

التقييم المناعي لنساء سوريات يعانين من إسقاطات متكررة

إعداد طالبة الدكتوراه

ملك حرّاته*

ومشاركة الدكتورة

تهاني علي***

إشراف الأستاذ الدكتور

أحمد عثمان**

الملخص

هدف البحث: هدف هذا البحث إلى تحديد نسب الخلايا الدموية البيضاء واللمفاويات بأنواعها وأنسالتها، بكشفها بالواسمات (CD) عند زوجات سوريات يعانون من مشكلة الإسقاطات المتكررة تفيد في تشخيص حالاتهم ووضع تصور مناعي، مع عناصر أخرى، لهم لتطبيق طريقة علاجية لمشكلتهم.

المواد وطرائق البحث: حددت أعداد الخلايا الدموية البيضاء ونسبها (WBC) واللمفاويات التائية T-Lymphocytes والكابحات Suppressors والمساعدات Helpers والبائية B-Lymphocytes في الدم المحيطي بتقانة القياس الخلوي بالتدفق Flow Cytometry باستخدام صفوف التمايز الواسمة CD: CD⁺³، CD⁺⁴، CD⁺⁸، CD⁺¹⁹، CD⁺⁴⁵، CD⁺⁵⁶، وذلك عند 25 امرأة سورية ولوداً، وعند 102 امرأة سورية يعانين من إسقاطات متكررة.

النتائج: كان متوسط عدد الكريات البيض عند الشاهد 8072 مقارنة بالمرضى 8453، ومتوسط النسبة المئوية لعدد اللمفاويات الكلي عند الشاهد 33% مقارنة بالمرضى 35%، ومتوسط التعداد الكلي لللمفاويات عند الشاهد 2635، وكان عند المرضى 2913، ومتوسط التعداد الكلي للتائيات عند الشاهد 2036، وكان عند المرضى 2223، أمّا متوسط عدد البائيات فهو عند الشاهد 213 وعند المرضى 263، وكان متوسط عدد القتلة الطبيعيين عند الشاهد 285 وعند المرضى 360.

الخلاصة: تدل هذه النتيجة على ارتفاع في تعداد أنماط الخلايا المناعية عند المرضى مقارنة بالشاهد. ويرجح أن تؤدي هذه التبدلات دوراً حاسماً في عملية الإسقاط.

الكلمات المفتاح: الإسقاطات المتكررة، صفوف التمايز CD، اللمفاويات، القتلة الطبيعيين.

* قسم علم الحياة الحيوانية - اختصاص علم المناعة - كلية العلوم - جامعة دمشق.

** أستاذ - قسم علم الجنين - كلية الطب البشري - جامعة دمشق.

*** أستاذ مساعد - قسم الطب المخبري - كلية الطب - جامعة دمشق.

Immunological Evaluation of Syrian Patients With Recurrent Abortion

Malak Hrateh*

Ahmad Osman**

Tahani Alli***

Abstract

Objective: The prospective of this study is to define the percentages of white blood cells , lymphocytes cell lines, using (CD) markers for Syrian women (wives) suffering from recurrent abortions. We estimate that this will be useful tools to make un immunological diagnostic screening , with other elements, offering convenient therapeutic protocols.

Materials and methods: White blood cells (WBC)s , T-Lymphocytes, Suppressors , Helpers, and Natural Killers (NK)B-Lymphocytes, from peripheral blood cells of Syrian normal Multiparus 25 Women and 102 Women with recurrent abortions were assessed by flow cytometry using : CD^{+3} , CD^{+4} , CD^{+8} , CD^{+19} , CD^{+45} , CD^{+56} , markers.

Results and conclusions: The mean (WBC) count in the control group was 8072, 8453 in the patient group. The mean percentage of the total lymphocytes count was 33 % in control group , it was 35 % in patient group. The mean count of total Lymphocytes was 2635 in control group, it was 2913 in patient group. The mean count of T-Lymphocytes was 2036 in control group, 2223 in patient group. The B-Lymphocytes count was 213 in control group, 263 in patient group. The mean count of natural killers (NK) was 285 in control group, 360 in patient group.

Conduction: The results indicate to increased values in patient group comparing with control group , it is probable that these changes would play a crucial role in recurrent abortion .

Key words: Recurrent Abortion , Class of Differentiation CD , Lymphocytes, Natural Killers

* Master in Animal Biology (Immunology), Faculty of Sciences, Damascus University.

** Prof. Faculty of Medicine, Damascus University

*** Ass. Prof . Medecine de laboratoire Faculty of Medicine, Damascus University .

المقدمة

إن التنسيق بين عمل العناصر المناعية الجنينية والعناصر المناعية للأم بما في ذلك أضداد اللمفاويات الأبوية (APLA) الحاصرة [8] وأضداد الفوسفوليبيد (APA) والأضداد المضادة للنوى (ANA) هو الذي يمنع الغزو العشوائي للأصلية المغذية الجنينية من جهة، ويخفض السمية الخلوية Cytotoxicity للخلايا المناعية المهاجمة للحمل، ويجعل الحمل محمولاً مناعياً طيلة مدة الحمل.

ويبدو أن الإخلال بهذا التوازن عند النساء اللواتي يعانين من إسقاطات متكررة Recurrent Abortions لصالح العناصر المناعية للأم هو المسؤول عن حدوث الإسقاط في الحالات التي تنتفي منها أسباب أخرى كالأَسباب الصبغية والوراثية والمرضية. وقد قامت دراسات عديدة [9، 10، 11] بتتميط اللمفاويات من الصفوف: (CD^{+3}), (CD^{+4} , CD^{+8} , CD^{+16} , CD^{+18} , CD^{+56} , CD^{+19} ...) الواسمة بصورة خاصة لللمفاويات التائية T-Lymphocytes، وأنسالتها من المساعدات Helpers والكابحات Suppressors، والقَتلة الطبيعيين NK لكل من الأزواج والزوجات الذين يعانون من إسقاطات متكررة لتتبع خلل في أعدادها أو أنماطها يخل بالتوازن الحاصل في الحمولات الطبيعية، كما عيّن لهؤلاء سويات هرمون البروجسترون، والهرمونات الأخرى الخاصة بالحمل للتأكد من سوياتها الطبيعية ونفيها كسبب للإسقاط.

هدف هذا البحث إلى تحديد نسب الخلايا الدموية البيضاء واللمفاويات بأنواعها وأنسالتها، بكشفها بالواسمات (CD) عند زوجات سوريات يعانين من مشكلة الإسقاطات المتكررة تفيد في تشخيص حالاتهم، ووضع تصور مناعي، مع عناصر أخرى لهم لتطبيق طريقة علاجية لمشكلتهم.

المواد والطرائق:

أجري البحث على 25 امرأة ولوداً منجبة لا يعانين من مشكلة الإسقاطات المتكررة، وأعتبرن شواهد. وأجري

تبدأ المواجهة المناعية بين الجنين المعشش، منذ الانغراس في بداية الأسبوع الثاني من الإلقاح. ويبدأ رد فعل بطانة الرحم بنشوء خلايا صقلية Stromal cells منه إلى خلايا ذات فعالية استقلابية مرتفعة تسمى الخلايا الساقطية Decidual cells، تشكل في النهاية، طبقة تحيط بالجنين المعشش تسمى الطبقة الساقطة Decidua. ويرتشح في الطبقة الساقطة أعداد كبيرة من اللمفاويات تقدر بنحو (10-15) % من خلاياه، وإن نحو 90 % من هذه الخلايا الراشحة هي من القَتلة الطبيعيين NK موجبة الـ CD^{+56} على الغالب ولوحظ أن كيموكينات Chemokines تساعد في حشد خلايا الجهاز المناعي في الطبقة الساقطة [1، 2، 3].

من جهة ثانية، تتركب خلايا الأصلية المغذية المخلوية Syncytiotrophoblast الموجودة في محيط كيس الحمل مستضداً جنينياً خاصاً يسمى HLA-G [4، 5] له دور في زيادة إنتاج المستسخ 4 المثبط والمثبه بالغلوبولين المناعي Immunoglobuline like transcript-4 له مستقبل على سطح البالعات الكبيرة Macrophages والقَتلة الطبيعيين NK، مما يؤدي إلى تقنيع الخلايا المذكورة وتحييدها ومنع رفض الطعم (الجنين). كما تتركب مستضدات جنينية أخرى مثل HLA-E تؤدي دوراً أيضاً في المحافظة على الحمل. ويذكر أيضاً أن الانترلوكين 10 (IL-10) وهو سيتوكين cytokine يثبط استجابة مناعية متخالفة، وأن للبروجسترون أثراً مماثلاً [6]. وأوضحت دراسة أجريت على الفأر [7] أن خلايا الأصلية المغذية الخلوية Cytotrophoblast تتركب وتفرز أنزيم Indoleamine 2,3-dioxygenase الذي يفكك التربتوفان في الخلايا اللمفاوية التائية فتتخفف فعاليتها. وتبين أن طبقة الأصلية المغذية المخلوية (اللاخلوية) في الجنين البشري تنتج وتفرز هذا الأنزيم.

عندئذٍ تمدد مرتين بالـ PBS، أما إذا كانت من 27000 – 30000 فتمدد 3 مرات بالـ PBS. 4- نأخذ 500µ من دم المريضة، ونضع فوقها الـ PBS، ونقوم بالتثقيف لمدة 5 دقائق 1700 – 2000 أو 3000 دروة / د.

5- في هذه الأثناء يتم تحضير ثلاثة أنابيب لكل عينة دم، وترقم الأنابيب الخاصة بجهاز الفلو 1، و 1، و 2، كما يأتي:

الأنبوب 1 : يسمى الأنبوب الشاهد نضع فيه 100µ من الدم بعد تثقيفه، أي دون أضداد الـ CD ويسمى الأنبوب

Auto

الأنبوب 1 : نضع فيه 20µ من الأضداد CD45+ CD3+ CD4 CD8+

الأنبوب 2 : نضع فيه 20 µ من الأضداد CD3+ CD16+ CD45+ CD19

6- في حال انتهاء عملية التثقيف نزيل الطافي ونحتفظ بكمية الدم المأخوذة قبل التثقيف، ونأخذ 100µ من الدم بعد رج الأنابيب رجّة صغيرة على الرجاجة، ونضيفها إلى كلّ أنبوب من الأنابيب المحضرة سابقاً في البند 5 (1)، (1، 2).

7- نرج الأنابيب الثلاثة لكل عينة رجّة صغيرة، ثم نضع الأنابيب في البراد والظلام مدة 25-30 دقيقة.

8- نخرج الأنابيب من البراد ونضع فوقها 2000µ (2 مل) من الـ Lysin الممدد 10/1 لكل أنبوب (1، و 1، و 2)، ثم نرج الأنابيب رجّة صغيرة .

9- نضع الأنابيب في البراد لمدة 9 دقائق

10- نخرج الأنابيب من البراد ونقوم بعملية التثقيف 1700دورة / د لمدة 5 دقائق

11- يتم رمي السائل في المغسلة (أي الكريات الحمر) ثم ننشف الأنابيب على المحارم

على (102) امرأة أخرى يعانين من مشكلة الإسقاطات المتكررة، ولم يبيّن الفحص السريري والاختبارات المخبرية وجود سبب يمنعهن من الإنجاب (إسقاط مجهول السبب). واستخدم في تقدير عدد للمفاويات التائية T-Lymphocytes والمساعدات Helpers والكابحات Supressors والبائيات B-Lymphocytes والقتلة الطبيعيون (NK) عدد من كواشف صفوف التمايز CD: CD^{+3} ، CD^{+4} ، CD^{+8} ، CD^{+16} ، CD^{+19} ، C^{+45} ، CD^{+56} . واتبع في التحليل طريقة القياس الخلوي بالتدفق Flow Cytometry.

مبدأ جهاز القياس الخلوي بالتدفق Flow Cytometry :

يعتمد عمل جهاز القياس الخلوي بالتدفق على استخدام واسم نوعي يعدّ ضدّاً وحيد النسيلة monoclonal antibody ويكون مقترناً بمركب متفلور يصدر لوناً خاصاً عند تسليط أشعة UV بطيف امتصاص الضد، يقترن الواسم (الضد) مع مستضد نوعي على سطح الخلايا الهدف (صفوف الـ CD الواسمة للمفاويات)، ثم يسقط عليه أشعة UV فيقيس الجهاز كمية الضوء الممتصة، ويقدر عدد الخلايا الهدف المتقضي عنها حسب ألوانها. ولما كانت الخلايا للمفاوية وأنسالها تحمل مستضدات نوعية تتمثل بنمط الـ CD كان كشفها بهذه الطريقة على درجة عالية من الدقة.

خطوات العمل التالية الخاصة بالتقنية:

1- يؤخذ 2سم³ عينة دم على أنابيب مانع التخثر EDTA من المريضة.

2- يتم تمرير عينة الدم المحيطي (أنبوب الدم) على جهاز حساب عدد الكريات (لحساب التعداد العام للكريات البيض والحمر).

3- إذا كان عدد الكريات البيض يتراوح من 5000 – 10000 فلا حاجة للتمديد أكثر من مرة واحدة، أما إذا كانت أكبر من 10000 أي من 17000 – 20000

12- نضع فوق الأنابيب الثلاثة السابقة 2000μ من Cell Washing، ثم نرج الأنابيب رجة صغيرة ونثقل الأنابيب مرة أخرى في المثقلة 1700 دورة /دقيقة.

13- نزيل المحلول الطافي وننشف على المحارم.

14- نضيف إلى كل أنبوب 400μ من الـ Fixing الممد 10/1 ونرج الأنابيب رجة صغيرة.

15- نضع أغشية الأنابيب على الأنابيب ونحفظها في البراد مدة ساعة حتى تصبح جاهزة للقراءة على جهاز الفلو.

16- نقرأ الأنابيب على الجهاز ونحصل على النتيجة حسابياً.

1- النتائج عند الشواهد

يبين الجدول 1 نتائج تقدير التعداد العام لكريات الدم البيضاء، وتعداد اللمفاويات بنوعها البائية والتائية وأيضاً القتلة الطبيعيين NK، وتقدير عدد الـ (NK+ T+ B) مقارنة بالتعداد الإجمالي لللمفاويات:

الجدول (1): نتائج تعداد الكريات البيض العام، واللمفاويات، والتائيات، والبائيات، والقتلة الطبيعيين عند 25 امرأة طبيعية (الشواهد)، وقد قدر مجموع (NK+B+T) للمقارنة بالتعداد العام لللمفاويات.

الفرق بين التعداد الكلي - (مجموع T + مجموع B + مجموع NK)	مجموع (T+B+NK)	90-590	90-660	690-2540	Reference range			رقم العينة
		تعداد NK	تعداد البائيات	تعداد التائيات	التعداد الكلي للمفاويات	Lymphs%	WBC التعداد	
34	2107	383	195	1529	2141	30	7100	1
34	2912	216	348	2348	2946	35	8300	2
68	1573	200	110	1263	1641	18	8800	3
77	1823	310	128	1385	1900	31	6200	4
157	2683	576	225	1882	2840	30	9300	5
234	3444	707	342	2395	3678	38	9400	6
99	1827	131	228	1468	1926	21	9300	7
44	3554	218	269	3067	3598	45	8100	8
144	1840	108	149	1583	1984	30	7300	9
167	3201	222	248	2731	3368	36	9200	10
114	2352	452	120	1780	2466	38	6500	11
108	1873	204	108	1561	1981	26	7700	12
71	2315	191	64	2060	2386	36	6500	13
80	3344	182	265	2897	3424	34	11100	14
97	2999	267	347	2385	3096	49	6200	15
53	2035	253	119	1663	2088	38	5500	16

224	3363	396	431	2536	3587	39	9200	17
81	2667	320	385	1962	2748	32	8800	18
89	2742	406	203	2133	2831	30	9400	19
89	3693	242	265	3186	3782	47	8100	20
125	2915	337	97	2481	3040	34	8800	21
69	1827	131	228	1468	1896	21	9200	22
99	2169	121	165	1883	2268	41	5600	23
113	1959	251	122	1586	2072	24	8400	24
54	2124	290	172	1662	2178	28	7800	25
101	2534	285	213	2036	2635	33	8072	المتوسط

كانت أدنى قيمة لتعداد الكريات البيض (WBC) المسجلة (5500) والأعلى قيمة (11100) والمتوسط (8072). وعدا هاتين القيمتين لا توجد فروق دالة في التعداد بين الشواهد. وتلاحظ فروق دالة واضحة في النسبة المئوية للمفاويات بين مجموع الكريات البيض، وكانت أدنى قيمة 20.5% والأعلى 40.5%. وقد انعكست هذه الفروق الدالة على التعداد العام للمفاويات التائية والبائية والقتلة الطبيعية، وأيضاً على مجموع (NK+ B+ T). كما يلاحظ أن عدداً من الخلايا للمفاوية لم تعرف بشكل

2- النتائج عند المرضى:

يبين الجدول 2 نتائج تقدير التعداد العام لكريات الدم البيضاء (WBC) وتعداد اللمفاويات بنوعها التائية والبائية وتعداد القتلة الطبيعيين (NK)، وتقدير عدد (NK+ B+ T) مقارنة بالتعداد الإجمالي للمفاويات:

الجدول (2): نتائج تعداد الكريات البيض العام، واللمفاويات، والتائيات، والبائيات، والقتلة الطبيعيين عند 102 امرأة تعاني من إسقاطات متكررة وقد قدر مجموع (NK+B+T) للمقارنة بالتعداد العام للمفاويات.

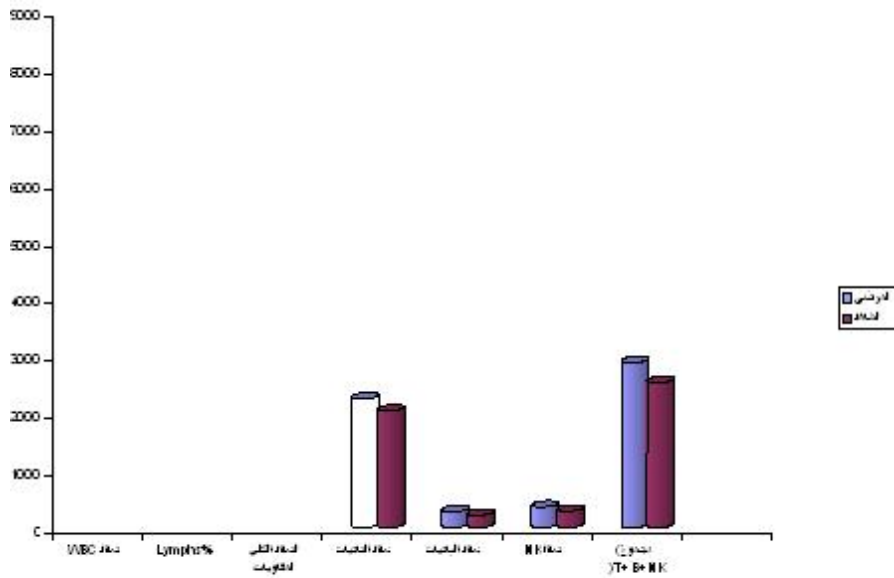
الفرق بين التعداد الكلي - (مجموع T + مجموع B) (مجموع NK + مجموع T)	مجموع (NK+B+T)	NK	B.Cells	T.Cells	القيم الطبيعية Ref.range			
		90-590	90-660	690-2540	التعداد الكلي للمفاويات	Lymphs%	تعداد WBC	رقم العينة
137	2827	723	228	1876	2964	38.5	7700	1
115	3175	308	187	2680	3290	38.7	8500	2
103	2026	203	58	1765	2129	36.7	5800	3
123	2261	307	190	1764	2384	29.8	8000	4
45	1809	56	192	1561	1854	41.2	4500	5
90	2755	937	129	1689	2845	34.7	8200	6
84	2104	290	172	1642	2188	27.7	7900	7
30	2507	171	430	1906	2537	43	5900	8
58	3438	426	174	2838	3496	46	7600	9
211	3095	123	250	2722	3306	32.1	10300	10
204	4297	429	329	3539	4501	48.4	9300	11
97	1984	183	126	1675	2081	28.5	7300	12
109	2323	266	342	1715	2432	19.3	12600	13
89	2139	121	165	1853	2228	40.5	5500	14
63	1969	251	122	1596	2032	23.9	8500	15

50	1361	87	122	1152	1411	29.4	4800	16
51	2116	615	78	1423	2167	25.8	8400	17
107	3222	72	503	2647	3329	35.8	9300	18
121	3228	479	166	2583	3349	31.3	10700	19
58	2812	290	402	2120	2870	35	8200	20
51	2116	615	78	1423	2167	25.8	8400	21
83	3199	218	275	2706	3282	37.3	8800	22
79	2481	365	142	1974	2560	31.6	8100	23
214	3660	507	469	2684	3874	30.5	12700	24
101	3084	215	397	2472	3185	32.5	9800	25
102	1936	415	178	1343	2038	25.8	7900	26
33	1238	153	119	966	1271	23.1	5500	27
35	3532	668	234	2630	3567	39.2	9100	28
101	2179	211	210	1758	2280	22.8	10000	29
125	2066	522	109	1435	2191	33.2	6600	30
125	4754	532	441	3781	4879	41.7	11700	31
122	3583	686	301	2596	3705	39	9500	32
91	3649	532	277	2840	3740	42.5	8800	33
112	2509	424	388	1697	2621	28.8	9100	34
69	3019	257	637	2125	3088	40.1	7700	35
-165	4630	905	252	3473	4465	47	9500	36
125	4754	532	441	3781	4879	41.7	11700	37
83	1793	209	118	1466	1876	26.8	7000	38
50	2118	145	207	1766	2168	27.8	7800	39
40	2707	82	300	2325	2747	20.2	13600	40
67	3358	307	176	2875	3425	34.6	9900	41
63	2126	314	202	1610	2189	26.7	8200	42
93	3919	641	354	2924	4012	47.2	8500	43
52	3051	449	379	2223	3103	53.5	5800	44
87	5334	297	366	4671	5421	29.3	18500	45
187	3720	455	480	2785	3907	43.9	8900	46
80	4607	488	385	3734	4687	32.1	14600	47
33	1606	267	142	1197	1639	24.1	6800	48
60	2541	406	308	1827	2601	28.9	9000	49
39	2404	164	157	2083	2443	34.9	7000	50
51	1322	276	260	786	1373	15.6	8800	51
49	2743	695	127	1921	2792	35.8	7800	52
114	1697	324	98	1275	1811	30.7	5900	53
68	2564	723	193	1648	2632	47	5600	54
172	3532	267	328	2937	3704	34.3	10800	55
38	2040	301	207	1532	2078	39.2	5300	56
130	2691	722	16	1953	2821	34.4	8200	57
45	4125	233	445	3447	4170	40.1	10400	58
230	2114	321	128	1665	2344	18.9	12400	59
131	2666	223	206	2237	2797	44.4	6300	60
97	3251	222	248	2781	3348	36	9300	61
84	2342	452	120	1770	2426	37.9	6400	62

128	1863	204	108	1551	1991	26.2	7600	63
101	2275	191	64	2020	2376	36	6600	64
70	3334	182	265	2887	3404	33.7	10100	65
47	3009	267	347	2395	3056	48.5	6300	66
53	2015	253	119	1643	2068	38.3	5400	67
196	3532	478	332	2722	3728	34.2	10900	68
96	4783	107	414	4262	4879	59.5	8200	69
116	2647	424	143	2080	2763	30.7	9000	70
130	3809	697	345	2767	3939	39	10100	71
199	3439	707	342	2390	3638	37.9	9600	72
122	3275	417	205	2653	3397	38.6	8800	73
133	2885	232	326	2327	3018	36.8	8200	74
224	3343	396	431	2516	3567	39.2	9100	75
71	2647	320	385	1942	2718	31.6	8600	76
89	2742	406	203	2133	2831	29.8	9500	77
79	3673	242	265	3166	3752	46.9	8000	78
85	2925	337	97	2491	3010	34.2	8800	79
51	2557	262	218	2077	2608	31.8	8200	80
30	1828	212	89	1527	1858	34.4	5400	81
22	1846	364	120	1362	1868	32.2	5800	82
25	2105	90	220	1795	2130	42.6	5000	83
49	2230	139	190	1901	2279	29.6	7700	84
47	2455	258	231	1966	2502	39.1	6400	85
56	2914	313	342	2259	2970	37.6	7900	86
82	1271	298	112	861	1353	33	4100	87
99	1787	131	228	1428	1886	20.5	9200	88
34	3534	218	269	3047	3568	44.6	8000	89
64	1820	108	149	1563	1884	29.9	6300	90
18	3207	502	379	2326	3225	37.5	8600	91
77	3434	824	246	2364	3511	41.8	8400	92
77	2773	369	177	2227	2850	25	11400	93
117	3772	476	266	3030	3889	44.7	8700	94
167	4171	396	656	3119	4338	34.7	12500	95
45	3428	176	316	2936	3473	45.1	7700	96
114	3962	337	134	3491	4076	28.5	14300	97
64	1820	108	149	1563	1884	29.9	6300	98
34	3534	218	269	3047	3568	44.6	8000	99
34	2087	383	195	1509	2121	30.3	7000	100
141	2680	759	1194	1921	2821	34.4	8200	101
145	2487	859	1047	1628	2632	47	5600	102
88	2825	360	263	2223	2913	35	8453	المتوسط

كانت أدنى قيمة مسجلة لتعداد الكريات البيض (WBC) أعداد الكريات البيض بين أفراد المرضى، كما لوحظت (4100) والأعلى قيمة (18500)، والمتوسط (8453)، فروق دالة واضحة في النسبة المئوية للمفاويات، وكانت وباستثناء هاتين الحاليتين لوحظت فروق دالة واضحة في أدنى قيمة 20.2 % والأعلى 53.3 %، وتوضحت هذه

الفروق في التعداد العام للمفاويات وتعداد التائيات وتعداد البائيات وتعداد القتل الطبيعية الطبيعيين (NK) ومجموع (NK+B+T). وهنا أيضاً، يوضح العمود الأخير من الجدول (2) أعداداً صغيرة لم تعرف هويتها بين أنماط للمفاويات بهذه التقانة، لكنها لا تؤثر في نسب أنماط هذه الخلايا، وليست ذات أهمية.



مخطط بياني (1) يوضح التبدلات الملاحظة بين قيم تعدادات الخلايا الدموية البيضاء والمفاويات التائية، والقتلة الطبيعيين ومجموع (T+ B+ NK) وذلك بين الشاهد والمرضى.

ومن الجدول العام (1) قمنا بتعداد للمفاويات التائية اعتماداً على واسماتها النوعية من الـ CD، وذلك في وأنسالها الكابحة والمساعدة، والقتلة الطبيعيين للشاهد الجدول (3).

الجدول (3): يبين أعداد التائيات وأنسالها الكابحات والمساعدات والقتلة الطبيعيين عند الشواهد.

90-590		Helper المساعدة	الكابحة Suppressor		القيم Reference range الطبيعية	
CD16+CD56		410-1590	190-1140	690-2540		
تعداد NK	تعداد CD3+CD8+CD4	تعداد CD3+CD4	تعداد CD3+CD8	تعداد التائيات	WBC	رقم العينة
383	2	660	826	1529	7100	1
216	7	1268	931	2348	8300	2
200	1	622	577	1263	8800	3
310	9	775	554	1385	6200	4
576	10	1147	548	1882	9300	5
707	8	1458	625	2395	9400	6

131	1	1268	268	1468	9300	7
218	7	2010	1052	3067	8100	8
108	6	833	519	1583	7300	9
222	4	895	862	2731	9200	10
452	5	973	866	1780	6500	11
204	1	1275	231	1561	7700	12
191	5	1138	751	2060	6500	13
182	8	866	620	2897	11100	14
267	1	668	596	2385	6200	15
253	1	1091	650	1663	5500	16
396	3	1071	686	2536	9200	17
320	1	481	288	1962	8800	18
406	5	1296	794	2133	9400	19
242	1	1418	1120	3186	8100	20
337	3	1501	977	2481	8800	21
131	3	1168	305	1468	9200	22
121	1	1268	468	1883	5600	23
251	2	660	826	1586	8400	24
290	5	1047	622	1662	7800	25
285	4	1074	662	2036	8072	المتوسط

بالطريقة نفسها أعدنا الجدول (4) للمرضى.

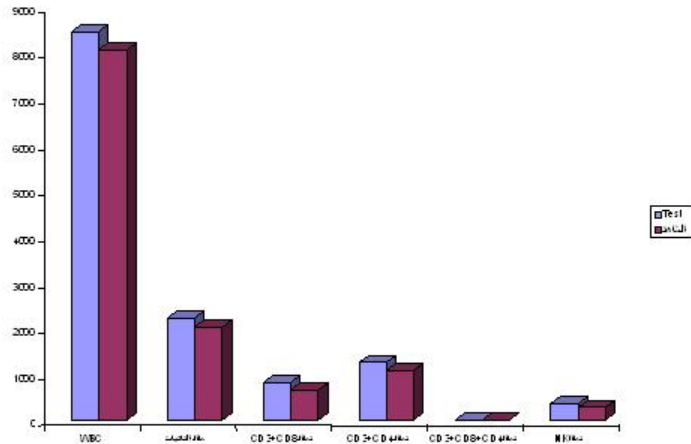
الجدول (4): يبين أعداد الخلايا وأنسالتها الكابحات والمساعدات والقتلة الطبيعيين عند المرضى.

تعداد NK	تعداد CD3+CD8+CD4	Helper	Suppressor	T.Cells	القيم الطبيعية Ref.range	
		410-1590	190-1140	690-2540	WBC	رقم العينة
723	12	1094	602	1876	7700	1
308	14	1118	1352	2680	8500	2
203	5	730	865	1765	5800	3
307	5	1088	579	1764	8000	4
56	29	1015	486	1561	4500	5
937	6	939	633	1689	8200	6
290	1	1021	539	1642	7900	7
171	7	1063	745	1906	5900	8
426	6	1659	1068	2838	7600	9
123	12	1612	815	2722	10300	10
429	20	1718	1504	3539	9300	11
183	1	970	518	1675	7300	12
266	3	1018	977	1715	12600	13
121	3	1168	605	1853	5500	14
251	1	1268	268	1596	8500	15
87	2	660	426	1152	4800	16
615	8	758	625	1423	8400	17
72	7	1971	589	2647	9300	18
479	9	1613	805	2583	10700	19

290	2	1160	854	2120	8200	20
615	8	758	625	1423	8400	21
218	3	1780	806	2706	8800	22
365	3	1306	570	1974	8100	23
507	10	1686	913	2684	12700	24
215	14	1312	1072	2472	9800	25
415	2	756	433	1343	7900	26
153	3	418	454	966	5500	27
668	16	1402	1082	2630	9100	28
211	105	904	689	1758	10000	29
522	2	816	551	1435	6600	30
532	2	1834	1656	3781	11700	31
686	48	1542	864	2596	9500	32
532	6	1662	866	2840	8800	33
424	3	831	784	1697	9100	34
257	4	1282	723	2125	7700	35
905	59	2537	1081	3473	9500	36
532	2	1834	1656	3781	11700	37
209	15	797	468	1466	7000	38
145	15	1211	527	1766	7800	39
82	4	1079	1119	2325	13600	40
307	5	1477	1197	2875	9900	41
314	144	988	562	1610	8200	42
641	7	2098	663	2924	8500	43
449	18	1330	890	2223	5800	44
297	41	2460	1937	4671	18500	45
455	12	1408	915	2785	8900	46
488	10	1990	1546	3734	14600	47
267	6	833	319	1197	6800	48
406	4	895	862	1827	9000	49
164	5	973	966	2083	7000	50
276	1	475	231	786	8800	51
695	20	941	892	1921	7800	52
324	6	839	350	1275	5900	53
723	6	998	483	1648	5600	54
267	22	1659	1124	2937	10800	55
301	7	734	720	1532	5300	56
722	12	1194	584	1953	8200	57
233	87	1791	1599	3447	10400	58
321	6	1104	402	1665	12400	59
223	0	1532	522	2237	6300	60
222	8	1834	842	2781	9300	61
452	5	900	713	1770	6400	62
204	0	862	554	1551	7600	63
191	1	1028	793	2020	6600	64
182	3	1997	789	2887	10100	65
267	5	1673	666	2395	6300	66

253	3	968	562	1643	5400	67
478	9	1507	1075	2722	10900	68
107	21	2501	1361	4262	8200	69
424	1	1214	795	2080	9000	70
697	62	936	1680	2767	10100	71
707	9	1072	1244	2390	9600	72
417	2	1469	856	2653	8800	73
232	8	1665	560	2327	8200	74
396	29	1177	1116	2516	9100	75
320	17	795	851	1942	8600	76
406	7	1268	726	2133	9500	77
242	34	1863	1230	3166	8000	78
337	6	1304	1087	2491	8800	79
262	5	1138	751	2077	8200	80
212	8	866	620	1527	5400	81
364	1	668	596	1362	5800	82
90	1	1091	650	1795	5000	83
139	3	1071	686	1901	7700	84
258	19	1053	768	1966	6400	85
313	10	1056	1092	2259	7900	86
298	1	481	288	861	4100	87
131	5	796	494	1428	9200	88
218	10	1292	818	3047	8000	89
108	1	904	494	1563	6300	90
502	27	1373	893	2326	8600	91
824	9	1267	952	2364	8400	92
369	84	1350	835	2227	11400	93
476	5	1493	1291	3030	8700	94
396	5	2079	875	3119	12500	95
176	1	1915	959	2936	7700	96
337	1	2164	1048	3491	14300	97
108	1	904	494	1563	6300	98
218	10	1292	818	3047	8000	99
383	36	816	643	1509	7000	100
759	21	1194	611	1921	8200	101
859	5	1047	422	1628	5600	102
360	14	1259	815	2223	8453	المتوسط

ونورد في المخطط البياني (2) التالي التبدلات الملحوظة التائية، وأنسالها الكابحة والمساعدة والقتلة الطبيعيين بين قيم تعدادات الخلايا الدموية البيضاء واللمفاويات حسب واسماتها النوعية، وذلك بين الشاهد والمرضى.



مخطط بياني (2) يوضح التبدلات الملاحظة بين قيم تعدادات الخلايا الدموية البيضاء والمفاويات التائية، والقتلة الطبيعيين، وذلك بين الشاهد والمرضى .

التحليل الإحصائي:

أجري تحليل إحصائي للناتج الخاصة بهذا البحث من خلال برنامج إحصائي T-Test لمعرفة P-V . [Sig & Sig (2 tailed)]

T-Test
Group Statistics
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	99% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
تعداد الـ WBC	Equal variances assumed	2.417	.123	.781	125	.436	380.94	487.763	-894.918	1656.800
	Equal variances not assumed			1.045	60.520	.300	380.94	364.483	-588.416	1350.298
Lymphs%	Equal variances assumed	.004	.948	1.084	125	.281	1.918	1.7704	-2.7124	6.5492
	Equal variances not assumed			1.088	36.856	.284	1.918	1.7634	-2.8711	6.7079
التعداد الكلي للمفاويات	Equal variances assumed	1.621	.205	1.479	125	.142	278.42	188.236	-213.955	770.794
	Equal variances not assumed			1.747	46.811	.087	278.42	159.391	-149.548	706.387
تعداد التائيات	Equal variances assumed	2.322	.130	1.177	125	.241	187.38	159.132	-228.870	603.624
	Equal variances not assumed			1.407	47.805	.166	187.38	133.181	-169.902	544.656

تعداد CD3+CD8	Equal variances assumed	1.983	.162	2.131	125	.035	152.77	71.700	-34.772	340.322
	Equal variances not assumed			2.600	49.707	.012	152.77	58.766	-4.626	310.176
تعداد CD3+CD4	Equal variances assumed	2.653	.106	1.919	125	.057	185.05	96.430	-67.181	437.288
	Equal variances not assumed			2.256	46.442	.029	185.05	82.020	-35.245	405.351
تعداد CD3+CD8+CD4	Equal variances assumed	8.290	.005	2.155	125	.033	9.68	4.491	-2.070	21.423
	Equal variances not assumed			4.231	113.121	.000	9.68	2.287	3.684	15.668
تعداد البائيات	Equal variances assumed	2.155	.145	1.371	125	.173	49.92	36.397	-45.291	145.121
	Equal variances not assumed			1.889	64.928	.063	49.92	26.420	-20.195	120.025
تعداد NK	Equal variances assumed	4.763	.031	1.752	125	.082	75.61	43.158	-37.282	188.495
	Equal variances not assumed			2.164	50.937	.035	75.61	34.930	-17.862	169.075
مجموع ((T+B+NK)	Equal variances assumed	2.207	.140	1.674	125	.097	312.90	186.869	-175.899	801.698
	Equal variances not assumed			2.006	48.041	.050	312.90	155.973	-105.437	731.235

المناقشة

ولكن يلاحظ تبدل طفيف في تعدادها بين أفراد الشاهد، وتتوع في أعدادها بين المرضى، مما يشير إلى عدم استقرار مناعي لدى النساء اللواتي يعانين من إسقاطات متكررة .

فكان متوسط عدد الكريات البيض عند الشاهد 8072 مقارنة بالمرضى 8453 ، ومتوسط النسبة المئوية لعدد اللمفاويات الكلي عند الشاهد 33 % مقارنة بالمرضى 35 %، ومتوسط التعداد الكلي لللمفاويات التائية عند الشاهد 2036 ، وكان عند المرضى 2223 ، أمّا متوسط عدد التائيات الكابحة (CD3+CD8) فهو عند الشاهد 662 وعند المرضى 815، ومتوسط عدد التائيات المساعدة (CD3+CD4) عند الشاهد 1074 وعند المرضى 1259،

يبدو من نتائج تقصي اللمفاويات التائية T-Cells وأنسالتها المساعدات Helpers بمختلف أنماطها باستخدام واسماتها (CD⁺⁸ , CD⁺⁴ , CD⁺³) عند الشواهد وعند المريضات المصابات بالإسقاطات المتكررة (الجدول 3، 4)، عدم وجود فروق دالة لهذه الخلايا عند الشواهد، واختلاف واضح في أعدادها عند المصابات بإسقاطات متكررة، وهذا يقودنا إلى افتراض أن اللمفاويات التائية وأنسالتها، بنسبها غير المستقرة، تؤهب هؤلاء النسوة إلى الإسقاطات المتكررة. وتلاحظ في الجدولين (3، 4) للشاهد والمرضى أن نسب الخلايا المناعية المدروسة تقع ضمن الحدود الطبيعية.

أجريت خارج أوقات الحمل، إذ بلغ متوسط NK عند الشواهد 285، وعند المرضى 360، مما يقترح أن لـ (NK) دوراً ما في الإسقاطات.

وتبدو آلية قبول الحمل أو لفظه معقدة، وغير مفهومة تماماً حتى الآن. والأرجح تدخل للمفاويات التائية وأنسالها والـ (NK) ومستضدات الـ HLA في هذه الآلية. وقد وضع Kopicow.H.D وزملاؤه [13] جوانب من هذه الآلية المعقدة. أكد الباحث أن الطبقة المغذية Trophoplast الجنينية السطحية على تماس مباشر مع خلايا (NK) المرشحة إلى الطبقة الساقطة Decidua لبطانة الرحم بنسبة (50-90%) من للمفاويات. وتقوم هذه الطبقة المغذية بإنتاج مستضد جنيني من نمط HLA-G يتفاعل مع NK مستهدفة في الطبقة الساقطة، ويعيقها عن القيام بوظيفتها، وحل الطبقة المغذية وإسقاط الجنين، وبذلك تبدو الـ NK أقل أهمية في إحداث الإسقاط المتكرر بصورة مباشرة. وتؤكد دراسة أخرى [14] هذا الافتراض.

وفي دور آخر للـ NK يؤكد الباحث نفسه وزملاؤه [15] أن هذه الخلايا تقوم بإنتاج مركبات ذات مقدرة مناعية معدلة من نمط galactin-1 (gal-1) تقدمها للخلايا التائية T-cells في الطبقة الساقطة Decidua وخاصة T-Cells^{CD8+}، فتكتسب مقدرة تموت خلوي Apoptotic تمكنها من مهاجمة الطبقة الأصلية المغذية السطحية. كما تتفعل بهذا المركب (Th1) و (Th17^{CD4+}). وفي نتائج هذا البحث يلاحظ ارتفاع معنوي بنسب هذه الخلايا (الجدول 4) عند المرضى، مما يقترح أن هؤلاء المريضة مؤهبات للإسقاطات المتكررة.

من جهة أخرى، وبمقارنة أعداد ونسب الخلايا المساعدة Helpers عند كل من الشواهد والمريضات (الجدولان 3، 4)، يلاحظ ارتفاع أعدادها عند المريضة. وهذا يقترح أن هذه الخلايا ستفعل الخلايا للمفاوية البائية B-cells عند المريضة لدرجة أكبر منها عند الشواهد. ولما كان ناتج هذا التفعيل هو تركيب وإنتاج الأضداد Antibodies من قبل البائيات، كان رد الفعل المناعي عند

ومتوسط تعداد الخلايا التائية (CD3+CD8+CD4) عند الشاهد 4 وعند المرضى 14، وكان متوسط عدد القتلة الطبيعيين عند الشاهد 285 وعند المرضى 360. وتدل هذه النتيجة على ارتفاع في تعداد أنماط الخلايا المناعية عند المرضى مقارنة بالشاهد. وبالنظر إلى التبدل في أعداد القتلة الطبيعيين (NK) بين المرضى، يلاحظ أن أعدادها تبقى رغم تبدلها المعنوي ضمن حدود تبدو معقولة.

وتتفق هذه الدراسة مع دراسة لـ Souza.SS وزملائه [9] الذي أجرى مقايسة لهذه الخلايا لنساء يعانين من إسقاطات متكررة، ولاحظ وجود ارتفاع في أعداد الخلايا التائية (CD⁸⁺) ولدرجة أقل البائيات (CD¹⁹⁺)، ولم يلاحظ ارتفاعاً في فعالية الـ (NK) الموسومة بـ (CD¹⁶⁺) و (CD⁵⁶⁺). واقترح الباحث أن حدوث الإسقاطات المتكررة لا تعود لارتفاع في فعالية (NK)، وعلى العكس من ذلك فإن التائيات T-Cells الموسومة بـ (CD⁸⁺) الجواله في الدم هي التي تتوسط حدوث الإسقاطات المتكررة.

وتتفق هذه الدراسة مع نتائجنا في درجة كبرى. إذ تنتهي هذه الدراسة إلى ترجيح احتمال عدم وجود دور لفعالية الخلايا (NK) في حدوث الإجهاضات المتكررة، وتقترح أن السمية الخلوية الجنينية fetal cytotoxicity ناجمة على الأرجح من توسط الخلايا التائية (ارتفاع عدد الخلايا التائية موجبة الـ CD⁸⁺ وليس من فعالية الـ NK !

وبمعايرة (NK) الموسومة بـ (CD⁵⁶⁺) و (CD¹⁶⁺) عند مجموعتين من النساء (شواهد وذوات إجهاضات متكررة) قبل الحمل وبعده، وجد الباحث Emmer PM وزملاؤه [12] أن أعدادها عند المجموعتين تكون متقاربة قبل الحمل، وتزداد قليلاً بأقل من 12% بعد الحمل عند المرضى، وبشكل فارق عن الشواهد، واقترح أنها تؤدي دوراً ما في إحداث الإسقاطات المتكررة. وفي نتائجنا تبدو أعداد (NK) متقاربة عند الشواهد وعند المريضة مع زيادة نسبية عند المريضة، مع ملاحظة أن المعايرة

المريضات في أثناء مدة الحمل أقوى وأعنف. وبذلك تسهم للمفاويات البائية مع للمفاويات التائية والعناصر الأخرى في العمل لإحداث الإسقاط.

الاستنتاجات

تتظاهر عند النساء السوريات اللواتي يعانين من إسقاطات متكررة تبدلات دالة في العناصر المناعية المقيسة بتقانة القياس الخلوي بالتدفق Flow cytometry باستخدام صفوف التمايز CD:

CD⁺³، CD⁺⁴، CD⁺⁸، CD⁺¹⁹، CD⁺⁴⁵، و CD⁺⁵⁶ الواسمة للمفاويات التائية T-Lymphocytes، الكابحات Suppressors والمساعدات Helpers، والبائية B-Lymphocytes، والقتلة الطبيعيين NK، ويستنتج من هذه التبدلات أن هذه العناصر جميعها تؤدي دوراً في حدوث الإسقاط بالاشتراك مع مستضدات خاصة من الـ HLA-II، ومستضدات جنينية من الـ HLA-I، وأنها خاصة مناعية لهؤلاء النسوة تؤهبهن للتعرض للإسقاطات المتكررة.

المراجع

1. Drake PM, Gunn MD, Charo IF, et al. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56 (bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1 alpha. *Exp Med* 2001;193:1199-212.
2. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *Exp Med* 1996;184:539-48.
3. Deniz G, Christmas SE, Brew R, Johnson PM. Phenotypic and functional cellular differences between human CD3-decidua and peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1994;152:4255-61.
4. Errol R, Norwitz, M.D., Ph.D. Danny J. Schust, M.D., and Susan J. Fisher, Ph.D. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, 2001; vol. 345, No. 19, Nov. 8, 1400-1408.
5. Carole O., HLA and pregnancy: The paradox of the fetal allograft. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62:1-5.
6. Davis OK, Berkeley AS, Naus GJ, Cholst IN, Fredman KS. The incidence luteal phase defect in normal, fertile women determined by serial endometrial biopsies. *Fertil Steril* 1989; 51:582-586.
7. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281:1191-3.
8. Reed E, Beer AE, Hutcherson H, et al., The alloantibody response of pregnant women and its suppression by soluble HLA antigens and anti-idiotypic antibodies. *J Reprod Immunol* 1991; 20:115-128.
9. Souza SS, Ferriani RA, Santos CM, Voltarelli JC., Immunological evaluation of patients with recurrent abortion. *J Reprod Immunol* Jul-Aug 2002; 56(1-2):111-21.
10. Hagihara M, Chargui J, Gansuvd B, Inoue H, Hotta T, Kato S., Increased frequency of CD3/856-positive umbilical cord blood T lymphocytes after allo-priming in vitro. *Ann Hematol.* Mar. 2003; 82(3):166-70.
11. Jones CA, Holloway JA, Warner JO. Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy. *J Reprod Immunol* Jul-Aug. 2002; 56(1-2):46-60.
12. Emmer PM, Nelen WL, Steegers EA EA, Hendriks JC, Veerhoek M, Joosten I. "Peripheral natural Killer cytotoxicity and CD56 (pos) CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion" *Hum Reprod.* 2000 May; 15(5): 1163-9.
13. Kopcow H.D, David S.J. Allan, Xi Chen, Basya Rybalov, Milena M. Andzelm, Baoxue Ge, and Jack L. Strominger " Human decidual NK cells from immature activating synapses and are not cytotoxic" Sep. 8, 2005, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
14. Kopcow H.D, Florencia Rosetti, Yiuka Leeung, David S.J. Allan, Jeffery L. Kutok, and Jack L. Strominger " T-Cell apoptosis at the maternal – fetal interface in early human pregnancy, involvement of galactin-1" *Journal List > Proc Natl Acad Sci USA > v.105; Nov 25, pp 18472-18477 (2008) .*
15. Kotaro Kitaya " Accumulation of Uterine CD16(-) Natural Killer (NK) Cells: Friends, Foes, or Jekyll-and-Hyde Relationship for the Conceptus? *Immunological Investigations* 2008, Vol. 37, No. 5-6, Pages 467-481.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2010/6/12.

تاريخ قبوله للنشر 2010/9/28