

عوامل تکنیکی موثر در تعداد روزتهای T و B

دکتر سیمین غازان‌شاهی - دکتر احمد مسعود

تهیه لنفوسیتها لنفوسیتها از خون محیطی بطریقه متد Thorby and Bratile (۷) جدا گردید.

تست روزت برای اندازه‌گیری تعداد لنفوسیتهای T
لنفوسیتهای جدا شده را بعد از شستشو با محلول بافر باربیتال طوری رقیق نمودیم که در هر سانتیمتر مکعب دارای 4×10^6 عدد لنفوسیت داشته باشیم سپس مقدار کمی از محلول لنفوسیتها را با مقدار متساوی محلول یک درصد گلبولهای قرمز گوسفند مخلوط نموده و بعد از سانتریفوژ کردن بمدت ۵ دقیقه در 600 RPM در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم از هر فردی چندین نمونه آزمایش تهیه نمودیم و روزتهای آنها را در فواصل زمانی متفاوت از یکدیگر بعد از نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد با هموسایتومتر شمردیم (لنفوسیت‌های که سه عدد و یا بیشتر گلبولهای قرمز گوسفند دورشان جمع شده بود روزت اطلاق نمودیم).

تست روزت لنفوسیتهای B لنفوسیتهای B دارای گیرنده طبیعی برای گلبولهای قرمز گوسفند مانند لنفوسیتهای T نمیباشند ولی چون دارای گیرنده‌هایی برای کمپلمان میباشند

میدانیم لنفوسیتها بدو نوع اصلی با اسم لنفوسیتهای T و B تقسیم میگردند. تعداد لنفوسیتهای T و B ممکن است بطور ارثی و مادرزادی و یا بطور اکتسابی بعلت بعضی از بیماریها مانند سرطانش (۱) تغییر یابد. بدین جهت اندازه‌گیری تعداد لنفوسیتهای T و B در خون محیطی یکی از روشهای موثر در تشخیص و یا بررسی پیش‌آگهی بیماریهای که با نقص سیستم ایمنی همراه هستند میباشد.

تست روزت Rosette test روش قابل اطمینان برای اندازه‌گیری تعداد لنفوسیتهای T میباشد. تعداد لنفوسیتهای B را بروش روزت مخصوص لنفوسیتهای B میتوان تعیین نمود گرچه برای تعیین تعداد لنفوسیتهای B روشهای متعدد دیگری هم وجود دارند که از جمله متد ایمونوفلورسان و بررسی ایمونوگلوبولین‌های سطحی میباشد. در مطالعه اخیر خود ما تاثیر عوامل زمانی و مکانیکی را در تعداد روزتهای T و B مورد مطالعه قرار دادیم.

روش تست روزت مخصوص اندازه‌گیری تعداد لنفوسیتهای B-T، از ۲۰ فرد سالم کنترل بین سنین ۱۰ و ۵۰ سال بعمل آمد و تغییراتی که عوامل زمانی و مکانیکی در روش تست در تعداد روزتهای T و B آنها داشت بررسی گردید.

از ۲۴ ساعت ملاحظه نمودیم که تعداد روزتهای T بین ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت ثابت میماند و بعد بتدریج از تعداد آنها کاسته شده در ۶ و یا ۷ روز به صفر میرسد .

در بررسی تأثیر عوامل مکانیکی در تعداد روزتهای T و B مطابق جدول (۲) ملاحظه میگردد که روزتهای T و B هر دو به عوامل مکانیکی مثل تکانهای شدید به لوله محتوی آنها حساس بوده و این تکانها سبب کاهش تعداد آنها میگردد . روزتهای T با مقایسه با روزتهای B بسیار مستحکمتر بوده و تکانهای شدیدتر برای کاهش تعداد آنها لازم میباشد در صورتیکه روزتهای T بسیار شکننده بوده و تکانهای شدید سبب کاهش فوق العاده در تعداد آنها میگردد .

بحث نظر باینکه اندازه گیری تعداد لنفوسیتهای T و B با انجام تست روزت در خون محیطی ممکن است در بسیاری از موارد کمک ذیقیمتی در تشخیص بیماریهایی که با نقص سیستم ایمنی همراه هستند بنماید آشنایی کامل با روش این تست برای کسانیکه علاقمند به تعیین تعداد لنفوسیتهای T و B در بیماران فوق الذکر میباشند لازم است و بعلت شکننده بودن روزتهای T و B مخصوصاً روزتهای T در اثر عوامل مکانیکی و همچنین تغییر تعداد روزتهای T با تغییر زمان نگهداری آنها در ۴ درجه اگر آزمایش کننده باین عوامل توجه ننماید احتمال دارد نتیجه کارشان یکنواخت و صحیح نباشد . بنابراین آزمایش کننده باید سعی نماید نمونه های کنترل و بیماران خود را در یک فاصله زمانی مساوی بعد از نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد بشمارد و همچنین به تاثیر عوامل مکانیکی توجه نموده و حل کردن رسوب روزت جهت شمارش باید هرچه ممکن است آرامی انجام گیرد . از هر بیمار باید بیشتر از یک نمونه تهیه نمود تا در صورت برخورد به ارقام غیر طبیعی برای اطمینان نمونه دیگر را هم مورد بررسی قرار داد . (با روشی که ما بکار میبریم اختلاف در شمارش روزتهای بین دو نمونه از یک فرد در شرایط مساوی کمتر از ۱۰ درصد میباشد) ثانیاً چون تعداد روزتهای T با طریقه نگهداری نمونه ها بطور طویل المدت (۲۴ - ۲۰) ساعت در ۴ درجه سانتی گراد بیشتر از طریقه سریع المدت (یکساعت) است بهتر است شمارش روزتهای T بدو طریقه سریع المدت (یکساعت) و طویل المدت (۲۴ - ۲۰ ساعت) بعد از نگهداری در ۴

برای انجام تست روزت جهت تعیین تعداد لنفوسیتهای B ابتدا باید گلبولهای قرمز گوسفند را بوسیله کمپلمان حساس نمود و سپس با انجام تست روزت مخصوص لنفوسیتهای B و شمردن روزتهای تشکیل شده تعداد لنفوسیتهای B را میتوان بدست آورد که جزئیات روش کار در مقاله قبلی شرح داده شده است (۲)

مطالعه تاثیر زمان در تعداد روزتها T برای بررسی تاثیر مدت نگهداری در چهار درجه سانتی گراد در تعداد روزتهای T از هر یک از افراد مورد آزمایش چندین نمونه آزمایشی تهیه نمودیم و هر نمونه را جداگانه در فواصل زمانی معین بعد از سانتریفوژ کردن لنفوسیتها با گلبولهای قرمز گوسفند مورد بررسی قرار دادیم نمونه اول را بلافاصله بعد از سانتریفوژ کردن و بدون نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد شمردیم نمونه های دیگر را به ترتیب بعد از یک ساعت ، دو ساعت و ۲۴ ساعت نگهداری در شرایط فوق الذکر بررسی نمودیم از بعضی از افراد نمونه های دیگری را هم بعد از ۴۸ ساعت ، ۷۲ ساعت ، ۵ روز ، یک هفته بعد از نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد شمارش نمودیم .

بررسی اثر عوامل مکانیکی در تعداد روزتهای T و B برای تهیه نمونه آزمایشی جهت شمردن روزتهای T و B در هموسایتومتر بطور معمول ماسوب ته لوله را که محتوی روزت میباشد در مایع بالای رسوب حل مینمائیم در تجربه اخیر خود ما تاثیر تکانهای شدید را در ضمن حل کردن رسوب در تعداد روزتهای T و B مورد مطالعه قرار دادیم بدین طریق که از هر فردی به یکی از نمونه ها برای حل کردن رسوب روزتهای T و B تکانهای شدید به لوله محتوی نمونه آزمایشی دادیم و تعداد روزتهای شمردن شده از نمونه های فوق را با ارقامی که از شمارش روزتهای T و B با حل کردن رسوب بطریق معمولی و آرام بدست آورده بودیم مقایسه نمودیم .

نتیجه بطوریکه در جدول (۱) نشان داده شده است افزایش قابل ملاحظه ای در تعداد روزتهای T با افزایش زمان نگهداری نمونه ها در ۴ درجه سانتی گراد تا حد معین (۲۴ ساعت) حاصل گردید . از شمارش بعضی از نمونه ها در زمان طولیتر

درجه سانتی گراد انجام گیرد.

روزتهای T نسبت به عوامل مکانیکی بسیار حساس بوده و حرکات شدید لوله آزمایش جهت حل کردن رسوب روزتها در محلول فوقانی در هنگام تهیه نمونه برای شمردن آنها باعث جدا شدن گلبولهای گوسفند چسبیده به لنفوسیتها و در نتیجه سبب کاهش تعداد روزتهای تشکیل شده میگردد. بدین جهت تمام مراحل تهیه نمونه جهت شمارش روزتها و مخصوصا روزتهای T باید با آرامی و ملایمت انجام گیرد.

خلاصه اندازه گیری تعداد لنفوسیتهای T و B در خون محیطی بروش تست روزت یکی از راههای بررسی سیستم ایمنی میباشد تعداد روزتهای T بر حسب مدت نگهداری نمونهها در ۴ درجه سانتی گراد متغیر میباشد. تعداد آنها بعد از نگهداری نمونهها بمدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق الذکر به حد نهائی خود میرسد سپس بعد از ۷۲ ساعت بتدریج از تعدادشان کاسته شده در ۶ - ۷ روز به صفر میرسد. روزتهای B مخصوصا

جدول ۱ - تغییرات تعداد درصد روزتهای T بر حسب زمان نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد

تعداد نفرات	بدون نگهداری در ۴ درجه	یک ساعت	۲ ساعت	۲۰ - ۲۴ ساعت
Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
۲۰ نفر	۵۴ ± ۷/۴	۶۶/۵ ± ۴/۲۲	۷۰/۱ ± ۱/۹۴	۷۶/۵ ± ۳/۷۲
اهمیت آماری	P < ۰/۰۱		P < ۰/۰۱	P < ۰/۰۱

Mean = حد متوسط

SD = Standard deviation

استاندارد دوی ایشن

در اهمیت آماری جدول فوق هر ستون فقط با ستون بلافاصله مابعد خود مقایسه شده است

جدول ۲ - تغییرات درصد روزتهای T و B در اثر عوامل مکانیکی

افراد	TRR Mean ± SD	TRV Mean ± SD	BRR Mean ± SD	BRV Mean ± SD
۲۰ نفر	۷۱/۵ ± ۷/۵	۴۲/۷ ± ۱۸/۴	۳۵/۲ ± ۳/۹	۲۹/۸ ± ۶/۶
اهمیت آماری	P < ۰/۰۱		P < ۰/۰۱	

TRR = T Rosettes with regular shaking

TRV = T Rosettes with vigorous shaking

BRR = B Rosettes with regular shaking

BRV = B Rosettes with vigorous shaking

Mean = حد متوسط

تعداد درصد روزتهای T با حل رسوب بطریقه معمول و آرام

تعداد درصد روزتهای T با حل رسوب توام با تکانهای شدید

تعداد درصد روزتهای B با حل رسوب بطریقه معمولی و آرام

تعداد درصد روزتهای B با حل رسوب توام با تکانهای شدید

References

1. Anthony H. M, Kirk J.A., Madsen K B., Mason M.K. and Templement G.H. E and EAC rosetting lymphocytes in patients with carcinoma of bronchus. *Clin Exp. Immunology*. 20, 29,40, 1975.
2. Ghazanshahi S, Townley R, Chaperone E and Villacorte G: T and B lymphocyte rosette in bronchial asthma. *Annals of Allergy*. 36; 5, 324, 1976.
3. Luckasen JR, Sabad KJ, Gajl-peczalaski KJ and Kersey JH: Lymphocytes bearing complement receptor, surface immunoglobulins and sheep erythrocyte receptors in primary immunodeficiency disease. *Clin Exp Immunol* 16: 536, 1974.
4. Report of WHO/IARC-sponsored workshop on human B and T cells. Special technical report. *Scand J Immunol* 3: 54, 1974.
5. Silveria NPA, Mendes NF and Tolina MEA: Tissue localization of two populations of human lymphocytes distinguished by membrane receptors. *J Immunol* 108: 1456, 1972.
6. Steel c, Evans MJ and Smith MA. The sheep cell rosette test on human peripheral blood lymphocytes. An analysis of some variable factors in the technique. *Br J hematol* 28: 245, 1974.
7. Thorsby E and Bratlie A. A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. *Histocompatibility testing 1970 ed. P.I.*
8. White side TL, Berardi RS and Rabin BS: Quantitation of human peripheral blood T and B lymphocytes. *Int Arch Allergy Appl Immun* 48: 431, 1975.
9. Williams, R.C. JR., Deboard J.R., Mellbye O.J., Messner, R. P. and Lindstrom F.D: Studies of T and B lymphocytes in patients with connective tissue disease. *The J of clinical investigation* 52: 283, 1973.
10. Yu DTY: Human lymphocyte subpopulation: Early and late rosettes. *J Immunol* 115: 91, 1975.