

بررسی مقدار طبیعی مکمل (Complement) در افراد سالم

مجله نظام پزشکی

سال پنجم، شماره ۴، صفحه ۳۱۶، ۲۵۳۵

دکتر نوشین فروزانفر - دکتر فریدون علاء - احمد قوامی نژاد *

مقدمه :

مکمل سابقاً فقط بعنوان عامل کمکی در همولیز گلبولهای قرمز پوشیده از پادتن شناخته میشد. ولی اکنون معلوم شده که این عامل تنها يك ماده نیست؛ بلکه بصورت مجموعه‌ای از عوامل آنزیمی است که اعمال فیزیولوژیائی آن کاملاً با آنچه در سابق شناخته میشد، متفاوت است.

این عوامل آنزیمی با علامت اختصاری C نامیده میشوند و بترتیب از C1 تا C9 شماره گذاری شده‌اند. C1 یا مکمل يك، خود از سه واحد تشکیل شده است: C1q و C1r و C1s. بنابراین در مجموع، دستگاه مکمل از یازده عامل آنزیمی تشکیل شده است. بطور خلاصه، فعال شدن این عوامل آنزیمی باین ترتیب است که عامل اول یا C1 فعال می‌شود و این فعالیت تا C9 پیش میرود تا منجر به همولیز شود (۱). این طریق فعالیت دستگاه مکمل را فعالیت از راه اصلی یا کلاسیک مینامند (۱).

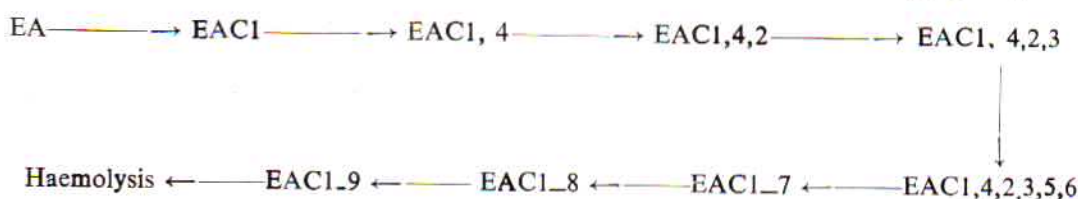
باید خاطر نشان ساخت که وقتی این آنزیم‌ها فعال میشوند، ترتیب فعالیت مطابق با ترتیب شماره گذاری نیست. بدین معنی که فعالیت C1 منجر به فعالیت C4 سپس C2 و بعد C3 می‌شود. بعد از C3 نوبت فعالیت C5 فرامیرسد. سپس فعالیت بترتیب شماره گذاری پیش میرود.

اخیراً راه فرعی برای فعالیت مکمل کشف شده است و آن بدین ترتیب است که عوامل دیگری غیر از C1، C4 و C2 موجب فعالیت مستقیم C3 میشوند و بقیه راه بهمان ترتیب راه کلاسیک است (۲). با وجود پیچیده بودن دستگاه مکمل میتوان اعمال فیزیولوژیائی آن را بطور کلی به سه دسته تقسیم کرد:

- ۱- خاصیت تولید ضایعه در غشاءها که منجر به همولیز میشود.
- ۲- تولید مواد فعال از نظر بیولوژیائی بنامهای Anaphylatoxin و Chemotaxin.
- ۳- تولید موادی که از راه تأثیر گیرنده‌های سلولی موجب پیشرفت و تسهیل اعمال فیزیولوژیائی بدن میشود، مانند تحریک فاگوسیتوز. با پیشرفتهای اخیر در علم ایمنولوژی و بیوشیمی، امکان اندازه گیری هر يك از عوامل ذکر شده در فوق وجود دارد. بدین ترتیب که بطور مثال میتوان C3 یا C4 و سایر عوامل آنزیمی دستگاه مکمل را بر حسب خواص بیولوژیائی شان اندازه گیری کرد. بعلاوه مقدار کل فعالیت مکمل بر حسب واحد در يك میلی لیتر خون نیز بطریق همولیز قابل اندازه گیری است (۵). مقدار واحد اخیر در اغلب ممالك پیشرفته در بین افراد سالم اندازه گیری و گزارش شده است (۴). اما تاکنون از مقدار کل مکمل در ایران گزارشی وجود ندارد و در این مقاله مقدار مکمل در افراد سالم ایرانی و تغییرات آن گزارش شده است.

روش آزمایش و وسائل - ۵۰ دهنده خون بالغ که سن آنها بین ۲۰ تا ۵۰ سال بود، برای آزمایش انتخاب شدند. در میان آنها ۳۰ تن مرد و بقیه زن بوده‌اند. برای انجام آزمایش از روش تغییر یافته Mayer استفاده شده است (۵). در این روش، خون بصورت لخته گرفته میشود و سرم جدا شده فوراً مورد آزمایش قرار می‌گیرد و پس از یخچال ۸۰ - درجه سانتیگراد نگاهداری میشود.

مجموعه پادکن و پادتن «Antigen و Anti-body» لازم است که بصورت Ag/Ab نشان داده میشود .
حال اگر (Antigen) پادکن گلبول قرمز باشد و (Anti-body) پادتن ضد گلبولهای قرمز، میتوان فعالیت این دستگاه را بصورت همولیز نشان داد و اندازه گیری کرد (شکل ۱).



سه بار با محلول Mayer می شوئیم و بعد ۱ میلی لیتر از رسوب گلبول برداشته با ۱۸ میلی لیتر محلول Mayer مخلوط می کنیم. سپس یک میلی لیتر از این محلول را با ۱۴ میلی لیتر آب مقطر مخلوط مینمائیم تا کاملاً همولیز شود سپس اسپکتروفتومتر را با طول موج ۵۴۱ Å میزان میکسیم و Optical Density (O.D.) محلول مذکور را اندازه میگیریم. باروشی که فوقاً ذکر شد این محلول باید (O.D.) ۰.۷۰ داشته باشد که باعقر به اسپکتروفتومتر قابل سنجش است .

۲- رقت آنتی سرم ضد گلبول قرمز گوسفند یک در ۲۵۰ میلی لیتر محلول مایراست .

۳- رقت سرم مورد آزمایش : سرم مورد آزمایش را یک بیستم با محلول Mayer رقیق میکنیم و در آخر محاسبه نتیجه حاصل شده را در بیست ضرب می کنیم.

۴- برای واری سحت آزمایش لازم است لوله های شاهد نیز وجود داشته باشد . یک لوله برای همولیز صفر درصد و لوله دیگری برای همولیز صد درصد.

سرم رقیق شده بر طبق روش Peltier را در هفت لوله آزمایش که درجا لوله ای قرار گرفته اند با نسبت لکاریتمی در محلول Mayer رقیق میکنیم و بهر کدام یک میلی لیتر از گلبول قرمز گوسفند که در محلول Mayer رقیق شده است ، اضافه میکنیم و مدت ۴۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداشته سپس بلافاصله در ظرف یخ قرار میدهیم تا از ادامه همولیز جلوگیری شود . لوله های آزمایش را در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می کنیم . سپس مجدداً لوله ها را در جالوله ای قرار داده و O.D. هر کدام را جدا گانه باعقر به های اسپکتروفتومتر می سنجیم. از روی جداول لکاریتمی بامقایسه O.D. مقدار CH50 را روی کاغذهای مدرج لکاریتمی بدست میآوریم .

اساس آزمایش عبارت است از بررسی مقدار واحد مکمل در یک میلی لیتر سرم که بتواند ۵۰ درصد همولیز ایجاد کند . به همین جهت نام آزمایش CH50 است که C علامت Complement و H معرف همولیز است. در نتیجه CH50 مقدار مکملی است که بتواند ۵۰ درصد همولیز ایجاد کند. به آنچه در مقدمه گفته شد باید اضافه کرد که برای فعالیت آنزیمی دستگاه مکمل از راه کلاسیک، ایجاد

در این نمودار منظور از E اریتروسیت و A پادتن ضد اریتروسیت و C ، همانطور که در مقدمه آمده است، مکمل می باشد.

بدین ترتیب مواد لازم برای آزمایش عبارتند از:

۱- E گلبول قرمز گوسفند (SRBC)
۲- A پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند که از کارخانه Wellcome تهیه میشود .

۳- محلول Mayer که در آزمایشگاه تهیه میشود.

۱- تهیه گلبولهای قرمز گوسفند - تحت شرایط سترون (Sterile) خون گوسفند گرفته میشود و سه حجم آن بایک حجم از محلول ضد انعقاد Alsever مخلوط میگردد . خون گرفته شده را باید حداقل ۴ روز در یخچال ۴ درجه نگهداری کرد تا قابل استفاده باشد. اگر نگهداری گلبول قرمز بیش از یک هفته مورد نظر باشد، باید مقداری آنتی بیوتیک بخون اضافه کرد تا از رشد باکتریها جلوگیری شود .

۲- پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند در کارخانه Wellcome تهیه می شود و نوع آن سرم خرگوش است .

۳- محلول Mayer بطرق مختلف تهیه میشود و در روش ما از محلولی که بوسیله Peltier (۵) درپاریس توصیه شده است، استفاده میگردد .

بدین ترتیب که مخلوطی از یک مولار کلروفرم و ۰/۳ مولار کلروکلسمین تهیه می کنیم. سپس محلول دیگری که دارای ۴۱/۵ گرم در لیتر کلروفرم و ۵/۰۹ گرم در لیتر باربیتون سدیم و ۱۷/۲۹ میلی لیتر اسید کلریدریک طبیعی (نرمال) است ، می سازیم. محلول اول را نیز بمقدار ۲/۵ میلی لیتر به محلول دوم اضافه کرده، این محلول را در موقع مصرف $\frac{1}{5}$ رقیق می کنیم .

روش آزمایش :

۱- آماده کردن گلبولهای قرمز گوسفند: گلبول قرمز گوسفند را

جدول ۱- میزان واحد مکمل و میانگین $\pm$ SD در هر میلی لیتر سرم

تعداد	Unit/ml	تعداد	Unit/ml
۱	۶۱۶	۲۶	۹۵۲
۲	۸۸۸	۲۷	۷۸۶
۳	۸۰۰	۲۸	۱۲۹۸
۴	۱۰۲۴	۲۹	۱۱۷۶
۵	۱۱۷۶	۳۰	۹۲۶
۶	۱۲۸۸	۳۱	۹۵۲
۷	۱۲۸۸	۳۲	۱۰۲۴
۸	۱۱۱۲	۳۳	۱۰۵۲
۹	۱۰۵۲	۳۴	۱۱۷۶
۱۰	۱۲۱۲	۳۵	۹۵۲
۱۱	۹۵۲	۳۶	۱۱۷۶
۱۲	۶۶۸	۳۷	۹۷۶
۱۳	۹۵۲	۳۸	۹۵۲
۱۴	۱۲۱۲	۳۹	۱۲۸۸
۱۵	۹۵۲	۴۰	۹۵۲
۱۶	۹۵۲	۴۱	۱۰۵۲
۱۷	۱۱۷۶	۴۲	۸۶۰
۱۸	۱۰۵۲	۴۳	۹۵۲
۱۹	۱۲۱۲	۴۴	۱۰۵۲
۲۰	۱۱۴۴	۴۵	۱۱۷۶
۲۱	۱۱۷۶	۴۶	۱۲۵۶
۲۲	۱۱۷۶	۴۷	۱۰۲۴
۲۳	۱۰۵۲	۴۸	۱۱۷۶
۲۴	۱۱۷۶	۴۹	۱۱۷۶
۲۵	۱۰۵۲	۵۰	۱۱۱۲

میانگین ۱۰۵۶
 $\pm$ S.D. ۱۵۵

نتیجه: نتایج بدست آمده نشان می دهد که مقدار کل مکمل در سرم ارتباطی به جنس ندارد و در مردان و زنان یک مقدار را نشان می دهد. در جدول ۱ مقدار کل مکمل و S.D.* آن و همچنین میانگین مقدار مکمل ۵۰ شخص سالم نوشته شده است.

بحث: از آنچه از جدول بر می آید مقدار کل مکمل در هر یک میلی لیتر سرم شخص سالم با در نظر گرفتن S.D. ۱۰۵۶ ($\pm$ ۱۵۵) واحد است این مقدار با مقادیر گزارش شده بوسیله Mayer و Lachman مطابقت دارد (مقدار میانگین ۱۰۰۰ واحد) $P < 0.1$ است. بدین ترتیب می توان گفت که برخلاف آنچه تصور می رفت (که مقدار مکمل کمتر یا بیشتر از آمار خارجی باشد) مقدار مکمل در هر میلی لیتر خون شخص سالم تفاوتی با آمار مورد گزارش متخصصین فوق ندارد. شاید کمبود مقدار مکمل مربوط به سوء تغذیه و افزایش آن مربوط به زندگی در شرایط غیر بهداشتی و درگیری با عفونت های مختلف باشد (۱).

بنظر می رسد دستگاه مکمل در مراحل خیلی پیشرفته سوء تغذیه دچار اختلال می گردد. تصور می شود علت مطابقت داشتن مقدار مکمل در افراد سالم ایرانی با آمار خارجی بستگی به نوع نمونه دارد، چون نمونه هایی که از آزمایش فوق تهیه گردیده از اهداء کنندگان خون گرفته شده است که در شرایط خوب زندگی میکنند. البته بسیار ضرور است که با در نظر گرفتن مقادیر مذکور در فوق اندازه گیری مقدار کل مکمل در افراد مختلف بظواهر طبیعی در طبقات مختلف جامعه بعمل آید تا صحت یا سقم نظریه فوق مورد بررسی قرار گیرد.

خلاصه:

مقدار فعالیت دستگاه مکمل در ۵۰ مرد وزن ایرانی بر اساس واحد همولیز در هر میلی لیتر مکعب سرم اندازه گیری و گزارش می گردد. برای انجام آزمایش از روش Peltier استفاده شده است. مقدار واحد مکمل در هر میلی لیتر سرم که بتواند ۵۰ درصد همولیز در گلبول های قرمز گوسفند ایجاد کند بنام CH50 نامیده می شود. میانگین این مقدار در ایرانیان ۱۰۵۶ واحد با تفاوت $\pm$ ۱۵۵ است که با مقایسه با افراد اروپائی اختلاف محسوسی نشان می دهد.

* S.D. Standard Deviation

REFERENCES:

- 1- Ruddy, S., Gigli, I., and Austen, K.F. (1972) N.E.J. Med. 287, 489.
- 2- Pillemer, L., Blum, L., Lerow, I.H. (1954) Science. 120, 279.
- 3- Lachman, P.G. (1975) The XIV Congress of the international Society of Blood Transfusion, Helsinki. & Ikkala, Nykanen Ed. P, 73.
- 4- Lachman, P.G., (1973) Handbook of Experimental Immunology. Vol. I. Weir D.M. Ed. P.S.I.
- 5- Peltier, Paris, Personal Communication.