

بررسی قدرت کشندگی نوتروفیل ها در بیماران همودیالیزی

نویسندگان: دکتر محمد وجگانی - شکور امید

گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه:

هدف از این مطالعه بررسی قدرت کشندگی نوتروفیل ها در بیماران همودیالیزی است و لذا از ۲۳ بیمار همودیالیزی که حداقل ۳ بار در هفته دیالیز می شدند و محدوده سنی آنان بین ۵۰-۲۵ سال بود خونگیری به عمل آمد و با اضافه کردن دکستران ۱۱۰ (۰.۶٪) نوتروفیل های بیماران را جدا نمودیم سپس با افزودن مخمر پسونیزه ولومینول به نوتروفیل ها مقدار پرتوهای کمی لومینیسانس ناشی از انفجار تنفسی نوتروفیل ها را در مدت یک دقیقه (که مقدار پرتو ساطع شده به حداکثر خود می رسد) بر حسب واحد CPM (Count per minute) قرائت نمودیم.

سپس میانگین حداکثر پرتو کمی لومینیسانس افراد همودیالیزی با میانگین حداکثر پرتو کمی لومینیسانس افراد سالم مورد مقایسه قرار گرفت و مشاهده گردید که میانگین پرتوهای کمی لومینیسانس افراد سالم بطور چشمگیری از افراد بیمار بالاتر است. آزمون T نشان داد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار است ($P < 1\%$) بدین ترتیب مشاهده شد که قدرت کشندگی نوتروفیل ها در جمعیت بیمار نسبت به گروه کنترل بطور چشمگیر و معنی داری کاهش یافته است.

● مقدمه:

مختل سازد. (۹۲) از آنجمله ممکن است تموج (Fluidity) رسپتورهای نوتروفیل ها را دچار مشکل نماید (۹۷).

همچنین همودیالیز و غشاء دیالیز کننده ممکن است بطور مکانیکی روی رسپتورهای C3b و IgG سطح نوتروفیل ها اثر کند (۹۵ و ۹۶).

لذا در این بررسی قدرت کشندگی (Killing) نوتروفیل ها در بیماران همودیالیزی مورد مطالعه قرار گرفته و با قدرت کشندگی نوتروفیل های افراد سالم و هم سن مقایسه گردیده است.

دیر زمانی است که دانشمندان بزرگ علم طب برای رهایی از مرگ حتمی مبتلایان به اورمی، از طریقه ای بنام دیالیز استفاده می نمایند. با توجه به اینکه اکثر بیماران همودیالیزی مستعد عفونتها و سرطان های مختلفی می باشند. (۲۱) محققین مطالعات زیادی را بر روی وضعیت سیستم ایمنی هومورال و سلولی این بیماران انجام داده اند (۳ و ۴ و ۵ و ۶) بطوریکه امروزه گزارشات متعددی در مورد فاگوسیتوز و کموتاکسی نوتروفیل های این بیماران در اختیار می باشد (۴ و ۷ و ۸).

آنچه مسلم است به هم خوردن تعادل آب و الکترولیت ها و تعادل اسید و بازی پلازما می تواند فونکسیون نوتروفیل ها را

● مواد و روش کار

سپس طی مراحل زیر اقدام به جداسازی و آماده نمودن نوتروفیل ها نمودیم.

تابلوی شماره ۱: نوع و مقدار مواد مورد استفاده در آزمایش کمی لومینسانس

مواد	نمونه	کنترل
لومینول	لاندا ۷۰۰	لاندا ۷۰۰
مخمرا پسونیزه	لاندا ۲۰۰	-
PBS	-	لاندا ۲۰۰
نوتروفیل	لاندا ۱۰۰	لاندا ۱۰۰

الف: مهمترین مواد مورد نیاز عبارتند از:

دکستران ۱۱۰ (۶٪) - هیپارین بعنوان ضدانعقاد - کلرید آمونیم (با فر لیزکننده) (Lys-ing buffer) - آب مقطر دیونیزه - لومینول - محلول DMSO - سرم AB بعنوان اپسونین - محلول PBS - لوله های آزمایش پلاستیکی - سمپلر - کاغذ پارافین - دستگاه کمی لومینسانس مدل ۱۲۵۱

- از هر بیمار با سرنگ هیپارینه ۱ml خون گرفته و با حجم مساوی از دکستران (۱۱۰) ۶٪ مخلوط می کنیم.
- سرنگ حاوی خون را بصورت ایستاده در حالیکه سر سوزن را خم نموده ایم، بمدت ۴۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری می کنیم.
- پس از انکوباسیون، محلول رویی سرنگ را در داخل یک لوله آزمایش پلاستیکی ریخته و سانتریفوژ می کنیم.

ب: طرز تهیه نوتروفیل ها:

برای تهیه نمونه ها به بخش همودیالیز بیمارستان امام خمینی (ره) مراجعه کرده و از ۲۳ بیمار همودیالیزی (۱۷ مرد و ۶ زن) که حداقل ۳ بار در هفته دیالیز می شدند و محدوده سنی آنان ۲۵ تا ۵۰ سال بود خونگیری به عمل آمد.

تابلوی شماره ۲: حداکثر مقدار پرتو کمی لومینسانس قرائت شده در افراد سالم در مدت یک دقیقه (CPM) در محدوده سنی ۲۵-۵۰ سال

شماره نمونه	حداکثر مقدار پرتو کمی لومینسانس در طی یک دقیقه	شماره نمونه	حداکثر مقدار پرتو کمی لومینسانس در طی یک هفته
۱	۱۶۴/۷۰۰	۱۱	۱۱۰/۵۰۰
۲	۴۵۹/۳۰۰	۱۲	۱۸۷/۹۸۰
۳	۵۱۱/۹۰۰	۱۳	۱۹۸/۲۰۰
۴	۲۶۰/۰۰۰	۱۴	۱۶۹/۷۹۰
۵	۱۷۸/۲۶۰	۱۵	۱۳۶/۰۰
۶	۱۵۵/۵۰۰	۱۶	۵۰۲/۰۰۰
۷	۱۵۹/۷۰۰	۱۷	۱۳۳۲
۸	۱۳۵/۲۶۰	۱۸	۲۰۰/۴۰۰
۹	۱۹۸/۳۶۰	۱۹	۱۸۸/۲۵۰
۱۰	۱۲۰/۴۷۰	۲۰	۱۸۴/۳۷۰

در این تحقیق قدرت کشندگی و ظرفیت انفجار تنفسی نوتروفیل های ۲۳ بیمار اورمیک و همودیالیزی و ۲۰ نفر انسان سالم مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. همانگونه که در تابلوی شماره ۳ و ۲ مشاهده می شود. میانگین پرتو کمی لومینسانس افراد همودیالیزی ۸۷/۸۵ و میانگین حداکثر پرتو کمی لومینسانس افراد سالم ۱۷۴/۹۹ می باشد. آزمون T نشان داد که اختلاف این دو گروه معنی دار است ($P < 1\%$) به این

۴- چنانچه در این مرحله گلوبول قرمز مشاهده شود با بافر لیز کننده (کلرید آمونیم) آنرا لیز می کنیم.

۵- باید دقت شود که نوتروفیل ها آسیب نبینند و بصورت توده در نیایند. PH محلولهای مورد استفاده را همواره باید کنترل کرد. از آلودگی نمونه ها نیز باید جلوگیری کرد.

۶- سپس مقدار نوتروفیل های تهیه شده را با لام نشو بار شمارش نموده و تعداد آنرا برای هر تست به 5×10^6 میلی لیتر می رسانیم.

تابلوی شماره ۳: حداکثر مقدار پرتو کمی لومینسانس قرائت شده در طی یک دقیقه (CPM)

در افراد همودیالیزی در محدوده سنی ۵۰-۲۵ سال

بیماران	حداکثر مقدار پرتو در مدت یک دقیقه	بیماران	حداکثر مقدار پرتو در مدت یک دقیقه
۱	۳۰/۴۷۰	۱۳	۹۸/۱۰۰
۲	۱۳۶/۵۰۰	۱۴	۸۸/۱۰۰
۳	۱۲۹/۱۰۰	۱۵	۱۰۵/۴۰۰
۴	۱۵۱/۹۰۰	۱۶	۵۸/۳۶۰
۵	۱/۰۵۴	۱۷	۱۱۰/۷۰۰
۶	۱۲۰/۹۰۰	۱۸	۱۱۸/۴۳۲
۷	۸۱/۵۸۰	۱۹	۷۵/۶۴۰
۹	۲۷/۳۱۰	۲۰	۹۲/۸۰۰
۱۰	۱۲۶/۵۰۰	۲۱	۸۹/۹۲۰
۱۱	۹/۱۸۰	۲۲	۱۳۷/۵۷۵
۱۲	۱۱۰/۵۶۰	۲۳	۶۷/۵۴۲

ج: طرز آماده سازی مخمر و تهیه مخمر افسونیزه:

برای تهیه مخمر کلنی مخمرها را با آب مقطر جوشانده (بمدت نیم ساعت) و ۲ بار با PBS شستشو می دهیم. و سپس با لام نشو بار شمارش نموده و از آن رقتی حاوی 55×10^6 در میلی لیتر عدد مخمر تهیه می کنیم. با اضافه کردن ۱/۰ ml سرم AB به ۰/۹ ml رقت تهیه شده مخمر آنرا افسونیزه می نمائیم.

برای ارزیابی قدرت کشندگی، نوتروفیل های جدا شده را با مقادیر مشخصی (تابلوهای شماره ۱) از لومینول و مخمر افسونیزه مخلوط

ترتیب این بررسی نشان داد که قدرت کشندگی نوتروفیل ها (در اثر کاهش انفجار تنفسی) در بیماران اورمیک همودیالیزی نسبت به افراد سالم کاهش نشان می دهد.

از آنجائیکه نوتروفیل ها نقش بسزایی در دفاع غیر اختصاصی بر علیه میکروارگانیزم های مختلف عفونی زایفا می کنند و در کنترل این قبیل بیماریها نقش مؤثری دارند، همچنین با توجه به مشکلات بیماران همودیالیزی از این جهت در این تحقیق قدرت کشندگی نوتروفیل ها و پتانسیل انفجار تنفسی این سلول ها را در این بیماران مورد بررسی قرار دادیم. نتایج

می کنیم. سپس با استفاده از دستگاه کمی لومینسانس پرتوهای ساطع شده ناشی از انفجار تنفسی نوتروفیل ها را در طی مدت یک دقیقه قرائت می کنیم (CPM) و حداکثر مقدار پرتوی ساطع شده در خلال یک دقیقه ملاک سنجش قرار می گیرد.

● نتایج:

سپس میانگین حداکثر مقدار پرتو ساطع شده از نوتروفیل های بیماران را با میانگین حداکثر مقدار خوانده شده در گروه کنترل مقایسه می کنیم.

کشندگی و انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها مختل می‌شود. به علاوه یافته‌های موجود حاکی از آن است که افزایش تری گلیسریدهای خون در بیماران همودیالیزی باعث جلوگیری از تموج غشاء و حرکت رستورهای سطحی این سلول می‌گردد. که این پدیده خود عامل دیگری در تشدید نارسائی فاگوسیتوز و کاهش توانایی کشندگی نوتروفیل‌ها است.

لذا بنظر می‌رسد برای جلوگیری از عوارض همودیالیزی بهتر است از غشاءهای دیالیزی که کمتر موجب فعال شدن کمپلمان می‌شوند و آسیب مکانیکی بر روی نوتروفیل‌ها دارند استفاده شود. در همین راستا لازم است به تغییرات pH و اسمولاریته و ازوتمی و اسیدوز سرم که هر یک می‌تواند فونکسیون نوتروفیل‌ها را مختل سازد توجه بیشتری مبذول گردد.

بدست آمده که در تابلوهای شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است، حاکی از آن است که قدرت کشندگی نوتروفیل‌ها و ظرفیت انفجار تنفسی این سلول‌ها در بیماران همودیالیزی نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیر و معنی داری را نشان می‌دهد. ($p < 1\%$)

با توجه به اینکه گزارشاتی مبنی بر کاهش اجزای کمپلمان بدنبال مصرف بیش از حد آن در این بیماران وجود دارد و همچنین با عنایت به اینکه میزان شیوع عفونت‌ها در افراد دیالیزی نسبت به سایرین افزایش قابل توجهی دارد، لذا بنظر می‌رسد که کاهش اجزای کمپلمان در این بیماران منجر به کاهش اپسونین‌های سرمی گردیده و این پدیده به همراه تغییرات PH و الکترولیت‌ها و همچنین اثرات مکانیکی غشاء دیالیز بر روی رستورهای سطح سلولی نوتروفیل‌ها می‌تواند فرآیند فاگوسیتوزی این سلول‌ها را مختل سازد که به دنبال آن قدرت

References

- 1) Abrutyn E, Solomons, N.W, Stclair L, Macgregor, R.R. Root R.K. Granulocyte function in patients with chronic renal failure, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. J. infect. Dis 1977; 135: 1-8
- 2) Montgomeri C. and Kalmanson. J.S. Leukocyte phagocytosis and serum bactericidal activity in chronic renal failure. Am. J. Med, Sci 1972 264: 385-393.
- 3) Baurain, G, Naret, C., Marcon, L, and Grateau, G, Druke, T., Urena, P, Nelson, Bach, DL, chatenoud, J.F. Invivo T cell pre-activation in choronic uremic hemodialysed and nonhemodialysed patients. Kidney int. 1989 36:636-644.
- 4) Salant D. J. Glorer, M. and Anderson, M, Depressed neutrophil chemo taxis in patients with chronic renal failure and after renal transplantation. j. Lab. Clin. Med. 1976 88: 536-546.
- 5) Wilson W.E.C Kirk patrick. C.H. and Talmage, D.W. Sup-pression of immunologic responsiveness in uremia Ann. Int. Med 1965 62:1-14.
- 6) Zierz R. and Gotze. O. (1987) Regulation of human Blymphocyte funcons by the complemernt fragment Ba (abstract) Complement 1987: 242-243.
- 7) Briggs. W.A. silliy D.H. Muhajan, S, and Mcdonald. F.D. (1993). Leukocyte metabolism and function.in uremia kidney. int, 1993 24:593-596.
- 8) Hirabavashi, Y., and kobayashi. T., Nishikawa, A., Okazaki, H., Aoki. T., Takaya, S., Kobayashi , Y. Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocyte in patients with chronic renal failure. Nephron 1988 49:305-312.
- 9) Lager A., Lovarik, j., Stummvoh, H-K, Urbanska, A, Lager, T.A. Blood Membran interaction in hemodialysis leads to increased cytokine production. kidney, int. 1987 32: 84-88.