بررسی آزمون مهاجرت لوکوسیتی بوسیله ایمنوگلوبولین G طبیعی در پلی‌آرتریت روماتوئید

مجله نظام پزشکی
سال پنجم ، شماره ۱ ، صفحه ۶۴ ، ۲۵۳۵

دکتر احمد مسعود*

۱ـ مقدمه

Rich و Lewis درسال ۱۹۳۲، برای اولین‌بار طرح In-vitro مهاجرت (Migration) ماکروفاژها را با استفاده از سلولهای حساس شده برعلیه توبرکولین پیشنهاد نمودند(۷). بعدها درسال ۱۹۶۲، George و Waughan آزمون بالارا بکمك ماکروفاژهائی که در داخل لوله‌های موئین قرار داده، سپس آنها را در محیط کشت گذاشته بودند، عملا نشان دادندوبدینوسیله شکل‌جدیدی از این‌نوع آزمایش مطرح گردید که‌بجای‌استفاده از explant های عضوی‌ازسلولهای‌کارپرورد(Les cellules-competantes)استفاده شده‌بود(۶). چندسال بعد Soborg , Bendixen بجای‌ماکروفاژها که‌تهیه آنهادرانسان کمی‌مشکل‌بنظر میرسید ازلوکوسیت‌های‌خونی در آزمون مهاجرت لوکوسیتی استفاده کردند (۸) و بدینوسیله آزمونی بوجرد آمدکه انجام آن در بیماریهای انسان ساده بنظر میرسید. ازاین‌تاریخ آزمون بالابعنوان وسیله‌ای در تشخیص برخی بیماریهای‌ایمونولوژیك سلولی‌مورد استفاده قرار گرفت. علت‌این امر وجود سلولهـای پیش حساس شده برعلیه پادگن اختصاصی بوده و عدم مهاجرت لوکوسیتی بعد از افزودن پادگن در محیط نیز بر همین‌اساس‌است. Froland و Gaarder (۴) برای‌اولین‌بار آزمون اخیر را در تشخیص پلی آرتریت روماتوئید بکاربردند. پادگنی که در انجـام آزمـایش فوق مورد استفاده قرار گرفت ایمنوگلوبولین G طبیعی‌بودکه اهمیت‌آن درفیزیوپاتولوژی پلی‌آرتریت روماتوئیدآشکاراست(۹). برای‌تحقیق مزبور ایمنوگلوبولین‌آگرژه(agregées) پادگن خوبی در تشخیص بیماری بود. Clot و همکارانش (۳) بـا استفاده از ایمنوگلوبولینG طبیعی تحقیقات دیگری نیزدراین‌زمینه نموده‌اند. مابرای انجام‌آزمایش از ایمنوگلوبولین G طبیعی انسان روی ۵۱ بیمار مبتلا به پلی‌آرتریت رومـاتوئید استفاده نموده و نتایج حـاصل را باعوامل بالینی وبیولوژیکی بیماری فوق مورد بررسی قرار داده‌ایم .

۲ـ روش ومواد لازم

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

افراد شاهد : افرادی که‌بعنوان شاهدمورد استفاده قرار گرفته‌اند ۳۶ نفراندکه ازمرکز انتقال خون Hotel-Dieu لیون‌فرانسه انتخاب گردیده‌اند. همه‌افراد فوق تحت‌کنترل بالینی وبیولوژیکی منظم قـرار گرفته‌اند . ۲۴ تن‌آنها مرد و ۱۲ تن زن بوده‌اند. حد متوسط سن‌آنها ۴۶ سال (بین ۲۶ تا ۵۷ سال) بوده است . هیچکدام از نظر آزمون‌هـای سرولوژیکی بیماری پلی‌آرتریت روماتوئید نتایج مثبت نداشته‌اند .

بیماران ـ از ۵۱ بیمار مبتلا به‌پلی‌آرتریت روماتوئیدکه براساس معیارهای LARA (۱) مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، ۱۵ تن مرد و۳۶ تن زن بوده‌اند وسن متوسط‌آنها ۵۳ سال (بین ۲۰ تا ۸۰سال) بوده‌است. ۲۳ تن‌آنها به‌آزمون Waaler-Rose پاسخ مثبت داده‌اندوبقیه پاسخ منفی‌داشته‌اند(عیارمثبت Waaler-Rose از $\frac{۱}{۳۲}$ بیالا محسوب شده است).

از طرف دیگر ۲۴ بیمار کـه مبتلا به‌ضایعات مفصلی غیراز پلی‌آرتریت روماتوئید بوده‌اند بعنوان‌افراد شاهد بیماردرمورد آزمایش

* دانشکده علوم پایه پزشکی ـ دانشگاه تهران.

قرار گرفته‌اند. همه بیماران فوق از کلینیك روماتولوژی بیمارستان Edward-Heriot لیون- فرانسه انتخاب شده‌انـد و بهیچ وجه قبـل از مشخص شدن نتـایج آزمایشگاهی ، تشخیص بالینی و بیولوژیکی آنها را نمی‌دانستیم .

پادگن مورد استفاده - پادگنی که استفـاده نمـوده‌ایم IgG طبیعی انسان، Native یا non-denaturé بوده ودرمرکز انتقال خون Rouen تهیـه شده است . مقادیری که مورد استفاده قرار گرفته عبارتست از ۲۵۰، ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم درهرمیلی‌لیتر محیط کشت .

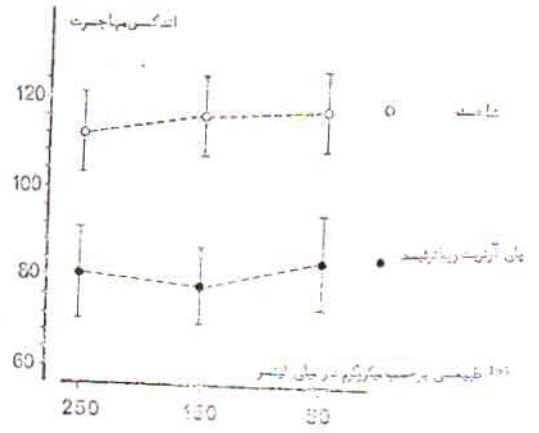
آزمون مهاجرت لوکوسیتی (Test migration leucocytaire)- روشی که استفاده نموده‌ایم تقریباً همان روشی است که بـوسیله Bendixen و Soborg عرضه شده است (۸) و تغییراتی که بدان داده‌ایم عبارتند ازاستفاده ازمقدارکمتری خون از یکطرف وتعدد لوله‌هـای موئی محتوی سلول از طرف دیگر برای تسهیل در برآوردهای آماری، بدین معنی که ۲۰ میلی‌لیتر از خون افرادرا بطور استریل درحالیکه ۲۰۰۰ واحد هپارین برای هرمیلی‌لیتر بدان‌اضافه نموده‌ایم برداشته سپس‌بمدت یکساعت آنرادرحرارت ۳۷درجه اتووقرارمیدهیم آنگاه محلول روئی‌را برداشته بمدت ۸ دقیقه با دور g ۲۰۰ سانتریفوژ نمودیم بعداً رسوب سلولی‌حاصل را ۳ بار با محلول Hanks شسته وآخرین بار رسوب حاصل را در محیط ۱۹۹ (انستیتو پـاستور پاریس) بصورت سوسپانسیون درآورده واز محلول فوق برای انجام‌آزمایش استفاده نموده‌ایم. سوسپانسیون سلولی در داخل لوله‌های موئی قرار داده شده پس از بستن یکطرف لوله‌های موئی آنها را بمدت ۱۰ دقیقه با دور g ۲۰۰ سانتریفوژکرده حد فاصل محلول روئی و رسوب سلولی حاصل را بریده ولوله‌هـای موئی را در داخل بوات دوپتری‌که محتوی یك‌میلی‌لیتر مایع۱۹۹ بوده‌است، قرار داده‌ایم. در بوات دوپتری‌ها را بسته و آنها را بمدت ۲۴ ساعت دراتوو ۳۷ درجه گذاشتیم و پس‌از ۲۴ ساعت سطح مهـاجرت سلولـی را بطریق Planimetrique اندازه گرفتیم. برای‌هرآزمون۱۶ بوات‌دوپتری آماده شده کـه ۴ عدد بدون پادگن و ۴ عدد درحضور سه مقدار (Dose) مختلف پادگن بوده‌اند و بدین ترتیب بـا استفاده از فرمول زیر اندکس مهاجرت لوکوسیتی را مشخص ساختیم.

$$\text{اندکس‌مهاجرت‌سلولی} = \frac{\text{سطح مهاجرت سلولی در حضور پادگن}}{\text{سطح مهاجرت سلولی بدون حضور پادگن (شاهد)}} \times ۱۰۰$$

نتایج :

تأثیرمقدارپادگن(آنتی‌ژن)-همانطورکه‌قبلاگفتیم‌برای‌هرآزمایش ازسه‌مقدارمختلف IgG طبیعی‌یعنی۲۵۰، ۱۵۰و۵۰میکروگرم‌در میلی‌لیترمحیط کشت استفاده نموده‌ایم. اندکس‌مهاجرت‌لوکوسیتی درافراد مبتلا به‌پلی‌آرتریت روماتوئید (۵۱ بیمار) باهرسه‌مقدار پادگن از نظرآماری رساتر از اندکس فوق درافراد شاهد است ($P<۰/۰۰۱$) برعکس منحنی‌مقدارمتوسط پادگن بین‌دوگروه فوق هیچگونه‌اختلاف قابل‌توجهی‌نشان نمیدهد(شکل۱وجدول۱)

شکل ۱ تاثیر مقادیر مختلف آنتی ژن (IgG طبیعی)



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

اندکس مهاجرت		غلظت طبیعی برحسب میکروگرم درمیلی‌لیتر
پلی‌آرتریت‌روماتوئید ۵۱ مورد	شاهد ۳۶ مورد	
۰/۸۱±۰/۱۰	۱/۱۲±۰/۸۱	۲۵۰۰
۰/۷۸±۰/۰۹	۱/۱۶±۰/۸۱	۱۵۰
۰/۸۴±۰/۱۰	۱/۱۷±۰/۰۹۵	۵۰

دقت درمحاسبه آماری حدود ۵٪ است.

نتایج در پلی آرتریت روماتوئید

اگر انـدکس ۷۵٪ را بعنوان نتیجه مثبت بـرای مقدار ۱۵۰ میکروگرم پادگن درهرمیلی‌لیتر محیط کشت درنظربگیریم، ۳۷ بیماریعنی۷۲/۵٪ آنها پاسخ مثبتی‌ایجاد میکنند

(۷۵٪≤ اندکس‌مهاجرت لوکوسیتی)

لازم به یادآوری است که درکلیه ۳۷ بیمار فوق لااقل دو مقـدار از ۳ مقـدار پادگن نتیجه مثبتی خواهند داد (یا ۲۵۰ و ۱۵۰ میکروگرم . و یا ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم پادگن درهرمیلی‌لیتر محیط کشت) در ۳۳ بیمـار که آزمون سرولوژیك آنهـا مثبت بوده ۲۴ تن یعنی ۷۲/۷٪ آنهـا اندکس مهاجرت لوکوسیتی مثبت و در ۱۸ بیمـار که آزمون سرولوژیك‌آنهـا منفی‌بوده، ۱۳ تن یعنی ۷۲/۲٪ آنهـا اندکس مهاجرت لوکوسیتی مثبت داشته‌اند (جدول۲). بنابراین‌بنظر نمیرسدکه مثبت بودن اندکس مهاجرت‌لوکوسیتی، به‌مثبت‌بودن ویامنفی‌بودن‌آزمون سرولوژیك در بیماران ما بستگی داشته باشد زیرا درصد پاسخ مثبت اندکس

مهاجرت لوکوسیتی در گروه سرولوژیك مثبت وسرولوژیك منفی بیك اندازه است .

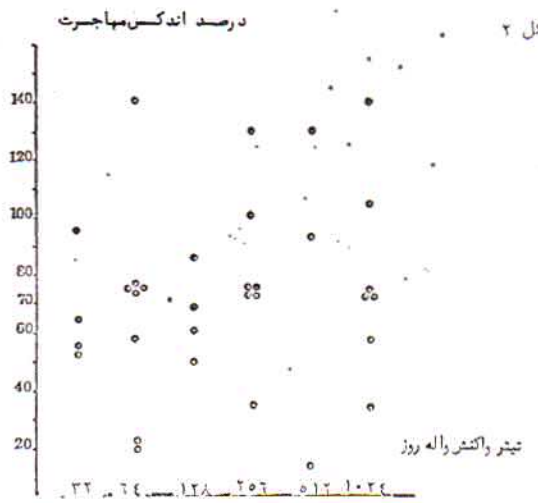
جدول ۲- رابطهٔ بین آزمون سرولوژیك وآزمون مهاجرت لوکوسیتی در ۵۱ مورد بیماری

پلی آرتریت روماتوئید	تعداد موارد	اندکس مهاجرت ۷۵٪	
		تعداد موارد	درصد
بیماران سرولوژیك مثبت	۳۳	۲۴	۷۲/۷
بیماران سرولوژیك منفی	۱۸	۱۳	۷۲/۲
جمع	۵۱	۳۷	۷۲/۵

آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب واکنش Waaler-Rose

در بیمارانی که آزمون سرولوژیك «Waaler-Rose» آنها مثبت بوده هیچگونه تناسبی بین عیار فوق و درجه ممانعت مهاجرت لوکوسیتی مشاهده نکردیم اما نزد کسانی که آزمون سرولوژیکی آنها بطورضعیفی مثبت بوده، اندکس مهاجرت سلولی غالباً ۷۵٪ نیست. برعکس نزد بیمارانی که آزمون سرولوژیك آنها قویاً مثبت است اندکس مهاجرت سلولی غالباً پائین‌تر از ۷۵٪ است . (شکل ۲)

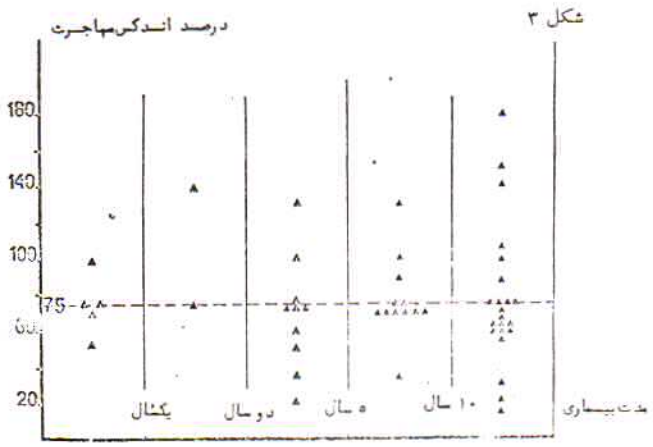
شکل ۲



آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب دوره تکامل بیماری

بین ۵۰ بیماری که دوره واقعی تکامل بیماریشان را می‌شناسیم ۱۶ تن تکاملی کمتراز 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 بااین حال اندکس مهاجرت لوکوسیتی نزد افرادی که بیماریشان کمتر از ۵ سال است کمی ضعیف است (جدول ۳ وشکل ۳).

شکل ۳



جدول ۳- مثبت شدن آزمون مهاجرت لوکوسیتی در ۵۰ مورد پلی‌ارتریت روماتوئید برحسب مدت بیماری (کمتر یا بیشتراز ۵ سال)

مدت بیماری	تعداد موارد	متوسط اندکس مهاجرت	اندکس مهاجرت ۷۵٪	
			تعدادموارد	درصدموارد
کمتراز۵سال	۱۶	۰/۷۵	۱۲	۷۵
بیشتراز۵سال	۳۴	۰/۷۷	۲۵	۷۳/۶

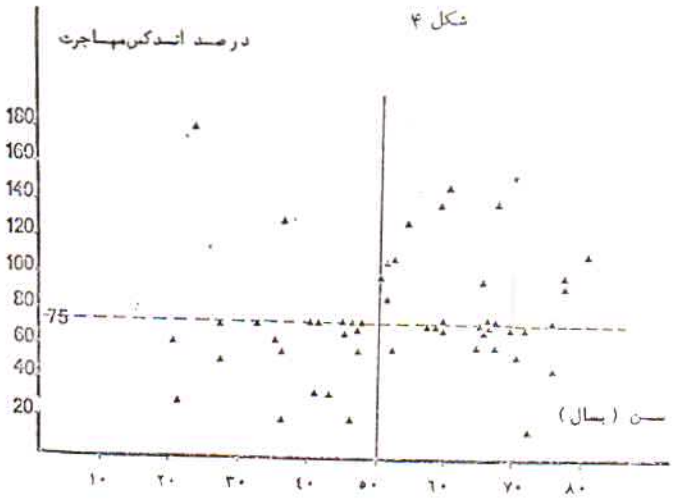
آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب سن بیماران

برای آنکه تأثیر سن بیمار را درآزمون مزبوربدانیم بیماران را به‌دو 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 ۵۰سال ضعیف است ($P<5\%$) بنظر نمیرسد که دوره تکامل بیماری در درجه و یا در شدت مثبت بودن آزمون مؤثر باشد (جدول ۴ وشکل ۴).

جدول ۴- مثبت شدن آزمون مهاجرت لوکوسیتی در ۵۱ مورد پلی‌ارتریت روماتوئید برحسب سن بیماران

سن	تعداد موارد	متوسط اندکس مهاجرت	اندکس مهاجرت ۷۵٪	
			تعداد موارد	درصد موارد
کمتراز۵۰سال	۲۲	۰/۶۸	۱۹	۸۶/۳
بیشتراز۵۰سال	۲۹	۰/۸۵	۱۸	۶۲

شکل ۴



آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب درجه پیشرفت بیماری

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

جدول ۵ - آزمون مهاجرت سلولی برحسب دورهٔ تکامل بیماری در ۴۳ مورد پلی‌ارتریت روماتوئید

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

آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب نشانه‌های بیولوژیکی التهاب

بعنوان نمونه سرعت رسوب گلبولی (۳۰ میلی‌متر 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 شدا انتخاب نمودیم. نتیجه اینکه هیچگونه ارتباط مشترکی بین شدت عوامل فوق ودرجه مثبت بودن اندکس مهاجرت لوکوسیتی مشاهده نکردیم.

آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب 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 واشخاصیکه بوسیله داروهای ضدالتهابی غیر کورتیکوئیدی و کورتیکوئیدی تحت درمان قرار میگرفتند مشاهده نشد.

نتایج درعفونت‌های مفصلی غیراز پلی‌آرتریت روماتوئید

در دومورد فقط اندکس مهاجرت لوکوسیتی کمتر یامساوی ٪۷۵ دیده شد که یکی از آنها به chondrocalcinose و دیگری به Spondylarthrite ankilosante مبتلا بوده است. در یك مورد روماتیسم پزورياتيك اندکس مهاجرت لوکوسیتی کمتر از ٪۷۵ برای مقادیر ۲۵۰ و ۵۰ میکروگرم پادگن در میلی‌لیتر محیط کشت بوده ولی برای مقدار ۱۵۰ میکروگرم اندکس مهاجرت لوکوسیتی برابر ٪۷۸ بوده است برعکس هیچگونه ممانعتی در مهاجرت لوکوسیتی ۶ بیمار مبتلا به آرتروز، ۲ بیمار مبتلا به آرتریت سپتیك 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 برروی ۵۱ بیمار انجام داده‌ایم، تحقیقات Froland و Gaarder (۵و۴) را ازیك طرف و کارهای Clot و همکارانش (۳) را از طرف دیگر تأئید میکند. محققان فوق نیز تأثیر IgG را بعنوان پادگن برروی لوکوسیت‌های خونی بیماران مبتلا به پلی‌آرتریت روماتوئید مورد مطالعه قرارداده‌اند. چنانچه نتایج Clot را مورد دقت قراردهیم ملاحظه خواهیم نمود اندکس مهاجرت لوکوسیتی که وی بعنوان مثبت بودن آزمون انتخاب کرده رقم ٪۸۰ است ودرچنین شرایطی همه بیماران او که مبتلا به پلی‌آرتریت روماتوئید بوده‌اند پاسخ مثبتی داده‌اند ولی ما برای دقت بیشتر رقم ٪۷۵ را بعنوان اندکس مهاجرت لوکوسیتی انتخاب کردیم و آنهم بدینجهت بود که برطبق برآوردهای آماری با احتساب دو Standard deviation وکاهش آن از میانگین اندکس مهاجرت سلولی - رقم ٪۷۵ بنظر ما صحیح‌تر است.

بهرحال درچنین شرایطی ما ٪۷۲/۵ پاسخ مثبت درجمع بیماران خود خواهیم داشت. بنظر Froland و Gaarder (۵) ممانعت از مهاجرت لوکوسیتی درحضور IgG دناتوره (Denaturée) ارزش تشخیصی بیشتری از IgG طبیعی و دست نخورده خواهد داشت. میانگین اندکس مهاجرت لوکوسیتی درکارهای Froland ٪۶۶ ودر تحقیقات Clot ٪۹۳ است درحالیکه میانگین همین اندکس درکارهای ما ٪۷۸ یعنی بین دو رقم فوق میباشد و رقمی است که به تحقیقات Brostoff وهمکارانش (۲) که از IgG دناتوره استفاده نموده‌اند نزدیکتر است وبهمین جهت ما درتحقیقات دیگری - که بعداً منتشر خواهد شد - روی همین بیماران اثر IgG طبیعی ودناتوره را با هم مقایسه کرده‌ایم. درحالیکه حدود ٪۳۰ از بیماران مبتلا به پلی‌آرتریت روماتوئید با آزمون مهاجرت لوکوسیتی پاسخ منفی داده‌اند

برای ما جالب بوده که بدانیم آیا بین عوامل بالینی و بیولوژیکی بیماران فوق ومثبت بودن آزمایش، ارتباطی وجود دارد یـا نه ؟ وآنطور که ما تحقیق نموده‌ایم (واین تحقیقات بوسیله برخی مؤلفان دیگر نیز باثبات رسیده) هیچگونه ارتباطی بین آزمون مهاجرت لوکوسیتی ودوره تکامل بیماری وهمینطور مراحل رادیولوژیك ـ سرولوژیك ـ نشانه‌های بیولوژیك والتهاب ودرمان مشاهده ننموده‌ایم. سن بیماران مبتلا به پلی آرتریت روماتوئید در نتایج آزمون نهامیتواند دخالت داشته باشد ، بطوریکه ملاحظه نموده‌ایم آزمون فوق در بیماران کمتر از ۵۰ سال بیشتر مثبت بوده است و این موضوع ارزش آزمون را درتشخیص بیماری پلی آرتریت روماتوئید بازگو میکند زیرا همانطور که میدانیم فاکتور روماتوئید موجود درسرم چنین بیماران و حتی افراد عادی درسنین بالا افزایش مییابد .

خلاصه

آزمون مهاجرت لوکوسیتی در حضور IgG طبیعی انسان نزد ۵۱ بیمار مبتلا به‌پلی آرتریت روماتوئید و ۳۶ تن شاهد و ۲۴ تن مبتلا به‌دیگر عفونتهای روماتیسمی غیر از پلی آرتریت روماتوئید انجام گرفت، هیچگونه ممانعتی درمهاجرت لوکوسیتی نزد افراد شاهد دیده نشد. اندکس مهاجرت لوکوسیتی مساوی یاکمتر از ۷۵% در ۷۲/۵% از افراد بیمار و در دو مورد روماتیسم التهابی دیده شد .

REFERENCES:

1. American Rheumatism Association. «Diagnostic criteria for rheumatoïd 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 Rhumatoïd 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 Rheumatoïd Arthritis.» Lancet. 1: 1071_1072, 1971.
5- Froland S.S., Gaarder P.I. «The effect of IgG in vitro on leucocytes from patients with Rheumatoïd 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 parametor of hypersensibility. Acta Med. Scand. 181: 247_256, 1967.
9- Ziff M. «Pathophysiology of Rheumatoïd Arthritis» Fed. Proc. 32: 131_133, 1973.