مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الطبية المجلد (21) العدد (8) 1999
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research –Medical Science Series Vol. (21) No (8) 1999

دراسة مورفولوجية وكيميائية نسيجية مناعية تبين أن خلايا لانجرهانس في لثة الإنسان مشتقة من الخلايا وحيدة النواة

الدكتور حسين حمامي*

(ورد إلى المجلة في 1999/9/8، قبل للنشر في 1999/10/19)

□ الملخّص □

تلعب خلايا لانجرهانس دوراً مناعياً هاماً في اللثة وتعتبر من الخلايا المناعية العقدمة للمستضد CD1a (antigen – presenting) وتظهر خلايا لانجرهانس بكثرة في الطبقة الشائكة لظهارة اللثة خاصة أثناء الالتهابات اللثوية. وتعتبر الخلايا وحيدة النواة (moncytes) طليعة (precursor) خلايا لانجرهانس حيث تتشكل في نقي العظام (bone marrow) ثم تنتقل إلى الدم ومنه إلى ظهارة اللثة حيث تستقر. وتؤكد هذه الدراسة سواءً باستخدام الطرق النسيجية المورفولوجية أو الطرق الكيميائية النسيجية المناعية. لاسيما أن طريقة التلوين بأزرق التلويدين للمقاطع النسيجية شبه الدقيقة < 1 ميكرو متر (semifine sections) المدموجة بالإبون (epon) تظهر أن شكل خلايا لانجرهانس في ظهارة لثة الإنسان تتشبه تماماً شكل الخلايا وحيدة النواة ، كما أظهرت خلايا لانجرهانس تفاعلاً إيجابياً مناعياً وميضياً (immunofluorescence) مع المصل المضاد لـCD4 الخاص بالخلايا وحيدة النواة الأمر الذي يؤكد أن هذه الأخيرة هي سليفة خلايا لانجرهانس في ظهارة لثة الإنسان.

* أستاذ مساعد في قسم النسج و التشريح المرضي – كلية طب الأسنان – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية

مجلة جامعة تشرين للدراسات و البحوث العلمية - سلسلة العلوم الطبية المجلد (21) العدد (8) 1999
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research –Medical Science Series Vol. (21) No (8) 1999

Morphological and Immunohistochemical Evidence of the Origin of Human Gingival Langerhans Cells in Monocytes.

Dr. Hussein HAMMAMI*

(Received 8/9/1999, Accepted 19/10/1999)

❐ ABSTRACT ❐

Langerhans cells are CD_{a1} Antigen. They have a central role in epithelial immunity. The number of Langerhans cells may be normal significantly increased in gingival inflammation. The Precursor of Langerhans cells within peripheral blood are how recognized to be monocytes, derived from bone marrow. The results of this morphological and immunohistochemical study demostrated that Langerhans cells derived from monocytes. Langerhans cells in the gingival epithelium have exactly the same appearance as the monocyte form, especially on semifine sections (< 1μm) stained by toluidine blue. These cells are also CD_4 positive by immunofluorescence.

*Associate Professor, Department of Histology and pathology, Faculty of Dentistry, Tishreen University, Lattakia, Syria

المقدمة (introduction) :

يعتبر العالم لانجرهانس Paul langerhans أول من اكتشف خلايا لانجرهانس في الظهارة الجلدية عام1888 و بالتحديد في الطبقة الشائكة وذلك بعد تلوينها بصبغة الهيماتوكسلين ايوزين، حيث تتلون النواة بشدة بينما تكون السيتوبلازما نيرة (clear). لقد أظهرت الدراسات الحديثة باستخدام الطريقة الكيميائية النسيجية المناعية (Immuno Histochemical Methods) أن خلايا لانجرهانس تلعب دورا مناعيا هاما في هذه الظهارة، و يعتبر (Stingl et al,1978) أول من لاحظ أن خلايا لانجرهانس هي خلايا مقدمة للمستضد CD1a (– antigen presinting cells). كما لاحظ (Katz et al, 1979). أن خلايا لانجرهانس ذات قدرة محدودة على تجديد نفسها الذي يتوجب تزويد الظهارة باستمرار بهذه الخلايا عن طريق نقي العظام، خاصة أثناء الالتهابات لذلك تعتبر خلايا لانجرهانس خلايا مهاجرة من الدم إلى الظهارة الجلدية أو اللثوية وأن الخلايا وحيدة النواة (monocytes)هي سليفة خلايا لانجرهانس.

تمكن (Walsh et al, 1988) استخلاص المستضد CD 1a (antigen CD 1a) الموجود على سطح خلايا لانجرهانس الذي يعتبر الخطوة الأولى من مراحل إنضاج خلايا لانجرهانس. ويمكن تحثيث (induced) الخلايا وحيدة النواة كي تتحول إلى خلايا لانجرهانس بوساطة ما يعرف بالسيتوكينات مثل cytokines Gm-csf الذي يفرز من قبل الخلايا الظهارية بالإضافة إلى عامل التنكز الورمي TNF (cytokin tumour necrosis) دراسات (Rossi et al;1992 Caux et al; 1992; Kasinrenk et al; 1993) وأخيرا استطاع (ATHNASAS et al 1995) عزل خلايا لانجرهانس من ظهارة لثة بعض المرضى المصابين بالتهاب اللثة ثم عالجوا هذه الخلايا بالمصل المضاد CD 1a (induction of The CD 1a) وكذلك بالسيتوكينات تحت درجة حرارة منخفضة واستطاع بذلك إثبات أن الكريات الدموية البيضاء وحيدة النواة هي سليفة أو طليعة (precursor) خلايا لانجرهانس.

أن خلايا لانجرهانس من الخلايا المقدمة للمستضد حيث تحتوي في سطحها على مستقبلات المستضدات لمجموعة (M.H.C صنف II) التي من بينها المستضد CD 4 (cluster of differentiation) الذي يوجد أيضا على سطح الكريات الدموية البيضاء وحيدة النواة. لاحظنا من خلال هذه الدراسة نسيجيا بالمجهر العادي أن الكريات الدموية البيضاء وحيدة النواة هي بالفعل سليفة خلايا لانجرهانس وذلك باستخدام طريقة التلوين

بأزرق التلويدين للمقاطع النسيجية شبه الدقيقة (semifine sectione) المدموجة بالإبون حيث بدت خلايا لانجرهانس في لثة الإنسان تشبه تماما الخلايا وحيدة النواة

طرق الدراسة ومواد البحث : material and methods

تم الحصول على العينات النسيجية للثة من بعض الأشخاص المصابين بالتهابات لثوية في قسمي أمراض اللثة وجراحة الفم في كلية طب الأسنان بجامعة بوخارست كما أخذت عينة نسيجية من شخص سليم بعد القلع الجراحي.

تم تثبيت الخزع للثة التي هي لزوم طريقة الهيماتوكسلين ايوزين وطريقة الكيمياء النسيجية المناعية في محلول الفورمول 20 % لمدة 3 أيام ثم غسلت بالماء ومررت بالكحول الإيتيلي بدرجة 70 –96 % بثلاثة كؤوس لمدة 3-6 ساعات ثم أبعد الكحول بوساطة الزايلول مدة نصف ساعة بعدئذ تم تشريبها بشمع البارافين المنصهر بدرجة 55 درجة مئوية لمدة 90 دقيقة،وأخيرا أدمجت بالبارافين لتجهيز قوالب الشمع لزوم التقطيع بالميكروتوم.

a) طريقة الهيماتوكسلين ايوزين H & E

تم تقطيع المقاطع النسيجية اللثوية لزوم التلوين بطريقة الهيماتوكسلين ايوزين بوساطة الميكروتوم بسماكة 5 ميكرو متر ثم الصقت المقاطع النسيجية على الشرائح، بعدئذ لونت بطريقة الهيماتوكسلين ايوزين التي تبدأ بإزالة البارافين بواسطة الزايلول وذلك بثلاثة كؤوس لمدة خمس دقائق، ثم مررت بكحول مطلق مدة خمس دقائق، وكحول 96 % لمدة ثلاث دقائق، وكحول 70 % مدة ثلاث دقائق، ثم غطست بماء مقطر لفترة قصيرة بعدئذ لونت بالهيماتوكسلين مدة خمس دقائق، ثم غسلت بالماء الجاري مدة 15 دقيقة، ثم لونت بالايوزين لمدة دقيقة واحدة فقط وأخيرا مررت بالزايلول لبضعة دقائق بعد أن أصبحت المقاطع النسيجية جاهزة للقراءة والفحص أخذت الصور بوساطة المجهر الضوئي (: MicroScope optic NIKON – la bopot II athachment (microflex HFX – DX.

b) طريقة الكيمياء النسيجية المناعية (immunohisto chemical)

ثم تقطع المقاطع النسيجية اللثوية والمدموجة بالبرافين لزوم هذه الطريقة بوساطة الميكروتوم بسماكة 2 ميكرومتر ثم ألصقت على الشرائح الزجاجية وتبدأ هذه الطريقة بإزالة البارافين بوساطة الزايلول لمدة 10 دقائق، ثم تمرر بثلاثة كؤوس من الإيتانول 100% وإيتانول 75 % وإيتانول 50 % كل منها لمدة 10 دقائق، بعدئذ غطست بماء مقطر معقم لمدة 10 دقائق، وأخيرا أضيف المصل المضاد أو الضادات CD4 (antibodies) مع

محلول ملحي TBS ووضعت الشرائح في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ثم تم غسلها بماء مقطر، و تم فحصها بعد إضافة مادة الغلسيرين (anhydra glycerin) والساترات مباشرة بوساطة المجهر المناعي الومضاني (MicroPhot II NIKON for fluorescence)

c) طريقة التلوين بأزرق التلويدين للمقاطع النسيجية شبه الدقيقة (semifine sections) والمدموجة بالإبون .epon

تم تثبيت عينات اللثة الطازجة بحجم 1مم3 بمحلول 3 % فوسفات الغلوتار الدهيد (0.1 M; pH 7.4) لمدة 3 ساعات بدرجة 4 م° ثم غسلت بمحلول فيزيولوجي، وعولجت بعد التثبيت (post fixed) بمحلول 1 % حمض الاسميوم (pH 7.4) مع الكاكوديليت (cacodylate) بدرجة 4 م° بعدئذ تم تجفيف هذه العينات المثبتة بتراكيز متدرجة التسلسل من الإيتانول، ثم غطست في 1.2 بروبيلنوكسيد (1.2 propylenoxid وأدمجت في راتنج الإبون epon 812 resin { تستخدم عادة هذه الطريقة من أجل المجهر الإلكتروني }. ثم تم تقطيع العينات المدموجة بالإبون بوساطة جهاز التقطيع الفائق الدقة (ultratom- RMC- MT 700 U.S.A) . وذلك للحصول على مقاطع نسيجية بسماكة اقل من واحد ميكرو متر ثم ألصقت المقاطع النسيجية على الشريحة الزجاجية وأخيرا تم تلوينها بمحلول ازرق التلويدين 0.25- 0.50%. الذي يتألف من 0.25 أزرق التلويدين (toluidine blue MERK) و 0.25 غرام بوراكس (borax) و 100 مل ماء مقطر. بعد مزج المحلول تم تصفيته بشكل جيد ثم لونت هذه المقاطع بمحلول أزرق التلويدين لمدة تصل حتى دقيقة واحدة فقط، وأخيرا فحصت هذه المقاطع النسيجية الملونة بوساطة المجهر الضوئي : (microscope optic : NIKON-labophot II with athachment microplex HFX – DX) وأخذت الصور.

النتائج – (results)

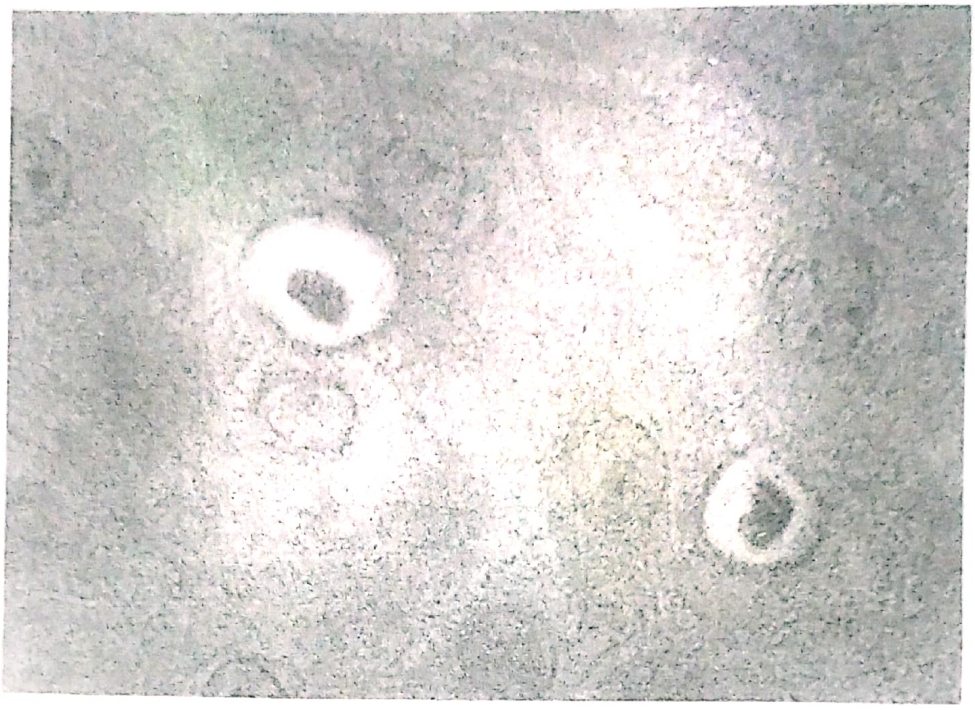
نستنتج من هذه الدراسة :

1 - إن طريقة الهيماتوكسلين أيوزين تسمح بإعطاء مؤشر عام حول وجود حالة التهابية لثوية أو كون الحالة سليمة، حيث بدت خلايا لانجرهانس بهذه الطريقة بشكل جيد أثناء وجود التهاب لثوي كما في الصورة رقم (1) بينما تكون خلايا لانجرهانس نادرة في حال كون اللثة سليمة صورة رقم(2)

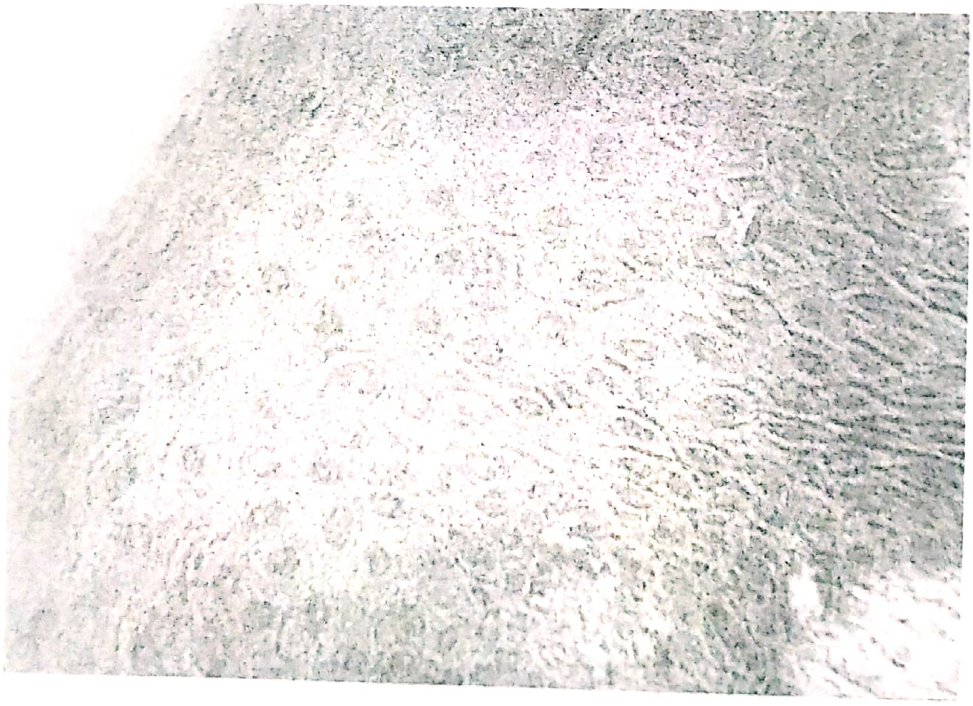
2 - يلاحظ أن خلايا لانجرهانس في اللثة أعطت تفاعلا إيجابيا لدى استخدام المصل المضاد لـ CD4 (antibody CD4) كما في الصورتين رقم (3) و (4) .وهذا يؤكد أن خلايا لانجرهانس هي وليدة الخلايا الدموية البيضاء وحيدة

النواة لاسيما أن المستضد CD4 يعتبر خاص بالخلايا وحيدة النواة بينما يكون التفاعل سلبياً عند عدم وجود خلايا لانجرهانس صورة (5) (حالة سليمة).

3 - يلاحظ لدى استخدام طريقة التلوين بأزرق التلويدين للمقاطع النسيجية اللثوية شبه الدقيقة المدموجة بالإبون أن خلايا لانجرهانس مورفولوجيا تشبه تماما الخلايا الدموية البيضاء وحيدة النواة كما يلاحظ في الصورتين (6) و (7) أن خلايا لانجرهانس تحتوي على نواة كلوية الشكل وكروماتين تشبه الخلايا وحيدة النواة كما يلاحظ حبيبات سيتوبلاسمية مما يؤكد نسيجيا أن الخلايا وحيدة النواة هي طليعة خلايا لانجرهانس. وكما لا حظنا بوساطة هذه الطريقة في النسيج الضام للثة خلية بدينة الصورة رقم (8).



صورة رقم (1) مقطع نسيجي في لثة ملتهبة يلاحظ خليتين لانجرهانس
و يلاحظ عدم احتوائها على الأشواك ملونة بـ H & E تكبير 100×

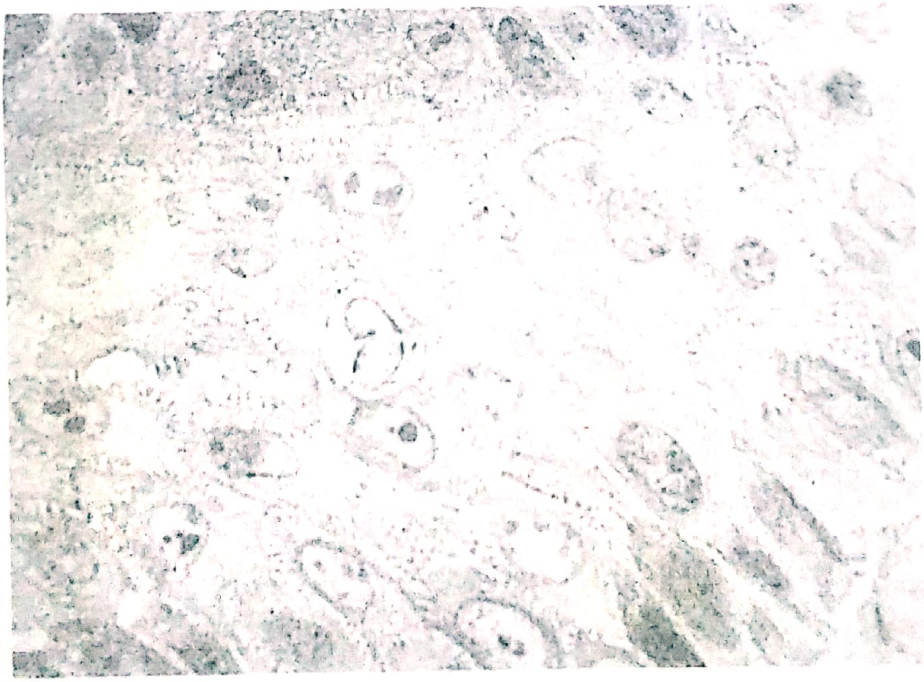


صورة رقم (2) مقطع نسيجي في لثة سليمة
بطريقة H & E بنسبة تكبير 40×

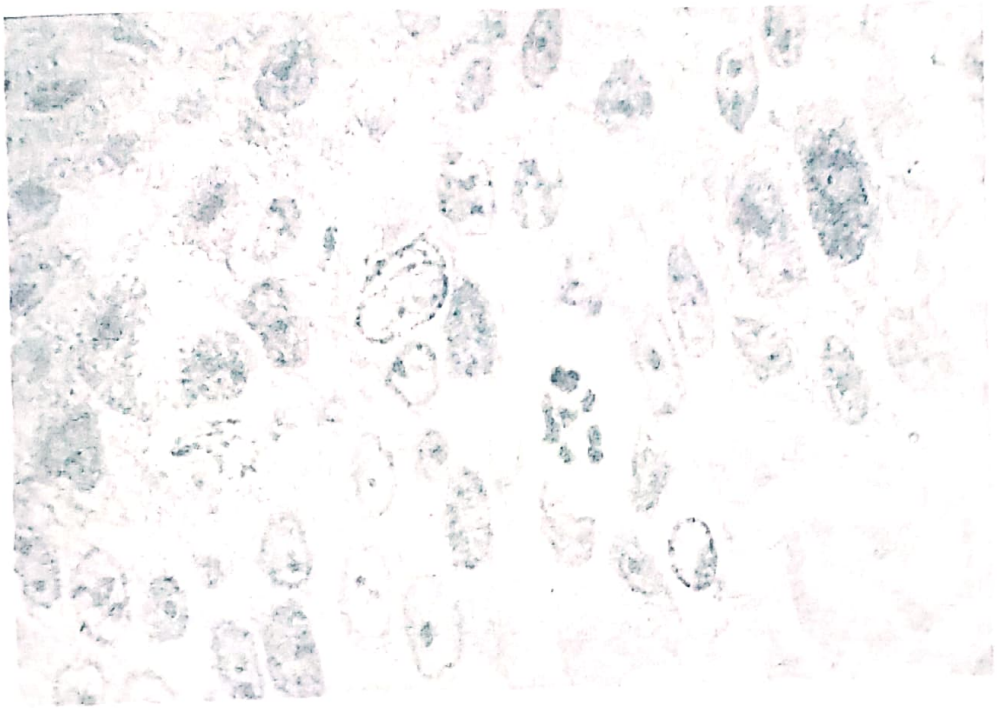
صورة رقم (3) تفاعل إيجابي لخلايا لانجرهانس بالمصل المضاد
لـــ CD4 ملتقطة بالمجهر الومضاني (لثلة ملتهبة) تكبير 40 ×

صورة رقم (4) تفاعل إيجابي لخلايا لانجرهانس للمصل
المضاد لـــ CD4 ملتقطة بالمجهر الومضاني تكبير 40 ×

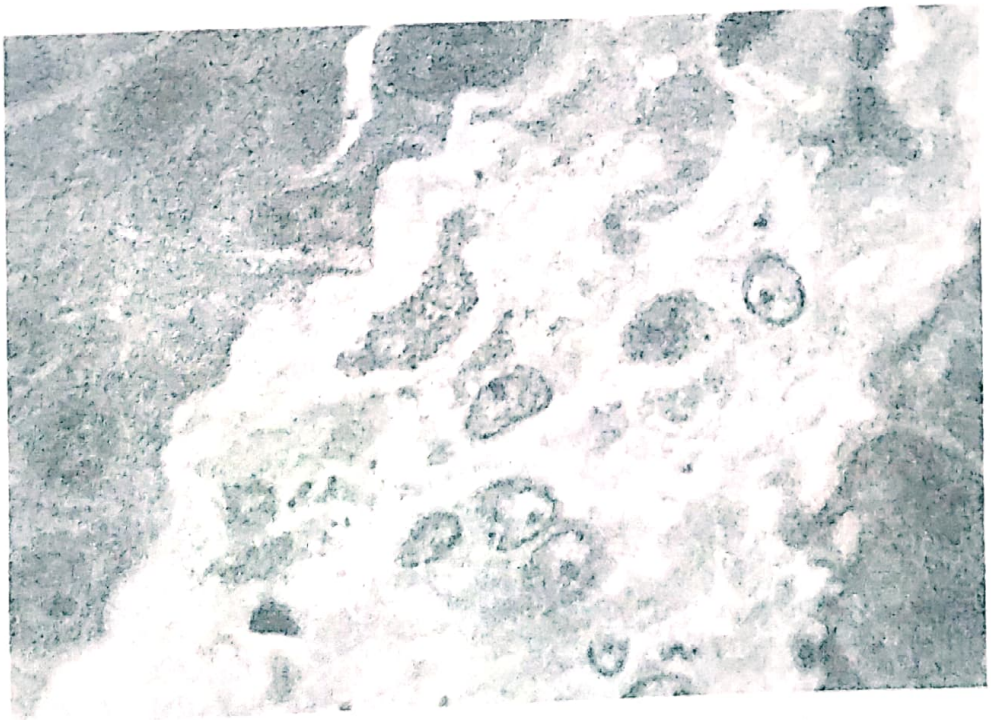
صورة رقم (5) تفاعل سلبي للمصل المضاد لـ CD4 ملتقطة بالمجهر الومضاني يلاحظ عدم وجود خلايا لانجرهانس (لثة سليمة) تكبير 40 ×



صورة رقم (6) مقطع نسيجي في ظهارة اللثة الملتهبة تظهر به خلية لانجرهانس في الطبقة الشائكة ذات نواة كلوية و كروماتين تشبه تماماً الخلية وحيدة النواة بطريقة التلوين بأزرق التلويدين تكبير 100 ×



صورة رقم (7) مقطع نسيجي في لثة ملتهبة تظهر به خلية لانجر هانس في الطبقة الشائكة للظهارة تحتوي على حبيبات في السيتوبلاسما طريقة التلوين بأزرق التلويدين للمقاطع الشبه الدقيقة تكبير 100 ×



صورة رقم (8) مقطع نسيجي في لثة ملتهبة يلاحظ فيه خلية بدينة في النسيج الضام ذات حبيبات كثيرة طريقة التلوين بأزرق التلويدين تكبير 100 ×

المناقشة : discussion

يلاحظ من نتائج هذه الدراسة سواء كانت بالطرق النسيجية أو الكيميائية النسيجية المناعية أن خلايا لانجرهانس تلعب دورا مناعياً هاماً في اللثة الأمر الذي يستدعي زيادة عددها بكثرة في حالة الالتهاب عنه في الحالة الطبيعية : (Stingl et al ,1978; Bhan et al , 1981 ; RegeziJa et al , 1992 ; Kasar et al , 1993 ; Porter & al,1997) تتشكل طلائع خلايا لانجرهانس في نقي العظام ثم تهاجر إلى الدم ومنه إلى الظهارة الجلدية أو اللثوية لتستقر في هذه الظهارة على هيئة غير نشيطة لمدة من الزمن وهذا يحدث باستمرار (Katz et al, 1979) ثم تنشط طلائع خلايا لانجرهانس بعملية البلعمة وتمر بأول مرحلة من مراحل الإنضاج مع توضع المستضد CD 1A على سطحها (Walsh et al, 1988) وهذا يتطابق مع نتائج هذه الدراسة، لاسيما أن خلايا لانجرهانس في الظهارة اللثوية أعطت تفاعلا إيجابيا للمصل المضاد لـ CD 4 الذي يوجد على سطح الخلايا وحيدة النواة والذي يعتبر خاص بها، ولكن من الجدير بالاهتمام أن هذه الدراسة وضحت نسيجيا (مورفولوجيا) باستخدام طريقة التلوين بأزرق التلويدين للمقاطع شبه الدقيقة والمدموجة بالإبون أن خلايا لانجرهانس تشبه تماما الخلايا الدموية البيضاء وحيدة النواة الأمر الذي يؤكد أن هذه الأخيرة هي طليعة خلايا لانجرهانس. نعتقد أن هذه الطريقة النسيجية سمحت بمشاهدة خلايا لانجرهانس بهذا الشكل ذلك لكون عينات اللثة من جهة مدموجة بالإبون الذي يسمح بأخذ مقاطع نسيجية بسماكة أقل من 1 ميكرومتر، كما نعتقد من جهة أخرى أن الخلايا الملتقطة هي بحالة غير نشطة أي لازالت في مرحلة الخلايا الدموية البيضاء وحيدة النواة وهذا يتطابق مع الدراسات النسيجية المناعية التي تؤكد أن الخلايا وحيدة النواة هي سليفة خلايا لانجرهانس

(Rossi et al. 1992; Caux et al , 1992 ; Kasinreck et al , 1993 ; Athanasas et al , 1995 ; Hiroshito et al , 1998)

النتيجة : conclusion

نستنتج من هذه الدراسة أن خلايا لانجرهانس تلعب دورا مناعيا هاما في اللثة لاسيما أنها من الناحية الكيميائية النسيجية المناعية والشكلية تشبه تماما الخلايا الدموية وحيدة النواة وهذه الأخيرة هي بحق طليعة خلايا لانجرهانس.

REFERENCES المراجع

- Athanasas S – Platsis; N.W.SavagE;Winning and L.J Walsh. Indruction of the CD1a Langerhans cell marker on Human monocyte. *Archs oral biol* (1995), 40: 157- 160.
- Bhan AK, Harrist T.J Murph G.F et al. T cell Subsets and Langerhans cells in Lichen planus in sit caracterisation using nonoclanal antibodies. Br J Dermatol (1981); 105; 617 – 22.
- Caux G, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D. and Banchercau T. GM-CSF and TNF – Cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells Nature (1992); 360,258-261.
- Hiroshito; toshitsuga Takekoshi; Mutsumi Miyauchi; Ikuko.O;Takashi.T; Hiromasa. N;Kazuchisa..Three – dimensional appearance of Langerhans cells in human gingival epithelium as revealed by confocal Laser scanning microscopy. *Archives of Oral Biology* (1998). 43: 741- 744.
- Katz, S.I., Tamaki K.and Sachs D.H. Epidermal langerhans cells are derived form cells which orginate in the bone marrow. *Nature* (1979); 282;328-326
- Kasinreck W, Baunruker T, Majdic O, Knapp W and Stochinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte – macrophage colony stimulating factor. *J Immunol* (1993), 150,579-584.
- Kasar. A Form L; Kahn H. Lymphocyte and macrophage subsets in active and inactive Lesion of Lichen planus. *Am. J. Dermatholpathol* (1993), 15; 217-233.
- Porter S.R.; Alun kirby;Irwin Olser and W. Barrett; London, U.K. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. *Oral surg oral pathol* (1997). 83,358 – 366.
- RegeziJa , Stewart Jc, Lioyd Rv, Headington J.J., Immunohistochemical staining of Langerhans cells phenotype form peripherial blood monocytes. *Immunol Lett* (1992);31,189-198.
- Rossi G, Dezutter-Dambuyant C, Schmit D. and banchercau T. Gm-CSF and TNF-cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells, *Nature* (1992); 360, 258- 261.
- Stingl G., Katz S.I., Clement L., Green I., and Shevech E.M., Immunologic function of labearing epidermal Langerhans cells. *J. Emmunol* (1978); 121; 2005 – 2013.
- Walsh L.J. , Seymour G.J and powell R.N Regulation of Langerhans cells, Dr and DQ antiexpression, an hypothesis *J.oral pathol* (1988); 17; 43-46.