للأصحاء 19.3 وهذا يدل على ان هذه الخلايا تكون فعالة لدى مرضى RA وهذا مهم في امراضية RA [9].

- خلايا البلعم الكبير

لها دور مهم في عملية البلعمة بمختلف اشكالها النسيجية، تكون هذه الخلايا ذات فعالية بلعمية ضعيفة تجاه الخمائر و البكتريا عند مرضى SLE [5].

المواد و طرائق العمل

تم جمع نماذج الدم من المرضى المراجعين لكل من العيادة الأستشارية لمستشفى بغداد التعليمي-شعبة المفاصل و مستشفى دار التمريض الخاص في باب المعظم خلال المدة من الأول من حزيران و لغاية الأول من كانون الأول لعام 2004، وقد شملت الدراسة جمع عينات دم من مجموعتين من المرضى (مع مراعاة التمييز بين المرضى ذوي الحالات الفعالة active وغير الفعالة non active من قبل الطبيب المختص) هما :-

- مجموعة مرضى RA

تضمنت 61 مريضاً (52 اناثاً، 9 ذكور) تراوحت اعمار الأناث ما بين (13-70) سنة، والذكور ما بين (30-65) سنة.

- مجموعة مرضى SLE

تضمنت 31 مريضاً (27 اناثاً و 4 ذكور) اعمار الأناث تراوحت ما بين (14-48) سنة والذكور ما بين (13-51) سنة.

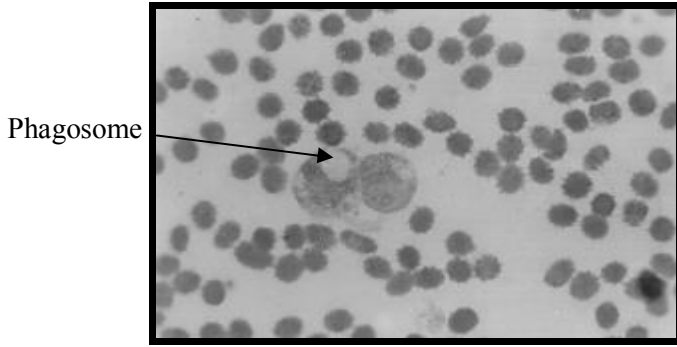
- اما مجموعتي السيطرة هي

* مجموعة الأصحاء ظاهرياً و كان عددهم 21 شخصاً (13 اناثاً و 8 ذكور) تراوحت اعمار الأناث (17-55) سنة و الذكور ما بين (23-60) سنة.

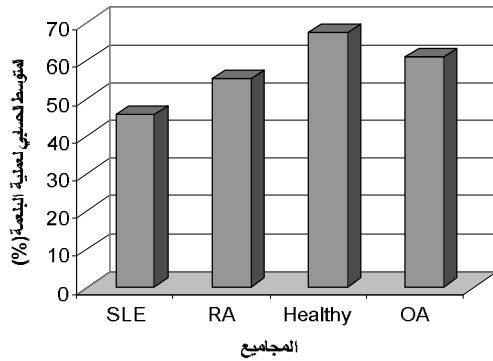
* مجموعة المصابين بالتهاب الفصال العظمي (OA) كان عددهم 8 (4 اناث و 4 ذكور) اعمار الأناث تراوحت (45-60) سنة و الذكور (50-70) سنة.

- تحضير محلول العالق البكتيري

1. يتم الحصول على عزلة نقية من جرثومة *Staphylococcus aureus* المشخصة من قسم



شكل (2) صورة لخلية عدلة neutrophil ملتهمة للمكورات العنقودية الذهبية. الصبغة المستخدمة هي صبغة لشمن، قوة تكبير 1000.



شكل (3) عملية البلعمة لمجاميع المرضى والسيطرة.

SLE : Systemic lupus Erythematosus.

R.A : Rheumatoid Arthritis.

O.A : Osteo Arthritis.

هذه الدراسة متوافقة مع ما اشارت اليه دراسات عديدة إذ كانت هذه الخلايا ذات فعالية بلعمية واطنة في الدم المحيطي لمرضى RA وقد يكون هذا نتيجة الألتهم المسبق للمعدنات المناعية بواسطة PMN إذ تتفاعل هذه المعدنات بطريقة خاصة تقلل من عملية الألتهم او بسبب قلة التعبير لمستقبلات المتمم الثالث C₃ [11, 12] و قد يكون عقار methotrexate السبب في انخفاض فعالية البلعمة لتقليله استجابة الأنجذاب الكيميائي للخلايا العدلة [13].

- مرضى داء الذئب الأحمراري

تم قياس فعالية الخلايا الملتهمة للمكورات العنقودية الذهبية خارج الجسم الحي in vitro لمرضى داء الذئب الأحمراري، إذ اظهرت النتائج انخفاض بفروق معنوية في النشاط البلعمي لمجموعة المرضى قياساً بمجموعتي السيطرة P<0.001، كما موضح في الشكل (3)، ان قلة عدد وانخفاض وظائف الخلايا عديدة اشكال النوى (PMN)

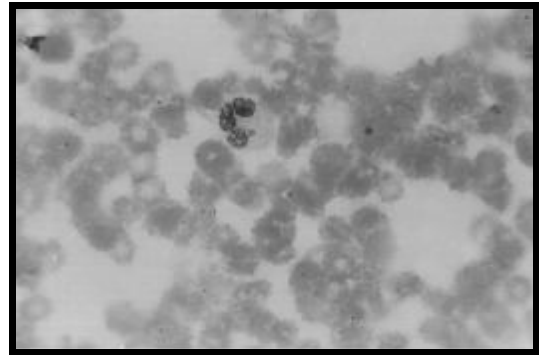
- اضيف (2-3) قطرات من الكحول المثلبي المطلق الى الغشاء لغرض تثبيته.
- تم غمر الغشاء بصبغة لشمن وترك لمدة (15) دقيقة، ثم غسل بالماء المقطر وترك يجف، فحص تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 1000.
- حسبت (200) خلية بلعمية ملتهمة وغير ملتهمة ثم حسبت النسبة المئوية للخلايا البلعمية الملتهمة بالأعتدال على المعادلة الآتية:-

$$\text{نسبة الخلايا الملتهمة \%} = \frac{\text{عدد الخلايا البلعمية الملتهمة}}{\text{خلية بلعمية ملتهمة وغير ملتهمة}} \times 100$$

النتائج و المناقشة

- مرضى التهاب المفاصل الرثوي

فحصت الشرائح الزجاجية بالمجهر الضوئي ثم حسبت الخلايا البلعمية الملتهمة وغير الملتهمة للمجاميع شكل (1،2)، أظهرت النتائج انخفاضاً بفروق معنوية في قابلية الخلايا البلعمية على البلعمة لمرضى RA قياساً بمجموعة السيطرة (الأصحاء) (P<0.001) ومجموعة السيطرة (التهاب الفصال العظمي O.A) P<0.05 وكما موضح في الشكل (3). جاءت نتائج



شكل (1) صورة لخلية عدلة neutrophil غير الملتهمة للمكورات العنقودية الذهبية، الصبغة المستخدمة هي صبغة لشمن، قوة تكبير 1000.

- piroxicam due to interference with the activation of NADPH Oxidase". Annals of the Rheumatic diseases. 45, 1986, pp. 249-255.
- [7] J.W.O'callaghan, P.Bretsch, A.S.Russell, "The effect of low dose chronic intermittent parental methotrexate in mouse model", J. Rheumatol. Vol.13, 1986, pp. 4-710.
- [8] M.C.Kraan, B.M.Koster, R.Elfeink, W.J.Post, F.C.Breedveld,; P.P.Tak, "Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with RA", Arthritis & Rheum.Vol. 43, 2000, pp. 95-1488.
- [9] M.M.Steven, S.E.Lennie, R.D.Sturrock, G.G.Gemmmell, "Enhanced bacterial phagocytosis by peripheral blood monocytes in rheumatoid arthritis", Ann. Rheu. Dis., Vol.43,1984, pp. 9-435, (Abs).
- [10] R.V.Furth, L.V.Theda, H.P.C.Leiji, "In vitro determination phagocytosis and intercellular killing by polymorph nuclear and mononuclear phagocytes", "Hand book of experimental immunology", Blackwell scientific publication 3rd (ed.), Vol.2, 1985, pp.1-14.
- [11] J.M.A.Wilton, T.Gibson, C.M.Chuck, "Defective phagocytosis by synovial and blood polymorphonuclear leukocytes in patient with RA", Rheumatol. Rhehabil. Vol.17(suppl), 1978,pp.25-35.
- [12] W.T.Butler, and R.D. Rossen, "Effects of corticosteroids on immunity in man. 1. Decreased serum IgG concentration caused by 3 or 5 days of high doses of methylopredi solone", J. Clin. Inves.,Vol.52, 1973, pp. 2629-2640.
- [13] Sc.Hsieh, H. S.Yu, W.W. Lin, K.H.Sun, C.Y.Tsai, D.F.Huang, Y.Y.Tsai, C.L.Yu, "Anti SSB/La is one of the antineutrophil auto antibodies responsible for neutrophilia and functional impairment of polymer phonuclear neutrophils in patients with SLE", Clin. Exp. Immunol., Vol.131, No.3, 2003, pp. 16-506. (Abst.).
- [14] M. M.Ward, "Evaluation laboratory assessing test that assess disease activity", Arthritis & Rheum., Vol.38, 1995, pp. 63-1555.

لمرضى SLE قد يعود الى وجود اضرار ذاتية ضد خلايا PMN يشارك ذلك في تقليل فعالية وظائف هذه الخلايا [14]. ان الانخفاض في عملية البلعمة لمرضى SLE لها دور في قابلية الإصابة بالأخماج (Infections) التي تعد احد اسباب الوفيات لهؤلاء المرضى [15]، كما ان انخفاض مستوى المتمم في حالات الإصابة الشديدة من مرضى SLE وهو مايسمى (hypocomplementemia) قد يسبب خللاً في عملية الطهي (Opsonization) مما يؤدي الى اخفاق عملية البلعمة [15] فضلاً عن استخدام عقار Corticosteroid ، methotrexate لفترات طويلة تعمل على تقليل استجابة الأنجذاب الكيميائي للخلايا العدلة [14].

أظهرت النتائج ان النشاط البلعيمي لمرضى SLE اكثر انخفاضاً قياساً بمرضى RA بفروق معنوية $P < 0.001$ هذا قد يعود الى فعالية المرض Disease activity لمرضى SLE في هذه الدراسة اكثر مما في حالة RA.

المصادر

- [1] E.Benjamini, R.Coico and G.Sunshine, "Autoimmunity, Innate and acquired immunity" in "Immunology" 4th edition, Wiley-Liss, 2000, pp. 329-343, 17, 21.
- [2] J.Kuby, "Autoimmunity", In "Immunology" 2nd edition, 1994, pp. 64-465.
- [3] J.I.Gallin, "Inflammation" in W.E. Paul (Ed) "Fundamental Immunology", Raven Press. Ltd., New York, 1993, pp. 1051-1032.
- [4] R.A.Turner, H.R.Schumacher, A.R. Myers, "Phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes in rheumatic diseases" J. Clin. Inves. Vol.52, 1973, pp.1632-1635.
- [5] J.E.Salmon, R.P. Kimberly, A. Gibofsky, M.Fotino, "Defective mononuclear phagocyte function in SLE Dissociation of Fc receptor-ligans binding and internalization" J. of Immunol. Vol. 133, 1984, pp. 31-2525.
- [6] P.Biemand, A.J.G.Swaak, J.M.A.Penders, C.M.B.Eindoff, and J.F.Koster, "Superoxide production by polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: in vivo inhibition by the anti rheumatic drugs

[15] M.M.Frank "Complement and Kinin" In "Medical Immunology" by D. P.Stites, A.I.Terr, and T.G.Parslow 9th ed, prentice-Hall International Inc. U.S.A. 1997, pp.169-180.

Abstract

Phagocytosis is one of immune response aspects for that we study it in patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and Systematic Lupus Erythematosus (SLE), these diseases belong to autoimmune diseases which characterize with defect in immune system. We determined phagocytic ability of neutrophils by use suspension of *Staphylococcus aureus*. The results showed significant decrease in phagocytic ability patients with R.A. compared with control group ($P < 0.001$), While in patients with SLE showed very significant decrease compared with control group ($P < 0.001$).