

بررسی آزمون مهاجرت لوکوسیتی بوسیله ایمنوگلوبولین G طبیعی در پلی آرتريت روماتوئید

مجله فلام پزشکی

سال پنجم، شماره ۱، صفحه ۶۴، ۲۵۳۵

دکتر احمد مسعود*

۱- مقدمه

Lewis و Rich در سال ۱۹۳۲، برای اولین بار طرح In-vitro مهاجرت (Migration) ماکروفاژها را با استفاده از سلولهای حساس شده بر علیه توپر کولین پیشنهاد نمودند (۷). بعدها در سال ۱۹۶۲، George و Waughan آزمون بالارابکمک ماکروفاژهایی که در داخل لوله‌های موئین قرار داده، سپس آنها را در محیط کشت گذاشته بودند، عملاً نشان دادند و بدینوسیله شکل جدیدی از این نوع آزمایش مطرح گردید که بجای استفاده از explant های عضوی از سلولهای کارپرورد (Les cellules-competantes) استفاده شده بود (۶). چند سال بعد Bendixen, Soborg، بجای ماکروفاژها که تهیه آنها در انسان کمی مشکل بنظر میرسد از لوکوسیت‌های خونی در آزمون مهاجرت لوکوسیتی استفاده کردند (۸) و بدینوسیله آزمونی بوجود آمد که انجام آن در بیماریهای انسان ساده بنظر میرسید. از این تاریخ آزمون بالا بعنوان وسیله‌ای در تشخیص برخی بیماریهای ایمونولوژیک سلولی مورد استفاده قرار گرفت. علت این امر وجود سلولهای پیش حساس شده بر علیه پادگن اختصاصی بوده و عدم مهاجرت لوکوسیتی بعد از افزودن پادگن در محیط نیز بر همین اساس است. Gaarder و Froland (۴) برای اولین بار آزمون اخیر را در تشخیص پلی آرتريت روماتوئید بکار بردند. پادگنی که در انجام آزمایش فوق مورد استفاده قرار گرفت ایمنوگلوبولین G طبیعی بود که اهمیت آن در فیزیوپاتولوژی پلی-آرتريت روماتوئید آشکار است (۹). برای تحقیق مزبور ایمنوگلوبولین آگرگه (agregées) پادگن خوبی در تشخیص بیماری بود.

Glut و همکارانش (۳) با استفاده از ایمنوگلوبولین G طبیعی تحقیقات دیگری نیز در این زمینه نموده‌اند. ما برای انجام آزمایش از ایمنوگلوبولین G طبیعی انسان روی ۵۱ بیمار مبتلا به پلی-آرتريت روماتوئید استفاده نموده و نتایج حاصل را با عوامل بالینی و بیولوژیکی بیماری فوق مورد بررسی قرار داده‌ایم.

۲- روش و مواد لازم

افراد مورد آزمایش: آزمون مهاجرت لوکوسیتی نزد ۱۱۱ تن بقرار زیر انجام شده است:

افراد شاهد: افرادی که بعنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفته‌اند ۳۶ نفر اند که از مرکز انتقال خون Hotel-Dieu لیون فرانسه انتخاب گردیده‌اند. همه افراد فوق تحت کنترل بالینی و بیولوژیکی منظم قرار گرفته‌اند. ۲۴ تن آنها مرد و ۱۲ تن زن بوده‌اند. حد متوسط سن آنها ۴۶ سال (بین ۲۶ تا ۵۷ سال) بوده است. هیچکدام از نظر آزمون‌های سرولوژیکی بیماری پلی آرتريت روماتوئید نتایج مثبت نداشته‌اند.

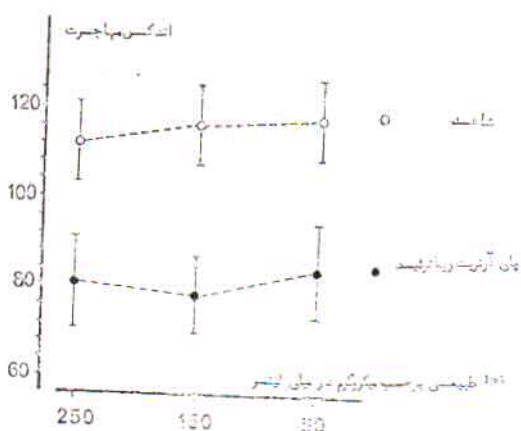
بیماران - از ۵۱ بیمار مبتلا به پلی آرتريت روماتوئید که بر اساس معیارهای LARA (۱) مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، ۱۵ تن مرد و ۳۶ تن زن بوده‌اند و سن متوسط آنها ۵۳ سال (بین ۲۰ تا ۸۰ سال) بوده است. ۲۳ تن آنها به آزمون Waaler-Rose پاسخ مثبت داده‌اند و بقیه پاسخ منفی داشته‌اند (عبارت مثبت Waaler-Rose از $\frac{1}{۳۳}$ بیلا محسوب شده است).

از طرف دیگر ۲۴ بیمار که مبتلا به ضایعات مفصلی غیر از پلی-آرتريت روماتوئید بوده‌اند بعنوان افراد شاهد بیمار مورد آزمایش

* دانشکده علوم پایه پزشکی - دانشگاه تهران.

میلی لیتر محیط کشت استفاده نموده ایم. اندکس مهاجرت لوکوسیتی در افراد مبتلا به پلی آرتريت روما توئید (۵۱ بیمار) با هر سه مقدار پادگن از نظر آماری رساتر از اندکس فوق در افراد شاهد است ($P < 0.001$) برعکس منحنی مقدار متوسط پادگن بین دو گروه فوق هیچگونه اختلاف قابل توجهی نشان نمیدهد (شکل ۱ و جدول ۱)

شکل ۱ تاثیر مقدار پادگن بر منحنی آنتی ژن (IgG طبیعی)



جدول ۱- متوسط اندکس مهاجرت لوکوسیتی برای سه مقدار مختلف پادگن (IgG طبیعی)

غلظت طبیعی بر حسب میکروگرم در میلی لیتر	اندکس مهاجرت	
	شاهد ۲۶ مورد	پلی آرتريت روما توئید ۵۱ مورد
۲۵۰	۱/۱۲ ± ۰/۸۱	۰/۸۱ ± ۰/۸۰
۱۵۰	۱/۱۶ ± ۰/۸۱	۰/۷۸ ± ۰/۰۹
۵۰	۱/۱۷ ± ۰/۰۹۵	۰/۸۴ ± ۰/۱۰

دقت در محاسبه آماری حدود ۵٪ است.

نتایج در پلی آرتريت روما توئید

اگر اندکس ۷۵٪ را بعنوان نتیجه مثبت برای مقدار ۱۵۰ میکروگرم پادگن در هر میلی لیتر محیط کشت در نظر بگیریم، ۳۷ بیمار یعنی ۷۲/۵٪ آنها پاسخ مثبتی ایجاد میکنند.

(۷۵٪ ≤ اندکس مهاجرت لوکوسیتی)

لازم به یادآوری است که در کلیه ۳۷ بیمار فوق لاقول دو مقدار از ۳ مقدار پادگن نتیجه مثبتی خواهند داد (با ۲۵۰ و ۱۵۰ میکروگرم و یا ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم پادگن در هر میلی لیتر محیط کشت) در ۳۳ بیمار که آزمون سرو لوژیک آنها مثبت بوده ۲۴ تن یعنی ۷۲/۷٪ آنها اندکس مهاجرت لوکوسیتی مثبت و در ۱۸ بیمار که آزمون سرو لوژیک آنها منفی بوده، ۱۳ تن یعنی ۷۲/۲٪ آنها اندکس مهاجرت لوکوسیتی مثبت داشته اند (جدول ۲). بنابراین بنظر نمی رسد که مثبت بودن اندکس مهاجرت لوکوسیتی، به مثبت بودن ویامنی بودن آزمون سرو لوژیک در بیماران ما بستگی داشته باشد زیرا درصد پاسخ مثبت اندکس

قرار گرفته اند. همه بیماران فوق از کلینیک روما تو لوژی بیمارستان Edward-Heriot لیون- فرانسه انتخاب شده اند و بهیچ وجه قبل از مشخص شدن نتایج آزمایشگاهی، تشخیص بالینی و بیولوژیکی آنها را نمی دانستیم.

پادگن مورد استفاده - پادگنی که استفاده نموده ایم IgG طبیعی انسان، Native یا non-denaturé بوده و در مرکز انتقال خون Rouen تهیه شده است. مقادیری که مورد استفاده قرار گرفته عبارتست از ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر محیط کشت.

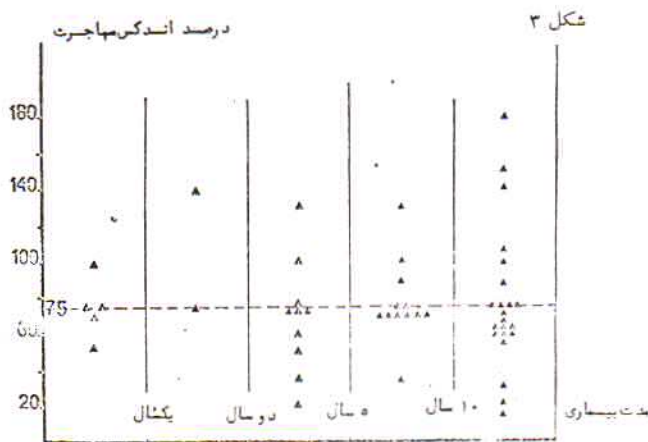
آزمون مهاجرت لوکوسیتی (Test migration leucocytaire)- روشی که استفاده نموده ایم تقریباً همان روشی است که بوسیله Bendixen و Soborg عرضه شده است (۸) و تغییراتی که بدان داده ایم عبارتند از استفاده از مقدار کمتری خون از یکطرف و تعداد لوله های موئی محتوی سلول از طرف دیگر برای تسهیل در برآوردهای آماری، بدین معنی که ۲۰ میلی لیتر از خون افراد را بطور استریل در حالیکه ۲۰۰ واحد هپارین برای هر میلی لیتر بدان اضافه نموده ایم برداشته سپس بمدت یکساعت آنرا در حرارت ۳۷ درجه اتوو قرار میدهم آنگاه محلول روئی را برداشته بمدت ۸ دقیقه با دور ۲۰۰ g سانتریفوژ نمودیم بعداً رسوب سلولی حاصل را ۳ بار با محلول Hanks شسته و آخرین بار رسوب حاصل را در محیط ۱۹۹ (انستیتو پاستور پاریس) بصورت سوسپانسیون در آورده و از محلول فوق برای انجام آزمایش استفاده نموده ایم. سوسپانسیون سلولی در داخل لوله های موئی قرار داده شده پس از بستن یکطرف لوله های موئی آنها را بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰ g سانتریفوژ کرده حد فاصل محلول روئی و رسوب سلولی حاصل را بریده و لوله های موئی را در داخل بوات دوپتری که محتوی یک میلی لیتر مایع ۱۹۹ بوده است، قرار داده ایم. در بوات دوپتری ها را بسته و آنها را بمدت ۲۴ ساعت در اتوو ۳۷ درجه گذاشتیم و پس از ۲۴ ساعت سطح مهاجرت سلولسی را بطریق Planimetric اندازه گرفتیم. برای هر آزمون ۱۶ بوات دوپتری آماده شده که ۴ عدد بدون پادگن و ۴ عدد در حضور سه مقدار (Dose) مختلف پادگن بوده اند و بدین ترتیب با استفاده از فرمول زیر اندکس مهاجرت لوکوسیتی را مشخص ساختیم.

$$100 \times \frac{\text{سطح مهاجرت سلولی در حضور پادگن}}{\text{سطح مهاجرت سلولی بدون حضور پادگن (شاهد)}} = \text{اندکس مهاجرت سلولی}$$

نتایج:

تأثیر مقدار پادگن (آنتی ژن)- همانطور که قبلاً گفتیم برای هر آزمایش از سه مقدار مختلف IgG طبیعی یعنی ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰ میکروگرم در

اندکس مهاجرت لوکوسیتی نزد افرادی که بیماریشان کمتر از ۵ سال است کمی ضعیف است (جدول ۳ و شکل ۳).



جدول ۳- مثبت شدن آزمون مهاجرت لوکوسیتی در ۵ مورد پلی آرتریت روماتوئید بر حسب مدت بیماری (کمتر یا بیشتر از ۵ سال)

مدت بیماری	تعداد موارد	متوسط اندکس مهاجرت	اندکس مهاجرت %۷۵	
			تعداد موارد	درصد موارد
کمتر از ۵ سال	۱۶	۰/۷۵	۱۲	۷۵
بیشتر از ۵ سال	۳۴	۰/۷۷	۲۵	۷۳/۶

آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر حسب سن بیماران

برای آنکه تأثیر سن بیمار را در آزمون مزبور بدانیم بیماران را به دو گروه کمتر از ۵۰ سال و بیشتر از ۵۰ سال تقسیم نمودیم. بنظر میرسد که در بیماران کمتر از ۵۰ سال درصد مثبت بودن آزمون بیشتر بوده و اندکس متوسط مهاجرت لوکوسیتی نیز در بیماران کمتر از ۵۰ سال ضعیف است ($P < 5\%$) بنظر نمیرسد که دوره تکامل بیماری در درجه ۴ یا در شدت مثبت بودن آزمون مؤثر باشد (جدول ۴ و شکل ۴).

جدول ۴- مثبت شدن آزمون مهاجرت لوکوسیتی در ۵۱ مورد پلی آرتریت روماتوئید بر حسب سن بیماران

سن	تعداد موارد	متوسط اندکس مهاجرت	اندکس مهاجرت %۷۵	
			تعداد موارد	درصد موارد
کمتر از ۵۰ سال	۲۲	۰/۶۸	۱۹	۸۶/۳
بیشتر از ۵۰ سال	۲۹	۰/۸۵	۱۸	۶۲

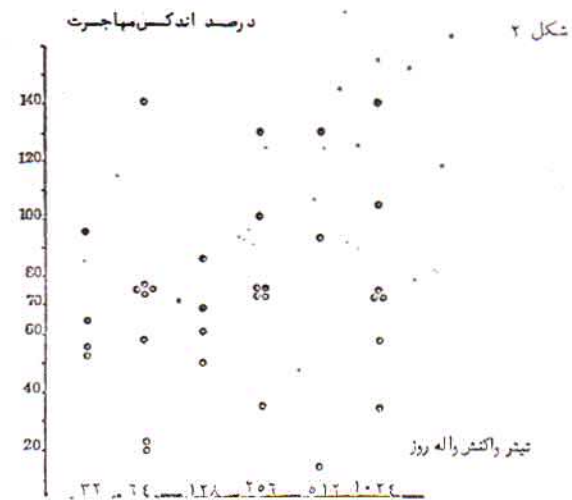
مهاجرت لوکوسیتی در گروه سرو لوژیک مثبت و سرو لوژیک منفی بیک اندازه است.

جدول ۲- رابطه بین آزمون سرو لوژیک و آزمون مهاجرت لوکوسیتی در ۵۱ مورد بیماری

	تعداد موارد	اندکس مهاجرت %۷۵	
		تعداد موارد	درصد
بیماران سرو لوژیک مثبت	۲۳	۲۴	۷۲/۷
بیماران سرو لوژیک منفی	۱۸	۱۳	۷۲/۲
جمع	۵۱	۳۷	۷۲/۵

آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر حسب واکنش Waler-Rose

در بیمارانی که آزمون سرو لوژیک «Waler-Rose» آنها مثبت بوده هیچگونه تناسبی بین عیار فوق و درجه همانند مهاجرت لوکوسیتی مشاهده نکردیم اما نزد کسانی که آزمون سرو لوژیکی آنها بطورضعیفی مثبت بوده، اندکس مهاجرت سلولی غالباً %۷۵ نیست. برعکس نزد بیمارانی که آزمون سرو لوژیک آنها قویاً مثبت است اندکس مهاجرت سلولی غالباً پایین تر از %۷۵ است. (شکل ۲)

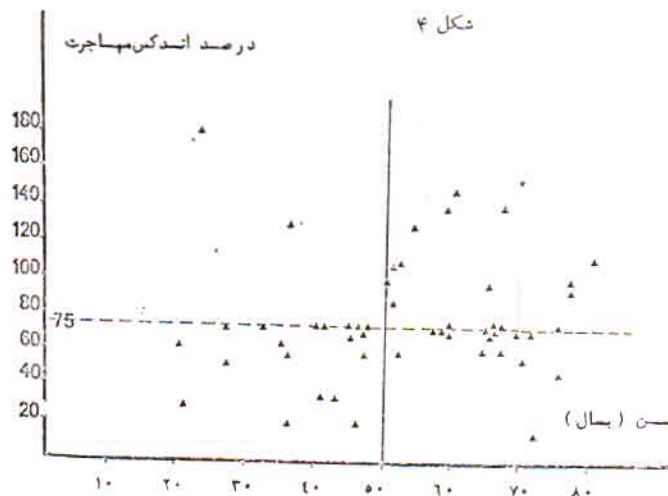


آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر حسب دوره تکامل بیماری

بین ۵۰ بیماری که دوره واقعی تکامل بیماریشان را می شناسیم ۱۶ تن تکاملی کمتر از ۵ سال و ۳۴ تن تکاملی بیش از ۵ سال دارند. بین این دو گروه درصد مثبت آزمون مهاجرت سلولی هیچگونه تفاوتی که از نظر آماری قابل توجه باشد وجود ندارد اما باین حال

نتایج در عفونت‌های مفصلی غیر از پلی آرتریت روماتوئید

در دومورد فقط اندکس مهاجرت لوکوسیتی کمتر یا مساوی ۷۵٪ دیده شد که یکی از آنها به chondrocalcinose و دیگری به Spondylarthritis ankylosante مبتلا بوده است. در یک مورد روماتیسم پزوریاتیک اندکس مهاجرت لوکوسیتی کمتر از ۷۵٪ برای مقادیر ۲۵۰ و ۵۰ میکروگرم پادگن در میلی لیتر محیط کشت بوده ولی برای مقدار ۱۵۰ میکروگرم اندکس مهاجرت لوکوسیتی برابر ۷۸٪ بوده است برعکس هیچگونه معانی در مهاجرت لوکوسیتی ۶ بیمار مبتلا به آرتروز، ۲ بیمار مبتلا به آرتریت سپتیک و ۹ بیمار مبتلا به عفونت‌های مختلف روماتیسمی بدون التهاب و همینطور نزد دیگر بیماران مبتلا به روماتیسم التهابی دیده نشد.



بحث:

مطالعه‌ای که توسط آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر روی ۵۱ بیمار انجام داده‌ایم، تحقیقات Gaarder و Froland (۵۴) را از یک طرف و کارهای Clot و همکارانش (۳) را از طرف دیگر تأیید میکند. محققان فوق نیز تأثیر IgG را بعنوان پادگن بر روی لوکوسیت‌های خونی بیماران مبتلا به پلی آرتریت روماتوئید مورد مطالعه قرار داده‌اند. چنانچه نتایج Clot را مورد دقت قرار دهیم ملاحظه خواهیم نمود اندکس مهاجرت لوکوسیتی که وی بعنوان مثبت بودن آزمون انتخاب کرد در ۸۰٪ است و در چنین شرایطی همه بیماران او که مبتلا به پلی آرتریت روماتوئید بوده‌اند پاسخ مثبتی داده‌اند ولی ما برای دقت بیشتر رقم ۷۵٪ را بعنوان اندکس مهاجرت لوکوسیتی انتخاب کردیم و آنهم بدینجهت بود که بر طبق برآوردهای آماری با احتساب دو Standard deviation و کاهش آن از میانگین اندکس مهاجرت سلولی - رقم ۷۵٪ بنظر ما صحیح تر است.

آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر حسب درجه پیشرفت بیماری

بعلمت کم بودن تعداد بیماران، ما نتوانستیم طبقه بندی Steinbrocker را با آزمون فوق تطبیق داده مطالعه کنیم فقط ضمن جدول (۵) نتایج حاصل را می نویسیم.

جدول ۵ - آزمون مهاجرت سلولی بر حسب دوره تکامل بیماری در ۴۲ مورد پلی آرتریت روماتوئید

دوره تکامل	تعداد موارد	اندکس مهاجرت < ۷۵٪	اندکس مهاجرت > ۷۵٪
I	۴	۴	۰
II	۹	۶	۳
III	۱۶	۱۰	۶
IV	۱۳	۱۰	۳

آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر حسب نشانه‌های بیولوژیکی التهاب
 بعنوان نمونه سرعت رسوب گلوبولی (۳۰ میلی متر در ساعت) را برای نشان دادن التهاب در زمان انجام آزمایش و هم چنین در همین موقع مقدار α_2 و گاما گلوبولین را که بوسیله الکتروفورز اندازه گرفته شده‌اند انتخاب نمودیم. نتیجه اینکه هیچگونه ارتباط مشترکی بین شدت عوامل فوق و درجه مثبت بودن اندکس مهاجرت لوکوسیتی مشاهده نکردیم.

آزمون مهاجرت لوکوسیتی بر حسب درمان

فقط یکی از بیماران ما در زمان انجام آزمایش از کلرامبوسیل (Chlorambucil) استفاده نموده بود که اندکس مهاجرت لوکوسیتی او نیز منفی شد. وانگهی هیچگونه رابطه‌ای بین آزمون مهاجرت لوکوسیتی و اشخاصیکه بوسیله داروهای ضد التهابی غیر کورتیکوئیدی و کورتیکوئیدی تحت درمان قرار می گرفتند مشاهده نشد.

بهر حال در چنین شرایطی ما ۷۲/۵٪ پاسخ مثبت در جمع بیماران خود خواهیم داشت. بنظر Gaarder و Froland (۵) ممانعت از مهاجرت لوکوسیتی در حضور IgG دناتورده (Denaturée) ارزش تشخیصی بیشتری از IgG طبیعی و دست نخورده خواهد داشت. میانگین اندکس مهاجرت لوکوسیتی در کارهای Froland ۶۶٪ و در تحقیقات Clot ۹۳٪ است در حالیکه میانگین همین اندکس در کارهای ما ۷۸٪ یعنی بین دو رقم فوق می باشد و رقمی است که به تحقیقات Brostoff و همکارانش (۲) که از IgG دناتورده استفاده نموده‌اند نزدیکتر است و به همین جهت ما در تحقیقات دیگری - که بعداً منتشر خواهد شد - روی همین بیماران اثر IgG طبیعی و دناتورده را با هم مقایسه کرده‌ایم. در حالیکه حدود ۳۰٪ از بیماران مبتلا به پلی آرتریت روماتوئید با آزمون مهاجرت لوکوسیتی پاسخ منفی داده‌اند

میکند زیرا همانطور که میدانیم فاکتور روماتوئید موجود در سرم چنین بیماران و حتی افراد عادی در سنین بالا افزایش مییابد.

خلاصه

آزمون مهاجرت لوکوسیتی در حضور IgG طبیعی انسان نزد ۵۱ بیمار مبتلا به پلی آرتريت روماتوئید و ۳۶ تن شاهد و ۲۴ تن مبتلا به دیگر عفونت‌های روماتیسمی غیر از پلی آرتريت روماتوئید انجام گرفت، هیچگونه همانندی در مهاجرت لوکوسیتی نزد افراد شاهد دیده نشد. اندکس مهاجرت لوکوسیتی مساوی یا کمتر از ۷۵٪ در ۷۲/۵٪ از افراد بیمار و در دو مورد روماتیسم التهابی دیده شد.

برای ما جالب بوده که بدانیم آیا بین عوامل بالینی و بیولوژیکی بیماران فوق و مثبت بودن آزمایش، ارتباطی وجود دارد یا نه؟ و آنطور که ما تحقیق نموده‌ایم (و این تحقیقات بوسیله برخی مؤلفان دیگر نیز با ثبات رسیده) هیچگونه ارتباطی بین آزمون مهاجرت لوکوسیتی و دوره تکامل بیماری و هم‌منظور مراحل رادیولوژیک - سرولوژیک، نشانه‌های بیولوژیک و التهاب و درمان مشاهده نشده‌ایم. سن بیماران مبتلا به پلی آرتريت روماتوئید در نتایج آزمون‌ها نمیتواند دخالت داشته باشد، بطوریکه ملاحظه نموده‌ایم آزمون فوق در بیماران کمتر از ۵۰ سال بیشتر مثبت بوده است و این موضوع ارزش آزمون را در تشخیص بیماری پلی آرتريت روماتوئید بازگو

REFERENCES.

1. American Rheumatism Association. «Diagnostic criteria for rheumatoid arthritis» Am Rheum. As., 18: 49, 1959.
- 2- Brostoff J., Howell A., Roitt I.M., «Leucocyte migration inhibition with aggregated gamma globulin in patients with Rheumatoid Arthritis» Clin. Exp. Immunol. 15: 1-7, 1973.
- 3- Lot J., Sany J., Serre H. Aspects de l'immunité à médiation cellulaire dans la Polyarthrite rhumatoïde. I - Etude et caractérisation de la réponse vis-à-vis des Immunoglobulines G non dénaturées, Path. Biol. 21: 465-70, 1973.
- 4- Froland S.S., Gaarder P.I. «Leucocyte migration inhibition induced by IgG in Rheumatoid Arthritis.» Lancet. 1: 1071-1072, 1971.
- 5- Froland S.S., Gaarder P.I. «The effect of IgG in vitro on leucocytes from patients with Rheumatoid Arthritis». Scand. J. Immunol., 2: 385-393, 1973.
- 6- George M., Vaughan J. «In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity». Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111: 514, 1962.
- 7- Rich. A.R., Lewis M.R. «The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies». Bull. Johns Hopkins Hosp. 50: 115, 1932.
- 8- Soborg M., Bendixen G. «Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensibility. Acta Med. Scand. 181: 247-256, 1967.
- 9- Ziff M. «Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis» Fed. Proc. 32: 131-133, 1973.