

الاجسام المضادة للفوسفاتديل سيرين كمؤشرات تشخيصية للتحري عن الاصابة بمتلازمة الدهون الفوسفاتية في النساء المجهضات

رقاء عبد المحسن محمد صالح العبيدي

دائرة صحة نينوى/ وزارة الصحة

E-mail: raqaamuhsin82@gmail.com

أديبة يونس شريف النعمان

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

E-mail: shareefadeeba@yahoo.com

الملخص

ان هذه الدراسة شملت 90 عينة دم، 80 منها جمعت من النساء اللاتي تعرضن لحالات الإجهاض التلقائي او المتكرر و10 جمعت من النساء ذوات الحمل الطبيعي كعينات سيطرة، حضر المصل من هذه العينات لاستخدامه في التحري عن الاجسام المضادة لدهون الفوسفاتديل سيرين في المريضات أظهرت النتائج أن 21 عينة موجبة لوجود الاجسام المضادة لدهون الفوسفاتديل سيرين وبلغ معدل التركيز في هذه الحالات الموجبة (14.6 ± 1.4 RU/ml) عند مجموعة المريضات اما في مجموعة السيطرة فلم تظهر حالات موجبة وبلغ معدل تركيز الاضداد (7.9 ± 2.0 RU/ml) عند مجموعة السيطرة. ازداد تواجد هذه الاجسام المضادة عند مجموعة المريضات اللواتي قد عانين من ثلاث اجهاضات او اكثر وكان عددهم 15 حالة اما العينات الـ 6 الموجبة المتبقية فقد ظهرت في مجموعة النساء اللواتي عانين من اجهاضين إذ بلغ معدل التركيز للأجسام المضادة للفوسفاتديل سيرين عند هذه المجموعة من المريضات (15.1 ± 2.1 RU/ml) ولم تظهر اي نتيجة موجبة في مجموعة النساء اللواتي تعرضن لإجهاض واحد.

الكلمات الدالة: الاجسام المضادة للفوسفاتديل، النساء المجهضات، الدهون الفوسفاتية.

المقدمة

تعد متلازمة الدهون الفوسفاتية Antiphospholipid syndromc (APS) واحدة من الاضطرابات المناعية الجهازية وامراض المناعة الذاتية التي تتميز بحدوث التخثرات والمضاعفات أثناء الحمل وتكون مصحوبة بوجود الاجسام المضادة للدهون الفوسفاتية Antiphospholipid Antibodies (APL) (Santos *et al.*, 2017). ان الاهتمام بعوامل المناعة الذاتية كمسببات لحالة (RPL) وقد ازداد على نحو واسع لا سيما بعد تشخيص وجود مختلف أنواع الاجسام المضادة وارتباط ظهورها مع هذه الحالات (Asithambia *et al.*, 2017). وان اضطرابات المناعة الذاتية تكون شائعة في النساء بنسبة (6-10) اضعاف ما هو مشخص في الرجال، وتظهر هذه الاضطرابات في النساء غالباً في سن الانجاب (Gomes *et al.*, 2015). ان الاجسام المضادة للدهون الفوسفاتية تمثل عائلة من الاجسام المضادة المتغايرة والتي تسبب التخثرات ومضاعفات الحمل خصوصاً عند الإجهاض التلقائي المتكرر ومن اهم اعداد (APL) Antiphospholipid Antibodies والتي تفيد في تشخيص المرض هي : عامل التخثر الذئبي (Lupus Anticoagulant)، الاجسام المضادة للدهون القلبية (Anticardiolipin Antibodies)، الاجسام المضادة للبروتين السكري beta2glycoprotien1 (Antiβ 2 GPIantibodies) (Kwak-Kim *et al.*, 2014) ، بالإضافة لهذه الاضداد الثلاثة دلت الأبحاث عن وجود اعداد غير طبيعية أخرى لها دور مهم في إحداث حالات الإجهاض التلقائي مثل اعداد دهون الفوسفاتيديل سيرين (Anti-Phosphatidyl Serine Antibodies)، ان الاجسام المضادة لدهون الفوسفاتيديل سيرين عبارة عن كلوبولينات مناعية ترتبط مع الدهون الفوسفاتية ومع بروتينات البلازما التي قد ترتبط مع الـدهون الفوسفاتية الموجودة على سطح الخلايا الطلائية الوعائية او على الصفائح الدموية (Martinuzzo,2010). من اكثر انواع اعداد الـدهون الفوسفاتية المهمة سريريا التي اكتشفت واجمع على اهميتها السريرية هي اعداد Beta 2-Glycoprotein antibodies, Lupus anticoagulant, Anti coodiolipin antibodies (Tebo *et al.*, 2008) (β_2GP_1 , LA, ACL) ان لهذه الاضداد اهمية طبية وتشخيصية كبيرة خاصة للأشخاص المعرضين للتجلطات والنساء المعرضات لحالات فقدان الحمل المتكرر وهناك انواع اخرى من الاجسام المضادة الذاتية التي لا تزال غير محددة بشكل كامل منها الاجسام المضادة للفوسفاتيديل سيرين وللبروثرومبين وللأنكسين وللـفوسفاتيديل اينوسيتول (Okuma *et al.*, 2010).

وقد تم التوصل الى وجود بعض الارتباط بين هذه الاجسام المضادة الذاتية والصفات السريرية لمتلازمة الدهون الفوسفاتية APS، اذ وجدت دراسة (Adler *et al.*,1995) أن اعداد الفوسفاتيديل سيرين قد تتداخل مع التكوين الطبيعي للأغشية الجنينية الاولية، إذ تؤثر على تطور المشيمة، وتم تقييم هذا النوع من الاجسام المضادة في الدراسة التي اقترحت وجود علاقة بين اعداد الفوسفاتيديل سيرين وفشل الحمل المتكرر وفي مرضى متلازمة الدهون الفوسفاتية (Velayuthaprabhu and Archuna, 2005). اوضحت دراسة (Khogeer *et al.*, 2015) الارتباط المعنوي بين الاجسام المضادة للفوسفاتيديل سيرين والاجسام المضادة للدهون الفوسفاتية خاصة عند استخدامها في تشخيص الحالات التي تظهر نتيجة سالبة للأجسام المضادة للدهون الفوسفاتية وكذلك دراسة (Archunan,2005) ان الاجسام المضادة للفوسفاتيديل سيرين قد تظهر نتيجة موجبة عند بعض النساء المعرضات للإجهاض واللواتي اظهرن نتيجة سالبة للأجسام المضادة للدهون القلبية، كما بين (Mitsui *et al.*, 2005) ان الاجسام المضادة للفوسفاتيديل سيرين تعد عامل خطورة لتكرار الاجهاض في النساء المصابات بتسمم الحمل وهذا ما أكدته دراسة (Aligotas-Reig *et al.*, 2010) ولذلك فان قياس تركيز مستوى هذه الاجسام المضادة قد يحسن حالة المريضة اللواتي يعانين من الاجهاض المتكرر واللواتي لا تظهر لديهن الانواع الاخرى من اعداد الـدهون الفوسفاتية. إن الهدف من الدراسة الحالية

تقييم دور الاجسام المضادة للدهون الفوسفاتية نوع فوسفاتيديل سيرين في تشخيص الاصابة بمتلازمة الدهون الفوسفاتية عند النساء المجهزات.

المواد وطرائق العمل

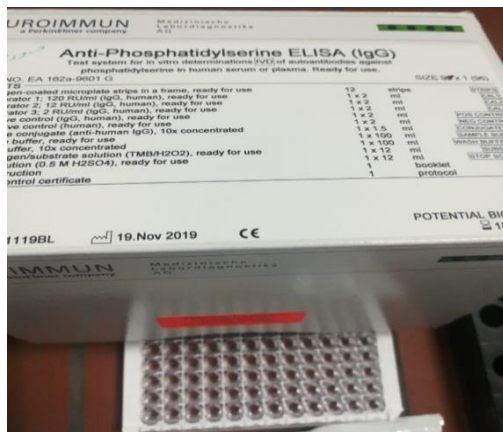
قياس مستوى الاجسام المضادة لدهون الفوسفاتيديل سيرين بطريقة الادمصاص المناعي المرتبط بالانزيم المباشرة. استخدمت عدة الفحص المجهزة من قبل EUROIMMUN الالمانية (الجدول 1) والشكلين (1 و2).

مبدأ الكشف:

قياس الاجسام المضادة للفوسفاتيديل سيرين في المصل او البلازما باستخدام هذه العدة يعطي نتائج كمية او شبه كمية. وتكون الحفر في صفيحة البولي ستيرين مغلقة مسبقا بمستضد الفوسفاتيديل سيرين، يعتمد تفاعل هذا المستضد مع الاجسام المضادة له على وجود البروتين β_2GP_1 البلازمي كعامل مساعد من اجل تمييز المستضد ولهذا فإن الدراي المستخدم يحتوي على هذا العامل المساعد المهم لحدوث التفاعل، عند اضافة المصل المخفف الحاوي على الاجسام المضادة. سوف ترتبط مع المستضد عند وجودها في المصل والتي قد تكون من نوع IgG, IgM, IgA، وللكشف عن تكون معقد الضد-المستضد يتم اضافة الاضداد المقترنة بالانزيم enzyme-labelled anti-human IgG ترتبط مع المعقد (المستضد / الاجسام المضادة) وتحفز التفاعل اللوني والذي تتناسب شدته طرديا مع تركيز الاضداد الموجودة بالعينة.

الجدول 1: مكونات عدة الكشف عن الاجسام المضادة للفوسفاتيديل

المادة	الكمية
صفيحة البولي ستيرين المغلفة بالمستضد	حفر 8 X شرائط 12
120 Ru/ml calibrator 1	2 ml
12 Ru/ml calibrator 1	2 ml
2 Ru/ml calibrator 1	2 ml
عينة سيطرة موجبة	2.0 ml
عينة سيطرة سالبة	2.0 ml
الاضداد المقترنة بالانزيم	1.5 ml
محلول دارى لتخفيف العينات	100 ml
محلول دارى للغسل	100 ml
محلول المادة الاساس	12 ml
محلول ايقاف التفاعل	12 ml



الشكل 2: عدة فحص اضرار Ph. Serine



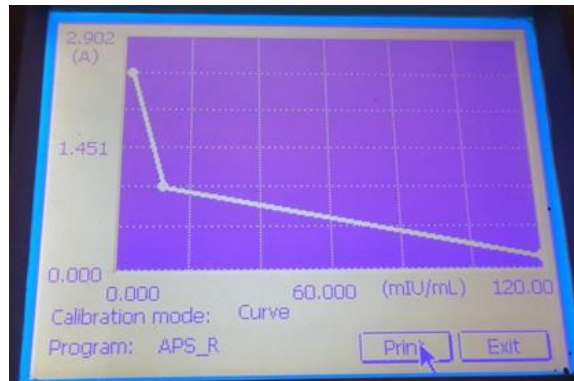
الشكل 1: مكونات عدة فحص اضرار Ph. Serine

طريقة العمل:**تخفيف المحاليل المركزة:**

- أ - خفف محلول الاضداد بنسبة 10:1 بالمحلول الدارئ لتخفيف العينات.
 ب - تم اضافة حجم واحد من المحلول الدارئ للغسل الي (9) مل من الماء المقطر للحصول على المحلول الدارئ للغسل المخفف بنسبة 10:1.
 ج - تم تخفيف المصل بنسبة 1:201 وذلك بإضافة 5 µl من المصل الى 1.0 ml المحلول الدارئ للعينات مع المزج الجيد.

خطوات العمل:

- 1- تركت عدة الفحص مدة نصف ساعة للوصول لدرجة حرارة المختبر.
 2 - اضيف 100 µl من كل من calibrators و عينات السيطرة الموجبة والسالبة و عينات المصل لحفر الصفيحة.
 3 - حضنت الصفيحة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة (18-25) م°.
 4 - غسلت الحفر ب 300 µl من محلول الغسل الدارئ المخفف وترك المحلول في الحفر 60 ثانية.
 5 - اضيف 100 µl من محلول الاضداد المقترنة لكل حفرة وحضنت الصفيحة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 18-25 م°.
 6- غسلت الحفر ب 300 µl من المحلول الدارئ للغسل المخفف مع ترك المحلول 30-60 ثانية.
 7 - اضيف 100 µl من محلول المادة الاساس لكل حفرة.
 8-حضنت الصفيحة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 18-25 م°.
 9 - اضيف 100 µl من محلول الايقاف لكل حفرة.
 10- تم قياس شدة اللون عند طول موجي 450 nm. وتم حساب التركيز من خلال استخدام المنحني القياسي الشكل (3) الذي يوضح العلاقة بين تركيز الاجسام المضادة للفوسفاتديل سيرين والكثافة الضوئية للعينات القياسية.



الشكل 3: المنحني القياسي للأجسام المضادة للفوسفاتديل سيرين

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الكشف عن اضداد دهون الفوسفاتديل سيرين عن وجود (21) حالة موجبة لهذه الاضداد في عينات المريضات، مقارنة بعينات السيطرة الذين لم تظهر لديهم نتيجة موجبة لهذا النوع من الاجسام المضادة، وأظهر التحليل الاحصائي (T-Test) بواسطة برنامج (SPSS) وجود فرق معنوي بين المجموعتين عند مستوى ($P \leq 0.01$)، بلغ معدل تركيز اضداد Phosphatidyl serine (Ph.S) في مجموعة المريضات (14.6 ± 1.4) RU/ml بينما في مجموعة السيطرة كان التركيز (7.9 ± 2.0) RU/ml كما موضح في (الجدول 2).

الجدول 2: عدد العينات الموجبة لأضداد Ph.S في مجموعة المريضات ومجموعة السيطرة

P-Value	معدل تركيز الأضداد	%	عدد الحالات الموجبة	%	عدد العينات	النتائج
						المجاميع
0.01	1.4±14.6 RU/ml	26.2	21	88.8	80	مجموعة المريضات
	2.0±7.9 RU/ml	0.0	0	11.1	10	مجموعة السيطرة

وقد توزعت الحالات الموجبة لأضداد Ph.S في المجاميع وحسب عدد حالات الاجهاض كالتالي، في مجموعة المريضات ذوات اجهاض واحد لم تظهر فيها نتيجة موجبة وكان معدل تركيز هذه الاضداد فيها (8.8 ± 1.4 RU/ml)، أما في مجموعة المريضات اللواتي تعرضن للإجهاض مرتين فقد ظهرت فيها (6) حالات موجبة وبمعدل تركيز للأضداد إذ بلغ (15.1 ± 2.1 RU/ml)، بينما في مجموعة المريضات اللواتي تعرضن لثلاثة اجهاضات فأظهرت أكبر عدد للحالات الموجبة حيث بلغ (15) حالة موجبة وبمعدل تركيز (14.4 ± 1.1 RU/ml) وقد بين التحليل الاحصائي وجود علاقة طردية لوجود اضرار Ph.S مع عدد حالات الاجهاض، كما موضح في (الجدول 3) و الشكل (4) الذي يوضح العلاقة بين اعداد العينات الموجبة لوجود اضرار Ph.S وعلاقتها بعدد الاجهاضات والذي يوضح زيادة اعداد الإصابات في المريضات المعرضات لأعداد اكبر من حالات الإجهاض.

الجدول 3: عدد الحالات الموجبة لأضداد Ph.S في المريضات وعلاقتها بعدد حالات الإجهاض

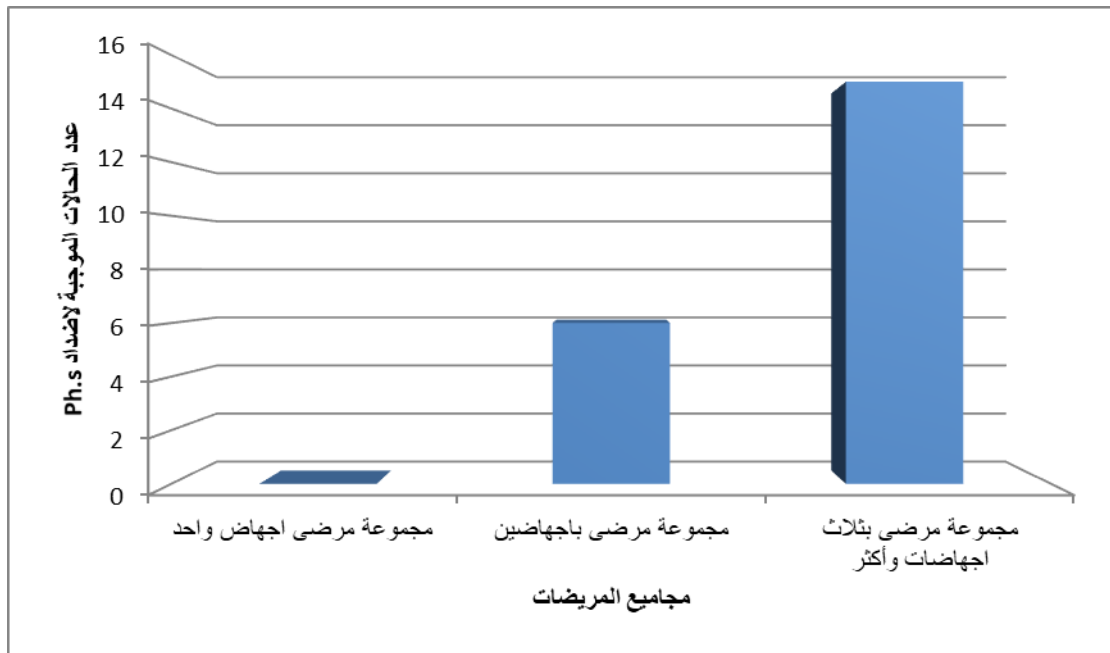
معدل تركيز الأضداد	%	عدد العينات السالبة	معدل تركيز الأضداد	%	عدد العينات الموجبة لأضداد Ph.S	%	عدد العينات	اضداد Ph.S
								مجاميع المريضات
1.4±8.8 RU/ml	100	15	0.0	---	0	18.75	15	مجموعة 1
2.5±8.0 RU/ml	70	14	15.1±2.1 RU/ml	30	6	25	20	مجموعة 2
0.8±10.3 RU/ml	66.66	30	14.4±1.1 RU/ml	33.33	15	56.25	45	مجموعة 3

* المجموعة 1 (مريضات ذوات اجهاض واحد)، المجموعة 2 (مريضات تعرضن لإجهاضين)، المجموعة 3 (مريضات تعرضن لثلاث اجهاضات او أكثر)

سجلت دراسة (Khogeer et al., 2015) نسبة (52%) من المريضات اللواتي عانين من الاجهاض المتكرر وعددهم (34) مريضة اظهرن نتيجة إيجابية لوجود اضرار Ph.S، واقترحت هذه الدراسة اضافة فحص الكشف عن اضرار Ph.S بالتزامن مع فحوصات LA و ACA و β_2GP_1 من الممكن أن يعطي أهمية كبيرة للفحص الشامل للكشف عن متلازمة APS خاصة عندما تكون متلازمة APS أولية، في دراسة (Zohoury et al., 2017) أن نسبة تردد اضرار Ph.S كانت (53.4%) إذ أظهرت نتائج موجبة في 46 حالة من مجموع (86) امرأة يعانين من الاجهاض.

وبينت نتائج الدراسة الحالية أن اضرار Ph.S ظهرت في (9) مريضات كانت نتائجهم سالبة لباقي اضرار الدهون الفوسفاتية، إن هذه الحالة تُفسر بحالة تسمى العينات السالبة لمتلازمة الدهون الفوسفاتية مصلياً (SeroNegative - APS) وهم المريضات الذين لديهم نتائج سلبية لأضداد الدهون الفوسفاتية الرئيسية وهي (LA و ACA و B_2GP_1) ولكن لديهم اعراض

سريرية تؤكد المرض وتظهر لديهم نتائج ايجابية للأضداد غير التقليدية لتشخيص APS مثل اضداد Ph.S (Roggenbuck) (et al., 2012)، إذ خلصت دراسة مشتركة أجريت بين الولايات المتحدة الأمريكية وبريطانيا أن المريضات الذين يعانون من مظاهر سريرية لمتلازمة APS لكنهم سلبيون للدلائل التقليدية من الممكن أن يخضعوا لاختبارات اضافية غير تقليدية (Pignatelli 2020). وفي دراسة (Billoir et al., 2019) وجد أن من بين (866) امرأة يعانين من Recurrent pregnancy loss (RPL)، (87) منهن اظهرن نتائج سالبة لوجود ACA فيما ظهرت نتائج موجبة للأنواع الأخرى من اضداد الدهون الفوسفاتية وبينت دراسة أخرى (Jaslow et al., 2010) شملت (872) امرأة يعانين من RPL، أن (49) حالة كانت نتائجهم سالبة لوجود اضداد ACA و LA ولكنهم اظهروا نتيجة موجبة لوجود اضداد Ph.S كما توصلوا في هذه الدراسة الى أن عدد الحالات الموجبة لوجود اضداد Ph.S ارتبطت طردياً مع عدد حالات الإجهاض.



الشكل 4: عدد الحالات الموجبة في مجموعة المريضات وعلاقتها مع عدد حالات الاجهاض

المصادر

- Adler, R.R.; Ng, A.K.; Rote, N.S. (1995). Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, *JAR. Biol. Reproduct.*, **53**(4), 905-910.
- Alijotas-Reig, J.; Ferrer-Oliveras, R.; Rodrigo-Anoro, M.J.; Farran-Codina, I.; Cabero-Roura, L.; Vilardell-Tarres, M. (2010). Anti- β 2-glycoprotein-I and anti-phosphatidylserine antibodies in women with spontaneous pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, **93**(7), 2330-2336.
- Asaithambi, A.; Gunasekaran, M.; Manivelan, S.; Nainar, P. (2017). Antinuclear antibodies in patients with unexplained recurrent abortions. *Asian J. Pharma. Clinic. Res.* **10**(8), 256-259.
- Billoir, P.; Miranda, S.; Abboud, J.; Armengol, G.; Levesque, H.; Benhamou, Y.; Le, V. C. D. (2019). Which place of antiphosphatidylethanolamine antibodies research in seronegative antiphospholipid syndrome suspicion?. *La Revue de Medicine Interne*, **40**(6), 351-354.
- Gomes, V.; Mesquita, A.; Capela, C. (2015). Autoimmune diseases and pregnancy: analysis of a series of cases. *BMC research notes*, **8**(1), 1-7.

- Jaslow, C.R.; Carney, J.L.; Kutteh, W.H. (2010). Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertility and sterility*, **93(4)**, 1234-1243.
- Khogeer, H.; Alfattani, A.; Al Kaff, M.; Al Shehri, T.; Khojah, O.; Owaidah, T. (2015). Antiphosphatidylserine antibodies as diagnostic indicators of antiphospholipid syndrome. *Lupus*, **24(2)**, 186-190.
- Kwak-Kim, J.; Bao, S.; Lee, S.K.; Kim, J.W.; Gilman-Sachs, A. (2014). Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *American J. Reproduct. Immunol.*, **72(2)**, 129-140.
- Martinuzzo, M. (2010). Laboratory criteria of antiphospholipid syndrome need to be updated or strictly followed. *The Open Autoimmunity J.*, **2(1)**.
- Mitsui, M.; Yamashiro, M.; Yamamoto, T. (2005). Anti-phosphatidylserine-prothorombin antibody in patients with recurrent abortion and preeclampsia. *Japanese J. Clin. Immunol.*, **28(1)**, 33-39.
- Okuma, H.; Kitagawa, Y.; Takagi, S. (2010). Investigation of antiphosphatidyl-serine antibody and antiphosphatidyl-inositol antibody in ischemic stroke patients. *Clin. and Developmental Immunol.*, 2010, **439230**. <https://doi.org/10.1155/2010/439230>
- Pignatelli, P.; Ettore, E.; Menichelli, D., Pani, A.; Violi, F.; Pastori, D. (2020). Seronegative antiphospholipid syndrome: refining the value of “non-criteria” antibodies for diagnosis and clinical management. *Haematologica*, **105(3)**, 562-572.
- Roggenbuck, D.; Egerer, K.; von Landenberg, P.; Hiemann, R.; Feist, E.; Burmester, G. R.; Dörner, T. (2012). Antiphospholipid antibody profiling—time for a new technical approach?. *Autoimmunity reviews*, **11(11)**, 821-826.
- Santos, T.D.S.; Ieque, A.L.; deCarvalho, H.C.; Sell, A.M.; Lonardon, M.V.C.; Demarchi, I.G.; Teixeira, J.J.V. (2017). Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *J. Reproduc. Immunol.* **123**, 7-87.
- Tebo, A.E.; Jaskowski, T.D.; Hill, H.R.; Branch, D.W. (2008). Clinical relevance of multiple antibody specificity testing in anti-phospholipid syndrome and recurrent pregnancy loss. *Clin. Experimental Immunol.*, **154(3)**, 332-338.
- Velayuthaprabhu, S.; Archunan, G. (2005). Evaluation of anticardiolipin antibodies and antiphosphatidylserine antibodies in women with recurrent abortion. *Indian J. Med. Sci.*, **59(8)**, 347–352. <https://doi.org/10.4103/0019-5359.16651>
- Zohoury, N.; Bertolaccini, M. L.; Rodriguez-Garcia, J. L.; Shums, Z.; Ateka–Barrutia, O.; Sorice, M.; Khamashta, M. (2017). Closing the serological gap in the antiphospholipid syndrome: the value of “non-criteria” antiphospholipid antibodies. *J. Rheumatol.*, **44(11)**, 1597-1602.
-

Antiphosphatidyl Serine as Diagnostic Indicators for Detection of Antiphospholipid Syndrome in Aborted Women

Raqaa A. Al-Ubaidi

Nineveh Health Directorate / Ministry of Health

Adeba Y. Al-Noaman

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

This study included 90 blood samples. 80 of which were collected from women who had undergone spontaneous or recurrent miscarriage and 10 were collected from women with a normal pregnancy as control samples. Serum was prepared from these samples for use in investigating antiphosphatidyl serine antibodies, the results of the study showed that 21 samples give a positive result for the presence of antiphosphatidyl serine antibodies, the concentration rate in these positive cases was 14.6 ± 1.4 RU/ml in the patient group, control group did not show positive cases, the concentration rate of these antibodies reached 7.9 ± 2.0 RU/ml in the control group and the presence of these antibodies increased in the group of patient who had suffered from three or more miscarriages and their number was 15 cases ,while the remaining 6 positive samples was belong to group of women suffered from two abortion and the average concentration of anti-phosphatidyl serine antibodies in this group of patient was 15.1 ± 2.1 RU/ml, and there was no positive result in the group of women had underwent one miscarriage .

Keywords: Antiphospholipid, Aborted women, Phospholipids.