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

مجله نظام پزشکی

سال پنجم ، شماره ۱ ، صفحه ۶۴ ، ۲۵۳۵

دکتر احمد مسعود*

۱ـ مقدمه

Rich و Lewis درسال ۱۹۳۲، برای اولین بار 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 عضوی‌ازسلولهای کارپرورد(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 بوجود 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 قرارگرفته‌اند ۳۶ نفراندکه ازمرکز انتقال خون Hotel-Dieu لیون‌فرانسه انتخاب گردیده‌اند. همه‌افراد فوق تحت‌کنترل‌بالینی 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 از۵۱بیمار مبتلا به‌پلی‌آرتریت روماتوئیدکه براساس معیارهای LARA (۱) مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، ۱۵ تن مرد و۳۶ تن زن بوده‌اند وسن متوسط‌آنها ۵۳ سال (بین۲۰ تا ۸۰سال) بوده‌است. ۲۳ تن‌آنها به‌آزمون Waaler-Rose پاسخ مثبت داده‌اندوبقیه پاسخ منفی‌داشته‌اند(عیارمثبت Waaler-Rose از $\frac{1}{32}$ ببالا محسوب شده است).

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

* دانشکده علوم پایه پزشکی ـ دانشگاه تهران.

[Downloaded from jmciri.ir on 2024-10-13]

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

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

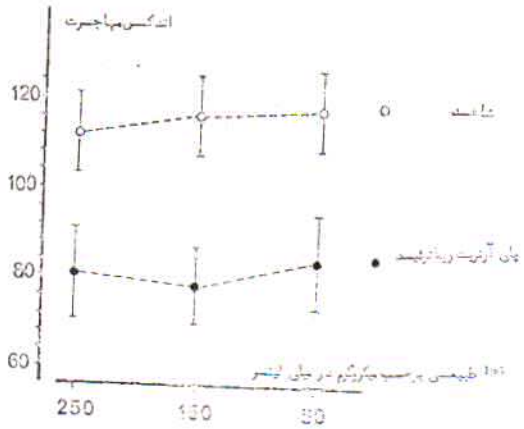
آزمون مهاجرت لوکوسیتی (Test migration leucocytaire)- روشی که استفاده نموده‌ایم تقریباً همان روشی است که بوسیله Bendixen و Soborg عرضه شده است (۸) و تغییراتی که بدان داده‌ایم عبارتند ازاستفاده ازمقدارکمتری خون از یکطرف وتعدد لوله‌های موئی محتوی سلول از طرف دیگر برای تسهیل در برآوردهای آماری، بدین معنی 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 پاستور 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 سانتریفوژ کرده حد فاصل محلول روئی و رسوب سلولی حاصل را بریده ولوله‌های موئی را در داخل بوات دوپتری که 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 مهاجرت سلولی را بطریق Planimetrique اندازه گرفتیم. برای‌هر آزمون۱۶ بوات‌دوپتری آماده شده که ۴ عدد بدون پادگن و ۴ عدد درحضور سه مقدار (Dose) مختلف پادگن بوده‌اند و بدین ترتیب با استفاده از فرمول زیر اندکس مهاجرت لوکوسیتی را مشخص ساختیم.

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

نتایج :

تأثیر مقدار پادگن (آنتی‌ژن)- همانطور که‌قبلا گفتیم برای‌هر آزمایش ازسه‌مقدارمختلف IgG طبیعی‌یعنی ۲۵۰، ۱۵۰و۵۰میکروگرم‌در میلی‌لیترمحیط کشت استفاده نموده‌ایم. اندکس‌مهاجرت‌لوکوسیتی درافراد مبتلا به‌پلی‌آرتریت روماتوئید (۵۱ بیمار) باهرسه‌مقدار پادگن از نظر آماری رساتر از اندکس فوق درافراد شاهد است ($P<۰/۰۰۱$) برعکس منحنی‌مقدارمتوسط پادگن بین‌دوگروه فوق هیچگونه‌اختلاف قابل‌توجهی نشان نمیدهد(شکل۱وجدول۱)

شکل ۱ تاثیر مقادیر مختلف آنتی ژن (IgG طبیعی)



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

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

دقت درمحاسبه آماری حدود ۵٪ است.

نتایج درپلی‌آرتریت روماتوئید

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

(اندکس‌مهاجرت لوکوسیتی ≤۷۵٪)

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

[Downloaded from jmciri.ir on 2024-10-13]

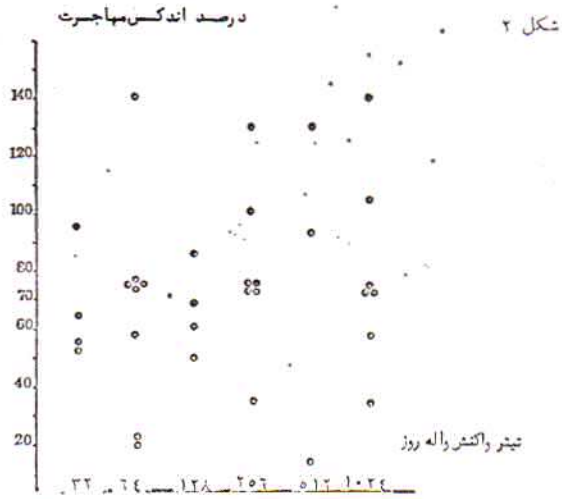
مهاجرت لوکوسیتی در گروه سرولوژیك مثبت وسرولوژیك منفی بیك اندازه است .

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

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

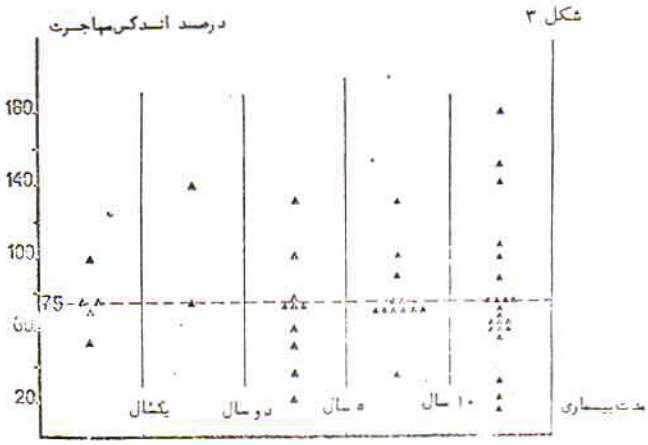
آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب واکنش Waaler-Rose

در بیمارانی که آزمون سرولوژیك «Waaler-Rose» آنها مثبت بوده هیچگونه تناسبی بین عیار فوق و درجه ممانعت مهاجرت لوکوسیتی مشاهده نکردیم اما نزدکسانی 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)



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 بیش‌از ۵ سال دارند. بین این دو گروه درصد مثبت آزمون مهاجرت سلولی هیچگونه تفاوتی که‌ازنظر آماری قابل‌توجه‌باشد وجود ندارد اما بااین‌حال اندکس مهاجرت لوکوسیتی نزد افرادی‌که بیماریشان کمتر از ۵ سال است کمی ضعیف‌است (جدول ۳ وشکل۳).



جدول ۳- مثبت شدن آزمون مهاجرت لوکوسیتی در۵۰ مورد پلی‌ارتریت روماتوئید برحسب مدت بیماری (کمتر یا بیشتراز ۵ سال)

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

آزمون مهاجرت لوکوسیتی برحسب سن بیماران

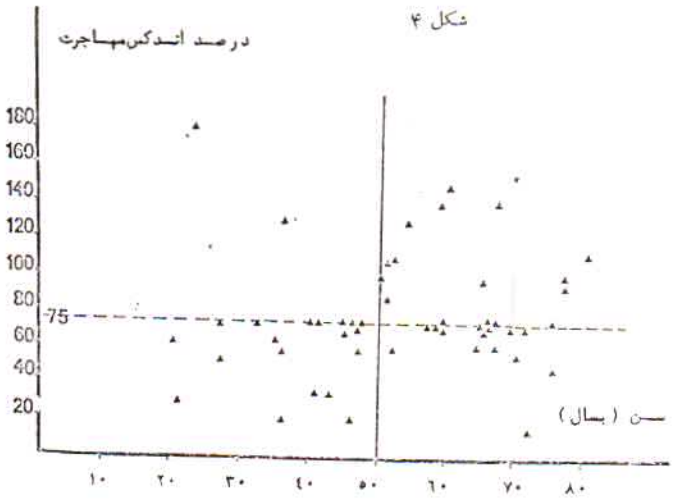
برای‌آنکه تأثیر سن بیمار را درآزمون مزبوربدانیم بیماران را بدوگروه کمتر از ۵۰ سال و بیشتر از۵۰ سال تقسیم نمودیم . بنظر میرسد که در بیماران کمتر از ۵۰ سال درصد مثبت بودن آزمون بیشتر بوده و اندکس متوسط مهاجرت لوکوسیتی نیز در بیماران کمتر از۵۰سال ضعیف است ($P<5\%$) بنظر نمیرسدکه دوره تکامل بیماری در درجه 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

[Downloaded from jmciri.ir on 2024-10-13]

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 ۴۲ مورد پلی ارتریت 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 برحسب نشانه‌های بیولوژیکی التهاب

بعنوان نمونه سرعت رسوب گلبولی (۳۰ میلی متر درساعت) 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 نتخاب 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 وکورتیکوئیدی تحت درمان قرار میگرفتند مشاهده نشد.

نتایج درعفونت‌های مفصلی غیراز پلی آرتریت 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 پزوریاتیك 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 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 پلی آرتریت 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 پلی آرتریت روماتوئید بوده‌اند پاسخ مثبتی داده‌اند ولی ما برای دقت بیشتر رقم ۷۵٪ را بعنوان اندکس مهاجرت لوکوسیتی انتخاب کردیم وآنهم 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 دورقم فوق میباشد ورقمی است که به تحقیقات Brostoff وهمکارانش (۲) که از IgG دناتوره استفاده نموده‌اند نزدیکتر است وبهمین جهت ما درتحقیقات دیگری ـ که بعداً منتشر خواهد شد ـ روی همین بیماران اثر IgG طبیعی ودناتوره را با هم مقایسه کرده‌ایم. درحالیکه حدود ۳۰٪ ازبیماران مبتلا به پلی آرتریت روماتوئید با آزمون مهاجرت لوکوسیتی پاسخ منفی داده‌اند

[Downloaded from jmciri.ir on 2024-10-13]

برای ما جالب بوده که بدانیم آیا بین عوامل بالینی و بیولوژیکی بیماران فوق ومثبت بودن آزمایش، ارتباطی وجود دارد یا 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 رادیولوژیک - سرولوژیک - نشانه‌های بیولوژیک والتهاب ودرمان مشاهده ننموده‌ایم. سن بیماران مبتلا به پلی آرتریت روماتوئید در نتایج آزمونها میتواند 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 آرتریت روماتوئید باز گو 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 به پلی آرتریت روماتوئید و ۳۶ تن شاهد و ۲۴ تن مبتلا به دیگر عفونتهای روماتیسمی غیر از پلی آرتریت روماتوئید انجام گرفت، هیچگونه ممانعتی درمهاجرت 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 .

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.

[Downloaded from jmciri.ir on 2024-10-13]