الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـــــامعة دمشق
كلية الطب البشري
قســم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية–التشريح المرضي

دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية التشخيص في الداء الزلاقي وتصنيفاته وأهميتها العلاجية والإنذارية

رسالة مُقدَّمة لنيل شهادة الدراسات العليا التخصصية في الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية

إعداد طالبة الدراسات العليا
شاهناز راغب الحلبيه

بإشراف
الأستاذ الدكتور: فريز أحمد
المدرس الدكتور في قسم الباثولوجيا والباثولوجيا الخلوية – التشريح المرضي
في كلية الطب البشري – جامعة دمشق

1444 هـ/2023 م

قرار لجنة الحكم وتوقيعات لجنة المناقشة Approval

نُوقِشت هذه الرسالة الموسومة بعنوان (دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية التشخيص في الداء الزلاقي وتصنيفاته وأهميتها العلاجية والإنذارية) في جلسة علنية بتاريخ / /2023 م، وبعد الاطلاع على النسخة المُعدَّلة المُقدَّمة من قبل طالبة الدراسات العليا: **شاهناز راغب الحلبيه** تبيَّن أنه تم التقيد بالملاحظات كلها، وأُجرِيَتْ التصويبات المطلوبة كلها، **وأُجِيزَت من قبل أعضاء لجنة التحكيم الآتية أسماؤهم:**

الدكتور فريز أحمد: المدرس الدكتور في قسم التشريح المرضي، كلية الطب البشري، جامعة دمشق – مشرفاً.

الاسم: أ.د. فريز أحمد

الدكتور : الأستاذ الدكتور في قسم التشريح المرضي، كلية الطب البشري، جامعة دمشق – عضواً

الاسم: أ.د.محمد إياد الشطي

الدكتور : الأستاذ الدكتور في قسم التشريح المرضي، كلية الطب البشري، جامعة دمشق – عضواً.

الاسم: أ.د. ياسر السيد علي

تصريح خطي

أنا الموقعة أدناه أصرح بعلمي الكامل وقبولي:

1- أن كل ما ينتج عن البحث والأطروحة هو ملكية فكرية ومالية بالتشارك مع جامعة دمشق، وأنني ألتزم بأخذ موافقة الجامعة في حال رغبتي بنشر البحث أو الأطروحة أو جزء منها نصاً أو مضموناً خارج إطار الجامعة (من نشر أو مكتبات أو مواقع إلكترونية وغيرها من وسائل النشر).

2- أنه لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة اُقتبس من عمل علمي آخر أو أُنجِزَ للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أو معهد تعليمي داخل الجمهورية العربية السورية أو خارجها .

الاسم والتوقيع:

شاهناز راغب الحلبيه

شكر وتقدير Acknowledgment

المدرس الدكتور فريز أحمد

المشرف على هذا البحث، الأستاذ المتميز وصاحب الفضل الكبير، الذي أعطاني من وقته وعلمه كثيراً، ولم يبخل بأي معلومة أو ملاحظة، له مني كل التقدير والحب، والشكر الخالص لإشرافه على هذا البحث، مع تمنياتي له بدوام الصحة والعافية.

الأستاذ الدكتور محمد إياد الشطي

إلى أستاذي الأغلى ومرجعيتي في العلم والإنسانية .... إلى من لم يبخل علي بالعلم والنصح وكان بمثابة أب لي ... دام فضلك علي وعلى زملائي ودمت في قلوبنا ما حيينا ... لك مني جل الاحترام وفيض من المحبة ... أستاذي الغالي ... الأستاذ الدكتور محمد إياد الشطي

المدرس الدكتور ياسر السيد علي

الذي شرفني بتقييم البحث بإجراء المشاركة في لجنة الحكم، وما قدمه من ملاحظات ونصائح لك مني كل الشكر والاحترام والتقدير.

الاهداء

إلى أمي أولاً .... كنتي ومازلتِ ... وستبقين أهم وأغلى ما أملك ..

وفيكِ ومنكِ كل ما أنا فيه ولك جل الفضل بكل شيء ... أدامك الله شمساً في سمائي

إلى أبي .. دام فخري بك وشخصك بجري في عروقي ... ولكم كنت أتمنى وجودك

إلى جانبي .. رحمك الله .

إلى إخوتي ... محبتي لكم لا تتسع لها الأرض بأكملها ... بسمائها وفضائها وكل نجومها

حتى مجرتها .

د. سارة ... د . زين شقيقتي الروح ... لا أملك من الكلمات ما يفي بحقكما .. فلكم

في قلبي نظم خاص .. فلا كلام ولا سطور .

أصدقائي ... إخوتي الذين لم تلدهم أمي لكم فيَ عظيم الأثر وفي قلبي لكم الكثير .

..... شكراً .....

مع محبتي

فهرس المحتويات Table of Contents

القسم	الصفحة
الجزء التمهيدي	
1- المقدمة	1
2- المشكلة البحثية	2
3- تساؤلات البحث	2
4- فرضيات البحث	2
5- مسلمات البحث	2
6- هدف البحث	2
7- أهمية البحث	3
8- حدود البحث	3
9- مناهج البحث وأدواته	3
10- الدراسات المرجعية	4
11- مكونات البحث	5
الجزء الأول: القسم النظري	8
الفصل الأول: لمحة عن الداء الزلاقي Celiac Disease	8
1-1- تمهيد	8
1-2- تصنيف الداء الزلاقي Classification of Celiac Disease:	8
1-2-1- الداء الزلاقي النموذجي (الكلاسيكي)	8
1-2-2- الداء الزلاقي اللاعرضي (الداء الصامت)	9
1-2-3- الداء الزلاقي المُحتمَل (الكامن)	9
1-2-4- الداء الزلاقي غير المُستَجيب	9
1-2-5- الداء الزلاقي المُعنِّد	9
1-3- تاريخ الداء الزلاقي History of Celiac Disease	9
1-4- الوبائيات Epidemiology	11
1-5- الإمراضية Pathology	13
1-6- الآلية المرضية Pathogenesis	16
1-6-1- العوامل البيئية Enviromental Factors	16

1-6-2- العوامل الجينية Genetic Factors	18
1-6-3- العوامل المناعية Immune Factors	19
1-7- التظاهرات السريرية Clinical Features	20
1-7-1- التظاهرات السريرية عند الأطفال	21
1-7-2- التظاهرات السريرية عند البالغين	21
1-7-3- التظاهرات الهضمية	22
1-7-4- التظاهرات خارج هضمية	24
1-9- التشخيص Diagnosis	25
1-9-1- الاختبارات المصلية Serology	25
1-9-2- أضداد غمد الليف العضلي من نمط الغلوبيولين المناعي IgA	25
1-9-3- أضداد ناقلة الأمين النسيجية(tTG)	26
1-9-4- أضداد الغليادين منزوع الأمين (DGP)	27
1-9-6- الفحص الجيني لـ HLADQ2/DQ8	27
1-9-7- اختبار التحدي بالغلوتين Gluten Challenge	28
الفصل الثاني : التقويم المجهري لخزعات الأمعاء الدقيقة ودور التلوينات المناعية	30
2-1- خزعة الأمعاء الدقيقة Small Intestinal Biopsy	30
2-1-1- مقدمة	30
2-1-2- المظاهر التنظيرية للداء الزلاقي	30
2-1-3- معايير الكفاية في خزعات الأمعاء الدقيقة	31
2-1-4- تقويم الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة IELs	32
2-1-5- طرائق تقدير زيادة الخلايا اللمفاوية ضمن الظهارة ودور التلوينات المناعية	34
2-1-6- صعوبات التقويم المجهري لخزعات الاثني عشر	36
2-1-7- ترميم الزغابات ، تضخم الخبيئات ، ونسبة الزغابات للخبيئات	37
الجزء الثاني: القسم العملي	39
الفصل الأول: أهداف البحث، التصميم، المواد والطرائق	39
1-1- تمهيد	39
1-2- خلفية البحث	39
1-3- تساؤلات البحث	40

1-4- هدف البحث	40
1-5- عينة الدراسة	40
1-6- مواد الدراسة وطرائقها	41
1-7- المحددات الأخلاقية	42
1-8- حجم العينة	42
1-9- المفاهيم والاعتبارات	42
1-10- طرق التحليل الإحصائي	45
1-11- موجز	45
الفصل الثاني: النتائج Results	46
2-1- تمهيد	46
2-2- النتائج	46
2-2-1- دراسة العمر في عينة البحث	46
2-2-2- دراسة الجنس في عينة البحث	47
2-2-3- دراسة استطباب التنظير الهضمي العلوي	47
2-2-4- دراسة نتائج معايرة الاضداد المصلية	48
2-2-5- دراسة تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E	48
2-2-6- دراسة تصنيف تعداد اللمفاويات بحسب CD3 ونمط توزعها بالنسبة للزغابات	49
2-2-7- دراسة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3	50
2-2-8- دراسة العلاقة بين الجنس مع CD3	51
2-2-9- دراسة العلاقة بين العمر مع CD3	51
2-2-10- دراسة التغيرات في تصنيف Marsh ونتائج الاضداد المصلية	52
2-2-11- دراسة تصنيف Marsh النهائي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية	53
2-2-12- دراسة انتشار الداء الزلاقي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية	53

2-2-13- دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس	54
2-2-14- دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع العمر	55
2-3- موجز	55
الفصل الثالث: المقارنة مع الدراسات العالمية المشابهة	56
3-1- تمهيد	56
3-2- مقارنة عامة بين الدراسات	56
3-3- مقارنة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3	57
3-4- مقارنة علاقة الجنس والعمر ونمط التوزع مع CD3	57
3-5-مقارنة علاقة تصنيف Marsh مع الجنس	58
3-6- مقارنة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس	59
3-7- مقارنة التغيرات في تصنيف Marsh	60
3-8- موجز	61
الفصل الرابع: المناقشة Discussion	62
4-1- تمهيد	62
4-2- مقارنة نتائج دراستنا مع الدراسات العالمية المشابهة ومناقشة النتائج	62
4-3- موجز	64
الجزء الثالث: خاتمة Conclusion	65
1-1- تمهيد	65
1-2- الاستنتاجات	65
1-3- صعوبات البحث	65
1-4- التوصيات	66
المراجع References	67
الملاحق	77
الملحق رقم (1) : استمارة البحث	78
الملحق رقم (2) : الموافقة المستنيرة	79
Abstract	80

قائمة الجداول List of Tables

اسم الجدول ورقمه	الصفحة
الجدول (1-1): يوضح التظاهرات خارج الهضمية في الداء الزلاقي	24
الجدول (1-2): يوضح الحساسية والنوعية والقيمة التنبؤية الإيجابية والسلبية للاختبارات المصلية عند المرضى غير المُعَالجين	26
الجدول (2-1): دراسة العمر في عينة البحث	46
الجدول (2-2): دراسة الجنس في عينة البحث	47
الجدول (2-3): دراسة استطباب التنظير الهضمي العلوي	47
الجدول (2-4): دراسة نتائج معايرة الاضداد المصلية	48
الجدول (2-5): دراسة تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E	48
الجدول (2-6): دراسة تصنيف تعداد اللمفاويات بحسب CD3 ونمط توزعها بالنسبة للزغابات	49
الجدول (2-7): دراسة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3	50
الجدول (2-8): دراسة العلاقة بين الجنس مع CD3	51
الجدول (2-9): دراسة العلاقة بين العمر مع CD3	51
الجدول (2-10): دراسة التغيرات في تصنيف Marsh ونتائج الاضداد المصلية	52
الجدول (2-11): دراسة تصنيف Marsh النهائي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية	53
الجدول (2-12): دراسة انتشار الداء الزلاقي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية	53
الجدول (2-13): دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس	54
الجدول (2-14): دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع العمر	55
الجدول (2-15): مقارنة عامة بين الدراسات	56
الجدول (2-16): مقارنة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3	57
الجدول (2-17): مقارنة علاقة الجنس والعمر ونمط التوزع مع CD3	57
الجدول (2-18): مقارنة علاقة تصنيف Marsh مع الجنس	58
الجدول (2-19): مقارنة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس	59
الجدول (2-20): مقارنة التغيرات في تصنيف Marsh	60

قائمة الأشكال List of Figures

اسم الشكل ورقمه	الصفحة
الشكل (1-1): توضح الصورة على يسار الشكل الضمور الزغابي والتغيرات الالتهابية في الداء الزلاقي غير المُعَالج، أما الصورة على يمين الشكل فتظهر تحسن الظهارية وعودتها للشكل الطبيعي بعد اتباع نظام غذائي خال من الغلوتين	16
الشكل (1-2): يوضح منظر تنظيري للعفج يظهر الشكل الأملس للمخاطية أو جلد القريدس	31
الشكل (1-3): يوضح منظراً تنظيرياً للعفج يظهر مقارنة بين مظهر الداء الزلاقي A و المظهر الطبيعي B	31
الشكل (1-4): يوضح المظهر المورفولوجي السليم لخزعات العفج بتلوين H&E	32
الشكل (1-5): يوضح وجود زيادة محتملة في الخلايا اللمفاوية ضمن البطانة بتلوين H&E	33
الشكل (1-6): يوضح طرائق حساب عدد اللمفاويات ضمن الظهارة	35
الشكل (1-7) : A وجود خلايا لمفاوية متناثرة ضمن الظهارة كموجودة طبيعية بتلوين H&E ، C : وجود زيادة في تعداد الخلايا اللمفاوية ضمن الظهارة بتلوين H&E ، D,B : الواسم المناعي ل CD3	36
الشكل (1-8): يوضح درجات الضمور الزغابي(A خفيف، B متوسط ، C شديد)	37
الشكل (2-1): يوضح تصنيف مارش لخزعة العفج	43

Table of Abbreviations جدول المصطلحات والاختصارات الطبية

الاختصار	الشرح
CD	Celiac Disease الداء الزلاقي
H&E	Hematoxylin and Eosin
H. pylori	Helicobacter pylori
IHC	Immunohistochemistry
tTGA	anti-tissue transglutaminase antibodies
IELs	intraepithelial lymphocytes
EmA	Endomysial
S.td	Standard Deviation الانحراف المعياري

الملخص

خلفية البحث:

الداء الزلاقي هو مرض مناعي شـائع يصـيب الأمعاء الدقيقة ناتج عن الحسـاسـية للغلوتين، وهناك العديد من الوسائل المستخدمة في تشخيص الداء الزلاقي وإن الدراسة النسيجية لخزعة الأمعاء الدقيقة يمكنها كشف التغيرات المرضية في الطبقة الظهارية.

أهداف البحث:

يهدف البحث لدراسة دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية الدراسة النسيجية في تشخيص الداء الزلاقي.

مواد البحث وطرائقه:

دراسة مقطعية استباقية–استعادية، لعينات من خزعات الأمعاء الدقيقة للمرضى المشتبه بإصابتهم بالداء الزلاقي سـريرياً ومخبرياً الواردة لمخبر التشـريح المرضـي في مشـفى المواسـاة ومشـفى الأسـد الجامعيين في المدة ما بين 2021/12/1 إلى 2022/12/1.

النتائج:

ضـــم البحث 200 مريضـــاً (متوســـط العمر 29.7 عاماً، 67% إناثاً). كان تعداد اللمفاويات داخل الظهارية باسـتخدام التلوين المناعي CD3 ايجابياً (≤100/30 خلية ظهارية) في 176 حالة (88%) وقد كان من النمط التصـاعدي في 174 حالة منهم. كان تعداد اللمفاويات داخل الظهارية بتلوين CD3 ايجابياً بنسـبة 21.4% في حالات Marsh 0 وبنسبة 83.3% من حالات Marsh I وفي جميع حالات Marsh II–III، وكان الفرق مهماً إحصائياً.

أدى اسـتخدام التلوين المناعي CD3 إلى تغيير تصـنيف درجة Marsh لخزعة الأمعاء الدقيقة في تسـع حالات. حيث تغير التصـنيف من الدرجة Marsh 0 إلى الدرجة Marsh I في حالة واحدة؛ وإلى Marsh II في خمس حالات. تغيير التصـنيف Marsh I في ثلاث حالات، حيث تغير إلى Marsh 0 في حالتين؛ وإلى Marsh II حالة واحدة. لم يتغير تصـنيف الدرجة Marsh II–III، لذا بلغت نسـبة تغير تصـنيف Marsh 4.5% من جميع الحالات، وكان هذا التغير مشـخصـاً للداء الزلاقي في سـت حالات إضـافية لم تشـخص باسـتخدام التلوين التقليدي H&E وبالتالي يكون استخدام تلوين CD3 زاد حساسية التشخيص بنسبة 3%.

الاستنتاجات:

أظهرت الدراسـة أن اسـتخدام التلوين المناعي CD3 أدى إلى تشـخيص المزيد من حالات الداء الزلاقي أكثر من التلوين التقليدي H&E خاصة في الحالات المصنفة على أنها Marsh 0-I.

كلمات مفتاحية : الداء الزلاقي، الخلايا اللمفاوية داخل الظهارية، تصـــنيف Marsh المعدل، التلوين كيميائي المناعي النسيجي CD3.

الجزء التمهيدي

1- المقدمة:

الداء الزلاقي (Celiac Disease) هو مرض مناعي شائع يصيب الأمعاء الدقيقة ناتج عن الحساسية للغلوتين الموجود في الطعام، الأمر الذي ينجم عنه التهاب في الغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة وضمور الزغابات وتضخم الخبايا وما ينجم عنه من اسهال مزمن وسوء امتصاص وفقدان وزن أو فشل نمو ونقص بالعناصر الغذائية كالحديد والفيتامينات [Schuppan, 2022] [49].

هناك العديد من الوسائل المستخدمة في تشخيص الداء الزلاقي مثل الاختبارات المصلية والتنظير الهضمي العلوي والدراسة النسيجية لخزعة الأمعاء الدقيقة التي يمكنها كشف التغيرات المرضية في ظهارية الأمعاء الدقيقة، وتعتمد السمات النسيجية المرضية على عدد وتوزع الخلايا اللمفاوية داخل الظهارية (intraepithelial lymphocytes) مع وجود أو غياب تضخم الخبايا والضمور الزغابي والتي تصنف إلى درجات بحسب تصنيف Marsh المعدل [Marsh, 1992] [50].

في بعض الحالات يكون هناك ارتشاح بالخلايا اللمفاوية داخل الظهارية دون تضخم الخبايا وضمور الزغابات (Marsh I) وهي غير مميزة للداء الزلاقي مما يستدعي استبعاد حالات مرضية أخرى مثل الانتان بالملتوية البوابية والجيارديا وغيرها [Robert, 2018] [51].

يتم تلوين الخزعات بشكل تقليدي باستخدام صبغة الهيماتوكسين أيوزين (H&E) لدراستها تحت المجهر، ومن الطرق المتوفرة ايضاً استخدام التلوينات الكيميائية المناعية النسيجية Immunohistochemistry (IHC) لـ CD3 والتي تسهّل حساب عدد اللمفاويات في الظهارية ونمط أو نوع توزعها على طول الزغابات (تصاعدي crescendo، تنازلي decrescendo) وبالتالي تقويم أدق لخزعة الأمعاء الدقيقة [Caio, 2019] [52] [Iftikhar, 2016] [53].

2- المشكلة البحثية:

تقويم خزعات الأمعاء الدقيقة في سياق تشخيص الداء الزلاقي يشكل تحدياً في الحالات غير الحاسمة مثل الدرجات Marsh 0 و Marsh I مما قد يؤخر التشخيص وبالتالي تقديم العلاج، لذا فإن البحث عن طرق تزيد من دقة تقويم خزعة الأمعاء الدقيقة يساهم في تشخيص الداء الزلاقي بشكل أكثر دقة خاصة في الحالات غير الواضحة.

3- تساؤلات البحث:

- ماهي علاقة تعداد اللمفاويات في ظهارية الأمعاء الدقيقة عند استخدام التلوينات المناعية CD3 مع تصنيف Marsh لخزعة الأمعاء الدقيقة.
- ما هي علاقة نمط توزع اللمفاويات المكتشف باستخدام التولين المناعي CD3 مع الداء الزلاقي.
- ما هو تأثير استخدام التلوين المناعي CD3 على تقويم خزعة الأمعاء وحساسية الدراسة النسيجية في تشخيص الداء الزلاقي.

4- فرضيات البحث:

نفترض أن استخدام التلوينات المناعية CD3 في دراسة خزعة الأمعاء الدقيقة يحسن من نتائج الدراسة النسيجية ويزيد حساسيتها التشخيصية.

5- مسلمات البحث:

إن الكشف عن الارتشاح اللمفاوي ونمطه ركن أساسي في تقييم خزعة الأمعاء الدقيقة في سياق تشخيص الداء الزلاقي وإن زيادة دقة الدراسة النسيجية مفيد في وضع التشخيص بشكل أدق.

6- هدف البحث:

يهدف البحث لدراسة دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية الدراسة النسيجية في تشخيص الداء الزلاقي.

7- أهمية البحث:

تكمن أهمية البحث في كونه يقيم طريقة تلوين نسيجية وتأثير استخدامها في الدراسة النسيجية لخزعة الأمعاء الدقيقة على زيادة حساسيته في تشخيص الداء الزلاقي، مما يساهم في تشخيص أدق وبالتالي تقديم العلاج باكراً.

8- حدود البحث:

- ❖ لم تتوفر نتائج معايرة اضداد EMA إلا في بعض الحالات.
- ❖ تمت الدراسة النسيجية من قبل مشخص واحد.
- ❖ تم استخدام التلوين المناعي CD3 ولم تتم دراسة تلوينات أخرى إلا في عدة خزعات محدودة العدد .

9- مناهج البحث وأدواته:

تصميم الدراسة: **دراسة مقطعية استباقية-استعادية Cross-Sectional Study**، لعينات من خزعات الأمعاء للمرضى المشتبه بإصابتهم بالداء الزلاقي الواردة لمخبر التشريح المرضي في مشفى المواساة ومشفى الأسد الجامعيين **الذين تحققت لديهم المعايير الآتية:**

معايير القبول:

- ❖ توفر بلوكات البارافين والسلايدات لخزعات الأمعاء الدقيقة للمرضى المشكوك بإصابة بالداء الزلاقي.
- ❖ توفر معلومات كافية لوضع التشخيص كالأعراض والعلامات ونتائج معايرة اضداد الترانسغلوتاميناز.

معايير الاستبعاد:

- ☒ عدم توفر البلوكات والسلايدات.
- ☒ نقص أو عدم اكتمال البيانات.
- ☒ رفض المشاركة في البحث.

المواد والطرائق:

تمت مراجعة أرشيف التشريح المرضي في مشفى الأسد ومشفى المواساة الجامعيين وتم اختيار الحالات المشكوك بإصابتها بالداء الزلاقي بشكل عشوائي وبعد أخذ موافقة المريض على الإشتراك في البحث أُجرِيَ الآتي:

- مراجعة أضابير المرضى واستخلاص المعلومات والبيانات اللازمة.
- إجراء قراءة ثانية للعينات من قبل الباحثة.
- إجراء تلوين مناعي CD3 وإعادة تقويم الخزعة وتصنيفها حسب Marsh.
- بعد جمع البيانات أُدخِلَتْ إلى الحاسوب ودُرِسَتْ إحصائياً باستخدام برنامج Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) واستخلاص النتائج.
- قُورِنَتْ نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسات مشابهة.
- وُضِعَتْ الإستنتاجات والتوصيات.

10- الدراسات المرجعية:

- **في دراسة للباحث Shihab [Shihab al., 2020] [20]:** وهي دراسة عراقية عن التلوين المناعي CD3 و CD20 ضمت 60 مريضاً لديهم الدرجة Marsh I-III في خزعة الأمعاء، وجدت أن استخدام التلوين المناعي CD3 ضرورياً في تشخيص الداء الزلاقي خاصة في المراحل المبكرة ل (Marsh) التي كانت فيها التغيرات النسيجية والارتشاح اللمفاوي خفيفاً وصعب التفسير.
- **في دراسة للباحث Balasubramanian [Balasubramanian, 2019] [55]:** وهي دراسة هندية قوَمت 101 خزعة أمعاء دقيقة، وجدت أن تعداد اللمفاويات باستخدام التلوين المناعي CD3 بنسبة 100/31 خلية مميزة للداء الزلاقي لدى سكان جنوب الهند عن حالات مرضية أخرى تشمل التهاب الاثني عشر المناعي الذاتي ونقص التغذية المصاحب لالتهاب الاثني عشر والتهاب الاثني عشر الانتانية والتهاب الاثني عشر غير النوعي.

❖ **دراسة للباحث Suárez [Suárez et al., 2016] [56] ودراسة للباحث Tosco [Tosco et al., 2014] [57]:** في دراستي Suárez (دراسة أجريت في البيرو) و Tosco (دراسة أجريت في ايطاليا) تمت دراسة أهمية التلوين المناعي CD3 و CD8 و CD4 و CD56 لدى مرضى الداء الزلاقي بالمقارنة مع أشخاص اصحاء وقد خلصت الدراستان إلى أن التلوين المناعي CD3 يعد من أفضل الطرق في تشخيص حالات الداء الزلاقي.

❖ **في دراسة للباحث Mubarak [Mubarak et al., 2011] [58]:** وهي دراسة هولندية ضمت 159 خزعة أمعاء دقيقة لدى أطفال لديهم أعراض مشككة بإصابتهم بالداء الزلاقي، وقد تمت اعادة دراسة 28 خزعة باستخدام التلوين المناعي CD3 بعد وجود نتائج مشككة على التلوين H&E وقد تغير التشخيص في 10 حالات منها أي بنسبة 35.7%، حيث تحول التقويم من ارتفاع بتعداد اللمفاويات على H&E إلى تعداد طبيعي على CD3 في خمس حالات، ومن تعداد طبيعي للمفاويات على H&E إلى ارتفاع بتعدادها على تلوين CD3، وشددت الدراسة على ضرورة إجراء التلوين المناعي CD3 مع العد عند الاشتباه في كثرة اللمفاويات داخل الظهارية في الخزعات الملونة باستخدام H&E عن طريق التقدير البصري.

11- مكونات البحث: يتكون البحث من ثلاثة أجزاء والمراجع:

الجزء الأول: وهو القسم النظري، ويتحدث عن الإطار النظري لموضوع دراستنا وعن التعاريف الأساسية ليكون لدى القارئ الإلمام الكامل، **ويتكون هذا الجزء من فصلين:**

- **الفصل الأول:** ويحوي لمحة عامة عن التعريف والوبائية والإمراضية والأعراض والتصنيف والتشخيص والتشخيص التفريقي والعلاج والإنذار للداء الزلاقي.
- الفصل الثاني : ويتضمن التقويم المجهري لخزعات الأمعاء الدقيقة و دور التلوينات المناعية

الجزء الثاني:

وهو الإطار العملي للدراسة الحالية والخطط المتبعة خلال مدة الدراسة للوصول إلى النتائج الماثلة أمامكم، **ويتكون هذا الجزء من أربعة فصول:**

- **الفصل الأول: أهداف البحث، التصميم، المواد والطرائق:** ويحوي خلفية البحث، وتساؤلات البحث، وهدف البحث، ومواد البحث وطرائقه (تصميم الدراسة – عينة الدراسة – معايير الادخال – معايير الإستبعاد – المواد والطرائق)، المُحدِّدات الأخلاقية، حجم العينة، استمارة البحث العلمي المُستَخدمة، الموافقة المستنيرة، طرق التحليل الإحصائي المُستَخدمة.
- **الفصل الثاني: النتائج:** ويحوي عرض للنتائج الإحصائية التي وصلنا إليها في دراستنا.
- **الفصل الثالث: المقارنة مع الدراسات العالمية المشابهة:** ويحوي مقارنة نتائج دراستنا مع نتائج الدراسات العالمية المشابهة.
- **الفصل الرابع: المناقشة:** ويحوي مراجعة لنتائج الدراسة الحالية ومقارنتها مع نتائج الدراسات العالمية المُشَابهة.

الجزء الثالث: الخلاصة Conclusion: وتحوي الاستنتاجات والصعوبات والتوصيات: ويحوي خلاصة نتائج هذا البحث والمقترحات المستقبلية للدراسات التي قد تُجرَى لاحقاً حول هذا الموضوع.

المراجع.

الملاحق.

الجزء الأول: القسم النظري

الفصل الأول: الداء الزلاقي Celiac Disease

1-1- تمهيد:

إن الداء الزلاقي هو اعتلال مزمن متواسط مناعياً يصيب الأمعاء الدقيقة بسبب الغلوتين (بروتين غير منحل بالماء مُشتَق من القمح، الشوفان، الجودار) وذلك عند الأفراد المستعدين وراثياً[1].

يتظاهر الداء الزلاقي بالضمور الزغابي للأمعاء الدقيقة مع سوء امتصاص للمغذيات وحدوث التحسن بالمظاهر السريرية والنسيجية بعد استبعاد الغلوتين من الغذاء، وعودة هذه التظاهرات عند إرجاعه[2].

وهنالك مُصطَلَحات أخرى تُستَخدم للتعبير عن الداء الزلاقي ومنها:

- الذرب الزلاقي.
- الاعتلال المعوي المحسس بالغلوتين.
- المتلازمة الزلاقية.
- الإسهال الدهني مجهول السبب.
- سوء الامتصاص البدئي[1].

1-2- تصنيف الداء الزلاقي Classification of Celiac Disease:

1-2-1- الداء الزلاقي النموذجي (الكلاسيكي):

يشمل تظاهرات سريرية لسوء الامتصاص مثل: الإسهال، والإسهال الدهني، ونقص الوزن، والأعواز الغذائية، ولكن معظم المرضى لايبدون هذه التظاهرات النموذجية، **ويمكن أن يُشَاهد لديهم:** فقر دم، وتعب عام، وانتفاخ بالبطن، وفقد ارتياح بالبطن، وهشاشة عظام، وقلة خصوبة، وهي ما تُسمَّى بالتظاهرات اللانموذجية وتُعَدُّ هي الأشيع[2] .

1-2-2- الداء الزلاقي اللاعرضي (الداء الصامت):

غالباً ما يُكشَف باختبارات المسح المصلية الخاصةً بالداء الزلاقي، ويُوصَف بالاعتلال المعوي بالغلوتين مع قلة الأعراض والعلامات السريرية[2].

1-2-3- الداء الزلاقي المُحتَمَل (الكامن):

تكون خزعة الأمعاء الدقيقة طبيعة، ولكن الأفراد على خطورة عالية للإصابة بالداء الزلاقي، وهنا تكون الاختبارات المصلية إيجابية[2].

1-2-4- الداء الزلاقي غير المُستَجيب:

يُوصَف بعود الأعراض أو العلامات أو نكسها التي تقترح المرض الفعال بالرغم من اتباع نظام غذائي خال من الغلوتين لأكثر من 6-12 شهراً[2].

1-2-5- الداء الزلاقي المُعنِّد:

هو تحت صنف من الشكل غير المُستَجيب، ويُعرَّف باستمرار الأعراض مع ضمور زغابي شديد على الرغم أنَ النظام الغذائي خال من الغلوتين لأكثر من 6-12 شهراً، وهذا الشكل يُشخَّص باستبعاد الأسباب الأخرى للضمور الزغابي أو اللمفوما[2].

إن الفحوص المصلية للداء الزلاقي نوعية لتحديد المرض غير المعالج وهي تضم:

- أضداد ناقلة الغلوتين النسيجية tTG المتعلقة بـ IgA – IgG .
- أضداد الغمد العضلي EMA المتعلقة بـ IgG – IgA.
- أضداد ببتيدات الغلوتين منزوعة الأمين DGP.
- أضداد الغليادين المتعلقة بـ IgG – IgA، وقد استُبعِدَتْ عامةً لأنها غير نوعية[1].

1-3- تاريخ الداء الزلاقي History of Celiac Disease:

في القرن الثامن عشر استخدم مُصطَلَح الذرب الذي أخذ من اللغة الهولندية sprow وهو يعني المرض القلاعي، وذلك بسبب شيوع قلاع الفم عند هؤلاء المرضى.

في عام 1888 م نشر صاموئيل جي كتاب (الميل للزلاقي) حيث وصف فيه مجموعة من التظاهرات السريرية للداء الزلاقي عند المرضى من كل الفئات العمرية، وهذه التظاهرات تزول بشكلٍ كامل عند اتباع نظام غذائي معين[3].

في منتصف القرن العشرين وُصِفَتْ العلاقة بين أنواع معينة من الحبوب والداء الزلاقي من قبل الطبيب الهولندي وليام كارل ديك الذي أكد على أن تناول القمح كان مسؤولاً مسؤوليةً مباشرةً عن التدهور السريري عند هؤلاء المرضى، وخلال الحرب العالمية الثانية استُخدِمَتْ البقوليات لتحضير الخبز في نيوزيلندا، وخلال هذا الوقت أظهر الأطفال المصابون بالداء الزلاقي تحسناً سريرياً ملحوظاً، وحدث النكس فقط عندما استُبدِلَتْ البقوليات بالقمح بعد انتهاء الحرب، وكانت تلك الملحوظة الأولى بأن تناول القمح يزيد من أعراض الداء الزلاقي.

اكتُشِفَ البروتين غير المُنحَل بالماء أو غلوتين القمح من قبل العالم كيمر وفريقه، وهذا البروتين هو المسؤول عن أذية ظهارية الأمعاء عند مرضى الداء الزلاقي .

في عام 1954 م كان العالم باولي أول من وضع وصفاً دقيقاً لأذية الأمعاء الدقيقة عند مرضى الداء الزلاقي، وبتطور تقنيات فحص الخزع في خمسينيات القرن الماضي رأى االعالم روبن وفريقه أن الداء الزلاقي عند الأطفال والبالغين له الموجودات السريرية والنسيجية نفسها.

منذ العام 1980 م أصبح لدينا تقدم جوهري في فهم الآلية المناعية والجينية والجزيئية للمرض، ففي عام 1986 لاحظ العالم هاويل وزملاؤه ترافق الداء الزلاقي مع الزمرة النسيجية HLA–DQ2 [9]، وفي العام 1993 م رأى العالم ليندن وزملاؤه أن هذه الزمرة النسيجية تُحدِّدُ ببتيدات الغليادين المسؤولة عن تفعيل الخلايا T اللمفاوية عند مرضى الداء الزلاقي[3].

لاحقاً وصف أنزيم tTG كمُستَضِد ذاتي للداء الزلاقي وعُدَّ من أكثر الفحوص المصلية فائدة في التشخيص، وفي العام 1998 م رأى العالم مولبيرغ وزملاؤه أن تمييز الغليادين بأنزيم المضيف tTG يُعزِّز استجابة خلوية من قبل الخلايا T عند مرضى الداء الزلاقي.

كما كُشِفَ الجزيء المحول منtTG وهو DGP (ببتيد الغليادين منزوع الأمين) الذي يُشكِّل أساس الآلية الإمراضية في الداء الزلاقي.

إن الدراسات المسحية التي استخدمَتْ أضداد EMA (أضداد الغمد العضلي)، و tTG (ناقلة أمين ترانس أميناز النسيجية) وجدت زيادةً في شيوع حالات الداء الزلاقي في الولايات المتحدة الأمريكية[4]، **وهذا ما دفع للبحث عن طرق علاجية جديدة غير النظام الغذائي خال من الغلوتين مثل:**

1- إزالة الغلوتين من القمح.

2- حلمهة الغلوتين.

3- تثبيط أنزيم tTG.

4- استخدام الطرق المناعية.

5- محاولة إعادة تحمل الغلوتين[5,6].

1-4- الوبائيات Epidemiology:

أشارت الدراسات الوبائية التي استُخدِمَتْ الاختبارات المصلية الخاصةً بالداء الزلاقي أن لهذا الداء انتشاراً جغرافياً واسعاً كما أنه يصيب الأفراد من مختلف الأعراق ، ولقد بلغ مُعدَّل الانتشار في أوربا حوالي 1%، عدا فلندا فكان مُعدَّل الانتشار الأعلى إذ بلغ 2.4%، **وهنالك مجموعة من العوامل التي ربما تشرح هذا الإختلاف في الشيوع مثل:**

1- الإستعداد الجيني.

2- وقت إدخال خال من الغلوتين للغذاء.

3- اختلاف تركيز الغليادين في أغذية الرضع.

4- الإختلاف في قراءة الخزعات النسيجية من الأمعاء الدقيقة.

في الولايات المتحدة الأمريكية دُرِسَتْ نسبة الانتشار ومقارنتها بأوروبا وأُجرِيَتْ الدراسة في مراكز متعددة من قبل العالم فاسانو وزملائه، وبحثت هذه الدراسة عن نسبة انتشار أضداد الغمد العضلي عند أكثر من 13 ألف شخص ممن هم على خطورة أو لا خطورة للإصابة بالداء الزلاقي[4]، **وكانت إيجابية الأضداد عند:**

1- 22/1 من أقارب الدرجة الأولى

2- 39/1 من أقارب الدرجة الثانية

3- 56/1 ممن لديهم أعراض معوية تشبه أعراض مرضى الداء الزلاقي.

4- 133/1 ممن ليس لديهم عوامل خطورة[1].

كما شهد مُعدَّل شيوع الداء الزلاقي زيادةً في الولايات المتحدة الأمريكية حسب دراسة تمت بفحص أضداد ناقلة الأمين النسيجية عند 9133 شخصاً في عينات دموية عام 1950 م، وبلغت الإيجابية 0,2% بالمقارنة مع إيجابية 0,9% في عينات حديثة؛ وذلك يقترح ارتفاع حوالي 4 أضعاف لمُعدَّل حدوث الداء الزلاقي، و بالتالي ارتفاع مُعدَّل الوفيات 4 أضعاف خلال 45 سنة[7]، كما ارتفع أيضاً مُعدَّل حدوث الداء الزلاقي ارتفع في فلندا من 0,1% إلى 0,2% في عام 2000 م[8].

استخدمت الدراسات الوبائية المؤشرات المصلية للداء الزلاقي في تشخيص المرض اللاعرضي أو مع أعراض قليلة أكثر مما هو في حال الداء العرضي. وأكثر من 80% من الحالات كانت غير مُشخَّصة في دراسة في الولايات المتحدة الأمريكية[9]، وأظهرت دراسات أخرى تأرجح بإيجابية tTG مع الوقت عند الأطفال مع داء زلاقي مُحتَمَل[10].

في دراسة لاحقة على39 طفلاً لديه داء زلاقي وجدوا أن هنالك 12 طفلاً أي بنسبة 31% مع داء زلاقي مُحتَمَل تطور لديهم ضمور بالزغابات خلال 3 سنوات من المتابعة، وهذا يُظهِر تغيرات فردية في القصة الطبية للداء الزلاقي على الأقل في الأطفال؛ حيث الإيجابية المصلية بـ tTG والاعتلال المعوي بالداء الزلاقي قد يتأرجح مع الوقت[1].

1-5- الإمراضية Pathology:

يصيب الداء الزلاقي مخاطية الأمعاء الدقيقة والطبقة تحت المخاطية والعضلية المخاطية؛ وتكون الإصابة متفاوتة بالشدة والامتداد؛ وغالباً لا تُصَاب الطبقة المصلية، وإن الفحص المُبكِّر للمخاطية في الإصابات الشديدة غير المُعَالجة يُظهِر تسطح المخاطية مع غياب كامل الزغابات[1].

إن الفحص النسيجي للزغابات يؤكد: غياب السطح الزغابي الطبيعي،، وتطاول الخبايا المعوية تطاولاً ملحوظاً وانفتاحها على السطح الظهاري، وربما تتناقص الثخانة الكلية للظهارية قليلاً لأن فرط تصنع الخبايا يُعوِّض قليلاً غياب الزغابات أو قصرها، وهذه التغيرات تنقص من السطح الظهاري المسؤول عن الامتصاص.

إن الخلايا المعوية التي تتوضع توضعاً عمودياً في العينات النسيجية الطبيعية تصبح مكعبة أو مربعة في الداء الزلاقي، وتصبح الهيولى الخلوية حامضية، ويكون الجزء القاعدي من النواة مُمَّزقاً، والسطح الظهاري رقيقاً رقة ملحوظة، وبالرؤية بالمجهر الالكتروني للزغابات الدقيقة للخلايا المُمتَصة تظهر قصيرة وذائبة، كما يُلحظ زيادة في عدد الريبوزومات الحرة[1].

إن التغيرات التنكسية تضم: تفجي الهيولى والمتقدرات، كما يُلحظ وجود عديد من الجسيمات الحالة أيضاً، كما أن التاذي التركيبي للالتصاق بين الخلايا المعوية المتاذية يُقدَّم تفسيراً شكلياً لزيادة النفوذية للمخاطية المعوية بالداء الزلاقي، كما أن قلة الشبكة الهيولية الداخلية يُفسَّر قِلَّة تصنيع الأنزيمات مثل: الأنزيمات المسؤولة عن حلمهة ثنائيات السكريد، وبذلك يَقُلُّ عدد الخلايا المسؤولة عن الامتصاص وفعاليتها، وبخلاف الخلايا الماصة فإن عدد خلايا الخبايا غير المتمايزة يزداد زيادة ملحوظة عند المرضى المُصَابين بالداء الشديد غير المُعَالج وبالتالي تتطاول الخبايا، علاوةً على ذلك يزداد الإنقسام زيادةً واضحة في الخبايا.

إن الموجودات الخلوية والنسيجية لخلايا الخبايا تكون طبيعية بالفحص بالمجهر الضوئي والالكتروني، كما أن دراسة حركية الخلايا الظهارية في الداء الزلاقي غير المُعَالج تقترح أن مُصطَلَح (الضمور الزغابي) هو مُصطَلَح مغلوط بسبب وجود دليل على زيادة التكاثر المعوي في الخبايا[1].

إن العالم رايت اعتقد أن المخاطية المعوية عند مرضى الداء الزلاقي تُنتِج خلايا في الخبايا كل ساعة أكثر من المخاطية الطبيعية بـ 6 مرات، وأن زمن الدورة الخلوية هو نصف الطبيعي وهذا ما يؤدي إلى خلايا متعددة وغير ناضجة.

إن الدليل الجزيئي يقترح أن الآلية المركزية لقصر الزغابات في الداء الزلاقي هو: التأثير السام على نضج الخلايا المعوية؛ الذي يؤدي إلى خلايا غير ناضجة كثيرة في الخبايا ومثل هذه الآلية قد تُفسِّر عديداً من الشذوذات النسيجية[1].

تزداد الخلوية في الصفيحة المخصُوصَة للأمعاء المصابة، ومعظم هذه الخلوية تتكون من الخلايا البلازمية واللمفاوية وكمية من الأضداد مثل: IgA وIgM وIgG التي تزداد من 2–6 أضعاف، وكما هو الحال في الحالة الطبيعية يكون IgA هو المسيطر، ويمكن مُشَاهدة الخلايا العدلة والحمضات والبلازمية، وإن عدد الخلايا يُقَاس دوماً بـ 100 خلية ظهارية (تكون مُزدَادة بالداء الزلاقي غير المُعَالج).

في الأمعاء السليمة تكون الخلايا في المخاطية والصفيحة المخصُوصَة من النمط T ذات الواسم CD4 (مساعدة)، أما في الداء الزلاقي فتكون من النمط CD8 (سامة)[1].

<u>تصنيف العالم مارش Marsh [25]: هو التصنيف الرائد في وصف أذية الأمعاء الدقيقة في الداء الزلاقي، ويُقسَم إلى:</u>

1- **الدرجة الطبيعية (ما قبل الإرتشاح اللمفاوي درجة 0).**
2- **ازدياد بالخلايا داخل الظهارية مع ارتشاح لمفاوي بالصفيحة المخصُوصَة (درجة 1).**
3- **فرط تصنع الخبايا (درجة 2).**
4- **وجود ضمور زغابي (درجة 3).**
5- **أخيراً الضمور الزغابي التام (درجة 4):** ويُوصَف بفقد كامل للزغابات، وبوجود ارتشاح خلوي مع ضمور في الخبايا.

عند مرضى الداء الزلاقي غير المُعَالجين، فإن امتداد إصابة الأمعاء الدقيقة يختلف من مريض لآخر، وعندما تكون الإصابة محدودة، فإن القسم الأول غالباً ما يُصَاب، وقد لا يُصَاب القسم الأول ويُصَاب القسم البعيد من الأمعاء الدقيقة ولكن هذا غير شائع[1].

إن الزيادة الخلوية في الظهارية المعوية غير كافية وحدها لوضع تشخيص نسيجي للداءالزلاقي، وهي غير نوعية ويمكن مشاهدتها في أمراض أخرى مثل:

1- فرط النمو الجرثومي.

2- التهاب العفج القرحي.

3- الإنتان بجرثومة الملتوية البوابية.

4- تناول مضادات الإلتهاب اللاستيروئيدية.

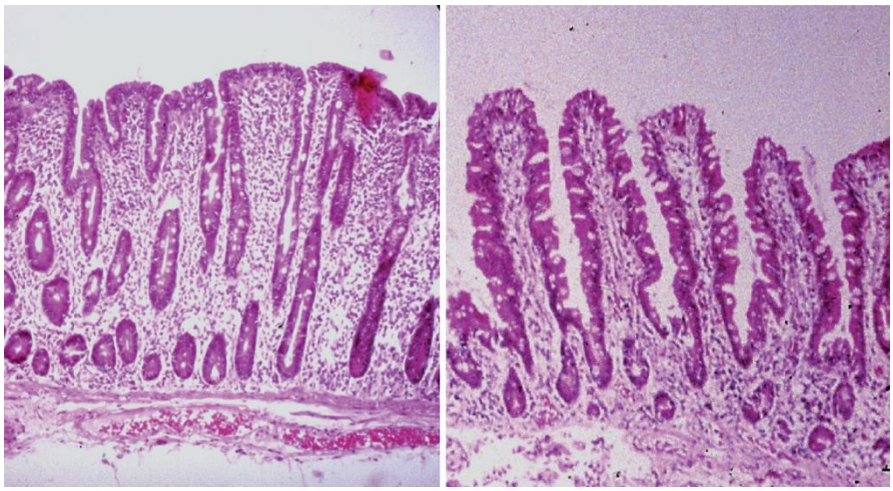
5- وفي أمراض مناعية أخرى[1].

لوضع تشخيص الداء الزلاقي يجب توفر كل من الآتي: قصر الزغابات، وفرط تكاثر الخبايا، وخلوية غير ناضجة بالخلايا السطحية، وزيادة الخلايا في الصفيحة المخصُوصَة.

إن المعالجة بنظامٍ غذائي خال من الغلوتين يؤدي إلى تحسن ملحوظ بظهارية الأمعاء، فإن التركيب الخلوي للخلايا السطحية يتحسن أولاً غالباً خلال عدة أيام (النمط العمودي مع نوى قاعدية مع تشكل سطح امتصاص طبيعي يحل مكان الخلايا المتخربة، وتقلُّ الخلايا ضمن الظهارية المعوية وبالنتيجة تركيب الزغابات المعوية يعود للطبيعي، كما تتطاول الزغابات وتقصر الخبايا، وتقل الخلايا في الصفيحة المخصُوصَة)[1] .

إن مخاطية الأمعاء القاصية تتعافى تعافياً أسرع من مخاطية الأمعاء الدانية، وعند بعض المرضى قد يتطلب نظاماً غذائياً خالياً من الغلوتين لأشهر أو سنوات حتى تعود المخاطية إلى الطبيعي، وفي الحقيقة قد تبقى بعض التبدلات والتي تكون بارزة أو خفيفة بسبب تناول الغلوتين تناولاً غير مقصود.

وأخيراً فإن المخاطية المعوية عند مرضى الداء الزلاقي غير المُعَالج يمكن أن تشابه نسيجياً المخاطية المتأذية بفعل طيفٍ واسع من الأذيات المعوية[1].



الشكل (1-1): توضح الصورة على يسار الشكل الضمور الزغابي والتغيرات الإلتهابية في الداء الزلاقي غير المُعَالج، أما الصورة على يمين الشكل فتظهر تحسن الظهارية وعودتها للشكل الطبيعي بعد اتباع نظام غذائي خال من الغلوتين[1].

1-6- الآلية المرضية Pathogenesis:

إن تفاعل جزيئات البروتين غير المُنحَل بالماء (الغلوتين) الموجود في القمح مع مخاطية الأمعاء الدقيقة عند الأشخاص المستعدين يُشكِّل أساس الآلية المرضية في الداء الزلاقي.

يُعَدُّ الداء الزلاقي من الأمراض المناعية المُثَارة بمؤرجات بيئية (غليادين) عند الأفراد المستعدين وراثياً، وأن طيف الأعراض السريرية هو نتيجة لتداخل عوامل متعددة بيئية، وجينية، ومناعية، وكيف أن هذه العوامل تتحكم باختلاف تعبيرية المرض وتغيره من الكامن إلى السريري لا تزال غير معروفة[1].

1-6-1- العوامل البيئية Enviromental Factors:

هو نمط الأمراض المناعية المثارة بعوامل بيئية، في البداية يتم الهضم بالببسين والتربسين، ثم التجزئة حسب الحلولية، لنحصل على عدة جزيئات بروتينية محدودة من القمح تُعَدُّ مُستَضِدات في الداء الزلاقي[1].

تُخزَّن جزيئات بروتين القمح في عدة أشكال، ويمكن أن تُصنَّف إلى أربع مجموعات (تُقسَم اعتماداً على الحلولية):

1- بروﻻمين ينحل بالإيتانول.

2- غلوتينين ينحل بمركب قلوي أو حمض ممزوج.

3- غلوبونين ينحل بكلور الصوديوم 10%.

4- ألبومين ينحل بالماء[1].

إن صف الغلوتين يضم كلاً من البرولامين والغلوتينين، وبالرغم من أن معظم الدراسات درست سمية البرولامين في الداء الزلاقي، فإن هنالك بيانات اقترحت أثر سمية الغلوتينين على الظهارية المعوية في الداء الزلاقي[27].

إن البرولامين الموجود في القمح يشير إلى الغلیادين، وعُزِلَ أيضاً من أنواع أخرى من الحبوب، وسُمِيَّت حسب المصدر: سيكالين من الجودار، وهوردين من الشعير، وأفينينس من الشوفان، وزينس من الذرة[1].

إن الاستجابة المُعقَّدة والمتنوعة للخلايا التائية تجاه الغلیادين أعظم من أن تُقدَّر مُسبَقاً، ويمكن أن يستجيب المريض على كميات مختلفة لجزيئات الغلوتين، علاوةً على ذلك فإن تحرر tTG داخل الخلوي وإعطاء بروتينات الغلوتين منزوعة الأمين وتحريض استجابة الخلايا التائية هو نتيجة DGPs (ببتيد الغلوتين منزوع الأمين)[1] .

في أوساط الزرع الحية فإن الببتيدات الصنعية المؤلفة من الأحماض الأمينية 31–49 من α غلیادين أثَّرتْ تأثيراً سمياً للظهارية وسببت الأذية لها عبر زيادة الخلايا داخل الظهارية[1].

إن الببتيد من (49–31) لا يُفعِّل الخلايا التائية السّامة عند مرضى الداء الزلاقي في أوساط الزرع الصنعية، وتكون الأحماض الأمينية من (43–31) قابلة لتحريض الخلايا التائية السامة CD4 المحيطية عند مرضى الداء الزلاقي مُسبِّبَة تموت الخلايا الظهارية ومُفعِلَة الخلايا البالعة، لذا اقترح أثر مشابه للآلية الإمراضية[11].

رأى العالم غونفريني وزملاؤه أن α غلیادين المؤلفة من الأحماض الأمينية (132–123) تُسبِّب تحفيز الخلايا التائية CD8 عند مرضى الداء الزلاقي وترافق الفعالية السمّية، على العكس من ذلك فإن الببتيد المؤلف من

الأحماض الأمينية (68–57) له أثر في تحفيز الاستجابة من خلال تحفيز الخلايا التائية بالأمعاء في الأوساط الحية، ولكن لا يظهر له أثر سمي مباشر على مخاطية الأمعاء للمرضى في أوساط الزرع الصنعية[1].

في دراسة بيِّنَتْ أن التقديم المبكر للغلوتين للأطفال بعمر (3 أشهر) ترافق مع زيادة خطر حدوث داء زلاقي بمقدار 5 أضعاف بالمقارنة مع التقديم بعمر متأخر (6–4 أشهر)[35]، وفي الدراسة نفسها فإن تأخير إدخال غذاء خال من الغلوتين لما بعد الشهر السابع من العمر ترافق مع زيادة خطر حدوث الداء الزلاقي بمقدار 1.9 ضعف بالمقارنة مع تقديم كمية ضئيلة بعمر 4–6 أشهر[1].

1–6–2– العوامل الجينية Genetic Factors:

إن الدراسات التي بحثت في حدوث حالات متكررة للداء الزلاقي العائلي أشارت للإسهام المهم للعوامل الجينية في الآلية المرضية، فوجدت أن حدوث داء زلاقي يتراوح بين 8–18%عند أقارب الدرجة الأولى وترتفع إلى 70% عند التوائم وحيدة الأمشاج.

إن فهمنا للاستعداد الجيني بدأ عند ملاحظة حدوث الداء الزلاقي مترافقاً مع الزمرة النسيجية HLA–DQ2، فإن جزيئات HLA الصف الثاني هي أغشية سكرية ثنائية (سلسلة α وß)، ،وتُقسَم إلى ثلاثة تحت صفوف: DR، وDQ، وDP، وتُرمَّز بـ HLA الصف الثاني على الصبغي6 [1].

وُجِدَتْ العلاقة المهمة مع الإستعداد الجيني من خلال عزل لمفاويات تائية نوعية مُحرَّضة بالغليادين من مخاطية الأمعاء لمرضى الداء الزلاقي ذوي الزمرة HLA–DQ2. فوُجِدَتْ الزمرة النسيجية HLA–DQ2 عند أكثر من 90% من الأشخاص المُصَابين بالداء الزلاقي مقارنةً مع 35% من عموم البشر.

من المعروف حالياً أنه بعد امتصاص الغلوتين؛ فإن الخلايا المُقدَّمة للمُستَضِد (ربما الخلايا التغصنية) تتحسس إلى مستقبلات HLA–DQ2 أو HLA–DQ8؛ ويوجد أخدود لتثبيت ببتيد الغليادين على الشعبة α، وهذا ما يؤدي إلى تحسس اللمفاويات التائية؛ وهذه اللمفاويات تفعل الخلايا اللمفاوية B لإنتاج الأضداد والخلايا التائية الأخرى لإنتاج السيتوكينات (IL4,IL5,IL6,IL16,TNF) والعامل المُنمِّي TGF–B، وهذه السيتوكينات لا تؤذي الخلايا المعوية فقط؛ ولكن أيضاً تُغُيِّر السطح اللمعي للخلايا الظهارية ليصبح مُستَضِداً يُحسِّس اللمفاويات[13].

هنالك قلة من المرضى يُظهِرون تعبيرية ل DQ2 يتطور لديهم داء زلاقي حقيقي، فإن HLA–DQ2 تظهر تعبيرية عند حوالي 35% من الأوروبيين وأصولهم؛ لذلك فالاستعداد الوراثي للداء الزلاقي يُورَّث بجيناتٍ أخرى غير HLA–DQ2، وإن البحث عن هذه الجينات التي تُورِّث الإصابة بالداء الزلاقي أظهر جيناتٍ أخرى بعضها ترافق مع الاستعداد للإصابة بالداء السكري النمط الأول[14].

1–6–3– العوامل المناعية Imuune Factors:

هنالك دليل جوهري على دور المناعة الخلوية والخلطية في الآلية المرضية للداء الزلاقي؛ فإن كمية الأضداد المنتجة من الخلايا البائية في الصفيحة المخصُوصَة للأمعاء المصابة في الداء الزلاقي تبلغ حوالي 2–6 أضعاف؛ إضافة لوجود أضداد IgA,IgG خاصةً للغليادين في المصل[1].

إن تكرار ارتفاع الأضداد IgA,IgG,DGP عند الشواهد منخفض جداً عامةً، وذلك يعكس انعكاساً مُحتَمَلاً أثر المُستَضِد DGPs في الآلية المرضية للداء الزلاقي[15,16].

إن تحديد مزيد من الأضداد الذاتية النوعية يغير من تفهمنا للآلية المرضية للداء الزلاقي، حيث يعمل الغليادين كركيزة لمعظم الأنزيمات داخل الخلوية المعتمدة على الكالسيوم في كل مكان، وظهر ذلك ظهوراً جليّاً أن tTG يعمل مفتاحاً لإزالة أمين الغلوتامين في الغليادين وتحويلها إلى حمض غلوتاميك سلبي الشحنة؛ والذي يفضل المواقع 4–6–7 من المُستَضِدات غير البروتينية لسلسلة HLA–DQ2، وبهذه الطريقة تُقدَّم المُستَضِدات، لذلك فإن تحويل الغليادين المتواسط بـ tTG لتوليد DGP يؤدي دوراً محورياً في توليد استجابة قوية بوساطة الخلايا التائية الخاصةً بالظهارية[1].

إن وجود دليل على الارتشاح اللمفاوي في الظهارية والصفيحة المخصُوصَة للأمعاء الدقيقة في المرض الفعَّال ليس غريباً مع استجابة مناعية متواسطة بالخلايا وذات أثرٍ مهمٍ في الآلية الإمراضية للداء الزلاقي[1].

هنالك عديد من الأدلة تدعم التداخل بين التكيف المناعي بوصف استجابة من قبل خلايا ذاكرة نوعية من النمط T لببتيدات الغلوتين، ومشاركة أقل من قبل المناعة الفطرية، فإن عديداً من الخلايا تكون مُفعَّلة في مخاطية الأمعاء الدقيقة عند المرضى غير المُعَالجين، وتُطلِق وسائط التهابية مثل: IL6,IL2,TNF,INF,TGF–β [13].

إن اللمفاويات المُفعَّلة من نمط CD4 تكون وافرة في الصفيحة المخصُوصَة للأمعاء الدقيقة، وبالمقابل فان الخلايا اللمفاوية داخل الظهارية التي توجد بأعدادٍ كبيرة في الداء الزلاقي غير المُعَالج يسيطر عليها الخلايا التائية من النمط CD8 [17].

إن الدراسات تقترح أن IL5 ربما يُسهِم إسهاماً مفتاحياً بالربط بين الاستجابة عبر المناعة الفطرية والتكيف المناعي في الآلية المرضية للداء الزلاقي[18,19].

إن الخلايا المعوية والبالعات تعطي وسائط التهابية بدئية تزداد بشكلٍ خفيف في مخاطية الأمعاء لمرضى الداء الفعال والمُعنِّد؛ على الرغم من أن الآلية المتعلقة بزيادة الإنتاج غير معروفة؛ فإن IL5 يُنظِّم تَوضُّع الخلايا داخل الظهارية عبر تحفيز الهجرة، وتقليل التموت الخلوي، وتضمين إمكانية أن تُسهِم قمة الخلايا المعوية إسهام خلايا فعالة للمُستَضِد[11].

في سياق الاستجابة لببتيد الغليادين، فإنIL5 يُنظِّم استجابة الخلاياCD4 في الصفيحة المخصُوصَة، وأيضاً إمكانية إيذاء الخلايا الظهارية إيذاءً مباشراً عبر تحفيز الخلايا داخل الظهارية بإطلاق الوسيط الالتهابي TNF γ [19].

1-7- التظاهرات السريرية Clinical Features:

وصف العالم صموئيل جي Samuel Gee السير الكلاسيكي للمرض الذي ضم طيفاً واسعاً من التظاهرات السريرية[3] .

في العالم الغربي وعلى الرغم من أن بعض المرضى قد يتظاهر لديهم المرض تظاهراً شديداً فإن معظمهم ليس لديه أي أعراض عند التشخيص، وهنالك حالات ربما تُكتَشف عند إجراء مسح للمرض عند أقارب المريض أو مسح للمرضى مع اضطرابات مرافقة مثل: الداء السكري النمط الأول، أمراض الدرق المناعية، متلازمة داون، والاضطرابات الدموية المُكتَشفة صدفةً مثل: فقر الدم بعوز الحديد، أو الاضطرابات الكيماوية الحيوية (ارتفاع بالأنزيمات الكبدية)[1].

1-7-1- التظاهرات السريرية عند الاطفال Childhood Presentation:

إن التظاهرات الكلاسيكية للداء الزلاقي عند الرضع هي: إسهال، إسهال دهني، مغص بطني متقطع، وهذا المرض يمكن أن يحدث بأي عمر بعد إدخال الحبوب إلى النظام الغذائي وخصوصاً في مرحلة الطفولة المبكرة.

تقليداً يكون لدى الطفل فشل بالنمو. وفتور. وهيوجية، وضعف عضلي، ونقص مقوية، وتوسع بالبطن، وإسهال مائي أو إمساك امتقطع و قد يكون التشخيص صعباً عندما تكون التظاهرات المعوية أقل بروزاً[1].

يمكن أن يحدث عند الأطفال هجوع عفوي ومُؤَقَّتْ للأعراض خلال مرحلة المراهقة، ولكن ذلك غير شائع في حال بدء المرض بمرحلة اليُفَّع[1].

في دراسة على الأطفال عاليي الخطورة فإن تقديم الغلوتين إلى غذاء الطفل خلال الـ 3 أشهر الأولى أو بعد الـ 7 أشهر من الولادة ترافق مع زيادة مهمة في الخطورة لحدوث الداء الزلاقي بالمقارنة عند إدخاله للغذاء بعمر 4-6 أشهر[12].

1-7-2- التظاهرات السريرية عند البالغين Adulthood Presentation:

عُدَّ في السابق أن الداء الزلاقي من أمراض الطفولة، ولكن حالياً يُوضَع التشخيص وضعاً متزايداً عند البالغين، وعامةً فإن متوسط عمر التظاهر 45 سنة.

لقد تغيَّرت الأعراض السريرية أيضاً خلال الخمس سنوات الماضية، وحالياً يُوصَف الإسهال وصفاً أقل اعتياداً[1].

1-7-3- التظاهرات الهضمية GI Features:

تختلف التظاهرات السريرية للداء الزلاقي من مريضٍ لآخر، وذلك لأن معظم الأعراض السريرية ناتجة عن سوء امتصاص الأمعاء، وهي غير نوعية للداء الزلاقي، ويمكن مُشاهَدتها في أمراض سوء الامتصاص الأخرى، فهنالك عديد من المرضى البالغين يكون لديهم تظاهرات معدية مثل: إسهال مائي، وإسهال دهني، وانتفاخ بالبطن، وغازات، ونقص وزن، وإن الإسهال يكون على شكل هجمات أكثر ما يكون مستمراً، ليلياً، أو بالصباح الباكر، والإسهال يأتي بعد الوجبات[1].

من الممكن أن يحدث لدى المرضى الذين لديهم داء منتشر أكثر من 10 مرات إسهال باليوم، والإسهال الدهني غالباً ما يكون غائباً عند المرضى مع الداء المُحدَّد بالجزء القريب من الأمعاء الدقيقة.

هنالك عدة عوامل تسهِم بحدوث الإسهال عند مرضى الداء الزلاقي، ولُوحظَ أن حلولية البراز وحجمه الواصلة للكولون تكون مزدادة، إضافة إلى إطلاق دسم بكثرة إلى الكولون بسبب أكسدة الحموض الدسمة بفعل البكتيريا والتي تزيد من الإسهال، كما أن الشوارد أيضاً تُفرَز إلى اللمعة أكثر مما تُمتَص[1].

تعتمد شدة نقص الوزن على شدة المرض، وامتداد الإصابة بالأمعاء الدقيقة، وقدرة المريض على تعويض سوء الإمتصاص بزيادة المدخول الطعامي، وإن بعض المرضى مع سوء امتصاص لديهم شهية جيدة و وزن طبيعي أو نقص خفيف بالوزن، ونادراً ما يُلَاحَظ في المرض الشديد وجود قهم مرافق، ونقص وزن سريع، وعند هكذا مرضى واهنين ناقصي الوزن ربما نلحظ وجود احتباس في السوائل العائد لنقص البروتين[1].

إن التعب والكسل شائع حتى بغياب فقر الدم، وعامةً فإن نقص البوتاسيوم الشديد بسبب الفقد اللمعي يسبب ضعفاً عضلياً شديداً[1].

غياب الارتياح البطني وخاصةً انتفاخ البطن (الشائع كثيراً) قد يوجه نحو تشخيص خاطىء لتناذر الأمعاء الهيوجة، وبسبب الصعوبة في تمييز الداء الزلاقي ذي التظاهرات الهضمية الخفيفة عن تناذر الأمعاء الهيوجة فإنه في هذه الحالة نلجأ لإجراء تحليل الأضداد: tTG أو EMA، ويجب أن تُجرَى لمرض تناذر الأمعاء الهيوجة مع سيطرة الإسهال[20].

يمكن أن يحدث ألم بطني شديد (وهو غير وصفي للداء الزلاقي غير المختلط)، وفي حال حدوثه فإنه يمكن أن يؤدي لحدوث اختلاطات مثل انغلاف الأمعاء أو التهاب الصائم القرحي أو لمفوما الأمعاء[1].

إن انتفاخ البطن بسبب وجود كمية كبيرة من الغازات كريهة الرائحة هو اختلاط شائع، وعامةً فإن وجود الغثيان والإقياء غير شائع بالداء الزلاقي غير المختلط، كما يمكن مصادفة قلس حامضي معدي مريئي والذي يمكن أن يتحسن باتباع نظام غذائي خال من الغلوتين[21].

عند وجود داء زلاقي غير مُعَالج وشديد عند الأطفال والبالغين فإنه يمكن أن يتظاهر الداء الزلاقي بإسهال غزير يُسبِّب تجفافاً، واضطراباً استقلابياً، وقصوراً كلوياً، وفي بعض الحالات قلة ثبات بالحالة الهيموديناميكية[22].

إن التشخيص المبكر للداء الزلاقي مهم ، وإن المرضى إجمالاً يبدون تحسناً باتباع النظام الغذائي خال من الغلوتين[1].

1-7-4- التظاهرات خارج هضمية Extraintestinal Features:

بالنسبة لمرضى الداء الزلاقي والمتقدمين بالعمر فإن المرض يميل للتظاهر عندهم باختلاطات لا تشير مباشرةً لوجود إصابة في السبيل الهضمي،،وهذه الأعراض ناتجة عن سوء امتصاص المغذيات، التي يمكن أن تصيب كل أعضاء الجسم كما هو موضح بالجدول التالي:

الجدول (1-1): يوضح التظاهرات خارج الهضمية في الداء الزلاقي[1]		
التظاهرات		السبب المُحتَمَل
الجلدية	– الفرفريات. – الوذمة. – التهاب الجلد الحلئي الشكل. – فرط التقرن الجريبي والتهاب الجلد.	– عوز فيتامين K، ونادراً نقص الصفيحات. – نقص البروتينات. – سوء امتصاص فيتامين A و B المركبة.
الغدية	– انقطاع الطمث، نقص الخصوبة، عنانة. – فرط نشاط جارات الدرق الثانوي	– سوء تغذية، سوء وظيفة وطائية في الغدة النخامية، سوء مناعي. –سوء امتصاص الكالسيوم مع/بدون سوء امتصاص فيتامين D.
الدموية	– فقر دم. – نزوف. – زيادة صفيحات، أجسام هول وجوي.	– عوز الحديد، فوليك، بيرودوكسين،B12. –عوز فيتامين K . –نقص الطحالية.
الكبدية	– ارتفاع الأنزيمات الكبدية. – التهاب كبد مناعي ذاتي	– التهاب كبد لمفاوي. – مناعية ذاتية.
العضلية	– ضمور عضلي. – تكزز. – ضعف عضلي.	–سوء التغذية الناتج عن سوء الامتصاص. –سوء امتصاص الكالسيوم وفيتامين D مع/بدون المغنيزيوم. – ضمور عضلي عام، نقص البوتاسيوم.
العصبية	–اعتلال أعصاب محيطية. – رنح. –آفات مزيلة للنخاعين والجهاز العصبي المركزي. –اختلاجات.	–عوز فيتامين B12، الثيامين، اضطراب عصبي مناعي. – أذية العمود الخلفي الشوكي والمخيخ. – اضطراب عصبي مناعي. –غير معروف.
الهيكلية	– نقص تعظم، تلين عظام، هشاشية عظام. – اعتلال عظمي مفصلي. – كسور مرضية.	– سوء امتصاص الكالسيوم وفيتامين D،، فرط نشاط جارات درق ثانوي.

1-9- التشخيص Diagnosis:

إن الموجودات المخبرية في الداء الزلاقي تختلف حسب شدة المرض وامتداده مثل الأعراض والعلامات، كما أن الفحوص المصلية النوعية للداء الزلاقي مثل: IgA، وDGP، وIgA EMA، وtTG، وخزعة الأمعاء الدقيقة هي الأكثر ثقةً في تشخيص الداء الزلاقي[23].

إن فحص البراز والتحاليل الدموية ربما تكون غير طبيعية، ولكنها نادراً ما تكون نوعية للتشخيص، لأن هذه الموجودات متشابهة في بقية أسواء الامتصاص[1].

كما أن فحص الزمر النسيجية HLA-DQ2\DQ8 ربما تساعد في استبعاد الداء الزلاقي في حالات سريرية مشابهة[24,25].

1-9-1- الاختبارات المصلية Serology:

في الممارسة السريرية الحالية هنالك عديد من الفحوص المصلية التي تساعد في التشخيص، والفحص الأكثر فائدةً في تشخيص الداء الزلاقي و هو أضداد tTG وIgA وإن التراص المُعتَمِد على DGP أيضاً أثبت أثراً جيداً في التشخيص[15,16]، وإن أضداد الغليادين المُوجِّهة ضد مُستَضِد الغليادين غير نوعية ويجب أن تُستَبعَد من التحاليل.

1-9-2- أضداد غمد الليف العضلي من نمط الغلوبيولين المناعي IgA:

ترتبط بالنسيج الضام والذي هو غمد الليف العضلي (غمد الليف العضلي: هو ما يحيط بالخلايا العضلية الملساء مُعطِياً مظهراً محيطياً يكشفه الومضان المناعي غير المباشر) ، والنتيجة تكون إيجابية أو سلبية لأنه حتى القيم الصغيرة من الضد IgA EMA تُعَدُّ عالية النوعية للداء الزلاقي، فإن الحساسية $\leq$ 90%، والنوعية 100% في الداء الزلاقي غير المُعَالج، ويتناقص مستوى الأضداد عند اتباع نظام غذائي خال من الغلوتين، ويصبح سلبياً عند الأفراد المعالجين، وإن هذا الاختبار أقل استخداماً من tTG وذلك لأن تقنيته أكثر كلفة وتحتاج خبرة أكثر[26].

1-9-3- أضداد ناقلة الأمين النسيجية(tTG) :

إن الإيجابية الكاذبة لأضداد tTG البشري غير مُحتَمَلة وخاصةً بالقيم العالية، وفي حال توافقها مع خزعة طبيعية للأمعاء فمن المُحتَمَل أن تدل على داء كامن، فبالرغم من فائدة IgG، وIgM من tTG عند مرضى عوز IgA، فإنها ليست كنوعية أضداد IgG DGP [27].

الجدول (2-1): يوضح الحساسية والنوعية والقيمة التنبؤية الإيجابية والسلبية للاختبارات المصلية عند المرضى غير المُعَالجين[1]

الاختبار المصلي	الحساسية%	النوعية%	القيمة التنبؤية الإيجابية%	القيمة التنبؤية السلبية%
tTG (IgA) بشري	%100-95	%100-97	%95-80	%100
EMA	%98-58	%100-97	%100-98	%95-80
أضداد الغليادين IgA	%90-75	%95-82	%100-28	%100-65
أضداد الغليادين IgG	%85-69	%90-73	%95-20	%88-41

1-9-4- أضداد الغليادين منزوع الأمين (Deamidated Gliadin Antibody (DGP:

يُعرَّف نازع كاتلاز tTG بالببتيد غليادين منزوع الأمين، وهذا يزيد ارتباط الغليادين إلى أخدود مُستَضِد DQ2، وبالتالي زيادة السمية، وبالاستناد إلى هذه المعلومة فإنه تطور استخدام DGP؛ والتي تعمل مُستَضِد غليادين مُعدِّلاً لـ tTG، وحساسيتها تقارب حساسية tTG [15,16].

إن نوعية إيجابية أضداد DGP أكثر من نوعية أضداد الغليادين، وبشكلٍ مُحتَمَل فإنه يقترح أن الداء الزلاقي المترافق مع أضداد الغليادين يُميِّز بوجود DGP، بينما وجود أضداد الغليادين في الأشخاص الذين ليس لديهم داء زلاقي يُميِّز بوجود ببتيدات أخرى أقل نوعية للمرض.

لقد لُحِظَ زيادة باستخدام اختبار الـ DGP، وهذا الاختبار يمكن أن يستَبْعِد أو يَؤكِّد وجود المرض عند الأشخاص الذين تعطي خزعة الأمعاء لديهم مظاهر تتوافق مع المرض ولكن مع سلبية tTG مثلاً[1]

في حالات عوز IgA يمكن أن نستخدم DGP-IgG، وأيضاً عند الأشخاص مع إيجابية أضداد الغليادين وسلبية tTG [25,27].

إن لاختبار أضداد الغليادين حساسية متوسطة ونوعية أقل من EMA، وtTG [29,28]، ولذلك فالإيجابية الكاذبة لهذه الاختبارات شائعة، ومن هنا فإن اختبار أضداد الغليادين لم يَعُدْ يُستَخدم في الشخيص البدئي للداء الزلاقي غير المُعَالج، وإن فحص tTG هو المُفضَّل[25].

1-9-6- الفحص الجيني لـ HLADQ2/DQ8Genetic Testing for HLA DQ2/DQ8:

تقريبياً إن كل مرضى الداء الزلاقي إيجابيون لـ DQ2 أوDQ8، وإن حوالي 35% من الأوروبيين لديهم إيجابية لـ DQ2 أو DQ8، لذلك فإن النتيجة الإيجابية لها قيمة تشخيصية صغيرة، لذلك فإن تحري الزمرة النسيجية HLA يجب ألا يُجرَى روتينياً لتشخيص الداء الزلاقي، وقد يساعد فحصها في استبعاد المرض في حالات سريرية معينة[25,30].

هنالك واحدة من أهم المؤشرات السريرية لفحص الزمر النسيجية HLADQ2/DQ8 ألا وهي:

1- عند المرضى الذين وُضِعوا على نظام غذائي خال من الغلوتين مع سلبية الواسمات المصلية ودون سوابق تشخيص مصلي أو نسيجي: وفي هذه الحالة فإن سلبية الزمر النسيجية تَستَبعِد التشخيص وتُوجِّه لضرورة إجراء اختبار تحري الغلوتين[32-31].

2- تقويم المرض مع اعتلال معوي يُشبِه الداء الزلاقي مع سلبية الواسمات المصلية.

3- عند المرضى مع استمرار الضمور الزغابي بالرغم من التقيد بالنظام الغذائي خال من الغلوتين: إن التشخيص البدئي للمرض غير محدد، وأيضاً لاستبعاد الداء الزلاقي عند أفراد ذوي خطورة مثل الأطفال مع قريب مصاب أو وجود متلازمة داون[24,25].

1-9-7- اختبار التحدي بالغلوتين Gluten Challenge:

وهو اختبار نقوم فيه بإيقاف النظام الغذائي خال من الغلوتين، وعودة تناول الطعام بشكلٍ طبيعي، ثم إعادة الخزعة من الأمعاء الدقيقة.

في السابق كان يُعَدُّ خطوة روتينية في تشخيص الداء الزلاقي، وحالياً يُجرَى أساساً للمرضى الذين لم يُشخَّص لديهم داء زلاقي بدئي ، ووُضِعُوا على نظام غذائي خال من الغلوتين.

إن تحسن الأعراض مع نظام غذائي خال من الغلوتين لا يُميِّز الداء الزلاقي عن الحساسية للقمح غير الداء الزلاقي[33].

في دراسة في الولايات المتحدة بيَّنَت أن معظم المرضى 89% من المُتَبِعين لنظام غذائي خال من الغلوتين لم يكن الداء الزلاقي مُشخَّصاً لديهم بدقة، لذلك فإن اختبار تحدي الغلوتين يجب أن يُجرَى إذا كان تشخيص الداء الزلاقي قد تم خلال الطفولة معتمداً على خزعة الأمعاء الإيجابية، وكانت الأضداد المصلية سلبية، لأن هنالك عدداً من الاضطرابات المعوية الطفولية العابرة عند الأطفال يمكن أن تُقلِّد الداء الزلاقي، ونادراً ما يكون ضرورياً عند المرضى مع أعراض وعلامات نموذجية للداء الزلاقي مقرونةً مع موجودات نسيجية بخزعة الأمعاء الدقيقة تتوافق مع الداء الزلاقي[34].

إن إيجابية الأضداد المصلية tTG، أوEMA، أوDGP تدعم تشخيص الداء الزلاقي وتجعل اختبار تحمل الغلوتين غير ضروري.

إن التوصيات الحديثة في اختبار تحدي الغلوتين عند مرضى الداء الزلاقي؛ والتي تستند إلى دراسات حشدية قد ألقت الضوء على عدة عناصر مهمة عند إجراءالاختبار، فالمرضى الذين يُظهِرُون أعراضاً شديدة بعد تناول الغلوتين فإنه من غير المُحتَمَل أن يتحملوا اختبار تحدي الغلوتين، وربما من الأفضل أن يبقوا على نظام غذائي خال من الغلوتين حتى لو كان التشخيص غير واضح لديهم[25,35].

إن الدراسات المصلية يجب أن تُجرَى منذ البداية، فإيجابية الأضداد تقترح أن الداء موجود وفعَّال، وإن فحص الزمر النسيجية غالباً ما يساعد لأن سلبية الزمرة تَستَبعِد الداء الزلاقي، وتُجنِّب الحاجة لإجراء اختبار التحدي[1].

يجب أن يُجرَى اختبار التحدي لمدة 6–8 أسابيع، وعند ذلك الوقت يجب إجراء الاختبارات المصلية tTG، أو DGP، وخزعة الأمعاء الدقيقة، فإذا كانت أعراض المريض تماماً كأعراض قلة التحمل عندها تُجرَى الخزعة مبكراً أول أسبوعين وقد يُوضَع التشخيص[35].

إذا بقيت الاختبارات المصلية سلبية بنهاية الاختبار فإنه يجب إعادتها بعد 4 أسابيع من نهاية الاختبار؛ ويستمر تركيز الأضداد بالارتفاع، وإذا كان كل من الاختبارات المصلية وخزعة الأمعاء سلبية، فإنه يجب أن يُرَاقب المريض حول وجود أعراض وعلامات الداء الزلاقي، ويبقى على نظام غذائي طبيعي على الأقل لمدة 6 أشهر، وبعدها يُعَاد تحليل الأضداد المصلية[35].

الفصل الثاني : التقويم المجهري لخزعات الأمعاء الدقيقة و دور التلوينات المناعية

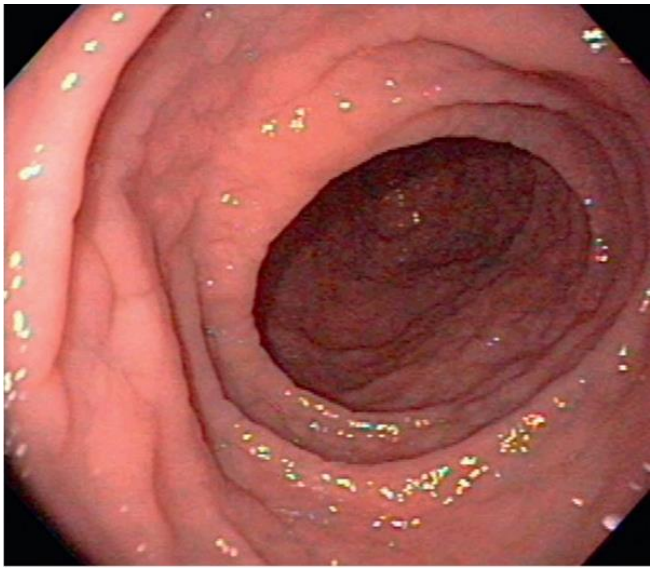
2-1- خزعة الأمعاء الدقيقة Small Instestinal Biopsy:

2-1-1- مقدمة :

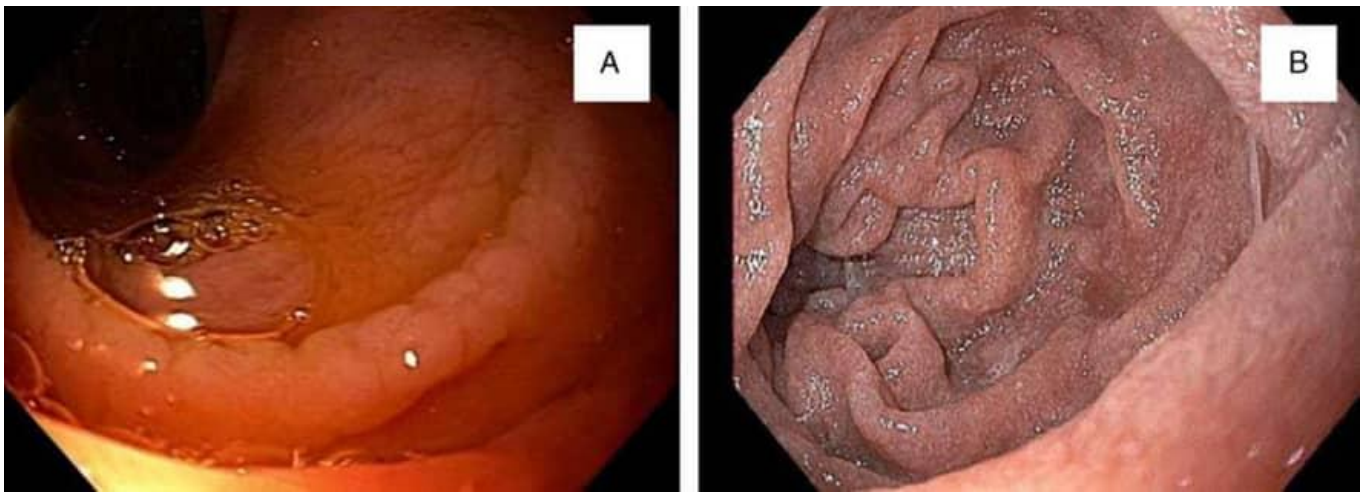
على الرغم من أنه يمكن تَوقُّع وجود الداء الزلاقي بالاعتماد على الموجودات السريرية أو فحوص مصلية غير طبيعية، فلا تزال الخزعة تمثل الفحص المعياري لوضع التشخيص، وغالباً ما تُجرَى الخزعة خلال التنظير الهضمي العلوي لأسباب تتعلق أولاً بالداء الزلاقي (تحري فقر دم بعوز الحديد، أو عدم ارتياح بأعلى البطن)[36].

2-1-2- المظاهر التنظيرية للداء الزلاقي :

لُحِظَ منظر الأرض العطشى (تسنن ثنيات العفج) Scalloping أو غياب ثنيات العفج عند بعض مرضى الداء الزلاقي، ولكن منظر الأرض العطشى ليس نوعياً للداء الزلاقي، ويمكن مُشاهَدته في: التهاب الأمعاء بالحمضات، والجيارديا، والداء النشواني، والذرب الإستوائي، واعتلال الأمعاء بالإيدز[36]، كما يمكن مُشَاهدة مظاهر تنظيرية أخرى مثل: تسطح الثنيات، وشقوق متعددة، أو منظر فسيفسائي، وعندما تُعزَل هذه الشقوق فإن هنالك مناطق من المخاطية تعطي منظر الحجارة المرصوفة، وقد تبدو المخاطية طبيعية في أثناء التنظير، وإن غياب المظاهر التنظيرية السابقة لا يَستَبعِد الحاجة للخزعة والفحص النسيجي في حال كان الداء الزلاقي مُتوَقَّعاً استناداً للموجودات السريرية والفحوص المصلية. إن استخدام الكبسول capsule وتنظير الأمعاء الدقيقة يُقدِّم فحصاً للأجزاء البعيدة من الأمعاء الدقيقة؛ حيث المظاهر التنظيرية ربما تكون واضحة أيضاً، ولأن هذه المظاهر غير نوعية للداء الزلاقي، فإن التصوير بالكبسول لايمكن أن يُغنِي عن الخزعة والفحص النسيجي، وهي ليست روتينية للتشخيص والمعالجة، وهي مفيدة عند المرضى ذوي الاختلاطات أو الداء الزلاقي المُعنِّد (التهاب الصائم القرحي) أو لمفوما الأمعاء[1].



الشكل (2–1): يوضح منظراً تنظيرياً للعفج يظهر الشكل الأملس للمخاطية أو جلد القريدس[1]



الشكل (3–1):يوضح منظراُ تنظيرياً للعفج يظهر مقارنة بين مظهر الداء الزلاقي A والمظهر الطبيعي B[48]

2–1–3– معايير الكفاية في خزعات الأمعاء الدقيقة الخاصى بمرضى الشك بالداء الزلاقي :

يجب على الطبيب المنظر الحصول على 4 عينات على الأقل من الاثني عشر القاصي (ما بعد البصلة) وعينتين من البصلة الاثني عشرية عند إجراء الخزعات لتقويم الداء الزلاقي[48].

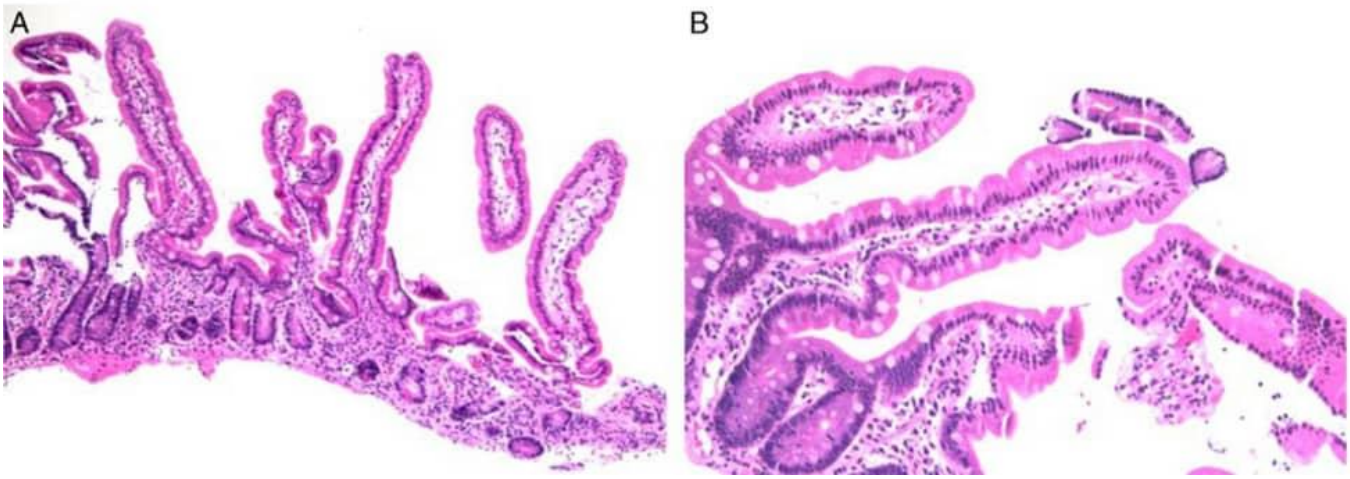
الخزعات المأخوذة من بصلة الاثني عشر قد تكون مفيدة في زيادة حساسية التشخيص للداء الزلاقي لكن يجب الحذر أن هذه الخزعات أكثر تعرضا للأذيات الخاصة بأمراض المعدة كما أنها ذات زغابات أقصر من تلك الموجودة في أجزاء الاثني عشر (مابعد البصلة) [48].

2-1-4- تقييم الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة IELs :

تغيرت المعايير المقبولة فيما يتعلق بعدد وتوزيع الخلايا الليمفاوية داخل الظهارة في خزعات الأمعاء الدقيقة ذات المظهر السليم مورفولوجياً على مدى العقود العديدة الماضية. حيث أشارت البيانات المأخوذة من دراسات خزعة الكبسولة الصائمية التي سبقت عصر التنظير الهضمي إلى أن ما يصل إلى 40 خلية لمفاوية داخل الظهارة لكل 100 خلية معوية كانت تعد من الموجودات الطبيعية في الأمعاء الدقيقة [36].

ومع ذلك ، فإن الدراسات الأحدث وصفت عددًا أقل من الخلايا الليمفاوية داخل الظهارة في الغشاء المخاطي الطبيعي للإثني عشر ، مما أدى بهم إلى استنتاج أن وجود 25 خلية لمفاوية لكل 100 خلية معوية يمثل الحد الأعلى الطبيعي [37]. في الوقت الراهن يعدَ معظم الباحثين أن 25 خلية ليمفاوية داخل الظهارة لكل 100 خلية معوية تمثل الحد الأعلى الطبيعي في خزعات الاثني عشر ، على الرغم من عدم توزع الخلايا الليمفاوية بالتساوي على أسطح الزغب [36].

حيث تكون اللمفاويات متوزعة على الجوانب الوحشية للزغابات مقارنة مع الذرى ، وهي ملاحظة سميت بنمط التوزع الطبيعي/التنازلي "decrescendo" لزيادة اللمفاويات داخل الظهارة [38] , حيث يجب حصر تقويم زيادة اللمفاويات داخل الظهارة فقط في المناطق ذات التوجيه الصحيح فقط .



الشكل (1-4): يوضح المظهر المورفولوجي السليم لخزعات العفج بتلوين H&E [48]

تُظهر خزعات العفج المأخوذة من جميع مرضى الداء الزلاقي تقريباً زيادة في ارتشاح الظهارة السطحية بالخلايا اللمفاوية التائية الناضجة عند التعرض لمنتجات الغلوتين بما يقدر ب 30 خلية لمفاوية إلى100 خلية ظهارية معوية على الأقل و زيادة تقدر بأكثر من 40 خلية لمفاوية إلى 100 خلية ظهارية معوية في معظم الحالات [39].في حين أن عدوى الملتوية البوابة، التهاب العفج الهضمي، الأذية المتعلقة بالأدوية، التهاب الامعاء الفيروسي، تترافق عادة مع درجات أقل من زيادة اللمفاويات المذكورة .

كما تجدر الإشارة إلى أن الداء الزلاقي قد يكون بؤرياً ، وقد ينخفض عدد الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة بعد تطبيق نظام غذائي خاص بسحب الغلوتين [39]. حيث وجدت إحدى الدراسات أن متوسط تعداد الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة انخفض من 100/61 خلية معوية إلى 38 في عينات خزعة الاثني عشر بعد سحب الغلوتين .

قيمت دراسة أخرى عينات خزعة من الغشاء المخاطي الاثني عشر من 28 مريضًا يعانون من الداء الزلاقي ، بما في ذلك أربعة عولجوا بسحب الغلوتين. في هذه الدراسة ، كان المتوسط 42 (يتراوح بين : 26 إلى 58) خلية لمفاوية داخل الظهارة لكل 100 خلية معوية في المرضى غير المعالجين مقارنة بـ 29 (يتراوح بين : 25 إلى 36) بين أولئك الذين يعانون من الداء الزلاقي و التزموا بنظام غذائي خالٍ من الغلوتين [36].

الشكل (1–5): يوضح وجود زيادة محتملة في الخلايا اللمفاوية ضمن البطانة بتلوين H&E [48]

2-1-5- طرائق تقدير زيادة الخلايا اللمفاوية ضمن الظهارة و دور التلوينات المناعية :

يمكن تقويم زيادة اللمفاويات داخل الظهارة مورفولوجياً بعدة طرق في خزعات الأمعاء الدقيقة ، حيث يقوم بعض الباحثين بحساب الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة على طول الزغابة بالكامل ، في حين يقوم آخرون بتقويم عدد الخلايا الليمفاوية ونمط توزيعها داخل الظهارة .

قامت إحدى الدراسات بالتقدير العددي للخلايا اللمفاوية ضمن الظهارة في ذرى 5 زغابات أختيرت عشوائياً، و موجهة بشكل جيد ووجدت أن المتوسط > 12 خلية لمفاوية داخل الظهارة لكل 20 خلية معوية هي علامة حساسة للاعتلال المعوي الحساس للغلوتين [40] ,و تم التحقق من صحة طرق العد الذروي في دراستين إضافيتين.

حيث كان المتوسط 6 خلايا لمفاوية داخل الظهارة لكل 20 خلية معوية ضمن الذرى موجودًا في 49 مريضًا لديهم بنية زغابية طبيعية وإيجابية الأضداد الدموية ، مقارنة بـ 3 أو أقل من الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة في الخزعات الشاهد [40,41]. ووجدت هذه الدراسات أن وجود > 29 خلية لمفاوية لكل 100 خلية ظهارية هو موجودة غير طبيعية في خزعات الإثني عشر [40].

قارن آخرون كثافة الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة في أطراف الزغابات بتلك الموجودة في قواعدها عن طريق عدَ الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة لكل 100 خلية معوية في كلا الموقعين ، ثم التعبير عن العلاقة كنسبة طرف إلى قاعدة. النسب الطبيعية بشكل عام هي أقل أو يساوي 1.5 ، في حين أن القيم > 2 تشير إلى الإصابة بالداء الزلاقي [36].

يمكن للتلوينات المناعية الموجهة ضد CD3 أن تعزز الكشف عن الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة وقد أوصي بالاستخدام السريري من قبل العديد من المفكرين ، معظمهم يحصون عدد الخلايا اللمفاوية إيجابية CD3 لكل 20 خلية معوية في 3 زغابات جيدة التوجيه [42].حيث تقوم التلوينات المناعية الكيميائية عموماً بوسم عددًا أكبر من الخلايا اللمفاوية التائية داخل الظهارة مما قد يظهر في الشرائح الملونة بالهيماتوكسيلين والأيوزين ؛ وبالتالي فإن عتبة كثرة اللمفاويات داخل الظهارة المرضية تتمثل ب (30 خلية إيجابية / 100 خلية معوية) عند استخدام التلوينات المناعية [36].

الموضوع الأكثر أهمية ، أن التلوينات المناعية الكيميائية لا تحسن الكشف عن مرض الاضطرابات الهضمية عندما لا يكون هناك شك بالفعل. حيث درست إحدى الأبحاث بشكل مستقبلي 200 عينة من خزعات الاثني عشر من المرضى الخاضعين للتقويميم السريري مرجح للداء الزلاقي ، ولم يُظهر أي منها تغيرات زغابية أو زيادة الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة عن طريق التقويم الروتيني بتلوين الهيماتوكسيلين والإيوزين . إلا أن الواسمات المناعية الخاصة ب CD3 اكتشفت عددًا طفيفًا من الخلايا الليمفاوية داخل الظهارة أكبر مما كان واضحًا في الشرائح المصبوغة بالهيماتوكسيلين والأيوزين [43].

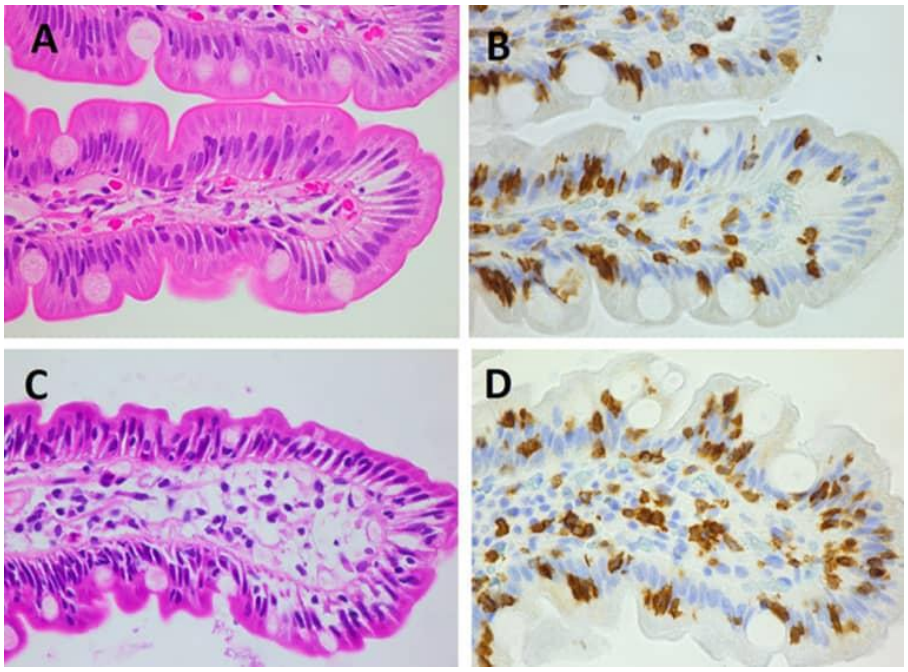
تعد زيادة الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة علامة حساسة لمرض الداء الزلاقي ، ولكن وجود هذه الزيادة شائع جدًا ويمكن رؤيته في مجموعة من الاضطرابات . حيث إن زيادة اللمفاويات داخل الظهارة المحدودة في البصلة الاثني عشرية مظهر شائع لعدوى الملوية البوابية [37]، أو قد تمثل رد فعل على المواد اللمعية مثل الأدوية و الأطعمة ، في حين أن التشخيص التفريقي لكثرة اللمفاويات ضمن البطانة واسع النطاق .في دراسة واحدة تبحث في السمات السريرية لـ 43 مريضًا يعانون من كثرة اللمفاويات داخل الظهارة ، وبنية زغبية طبيعية دون سوابق للداء الزلاقي ، ثبت أن 10 ٪ فقط من المرضى يعانون من الداء الزلاقي [44].

إن المرضى الذين يعانون من أعراض سريرية تشير إلى الداء الزلاقي مع مظهر زغابات طبيعي مورفولوجياً تظهر زيادة في عدد الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة المتوزعة على الزغابات بأكملها (> 100/25 خلية معوية) أو أكثر عددًا في ذروة الزغابات (> 20/6 خلية معوية) [36] .

كما وتعد زيادة اللمفاويات داخل الظهارة ، مع أو دون ضمور الزغابات ، هي علامة نسيجية حساسة ولكنها ليست نوعية للداء الزلاقي و يشمل التشخيص التفريقي مجموعة متنوعة من الإصابات المناعية والمعدية والمتوسطة بالمناعة والتي يجب استبعادها سريريًا ونسيجيا [36].

Interpretation	Counts	Stain
Diagnosis by counting intraepithelial lymphocytes per 100 enterocytes (count a total of 300 to 500 epithelial cells in well-oriented area)		
Upper limit of normal	20-25/100	H&E or CD3
Borderline Increased	25-29/100	H&E or CD3
Definitely Increased	≥ 29/100	H&E or CD3
Diagnosis by villous tip method (5 villi, 20 epithelial cells per villous tip, mean counts)		
Upper limit of normal	5/20	H&E or CD3
Definitely Increased	≥ 6/20	H&E or CD3

الشكل (1–6) : يوضح طرائق حساب عدد اللمفاويات ضمن الظهارة [48]



الشكل (1-7) : A وجود خلايا لمفاوية متناثرة ضمن الظهارة كموجودة طبيعية بتلوين H&E،

B,D : الواسم المناعي ل CD3 ، H&E C: وجود زيادة في تعداد الخلايا اللمفاوية ضمن الظهارة بتلوين

2-1-6 – صعوبات التقويم المجهري لخزعات الاثني عشر :

نظرًا لأن التشخيص يتطلب تقويمًا دقيقًا لضمور الزغابات ، يجب أن تكون خزعات الاثني عشر جيدة التوجيه ويتم الحصول على شرائح عالية الجودة. ففي بعض الحالات تكون خزعة الاثني عشر مقطوعة بشكل عرضي مما يؤدي إلى التفسير الخاطئ [48].

كما قد يؤدي التلوين الداكن باستخدام الهيماتوكسيلين إلى صعوبة في تقويم IELS ، خاصةً عندما يكون هناك تغيرات ترميمية ضمن الظهارة السطحية. في مثل هذه الحالات ، قد يكون إعادة التلوين الروتيني بالهيماتوكسيلين و الإيوزين مفيدًا، كما تفيد التلوينات المناعية للـ CD3 في تفادي هذه المشكلة [48].

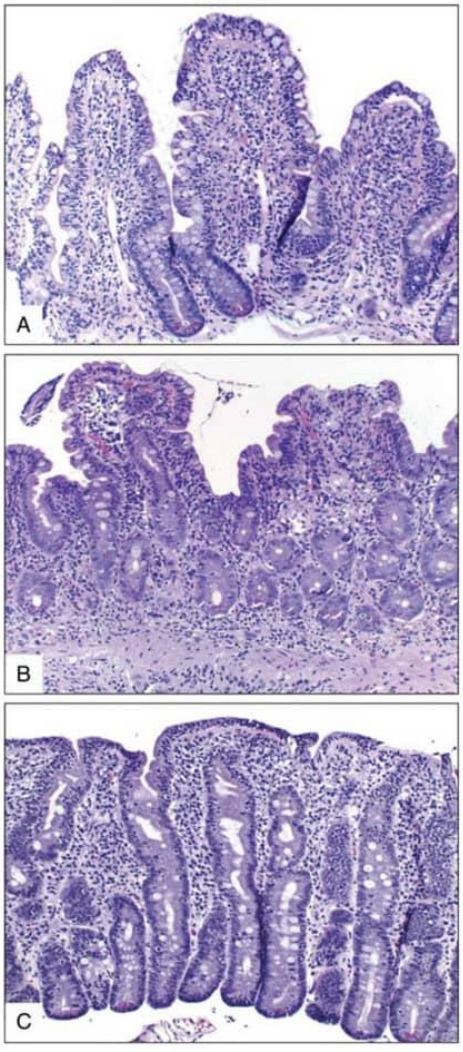
تؤدي المقاطع السميكة أيضًا إلى تقويم زائد في عدد الخلايا اللمفاوية ضمن البشرة بسبب تراكب النوى للخلايا الظهارية المعوية مما يؤدي إلى تشخيص إيجابي كاذب. قد يساعد وجود مقاطع أرق من الخزعة في تفادي هذه المشكلة، كما تفيد التلوينات المناعية لل CD3 في تفادي هذه المشكلة. علاوة على ذلك ، لا ينبغي تقويم الخلايا اللمفاوية ضمن البطانة IEL في المناطق التي تعلو التكتلات اللمفاوية أو في المقاطع العرضية لقاعدة الزغابات[48].

2-1-7- ترميم الزغابات ، تضخم الخبيئات ، ونسبة الزغابات للخبيئات:

عادةً ما تكون النسبة الطبيعية لطول الزغابات إلى عمق الخبيئات 3: 1 إلى 1:5 في الاثني عشر ، وهي أقل من تلك الموجودة في الأمعاء الدقيقة البعيدة .

إن التوجيه غير الجيد لخزعات الاثني عشر خلال التحضير النسيجي قد يقود إلى تقويم خاطئ لقصر الزغابات و بالتالي قبول أطوال أقل من الطبيعي خلال الممارسة العملية و تصنيف بعض الخزعات على أنها سليمة المظهر النسيجي مما يستوجب التوجيه الجيد لضمان التقييم الصحيح [45] .

عادة ما يؤدي وجود انفتاق غدد برونر في بصلة العفج ، ووجود مخاطية المعدة الهاجرة ، إلى تغيرات مورفولوجية في الزغابات التي تعلوها [46] .



و يمكن أيضًا رؤية زيادة الخلايا اللمفاوية الهامة في الظهارة فوق التجمعات اللمفاوية. بالتالي ، يجب على أطباء علم الأمراض أن يحصروا تقويمهم لبنية الزغابات على الغشاء المخاطي الجيد التوجيه بعيدًا عن التجمعات اللمفاوية وعقيدات غدد برونر[36]. توجد العديد من التصنيفات لتقويم بنية الزغابات ؛ و كان الأكثر استخداماً هو تصنيف مارش المعدل يصف هذا المقياس 4 مراحل من التبدلات : بنية الزغابة الطبيعية مع التوزع طبيعي للخلايا الليمفاوية داخل الظهارة ، البنية الزغابية الطبيعية مع زيادة الخلايا اللمفاوية داخل الظهارة. زيادة اللمفاويات داخل الظهارة المرافق مع ضمور زغابي خفيف أو معتدل أو تام (فقدان الزغابات مع تضخم الخبيئات) ونقص التنسج (الضموري) [47].

الشكل (1-8) : يوضح درجات الضمور الزغابي(A خفيف، B متوسط ، C شديد)

الجزء الثاني: القسم العملي

الفصل الأول: أهداف البحث، التصميم، المواد والطرائق

Objective, Design, Materials and Methods of the Research

1-1- تمهيد:

يستعرض هذا الفصل الجانب العملي من الدراسة في الأهداف وطريقة تصميم الدراسة والطرائق المُستَخدمة والمنهج الإحصائي المُتَّبع.

1-2- خلفية البحث:

الداء الزلاقي (Celiac Disease) هو مرض مناعي شائع يصيب الأمعاء الدقيقة ناتج عن الحساسية للغلوتين الموجود في الطعام، الأمر الذي ينجم عنه التهاب في الغشاء المخاطي للأمعاء الدقيقة وضمور الزغابات وتضخم الخبايا وما ينجم عنه من اسهال مزمن وسوء امتصاص وفقدان وزن أو فشل نمو ونقص بالعناصر الغذائية كالحديد والفيتامينات[49].

هناك العديد من الوسائل المستخدمة في تشخيص الداء الزلاقي مثل الاختبارات المصلية والتنظير الهضمي العلوي والدراسة النسيجية لخزعة الأمعاء الدقيقة التي يمكنها كشف التغيرات المرضية في ظهارية الأمعاء الدقيقة، وتعتمد السمات النسيجية المرضية على عدد وتوزع الخلايا اللمفاوية داخل الظهارية (intraepithelial lymphocytes) مع وجود أو غياب تضخم الخبايا والضمور الزغابي والتي تصنف إلى درجات بحسب تصنيف Marsh المعدل [50].

في بعض الحالات يكون هناك ارتشاح بالخلايا اللمفاوية داخل الظهارية دون تضخم الخبايا وضمور الزغابات (Marsh I) وهي غير مميزة للداء الزلاقي مما يستدعي استبعاد حالات مرضية أخرى مثل الانتان بالملتوية البوابية والجيارديا وغيرها [51].

يتم تلوين الخزعات بشكل تقليدي باستخدام صبغة الهيماتوكسين أيوزين (H&E) قبل دراستها تحت المجهر[54]، ومن الطرق المتوفرة ايضاً استخدام التلوينات الكيميائية المناعية النسيجية Immunohistochemistry (IHC) لـ CD3 والتي تسهّل حساب عدد اللمفاويات في الظهارية ونمط أو نوع توزعها على طول الزغابات (تصاعدي crescendo، تنازلي decrescendo) وبالتالي تقويم أدق لخزعة الأمعاء الدقيقة بناءاً على نتائج العديد من الدراسات [58-52].

1-3- تساؤلات البحث:

- ماهي علاقة تعداد اللمفاويات في ظهارية الأمعاء الدقيقة عند استخدام التلوينات المناعية CD3 مع تصنيف Marsh لخزعة الأمعاء الدقيقة.
- ما هي علاقة نمط توزع اللمفاويات المكتشف باستخدام التولين المناعي CD3 مع الداء الزلاقي.
- ما هو تأثير استخدام التلوين المناعي CD3 على تقويم خزعة الأمعاء وحساسية الدراسة النسيجية في تشخيص الداء الزلاقي.

1-4- هدف البحث:

يهدف البحث لدراسة دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية الدراسة النسيجية في تشخيص الداء الزلاقي.

1-5-عينة الدراسة:

مجموعة عينات خزعات الأمعاء الدقيقة للمرضى المشتبه بإصابتهم بالداء الزلاقي الواردة لمخبر التشريح المرضي في مشفى المواساة ومشفى الأسد الجامعيين سريرياً و مخبرياً، في المدة ما بين 2021/12/1 إلى 2022/12/1.

الذين تحققت لديهم المعايير الآتية: معايير القبول:

- توفر بلوكات البارافين والسلايدات لخزعات الأمعاء الدقيقة للمرضى المشكوك بإصابتهم بالداء الزلاقي.
- توفر معلومات كافية لوضع التشخيص كالأعراض والعلامات ونتائج معايرة اضداد الترانسغلوتاميناز.

معايير الاستبعاد:

☒ عدم توفر البلوكات والسلايدات.

☒ نقص أو عدم اكتمال البيانات.

☒ رفض المشاركة في البحث.

1-6- مواد الدراسة وطرائقها:

نمط الدراسة: دراسة مقطعية استباقية-استعادية A Prospective-Retrospective Cross-Sectional Study.

مكان الدراسة: مخبر التشريح المرضي في مشفى المواساة الجامعي ومشفى الأسد الجامعي بدمشق/سوريا.

زمان الدراسة: المدة الممتدة من 2021/12/1 إلى 2022/12/1.

متغيرات الدراسة:

1- العمر.

2- الجنس.

3- معايير مارش.

4- التحاليل المخبرية.

5- نتائج الدراسة النسيجية لخزعة الأمعاء الدقيقة باستخدام التلوين التقليدي H&E وباستخدام التلوينات المناعية CD3.

طريقة الدراسة ومراحل العمل:

تمت مراجعة أرشيف التشريح المرضي في مشفى الأسد ومشفى المواساة الجامعيين اختيار الحالات المشكوك بإصابتها بالداء الزلاقي بشكل عشوائي وبعد أخذ موافقة المريض على الاشتراك في البحث أُجرِيَ الآتي:

❖ مراجعة أضابير المرضى واستخلاص المعلومات والبيانات اللازمة.

- ❖ إجراء قراءة ثانية للعينات من قبل الباحثة.
- ❖ إجراء تلوين مناعي CD3 وإعادة تقييم الخزعة وتصنيفها حسب Marsh.
- ❖ بعد جمع البيانات أُدخِلَتْ إلى الحاسوب ودُرِسَتْ إحصائياً باستخدام برنامج Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) واستخلاص النتائج.
- ❖ قُورِنَتْ نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسات مشابهة.
- ❖ وُضِعَتْ الاستنتاجات والتوصيات.

1-7- المُحدِّدات الأخلاقية:

لن تُذكَر أي معلومات شخصية حساسة، وحُصِلَ على الموافقة المستنيرة من المشاركين في البحث مع شرح للإجراءات المتخذة خلال البحث.

1-8- حجم العينة:

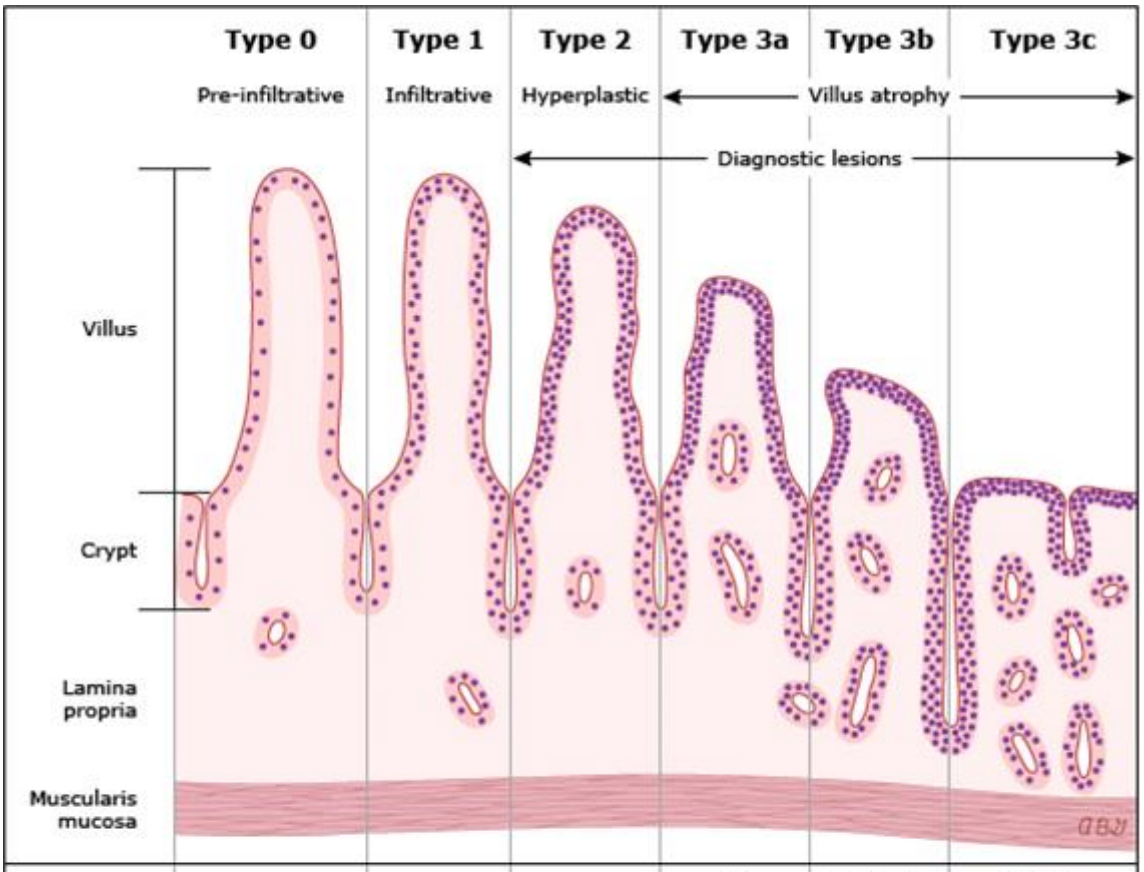
حُسِبَ الحد الأدنى لحجم العينة باستخدام معادلة ريتشارد جيجر كما يأتي (يعدَ: N: هو حجم المجتمع (بقدر بحوالي 400 عينة)؛ وZ: الدرجة المعيارية لمستوى الثقة 0.95 وتساوي 1.96؛ وd: نسبة الخطأ 0.05):

$$n = \frac{\left(\frac{z}{d}\right)^2 \times (0.50)^2}{1 + \frac{1}{N}\left[\left(\frac{z}{d}\right)^2 \times (0.50)^2 - 1\right]}$$

وبذلك يكون الحد الأدنى لحجم العينة المطلوب 197 حالة.

1-9- المفاهيم والاعتبارات:

- ❖ **تشخيص الداء الزلاقي:** تم التشخيص بوجود أعراض سريرية مع إيجابية خزعة العفج (Marsh 2-3) مع إيجابية الأضداد المصلية (EMA-IgA ،tTG-IgA):[49]
  - **المعايير النسيجية:** الدرجة 2 أو 3 بحسب معايير مارش للموجودات في خزعة مخاطية العفج الموضحة في الشكل (1-2).



Villus	Normal	Normal	Normal	Mild atrophy	Moderate atrophy	Severe atrophy
Crypt	Normal	Normal	Hyperplasia	Hyperplasia	Hyperplasia	Hyperplasia
Ratio, villus height: crypt depth	3:1	3:1	<3:1	<2:1	1:1	<1:1
IEL/ 100 EC	<40	>40	>40	>40	>40	>40

الشكل(2-1) يوضح تصنيف مارش لخزعة العفج

- Type 0: مخاطية طبيعية أو ما قبل الارتشاح اللمفاوي.
- Type 1: ارتشاح لمفاوي بالظهارة السطحية >40 كرية بـ 100خلية ظهارية.
- Type 2: Type 1 + فرط تصنع الخبايا.
- Type 3: Type 2 + ضمور زغابي.
  - ✓ Type 3a: الضمور الزغابي خفيف.
  - ✓ Type 3b: الضمور الزغابي متوسط.
  - ✓ Type 3c: الضمور الزغابي التام.

- **المعايير المصلية:** تم الاعتماد على إيجابية Anti-endomysial antibody (EMA-IgA).
- **المعايير السريرية:** الاستجابة على النظام الغذائي الخالي من الغلوتين سريرياً + مخبرياً.

❖ **الاسهال:** زيادة تواتر التبرز ≤ 3 مرات/اليوم، مع زيادة بوزن البراز >200 غ/اليوم[59].

❖ **فقر الدم:** يعتبر المريض مصاباً بفقر الدم إذا كان الخضاب <13.6 غ/دل للذكور و< 11.9 غ/دل للإناث و<10 غ/دل للأطفال بعمر <18 عاماً [60].

❖ **فشل النمو:** بالاعتماد على جداول مخططات النمو لمنظمة الصحة العالمية تم اعتبار الطفل مصاباً بفشل النمو في حال كانت قيمة Z-score (الوزن/الطول للأطفال بعمر ≤ 24 شهراً، و BMI للأطفال بعمر >24 شهراً) بحسب العمر <-2[61].

❖ **فقدان الوزن غير المقصود:** هو فقدان >5% من الوزن المعتاد خلال 6-12 شهراً دون قصد الشخص، ويعتبر المريض لديه نقص وزن اذا كان مشعر كتلة الجسم <18.5 كغ/م^2[62].

❖ **تعداد اللمفاويات باستخدام التلوين المناعي CD3:** تم اعتبار تعداد اللمفاويات باستخدام التلوين المناعي CD3 سلبياً إذا كان تعداد اللمفاويات ≤100/25 خلية ظهارية، وعدَت القيمة حدية اذا كانت ما بين 26-100/29 خلية ظهارية، وايجابية اذا كان ≤100/30 خلية ظهارية.

1-10- طرق التحليل الإحصائي:

بعد الانتهاء من جمع البيانات أُدخِلَتْ دورياً جميع البيانات إلى الحاسـوب عبر برنامج SPSS (IBM SPSS Statistics الإصـدار 23 سـنة 2015) الذي اعتُمِدَ في تحليل المعلومات واسـتخلاص النتائج بالاعتماد على المعايير والاختبارات الإحصائية الآتية:

- **المتوسط الحسابي** $\overline{X}$:

ويحسب من العلاقة الآتية

$$\overline{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

حيث: $\overline{X}$: المتوسط الحسابي.

Xi: مفردات العينة.

n : عدد المفردات

- **الانحراف المعياري** σ : ويحسـب بالعلاقة الآتية:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\overline{X} - X_i)^2}{n-1}}$$

حيث σ : الانحراف المعياري.

Xi: مفردات العينة.

n :عدد المفردات.

$\overline{X}$: المتوسط الحسابي.

- مُثِّلَتْ القيم الإحصائية المستمرة بـ (المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري).
- حُسِبَ المتوسط الحسابي والتكرارات لمختلف المتغيرات ونسبتها.
- اعتُمِدَ الاختبار الإحصـائي test Chi-square X2 (لدراسـة المتغيرات الفئوية) و Mann-Whitney U test (لدراسة المتغيرات المستمرة) لدراسة الفروقات بين المجموعات وإظهار الأهمية الإحصائية لهذه الفروقات، واعتُمِدَت قيمة $P \leq 0.05$ ليكون هناك فرق احصائي مهم.
- **الحسـاسـيّة Sensitivity (Se):** تعبّر عن الدقة في كشـف المرض باختبار ما عندما يكون المرض موجوداً.

Sensitivity= true positives/(true positive + false negative)

1-11- موجز:

في نهاية هذا الفصـل نكون قد ألقينا الضـوء على تفاصـيل الجزء العملي من الدراسـة مع تعريف مُفصَّـل بآلية العمل والطرق الإحصائية المُتَّبعة في البحث للوصول إلى إجابة عن السؤال البحثي.

الفصل الثاني: النتائج Results

2-1- تمهيد:

في نهاية البحث جُمِعَت بيانات 200 مريض محتمل إصابتهم بالداء الزلاقي حققوا معايير الدراسة، **وبدراسة هذه البيانات كانت النتائج الآتية.**

2-2- النتائج:

2-2-1- دراسة العمر في عينة البحث:

الجدول (1-2) دراسة العمر في عينة البحث		
	Mean	St.D
متوسط العمر (عاماً)	29.7 (2-75)	17.02
	N.	%
<15 عاماً (أطفال)	48	24
15-19 عاماً	20	10
20-29 عاماً	29	14.5
30-39 عاماً	42	21
40-49 عاماً	36	18
50-59 عاماً	14	7
≥60 عاماً	11	5.5

من الجدول (1-2) نلحظ الآتي:

- بلغ متوسط عمر المرضى 29.7 عاماً، وتراوحت أعمارهم ما بين 2-75 عاماً.
- بلغت نسبة الأطفال (العمر <15 عاماً) 24% من عينة البحث، بينما نسبة البالغين 76%.
- النسبة الأكبر من المرضى البالغين كانوا بأعمار ما بين 30-39، تليها نسبة المرضى بعمر ما بين 40-49 عاماً.

2-2-2- دراسة الجنس في عينة البحث:

الجدول (2-2): دراسة الجنس في عينة البحث		
	N.	%
الإناث	134	67
الذكور	66	33

من الجدول (2-2) نلحظ أن نسبة الإناث (67%) أكبر من نسبة الذكور (33%) في عينة البحث.

2-2-3- دراسة استطباب التنظير الهضمي العلوي:

الجدول (3-2): دراسة استطباب التنظير الهضمي العلوي		
	N.	%
اسهال مزمن	48	24
ألم بطني	71	35.5
فشل نمو	37	18.5
فقر دم	25	12.5
فقر دم بعوز الحديد	11	5.5
نقص وزن وتأخر النمو	8	4

من الجدول (3-2) نلحظ الآتي:

- شكل الألم البطني أشيع استطباب للتنظير الهضمي العلوي يليه الاسهال المزمن ثم فشل النمو ثم فقر الدم.
- أقل استطباب للتنظير الهضمي العلوي شيوعاً كان نقص الوزن وتأخر النمو.

2-2-4- دراسة نتائج معايرة الاضداد المصلية:

الجدول (4-2): دراسة نتائج معايرة الاضداد المصلية		
	N.	%
anti tTG -	29	14.5
anti tTG +	171	85.5
إجراء EMA	200/20	10
anti EMA -	20/13	65
anti EMA +	20/7	35

من الجدول (4-2) نلحظ الآتي:

- ❖ كانت اضداد الترانس غلوتاميناز النسيجي ايجابية لدى 85.5% من المرضى، بينما كانت سلبية لدى 14.5% من المرضى.
- ❖ تم إجراء معايرة اضداد غمد الليف العضلي EMA لدى 10% من المرضى وكانت سلبية في 65% من الحالات وايجابية في 35% من الحالات.

2-2-5- دراسة تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E:

الجدول (5-2): دراسة تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E		
	N.	%
(H&E) Marsh 0	28	14
(H&E) Marsh I	12	6
(H&E) Marsh II	9	4.5
(H&E) Marsh IIIa	36	18
(H&E) Marsh IIIb	39	19.5
(H&E) Marsh IIIc	76	38

من الجدول (5-2) نلحظ الآتي:

- ❖ تم تصنيف الخزعة على أنها من الدرجة Marsh 0 لدى 14% من المرضى، ومن الدرجة Marsh I لدى 6% من المرضى.
- ❖ تم تصنيف الخزعة على أنها من الدرجة Marsh II لدى 4.5% من المرضى.
- ❖ تم تصنيف الخزعة على أنها من الدرجة Marsh III لدى 75.5% من المرضى، وقد كانت غالبيتها من الدرجة Marsh IIIc.

2-2-6- دراسة تصنيف تعداد اللمفاويات بحسب CD3 ونمط توزعها نسبةً للزغابات:

الجدول (6-2): دراسة تصنيف تعداد اللمفاويات بحسب CD3 ونمط توزعها بالنسبة للزغابات						
Crescendo		Decrescendo		CD3		CD3 IELs/100 epithelial cells
%	N.	%	N.	%	N.	
5	1	95	19	10	20	CD3≤25%
0	0	100	4	2	4	CD3 26-29%
98.9	174	1.1	2	88	176	(+)CD3≥30%
87.5	175	12.5	25	100	200	المجموع
0.001>				-		P

من الجدول (6-2) نلحظ الآتي:

- ❖ كان تعداد اللمفاويات بتلوين CD3 سلبياً (≤25/100) في 20 حالة وكان التوزع في غالبيتها (95%) من النمط التنازلي.
- ❖ كان تعداد اللمفاويات بتلوين CD3 حدياً (26-29/100) في أربع حالات فقط وكان توزعها من النمط التنازلي.
- ❖ كان تعداد اللمفاويات بتلوين CD3 ايجابياً (≤30/100) في 176 حالة، وكان توزعها من النمط التصاعدي في غالبيتها (98.9%).

2-2-7- دراسة العلاقة بين تصنيف March بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3:

الجدول (2-7): دراسة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3								
P	CD3 IELs/100 epithelial cells						H&E	
	(+) CD3≥30/100		CD3 26-29		CD3≤25/100			
	%	N.	%	N.	%	N.	N.	
0.001>	21.4	6	10.7	3	67.9	19	28	(H&E) Marsh 0
	83.3	10	8.3	1	8.3	1	12	(H&E) Marsh I
	100	9	0	0	0	0	9	(H&E) Marsh II
	100	36	0	0	0	0	36	(H&E) Marsh IIIa
	100	39	0	0	0	0	39	(H&E) Marsh IIIb
	100	76	0	0	0	0	76	(H&E) Marsh IIIc

من الجدول (2-7) نلحظ الآتي:

- نسبة ايجابية CD3 كانت منخفضة في حالات Marsh 0 وارتفاع بشكل واضح في حالات Marsh I، وفي جميع حالات Marsh II-III.
- نسبة الحالات التي كانت فيها CD3 حدية أو سلبية أكبر في حالات Marsh 0 وانخفضت في حالات Marsh I.
- كانت العلاقة بين CD3 مع تصنيف Marsh مهمة احصائياً.

2-2-8- دراسة العلاقة بين الجنس مع CD3:

الجدول (2-8): دراسة العلاقة بين الجنس مع CD3								
	CD3 IELs/100 epithelial cells							P
	H&E	CD3≤25/100		CD3 26-29		(+) CD3≥30/100		
	N.	N.	%	N.	%	N.	%	
إناث	134	13	9.7	3	2.2	118	88.1	0.927
ذكور	66	7	10.6	1	1.5	58	87.9	

من الجدول (2-8) نلحظ أن نسبة الحالات التي كانت فيها CD3 ايجابية أكبر لدى الإناث من الذكور بفارقٍ صغير وغير مهم احصائياً.

2-2-9- دراسة العلاقة بين العمر مع CD3:

الجدول (2-9): دراسة العلاقة بين العمر مع CD3								
	CD3 IELs/100 epithelial cells							P
	H&E	CD3≤25/100		CD3 26-29		(+) CD3≥30/100		
	N.	N.	%	N.	%	N.	%	
أطفال (<15 عاماً)	48	4	8.3	0	0	44	91.7	0.464
بالغين (≤15 عاماً)	152	16	10.5	4	2.6	132	86.8	
	N.	Mean	St.D	Mean	St.D	Mean	St.D	P
متوسط العمر	-	34.7	21.1	37.5	15.4	28.9	16.5	0.235

من الجدول (2-9) نلحظ الآتي:

- نسبة الحالات التي كانت فيها CD3 ايجابية أكبر لدى الأطفال من البالغين لكن الفرق لم يكن مهماً احصائياً.
- متوسط عمر المرضى ايجابيي CD3 أصغر من متوسط عمر المرضى الذين كانت لديهم CD3 حدية أو سلبية، لكن لم يكن الفرق مهماً احصائياً.

2-2-10- دراسة التغيرات في تصنيف Marsh ونتائج الأضداد المصلية:

الجدول (10-2): دراسة التغيرات في تصنيف Marsh ونتائج الاضداد المصلية							
anti EMA +	anti tTG +	Marsh CD3		التغيرات بعد CD3		H&E	
N.	N.	N.	التصنيف الجديد	%	N.	N.	
1/0	1	1	Marsh I	21.4	6	28	(H&E) Marsh 0
5/5	5	5	Marsh II				
1/0	1	2	Marsh 0	25	3	12	(H&E) Marsh I
1/1	1	1	Marsh II				
–	9/9	–	–	0	0	9	(H&E) Marsh II
1/1	36/35	–	–	0	0	36	(H&E) Marsh IIIa
–	39/39	–	–	0	0	39	(H&E) Marsh IIIb
–	76/76	–	–	0	0	76	(H&E) Marsh IIIc

من الجدول (10-2) نلحظ الآتي:

- جميع الحالات التي تغير فيها تصنيف Marsh بعد اعتماد نتائج CD3 كانت في الدرجة Marsh 0-I، بينما لم تكن هناك تغيرات في الدرجات الأعلى.
- تغير تقييم Marsh 0 في ست حالات (21.4%)، حيث أصبح التصنيف Marsh I في حالة واحدة كانت فيها اضداد الترانسغلوتاميناز النسيجي ايجابية بينما كانت اضداد EMA سلبية، وتغير التقويم إلى Marsh II في خمس حالات وقد كانت اضداد الترانسغلوتاميناز وEMA ايجابية في جميعها وبالتالي صنفت على أنها داء زلاقي.
- تغير تقويم Marsh I في ثلاث حالات، حيث أصبح Marsh 0 في حالتين إحداهما كانت أضداد الترانسغلوتاميناز فيها سلبية والأخرى إيجابية واضداد EMA سلبية في حالة واحدة ولم تُجر في الحالة الأخرى، وفي حالة واحدة تغير تصنيف Marsh I إلى Marsh II وكانت أضداد الترانسغلوتاميناز النسيجي وEMA إيجابية وبالتالي تم تشخيص الداء الزلاقي فيها.
- في جميع الحالات من الدرجة Marsh II-III كانت أضداد الترانسغلوتاميناز النسيجي إيجابية باستثناء حالة واحدة من الدرجة Marsh IIIa لكن كانت فيها أضداد EMA إيجابية.
- بالنتيجة تم تشخيص ست حالات اضافية بالداء الزلاقي باستخدام CD3 أي أنه زاد من الحساسية لكن لم يتم نفي الإصابة عن أي حالة لذا فإنه لم يؤثر على النوعية.

2-2-11- دراسة تصنيف Marsh النهائي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية:

الجدول (2-11): دراسة تصنيف Marsh النهائي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية				
H&E		CD3		
%	N.	%	N.	
14	28	12	24	Marsh 0
6	12	5	10	Marsh I
4.5	9	7.5	15	Marsh II
18	36	18	36	Marsh IIIa
19.5	39	19.5	39	Marsh IIIb
38	76	38	76	Marsh IIIc

من الجدول (2-11) نلحظ الآتي:

- تم تصنيف الدرجة Marsh 0 في 24 حالة أي بنسبة 12% بينما كان سابقاً بنسبة 14%.
- تم تصنيف الدرجة Marsh I في 10 حالات أي بنسبة 5% بينما كانت سابقاً بنسبة 6%.
- تم تصنيف الدرجة Marsh II في 15 حالة أي بنسبة 7.5% بينما كانت سابقاً بنسبة 4.5%.
- لم تتغير نسبة تصنيف Marsh III بدرجاته المختلفة.

2-2-12- دراسة انتشار الداء الزلاقي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية:

الجدول (2-12): دراسة انتشار الداء الزلاقي بعد استخدام تلوين CD3 والدراسة المصلية المناعية		
%	N.	
17.5	35	لا داء زلاقي
82.5	165	داء زلاقي

من الجدول (2-12) نلحظ أن نسبة المرضى الذين تم تشخيص إصابتهم بالداء الزلاقي بلغت 82.5% من الحالات بعد استخدام CD3 ونتائج الدراسة المصلية المناعية.

2-2-13- دراسة علاقة تصنيف March النهائي مع الجنس:

الجدول (13-2): دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس						
	المجموع	إناث		ذكور		P
	N.	N.	%	N.	%	
Marsh 0	24	16	11.9	8	12.1	0.600
Marsh I	10	6	4.5	4	6.1	
Marsh II	15	11	8.2	4	6.1	
Marsh IIIa	36	20	14.9	16	24.2	
Marsh IIIb	39	29	21.6	10	15.2	
Marsh IIIc	76	52	38.8	24	36.4	
المجموع	200	134	100	66	100	-
	N.	N.	%	N.	%	P
لا داء زلاقي	35	22	16.4	12	18.2	0.755
داء زلاقي	165	112	83.6	54	81.8	

من الجدول (13-2) نلحظ الآتي:

- نسبة تصنيف Marsh 0-I وكذلك Marsh IIIa أكبر لدى الذكور، بينما نسبة تصنيف Marsh II-IIIb-IIIc أكبر لدى الإناث، لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً.
- نسبة تشخيص الداء الزلاقي أكبر لدى الإناث من الذكور، لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً.

2-2-14- دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع العمر:

الجدول (14-2): دراسة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع العمر							
متوسط العمر		بالغين (≤15 عاماً)		أطفال (<15 عاماً)		العدد	
St.D	Mean	%	N.	%	N.	N.	
20	35.2	13.2	20	8.3	4	24	Marsh 0
20.2	34.5	5.9	9	2.1	1	10	Marsh I
15.5	35.3	9.9	15	0	0	15	Marsh II
17.5	29.1	17.1	26	20.8	10	36	Marsh IIIa
16	27.1	19.1	29	20.8	10	39	Marsh IIIb
15.9	27.9	34.9	53	47.9	23	76	Marsh IIIc
–	–	100	152	100	48	200	المجموع
0.239		0.131				–	P
St.D	Mean	%	N.	%	N.	N.	
19.8	34.9	19.1	29	10.4	5	35	لا داء زلاقي
16.3	28.6	80.9	123	89.6	43	165	داء زلاقي
0.047		0.164				–	P

من الجدول (14-2) نلحظ الآتي:

- ❖ نسبة تصنيف Marsh 0-I-II أكبر لدى البالغين، بينما نسبة تصنيف Marsh IIIa-IIIb-IIIc أكبر لدى الأطفال، لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً، كما كان متوسط العمر أصغر في مجموعات حالات Marsh IIIa-IIIb-IIIc من مجموعات حالات Marsh 0-I-II وكذلك لم يكن الفرق مهماً إحصائياً.
- ❖ نسبة تشخيص الداء الزلاقي أكبر لدى الأطفال من البالغين لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً، وقد كان متوسط عمر المرضى المشخص لديهم الداء الزلاقي أصغر من الحالات التي لم يشخص فيها الداء الزلاقي وكان الفرق مهماً إحصائياً.

2-3- موجز:

بالنتيجة وجدنا أن استخدام التلوين المناعي CD3 ساهم في كشف المزيد من حالات الداء الزلاقي وبالتالي زاد من حساسية الفحص المجهري لخزعات الأمعاء الدقيقة.

الفصل الثالث: المقارنة مع الدراسات العالمية المشابهة

3-1- تمهيد:

رُوجِعَت دراسات تناولت استخدام التلوين المناعي CD3 في تشخيص الداء الزلاقي بشكل مشابه للدراسة الحالية وتم استخلاص أهم نتائجها، **وفيما يأتي أهم نقاط المقارنة مع نتائج الدراسة الحالية:**

3-2- مقارنة عامة بين الدراسات:

الجدول (15-2): مقارنة عامة بين الدراسات

الباحث	السنة	الدولة	حجم العينة	الإناث	الذكور	العمر
الدراسة الحالية	2023	سورية	200	67	33	29.7
Hammo[63]	2020	العراق	100	31	69	20.74
Mubarak[64]	2015	هولندا	159	33.3	66.7	17.8-0.9
Alhabbal[65]	2022	سورية	100	51	49	19.12

من الجدول (15-2) نلحظ الآتي:

- دراسات المقارنة حديثة نسبياً وإحداها كانت محلية أجريت عام 2021 ونشرت عام 2022.
- تراوح حجم العينة في دراسات المقارنةمابين 100-159 حالة في حين بلغ 200 حالة في الدراسة الحالية.
- في دراسة Alhabbal [65] كانت نسبة الذكور أكبر قليلاً من نسبة الإناث، بينما في الدراسة الحالية وباقي دراسات المقارنة كانت نسبة الإناث أكبر من نسبة الذكور.
- متوسط عمر المرضى في الدراسة الحالية أكبر من متوسط العمر في دراسات المقارنة.

3-3- مقارنة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3:

الجدول (16-2): مقارنة العلاقة بين تصنيف Marsh بحسب التلوين التقليدي H&E مع CD3									
	الدراسة الحالية				Hammo[63]				Mubarak[64]
	≤25	26-29	(+)≥30	P	≤25	26-29	(+)≥30	P	(+)≥30	P
	%	%	%		%	%	%		%	
(H&E) Marsh 0	67.9	10.7	21.4	0.001>	100	0	0	0.001>	26.2	0.001>
(H&E) Marsh I	8.3	8.3	83.3		36.7	6.7	56.7		83.3	
(H&E) Marsh II	0	0	100		0	0	100		100	
(H&E) Marsh IIIa	0	0	100		0	0	100		98.9	
(H&E) Marsh IIIb	0	0	100		0	0	100			
(H&E) Marsh IIIc	0	0	100		0	0	100			

من الجدول (16-2) نلحظ أنه في جميع الدراسات ارتفعت نسبة الحالات التي كان فيها تعداد اللمفاويات باستخدام CD3 ايجابياً مع زيادة شدة الإصابة باستخدام تصنيف Marsh، وقد كانت ايجابية في جميع حالات Marsh II-III، وكانت علاقة نتيجة CD3 مع تصنيف Marsh مهمة احصائياً في جميع الدراسات.

3-4- مقارنة علاقة الجنس والعمر ونمط التوزع مع CD3:

الجدول (17-2): مقارنة علاقة الجنس والعمر ونمط التوزع مع CD3								
	الدراسة الحالية				Hammo[63]			
	≤25	26-29	(+) ≥30	P	≤25	26-29	(+) ≥30	P
	%	%	%		%	%	%	
إناث	9.7	2.2	88.1	0.927	12.9	0	87.1	0.341
ذكور	10.6	1.5	87.9		21.7	2.9	75.4	
أطفال (<15 عاماً)	8.3	0	91.7	0.464	19.5	0	80.5	0.492
بالغين (≥15 عاماً)	10.5	2.6	86.8		18.6	3.4	78	
Decrescendo	76	16	8	0.001>	90.5	9.5	0	0.001>
Crescendo	0.6	0	99.4		0	0	100	

من الجدول (17-2) نلحظ الآتي:

- ❖ في الدراسة الحالية وفي Hammo [63] كانت نسبة الحالات التي كان CD3 فيها ايجابياً أكبر لدى الإناث، لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً في الدراستين.
- ❖ في الدراسة الحالية وفي Hammo [63] كانت نسبة الحالات التي كان CD3 فيها ايجابياً أكبر لدى الأطفال من البالغين، لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً في الدراستين.
- ❖ في الدراسة الحالية وفي Hammo [63] كان نمط توزع اللمفاويات فيها بشكل تصاعدي أكبر عندما كان CD3 ايجابياً، بينما نسبة الحالات التي كان نمط التوزع فيها تنازلي أكبر في حالات تعداد اللمفاويات باستخدام CD3 حدياً أو سلبياً، وكان الفرق مهماً إحصائياً في الدراستين.

3-5- مقارنة علاقة تصنيف Marsh مع الجنس:

الجدول (18-2): مقارنة علاقة تصنيف Marsh مع الجنس

	الدراسة الحالية			Hammo[63]		
	إناث	ذكور	P	إناث	ذكور	P
	%	%		%	%	
Marsh 0	11.9	12.1	0.600	7.2	9.7	0.005
Marsh I	4.5	6.1		31.9	25.8	
Marsh II	8.2	6.1		2.9	25.8	
Marsh IIIa	14.9	24.2		18.8	22.6	
Marsh IIIb	21.6	15.2		18.8	12.9	
Marsh IIIc	38.8	36.4		20.3	3.2	

من الجدول (18-2) نلحظ أنه في الدراسة الحالية وفي Hammo [63] كانت نسبة Marsh 0-IIIa أكبر لدى الذكور بينما نسبة Marsh IIIb-IIIc أكبر لدى الإناث، بينما اختلفت الدراستان بنسبة درجة Marsh I-II بين الذكور والإناث، وكان الفرق بدرجات Marsh بين الذكور والإناث مهماً احصائياً في دراسة Hammo [63] فقط.

3-6- مقارنة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس:

الجدول (19-2): مقارنة علاقة تصنيف Marsh النهائي مع الجنس						
	الدراسة الحالية			Hammo[63]		
	أطفال (<15 عاماً)	بالغين (≤15 عاماً)	P	أطفال (<15 عاماً)	بالغين (≤15 عاماً)	P
	%	%		%	%	
Marsh 0	8.3	13.2	0.131	12.2	5.1	0.081
Marsh I	2.1	5.9		26.8	32.2	
Marsh II	0	9.9		17.1	5.1	
Marsh IIIa	20.8	17.1		24.4	16.9	
Marsh IIIb	20.8	19.1		12.2	20.3	
Marsh IIIc	47.9	34.9		7.3	20.3	

من الجدول (19-2) نلحظ الآتي:

- في الدراسة الحالية وفي Hammo [63] نسبة الدرجة Marsh I أكبر لدى البالغين ونسبة الدرجة Marsh IIIa أكبر لدى الأطفال.
- اختلفت الدراستان بنسبة انتشار باقي درجات Marsh بين الأطفال والبالغين.
- في الدراستين لم تكن علاقة درجات Marsh مع العمر مهمة احصائياً.

3-7- مقارنة التغيرات في تصنيف Marsh:

الجدول (20-2): مقارنة التغيرات في تصنيف Marsh											
	الدراسة الحالية				Mubarak[64]				Alhabbal[65]		
(H&E)	N.	%	التصنيف الجديد		N.	%	التصنيف الجديد		N.	%	التصنيف الجديد	
Marsh 0	28/6	21.4	6/1	Marsh I	65/17	26.2	17/9	Marsh I	2	–	Marsh I	2
			6/5	Marsh II			17/2	Marsh II				
			–	–			17/6	Marsh III				
Marsh I	12/3	25	3/2	Marsh 0	6/2	33.3	2/1	Marsh 0	3	–	Marsh II	3
			3/1	Marsh II			2/1	Marsh III				
Marsh II	0	0	–	–	–	–	–	–	2	–	Marsh IIIa	2
Marsh IIIa	0	0	–	–	87/1	98.9	1/1	Marsh 0	1	–	Marsh IIIb	1
Marsh IIIb	0	0	–	–					–	–	–	–
Marsh IIIc	0	0	–	–					–	–	–	–
نسبة التغيير	%4.5				%12.6				%8			
ارتفاع مشخص للتصنيف	(%3) 200/6				(%5.7) 159/9				(%3) 100/3			

من الجدول (20-2) نلحظ الآتي:

- تغيير تقويم Marsh 0 إلى Marsh I في حالة واحدة في الدراسة الحالية وفي تسع حالات في دراسة Mubarak [64] وفي حالتين في دراسة Alhabbal [65]، بينما تغير إلى March II في خمس حالات في الدراسة الحالية وفي حالتين في دراسة Mubarak [64]، وقد اصبح Marsh III في خمس حالات في دراسات Mubarak [64].
- تغيير تقويم Marsh I إلى March 0 في حالتين في الدراسة الحالية وفي حالة واحدة في دراسة Mubarak [64]، وقد أصبح Marsh II في حالة واحدة في الدراسة الحالية وفي ثلاث حالات في دراسة Alhabbal [65]، بينما تغير إلى Marsh III في حالة واحدة في دراسة Mubarak [64].
- في الدراسة الحالية وفي دراسة Mubarak [64] لم يتغير تصنيف Marsh II، بينما في دراسة Alhabbal [65] تغير إلى Marsh IIIa في حالتين.

- ❖ لم يتغير تقويم Marsh III في الدراسة الحالية بينما تغير إلى Marsh 0 في حالة واحدة في دراسة Mubarak [64]، وتحول March IIIa إلى Marsh IIIb في حالة واحد في دراسة Alhabbal [65].
- ❖ بلغت نسبة تغير تقويم Marsh بعد استخدام التلوين المناعي CD3 في الدراسة الحالية 4.5% وكانت أكبر في دراسة Mubarak [64] حيث بلغت 12.6%، فيما كانت متوسطة بين الدراستين في دراسة Alhabbal [65] حيث بلغت 8%.
- ❖ زاد استخدام التلوين المناعي CD3 من نسبة تشخيص الداء الزلاقي في 3% من الحالات في الدراسة الحالية وفي دراسة Alhabbal [65] ووصلت النسبة إلى 5.7% في دراسة Mubarak [64].

3-8- موجز:

نلحظ بالمقارنة مع الدراسات المشابهة أن هناك ارتباطاً مهماً إحصائياً بين تعداد اللمفاويات استخدام التلوين المناعي CD3 ساهم في تشخيص المزيد من حالات الإصابة بالداء الزلاقي وبالتالي رفع حساسية الفحص النسيجي التشخيصية بنسبة ما بين 3-5.7%.

الفصل الرابع: المناقشة Discussion

4-1- تمهيد:

في هذه الدراسة دُرِسَ دور استخدام التوين المناعي CD3 في الدراسة النسيجية لخزعة الأمعاء الدقيقة على تشخيص الداء الزلاقي، وقُورِنَتْ النتائج مع نتائج عدة دراسات وقد وصلنا للنقاط الآتية.

4-2- مقارنة نتائج دراستنا مع الدراسات العالمية المشابهة ومناقشة النتائج:

صُمِّمَ البحث لدراسة دور استخدام التلوينات المناعية في زيادة حساسية التشخيص في الداء الزلاقي، وقد شمل 200 مريض، وقد درس تعداد ونمط توزع اللمفاويات باستخدام التلوين المناعي CD3 وكان تعداد اللمفاويات باستخدام التلوين المناعي CD3 ايجابياً (≤100/30 خلية ظهارية) في 176 حالة (88%) وقد كان من النمط التصاعدي في 174 حالة منهم، وكان التعداد حدياً (100/26-29) في 4 حالات (2%) جميعها من النمط التنازلي، وسلبياً (≤100/25) في 20 حالة (10%) حيث كان من النمط التنازلي في 19 حالة منها، وبالتالي أغلب الحالات الايجابية كانت من النمط التصاعدي، وكانت العلاقة بين ايجابية CD3 مع النمط التصاعدي مهمة إحصائياً وهذا توافق مع نتائج دراسة Hammo [63].

تراوحت أعمار المرضى ما بين 2-75 عاماً حيث بلغ متوسط العمر 29.7 عاماً، وقد كان متوسط العمر في الدراسة الحالية أكبر من متوسط العمر في دراسات المقارنة على الرغم من أن 24% من المرضى في الدراسة الحالية كانوا من الأطفال.

كانت نسبة ايجابية CD3 أكبر لدى الأطفال من البالغين لكن لم يكن الفرق مهماً إحصائياً، وكذلك وصلت دراسة Hammo [63] لنتائج مماثلة.

بلغت نسبة الإناث في عينة البحث 67% والذكور 33%، وكانت نسبة ايجابية CD3 أكبر لدى الإناث من الذكور لكن لم تكن العلاقة بينهما مهمة إحصائياً، وهذا مماثل لنتائج دراسة Hammo [63].

كانت نسبة ايجابية CD3 وخاصة نمط التوزع التصاعدي أكبر عند المرضى غير المصابين بالملتوية البوابية، في حين كانت نسبة الحالات التي كانت CD3 فيها سلبية أو حدية أكبر عند المرضى المصابين بانتان بالملتوية البوابية وخاصة من النمط التنازلي، وكانت علاقة الإنتان بالملتوية البوابية مع سلبية CD3 والنمط التنازلي مهمة إحصائياً، وهذا يشير لكون النمط التنازلي يعبر عن الإنتان أكثر، بينما النمط التصاعدي وايجابية CD3 تشير للداء الزلاقي بشكل أكبر.

ارتفعت نسبة ايجابية CD3 من 21.4% في حالات Marsh 0 إلى 83.3% في Mrash I وأصبحت 100% في Marsh II–III وكانت العلاقة مهمة إحصائياً، وهذا متوافق مع نتائج دراستي Hammo [63] وMubarak [64]، وبالتالي هناك اجماع على الأهمية الإحصائية لعلاقة ايجابية CD3 مع تصنيف Marsh.

أدى استخدام التلوين المناعي CD3 إلى تغيير تصنيف درجة Marsh لخزعة الأمعاء الدقيقة في تسع حالات، حيث تغير من الدرجة Marsh 0 إلى الدرجة Marsh I في حالة واحدة كانت فيها أضداد الترانسغلوتاميناز النسيجي ايجابية لكن كانت أضداد EMA سلبية، وتغير إلى Marsh II في خمس حالات كانت أضداد الترانسغلوتاميناز وEMA إيجابية في جميعها وبالتالي صنفت على أنها داء زلاقي، أيضاً تغيير التقويم Marsh I في ثلاث حالات، حيث أصبح Marsh 0 في حالتين إحداهما كانت أضداد الترانسغلوتاميناز فيها سلبية والأخرى ايجابية واضداد EMA سلبية في حالة واحدة، وفي حالة واحدة تغير تصنيف Marsh I إلى Marsh II وكانت أضداد الترانسغلوتاميناز النسيجي وEMA إيجابية وبالتالي تم تشخيص الداء الزلاقي فيها، ولم يتغير تصنيف الدرجة Marsh II–III، أي بلغت نسبة تغير تصنيف Marsh 4.5% من جميع الحالات وكان هذا التغيير مشخصاً في ست حالات إضافية لم تكن مشخصة باستخدام التوين التقليدي H&E وبالتالي يكون استخدام تلوين CD3 زاد حساسية التشخيص بنسبة 3%، وفي دراسة Mubarak [64] بلغت نسبة تغير تصنيف Marsh 12.6% من الحالات وكان مشخصاً في 5.7% من الحالات وكذلك في دراسة Alhabbal [65] بلغت نسبة تغير تصنيف Marsh 8% وكان مشخصاً في 3%، أي أنه زاد من الحساسية في جميع الدراسات.

بالنتيجة أدى استخدام التلوين المناعي CD3 إلى تشخيص المزيد من حالات الداء الزلاقي أكثر من التلوين التقليدي H&E بنسبة وصلت إلى 3% في الدراسة الحالية والتي كانت جميعها من الحالات المصنفة على أنها Marsh 0–I ولم يتغير تقويم الحالات Marsh II–III، وهذا يشير لفائدته في الحالات الحدية لكن في الحالات المشخصة باستخدام التلوين التقليدي (Marsh II–III) لم يقدم فائدة إضافية وفقط في دراسة Mubarak [64] ساهم في نفي التشخيص في حالة واحدة.

4-3- موجز:

بنتيجة الدراسة الحالية بلغت نسبة انتشار الداء الزلاقي في عينة البحث 82.5%، وبلغت نسبة ايجابية تعداد اللمفاويات باستخدام التلوين المناعي CD3 88% والتي ارتبطت مع Marsh II–III، زاد استخدام CD3 من حساسية التشخيص بنسبة 3%.

.

الجزء الثالث: الخاتمة Conclusion

1-1- تمهيد:

تمت دراسة أهمية استخدام التلوين المناعي CD3 في دراسة خزعات الأمعاء الدقيقة في تشخيص الداء الزلاقي، وخلصت للاستنتاجات الآتية.

1-2- الاستنتاجات:

- بلغت نسبة انتشار الداء الزلاقي في عينة البحث 82.5%.
- بلغت نسبة ايجابية CD3 (≤100/30 خلية ظهارية) 88% في مجمل عينة البحث وكان إيجابياً في جميع حالات Marsh II-III.
- هناك علاقة مهمة إحصائياً بين ايجابية CD3 مع ازدياد درجة تصنيف Marsh لخزعة الأمعاء الدقيقة وبشكل خاص الدرجة Marsh 0-I.
- ساهم استخدام التلوين المناعي CD3 في تشخيص 6 حالات لم تكن مشخصة باستخدام التلوين التقليدي H&E وبالتالي تشخيص 3% من الحالات بشكل عام.

1-3- صعوبات البحث:

- لم تتوفر نتائج معايرة أضداد EMA إلا في بعض الحالات.
- تمت الدراسة النسيجية من قبل مشخص واحد، ويفضل في الدراسات القادمة مقارنة النتائج عبر أكثر من مشخص لتجنب الفروقات الشخصية التي قد تكون موجودة.
- تم استخدام التلوين المناعي CD3 ويفضل استخدام أنواع أخرى وتقييم فائدتها التشخيصية.

1-4- التوصيات:

عند دراسة خزعات الأمعاء الدقيقة في سياق تشخيص الداء الزلاقي، نقترح الآتي:

- استخدام التلوين المناعي CD3 بعد دراسة الخزعات الملونة بشكل تقليدي بـ H&E وخاصة في الحالات التي يكون التشخيص فيها غير حاسم مثل الدرجة Marsh 0 والدرجة Marsh I.
- يمكن للتلوينات المناعية الواسمة لل CD3 المساهمة في تفادي بعض الصعوبات في التقييم الكميَ لعدد اللمفاويات داخل الظهارة التي قد تواجه الفاحص باستخدام التلوين الروتيني H&E منها (تراكب النوى في حالات المقاطع السميكة – زيادة اللون الداكن للهيماتوكسيلين) .
- إن ايجابية CD3 ليست محصورة في حالات الداء الزلاقي لذا يجب دائماً تفسير النتائج في ضوء التوجه السريري بالإعتماد على الأعراض والعلامات ونتائج الدراسة للأضداد المصلية.

References المراجع

1. Kelly, C.P. (2016). Chapter 107: **Celiac Disease**.In : Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease-Pathophysiology, Diagnosis, Management,10th Edition,2016.Elsevier. https://shop.elsevier.com/books/sleisenger-and-fordtrans-gastrointestinal-and-liver-disease-2-volume-set/feldman/978-0-323-60962-3.

2. Farrell,R.J.,Kelly,C.P.(2002). **Celiac sprue.**NEnglJMed.2002;346(3):180-188. https://doi.org/10.1056/nejmra010852.

3. Gee,S.(2013). **The Neolithic Revolution and Subsequent Emergence of the CeliacAffection.**StBarthHospRep.2013;1(1):19-22. https://doi.org/10.12691/ijcd-1-1-8.

4. Fasano, A.,Berti, I.,Gerarduzzi, T. et al. (2003). **Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: A large multicenter study.**ArchInternMed.2003;163:286-292. https://doi.org/10.1001/archinte.163.3.286.

5. Sollid, L.M., Khosla, C. (2005). **Future therapeutic options for celiac disease.** Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2005;2:140-147.

6. Mukherjee, R., Kelly, C.P., Schuppan, D. (2012). **Nondietary therapies for celiac disease.** Gastrointest Endosc Clin N Am. 2012;22:811-831. https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.09.011.

7. Rubio-Tapia, A., Kyle, R.A.,Kaplan, E.L.et al.(2009).**Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease .** Gastroenterology .2009;137:8893. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.059.

8. Lohi, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K. et al. (2007). **Increasing prevalence of coeliac disease over time.** Aliment Pharmacol Ther. 2007;26:12171225.https://doi.org/10.1111/j.13652036.2007.03502.x.

9. Rubio-Tapia A, Ludvigsson, J.F., Brantner, T.L. et al. (2012). **The prevalence of celiac disease in the United States.** Am J Gastroenterol. 2012;107:1538-1544. https://doi.org/10.1038/ajg.2012.219.

10. Tosco, A., Salvati, V.M., Auricchio, R. et al. (2011). **Natural history of potential celiac disease in children.** Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9:320-5; quiz e36. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.09.006.

11. Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I. et al. (2003). **Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease.** Lancet. 2003;362:30-37. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13803-2.

12. Norris, J.M., Barriga, K., Hoffenberg, E.J. et al. (2005). **Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease.** JAMA. 2005;293:2343-2351. https://doi.org/10.1001/jama.293.19.2343.

13. Nilsen, E.M., Lundin, K.E., Krajci, P. et al. (1995). **Gluten-specific, HLA-DQ-restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferongamma?**. Gut. 1995;37:766-776. https://doi.org/10.1136/gut.37.6.766.

14. Smyth, D.J., Plagnol, V., Walker, N.M. et al. (2008). **Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease.** N Engl J Med. 2008;359:2767-2777. https://doi.org/10.1056/nejmoa0807917.

15. Leffler, D.A., Edwards, G., Dennis, M. et al. (2007). **A prospective comparative study of five measures of glutenfree diet adherence in adults with coeliac disease.** Aliment Pharmacol Ther. 2007;26:1227-1235. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03501.x

16. Volta, U., Granito, A., Fiorini, E. et al. (2008). **Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up**.2008;53:1582-1588. https://doi.org/10.1007/s10620-007-0058-0.

17. Halstensen, T.S., Scott, H., Fausa, O., Brandtzaeg, P. (1993). **Gluten stimulation of coeliac mucosa in vitro induces activation (CD25) of lamina propria CD4+ T cells and macrophages but no crypt-cell hyperplasia.**ScandJImmunol.1993;38:581-590. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1993.tb03245.x.

18. Cellier, C., Delabesse, E., Helmer, C. et al. (2000). **Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma.** French Coeliac Disease Study Group. Lancet. 2000;356:203-208. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02481-8.

19. Mention, J.J., Ben Ahmed, M., Béque, B. et al. (2003). **Interleukin 15: A key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphoma genesis in celiac disease.** Gastroenterology. 2003;125:730-45. https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)01047-3.

20. Sanders, D., Carter, M.J., Hurlstone, D.P. et al. (2001). **Association of adult coeliac disease with irritable bowel syndrome: A case-control study in patients fulfilling Rome II criteria referred to secondary care.** Lancet.2001;358:15041508. https://doi.org/10.1016/S01406736(01)06581-3.

21. Nachman, F., Vzquez, H., Gonzalez, A. et al. (2011). **Gastroesophageal reflux symptoms in patients with celiac disease and the effects of a gluten-free diet.** Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9:214-219. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.06.017.

22. Jamma, S., Rubio-Tapia, A., Kelly, C.P. et al. (2010). **Celiac crisis is a rare but serious complication of celiac disease in adults.** Clin GastroenterolHepatol.2010;8:587-590. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.04.009.

23. Kabbani, T.A., Goldberg, A., Kelly, C.P. et al. (2012). **Body mass index and the risk of obesity in coeliac disease treated with the gluten-free diet.** Aliment Pharmacol Ther. 2012;35:723-729. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05001.x.

24. Green, P.H., Cellier, C. (2007). **Celiac disease.** N Engl J Med. 2007;357:1731-1743. https://doi.org/10.1056/nejmra071600.

25. Rubio-Tapia, A., Hill, I.D., Kelly, C.P. et al. (2013). **ACG clinical guidelines: Diagnosis and management of celiac disease.** Am J Gastroenterol. 2013;108:656-576. https://doi.org/10.1038/ajg.2013.79.

26. Carroccio, A., Vitale, G., Di Prima, L. et al. (2002). **Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: A prospective study.** Clin Chem. 2002;48:1546-1550. http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/48.9.1546.

27. Villalta, D., Alessio, M.G., Tampoia, M. et al. (2007). **Diagnostic accuracy of IgA anti-tissue transglutaminase antibody assays in celiac disease patients with selective IgA deficiency.** Ann N Y Acad Sci. 2007;1109:212-220. https://doi.org/10.1196/annals.1398.025.

28. Zanini, B., Lanzarotto, F., Mora, A. et al. (2010). **Five year time course of celiac disease serology during gluten free diet: Results of a community based "CD-Watch" program.** Dig Liver Dis. 2010;42:865-870. https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.05.009.

29. Green, P.H., Cellier, C. (2007). **Celiac disease.** N Engl J Med. 2007;357:1731-1743. https://doi.org/10.1056/nejmra071600.

30. Zanini, B., Lanzarotto, F., Mora, A. et al. (2010). **Five year time course of celiac disease serology during gluten free diet: Results of a community based "CD-Watch" program.** Dig Liver Dis. 2010;42:865-870. https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.05.009.

31. Tonutti, E., Visentini, D., Bizzaro, N. et al. (2003). **French-Italian Laboratory Study Group on Coeliac Disease. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: A French-Italian multicenter study.** J Clin Pathol. 2003;56:389-393. https://doi.org/10.1136%2Fjcp.56.5.389.

32. Leffler, D.A., Dennis, M., Hyett, B. et al. (2007). **Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease.** Clin GastroenterolHepatol.2007;5:445-450. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.006.

33. Kumar, P.J. (2003). **European and North American populations should be screened for celiac disease.** Gut. 2003;52:170-171. https://doi.org/10.1136/gut.52.2.170.

34. Fasano, A. (2003). **European and North American populations should be screened for celiac disease.** Gut. 2003;52:168-169. https://doi.org/10.1136%2Fgut.52.2.168.

35. Leffler, D., Schuppan, D., Pallav, K. et al. (2013). **Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease.** Gut. 2013;62:996-1004. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302196.

36. Robert, M. E., Crowe, S. E., Burgart, L., Yantiss, R. K., Lebwohl, B., Greenson, J. K., Guandalini, S., & Murray, J. A. (2018). **Statement on Best Practices in the Use of Pathology as a Diagnostic Tool for Celiac Disease**: A Guide for Clinicians and Pathologists. American Journal of SurgicalPathology,42(9),e44–e58. https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001107

37. Shmidt, E., Smyrk, T. C., Boswell, C. L., Enders, F. T., & Oxentenko, A. S. (2014). **Increasing duodenal intraepithelial lymphocytosis found at upper endoscopy**: Time trends and associations. Gastrointestinal Endoscopy, 80(1), 105–111. https://doi.org/10.1016/j.gie.2014.01.008

38. Walker, M. M., Murray, J. A., Ronkainen, J., Aro, P., Storskrubb, T., D'Amato, M., Lahr, B., Talley, N. J., & Agreus, L. (2010). **Detection of Celiac Disease and Lymphocytic Enteropathy by Parallel Serology and Histopathology in a Population-Based Study**. Gastroenterology, 139(1), 112–119. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.007

39. Rostami, K., Marsh, M. N., Johnson, M. W., Mohaghegh, H., Heal, C., Holmes, G., Ensari, A., Aldulaimi, D., Bancel, B., Bassotti, G., Bateman, A., Becheanu, G., Bozzola, A., Carroccio, A., Catassi, C., Ciacci, C., Ciobanu, A., Danciu, M., Derakhshan, M. H., … Srivastava, A. (2017). **ROC-king onwards: Intraepithelial lymphocyte counts, distribution & role in coeliac disease mucosal interpretation**.Gut,66(12),2080–2086. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314297

40. Järvinen, T. T., Collin, P., Rasmussen, M., Kyrönpalo, S., Mäki, M., Partanen, J., Reunala, T., & Kaukinen, K. (2004). **Villous tip intraepithelial lymphocytes as markers of early- stage coeliac disease**. Scandinavian Journal of Gastroenterology,39(5),428–433. https://doi.org/10.1080/00365520310008773

41. Nasseri-Moghaddam, S., Mofid, A., Nouraie, M., Abedi, B., Pourshams, A., Malekzadeh, R., & Sotoudeh, M. (2008). T**he normal range of duodenal intraepithelial lymphocytes**. Archives of Iranian Medicine, 11(2), 136–142.

42. Hudacko, R., Kathy Zhou, X., & Yantiss, R. K. (2013). **Immunohistochemical stains for CD3 and CD8 do not improve detection of gluten-sensitive enteropathy in duodenal biopsies**. Modern Pathology, 26(9), 1241–1245. https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.57

43. Lonardi, S., Villanacci, V., Lorenzi, L., Lanzini, A., Lanzarotto, F., Carabellese, N., Volta, U., & Facchetti, F. (2013). **Anti-TCR gamma antibody in celiac disease: The value of count on formalin-fixed paraffin-embedded biopsies**. Virchows Archiv, 463(3), 409–413. https://doi.org/10.1007/s00428-013-1448-7

44. Lymphocytes in Inflammatory Disorders of the Esophagus and Stomach. **Clinical GastroenterologyandHepatology**,4(5),631–634. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.12.028

45. Ensari, A. (2010). Gluten-Sensitive Enteropathy (Celiac Disease): **Controversies in Diagnosis and Classification**. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 134(6), 826–836. https://doi.org/10.5858/134.6.826

46. Corazza, G. R., Villanacci, V., Zambelli, C., Milione, M., Luinetti, O., Vindigni, C., Chioda, C., Albarello, L., Bartolini, D., & Donato, F. (2007). **Comparison of the Interobserver Reproducibility With Different Histologic Criteria Used**

in Celiac Disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 5(7), 838–843. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.03.019

47. Biagi, F. (2004). **Intraepithelial lymphocytes in the villous tip: Do they indicate potential coeliac disease? Journal of Clinical Pathology**, 57(8), 835–839. https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013607

48. Dai, Y., Zhang, Q., Olofson, A. M., Jhala, N., & Liu, X. (2019). **Celiac Disease: Updates on Pathology and Differential Diagnosis. Advances in Anatomic Pathology**, 26(5), 292–312. https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000242

49. Schuppan, D., Dieterich, W., Lamont, J.T., Grover, S. (Access: 2023). **Epidemiology, pathogenesis, and clinical manifestations of celiac disease in adults.** UpToDate: Topic 4774 Version 35.0. Literature review current through: Dec 2022. Last updated: Jul 20, 2022.

50. Marsh M.N. (1992). **Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue')**. Gastroenterology, 102(1), 330–354.

51. Robert, M. E., Crowe, S. E., Burgart, L., Yantiss, R. K., Lebwohl, B., Greenson, J.K., Guandalini, S., Murray, J.A. (2018). **Statement on Best Practices in the Use of Pathology as a Diagnostic Tool for Celiac Disease: A Guide for Clinicians and Pathologists.** The American journal of surgical pathology, 42(9), e44–e58. https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001107.

52. Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D.A., De Giorgio, R., Catassi, C., Fasano, A. (2019). **Celiac disease: a comprehensive current review**. BMC medicine, 17(1), 142. https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z

53. Iftikhar, R., Jamal, S., Zafar, A., & Saadia, A. (2016). **Histopathological and Immunohistochemical Analysis of Small Intestinal Biopsies in Adults Suspected of Celiac Disease**. Journal of the College of Physicians and Surgeons–Pakistan : JCPSP, 26(10), 827–830.

54. Shihab, M.A., Enaya, H.M. (2020). **Immunohistochemical evaluation of CD3 T-cell lymphocyte and CD20 B-cell markers in Iraqi patients with celiac disease**. Eurasia J Biosci 14: 2023-2028.

55. Balasubramanian, P., Badhe, B.A., Ganesh, R.N., Panicker, L.C., Mohan, P. (2019). **The Utility and Validation of Intraepithelial Lymphocyte Count in Duodenal Biopsies in A Tertiary Care Centre in South India**. Annals of Pathology and Laboratory Medicine, Vol. 6, Issue 10, October, A544-A549. DOI: https://doi.org/10.21276/apalm.2511.

56. Suárez, A.F., Portugal, S., Barreda, C., Montes, P., Perez-Narrea, M. T., Rodríguez, O., Vergara, G., & Monge, E. (2016). **Enfermedad celíaca vs. atrofia villositaria serológicamente negativa: similitudes y diferencias histológicas y en el perfil inmunohistoquímico de linfocitos CD3, CD4, CD8 y CD56 [Celiac disease and negative serology villous atrophy: histological comparison and immunohistochemical study of CD3, CD4, CD8 and CD56 lymphocytes]**. Revista de gastroenterologia del Peru : organo oficial de la Sociedad de Gastroenterologia del Peru, 36(2), 123–128.

57. Tosco, A., Maglio, M., Paparo, F., Greco, L., Troncone, R., & Auricchio, R. (2015). **Discriminant score for celiac disease based on immunohistochemical analysis of duodenal biopsies**. Journal of pediatric

gastroenterology and nutrition, 60(5), 621–625. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000675.

58. Mubarak, A., Nikkels, P., Houwen, R., & Ten Kate, F. (2011). **Reproducibility of the histological diagnosis of celiac disease**. Scandinavian journal of gastroenterology, 46(9), 1065–1073. https://doi.org/10.3109/00365521.2011.589471.

59. Schiller, L. R., Pardi, D. S., Spiller, R., Semrad, C. E., Surawicz, C. M., Giannella, R. A., Krejs, G. J., Farthing, M. J., Sellin, J. H. (2014). **Gastro 2013 APDW/WCOG Shanghai working party report: chronic diarrhea: definition, classification, diagnosis**. Journal of gastroenterology and hepatology, 29(1), 6–25

60. Pagana, K.D., Pagana, T.J., Pagana T.N. (2021). **Mosby's Diagnostic And Laboratory Test Reference. (Fifteenth Edition)**. Printed in the United States of America. ISBN: 978-0-323-67519-2

61. **The WHO Child Growth Standards. https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards.**

62. Wong C. J. (2014). Involuntary weight loss. The Medical clinics of North America, 98(3), 625–643.

63. Hammo,S.H., Al-Nuaimy, W.M.T., Hayawi, M.A. (2021). **The Significance of CD3 Marker in the Diagnosis of Celiac Disease**. Annals of the College of Medicine, Mosul, 42(2), 99-108. doi: 10.33899/mmed.2020.128710.1055.

64. Mubarak, A., Wolters, V.M., Houwen, R.H., & ten Kate, F.J. (2015). **Immunohistochemical CD3 staining detects additional patients with celiac disease**. World journal of gastroenterology, 21(24), 7553–7557. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i24.7553.

65. Alhabbal, A., Abou Khamis, I., (2022). **Immunohistochemical analysis of intestinal biopsies in individuals with celiac disease**. JGH Open, 6: 692–695. https://doi.org/10.1002/jgh3.12807.

الملاحق

الملحق رقم (1) : استمارة البحث

استمارة بحث: دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية التشخيص في الداء الزلاقي وتصنيفاته وأهميتها العلاجية والانذارية							
رقم العينة						رقم الاستمارة	
العمر:	الجنس					هاتف:	
نوع العينة المرسلة						القسم المرسل:	
المعلومات السريرية المتوفرة:							
المعلومات المخبرية:	tTG:			Anti EMA:			
دراسة الخزعة بتلوين H&E:	March	0	I	II	IIIa	IIIb	IIIc
دراسة الخزعة بتلوين CD3:	العدد:			التوزع: تصاعدي/تنازلي			
	March	0	I	II	IIIa	IIIb	IIIc
التشخيص							
التشخيص وملاحظات							
ملاحظات:							

منظمة الاستمارة

شاهناز راغب الحلبية

الملحق رقم (2) : الموافقة المستنيرة

الموافقة المستنيرة على المشاركة في البحث الذي عنوانه

(دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية التشخيص في الداء الزلاقي وتصنيفاته وأهميتها العلاجية والإنذارية)

نحن بصدد إجراء بحث علمي عن (دور التلوينات المناعية في زيادة حساسية التشخيص في الداء الزلاقي وتصنيفاته وأهميتها العلاجية والإنذارية) في مستشفى المواساة والأسد الجامعيين بدمشق، وبناءً على ذلك ندعوكم للمشاركة في هذا البحث، ولكم مطلق الحرية في قبول ذلك أو رفضه.

لكن قبل اتخاذ قراركم نرجو منكم قراءة المعلومات الآتية:

- ✓ سـيُطَّلَعْ على معلومات من ملفكم الطبي من قبل الأطباء والباحثين المشـاركين في هذه الدراسـة وذلك بعلم إدارة المشفى.
- ✓ لن يتم نشر أية معلومات متعلقة بكم ذات طابع شخصي.
- ✓ في حال الموافقة على الدخول في الدراسـة سـتُتَابَع حالتكم وتُسـتَخدَمْ المعلومات الموجودة في الملف الطبي ضـمن الدراسـة وقد يتم سـؤالكم عن بعض المعلومات إن لم تكن واردة في الملف، كما ستُجرَى تحاليل مخبرية ودراسة نسيجية لخزعات الأمعاء.
- ✓ إن رفض الموافقة على الدخول في الدراسـة لن يؤثر في تدبير المرض خلال إقامتكم في المشفى، وستُعتَمَدْ الخطة العلاجية المتبعة تقليدياً في المشفى.

لقد قرأت المعلومات الواردة أعلاه وكانت لدي الفرصـة لأطرح الأسـئلة وحصـلت على إجابات مقنعة؛ لذلك أعلن موافقتي على الدخول في الدراسة.

اسم المشترك وتوقيعه: **اسم الطبيبة وتوقيعها:**

شاهناز راغب الحلبيه

Abstract

Background:
Celiac disease is a common autoimmune disease of the small intestine caused by sensitivity to gluten. There are many methods used in the diagnosis of celiac disease, and the histological study of a biopsy of the small intestine can reveal pathological changes in the epithelial layer.
Objective:
The research aims to study the role of immunohistochemical stainings in increasing the sensitivity of the histological study in the diagnosis of celiac disease.
Materials and methods:
Study design: **A Prospective-Retrospective Cross-Sectional Study,** including samples from intestinal biopsies of patients suspected of having celiac disease received by the pathology laboratory at Al-Mowasat Hospital and Al-Assad University Hospital during the period from 1/12/2021 to 1/12/2022.
Results:
The study included 200 patients (mean age 29.7 years, 67% female). Intraepithelial lymphocyte (IEL) count per 100 enterocytes using immunohistochemistry (IHC) by CD3 stainings was positive (≥30 IEL/100 epithelial cells) in 176 cases (88%) and its distribution was crescendo in 174 of them. IEL count by CD3 was positive in 21.4% of Marsh 0 cases and in 83.3% of Marsh I cases and in all Marsh II-III cases, the difference being statistically significant.
The use of IHC CD3 staining resulted in a change in the Marsh score classification of small bowel biopsy in 9 cases. The Marsh 0 classification changed to Marsh I in one case; and to Marsh II in five cases. The Marsh I classification changed to March 0 in three cases; and to March II in one case.
The classification of Marsh II-III did not change, so the rate of change in the classification of Marsh was 4.5% of all cases.
This change was a diagnosis of celiac disease in six additional cases that were not diagnosed using the traditional H&E staining. Therefore, the use of IHC CD3 staining increased the diagnostic sensitivity by 3%.
Conclusions:
The study showed that the use of immunohistochemistry by CD3 staining led to the diagnosis of more cases of celiac disease than the traditional H&E staining, especially in cases classified as Marsh 0-I.
Key words: Celiac disease, Intraepithelial Lymphocytes, Modified Marsh Classification, CD3 Immunohistochemistry.

Syrian Arab Republic
Ministry of High Education
Damascus University
Faculty of Medicine
Histopathology Department

The Role of Immunohistochemical Staining in Increasing Diagnostic Sensitivity of Celiac Disease and its Classifications and Prognostic and Therapeutic Significance

A dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Specialized Higher Studies Certificate in Histopathology

BY

Dr. Shahnaz Ragheb Alhalabieh

Supervisor

Prof. Dr. Freiz Ahmad

2023