

تعیین سطح سرمی کمپلکس IgA- α_1 -antitrypsin در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

دکتر عباس صاحب‌قدم لطفی^۱، مجید مطهری^۲، دکتر محمدرضا شکیبی^۳،
دکتر میرکامران موسوی حسینی^۴، بهزاد ادیبی مطلق^۵، دکتر مهدی محمودی^۶

چکیده

سابقه و هدف

آرتریت روماتوئید یک بیماری مزمن التهابی شدید می‌باشد. در بیماری‌های التهابی از جمله آرتریت روماتوئید میزان IgA در سرم افزایش می‌یابد که به دنبال آن IgA اضافی می‌تواند با برخی از پروتئین‌های موجود در سرم از جمله آلفا-۱-آنتی تریپسین (α_1 AT) میانکنش داشته و تشکیل کمپلکس غیرایمنی بدهد. آزمایش‌های سروزولوژی رایج تشخیصی برای آرتریت روماتوئید از جمله RF، ESR و CRP در مواردی پاسخ منفی کاذب دارند اما براساس تحقیقات اخیر مشخص شده است که در بیماری آرتریت روماتوئید میزان این کمپلکس افزایش و پس از درمان کاهش می‌یابد، لذا می‌توان از آن به عنوان یک عامل تشخیصی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده تجربی، آزمایشگاهی بود. در این تحقیق میزان کمپلکس IgA - α_1 AT در سرم ۳۷ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید (با تشخیص قطعی پزشک) و ۴۴ فرد طبیعی به عنوان کنترل توسط روش الیزا با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد α_1 AT و آنتی‌بادی پلی کلونال ضد IgA کونژوگه شده با HRP (Horse Radish Peroxidase) برای اولین بار در ایران و در آزمایشگاه بیوشیمی انجام شد. همچنین میزان ESR، CRP و RF که آزمایش‌های معمول جهت تشخیص بیماری می‌باشند در سرم بیماران و افراد طبیعی نیز اندازه گیری گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که اختلاف میزان کمپلکس IgA - α_1 AT در سرم بیماران نسبت به افراد کنترل به لحاظ آماری معنی دار است ($15/4 \pm 43/7$ در بیماران و $8/3 \pm 21/5$ در افراد طبیعی) ($p < 0/05$). همچنین علیرغم این که RF در ۱۱ بیمار (۳۰٪ کل بیماران) منفی به دست آمد، کمپلکس IgA - α_1 AT تنها در یک بیمار (۳٪) از میانگین افراد طبیعی گزارش شده کمتر بود. این امر نشان‌دهنده این است که پاسخ‌های منفی کاذب در مورد میزان سرمی کمپلکس IgA - α_1 AT توسط روش الیزا نسبت به آزمایش RF به شدت پایین است.

نتیجه گیری

از مطالعه انجام شده نتیجه گیری می‌شود که تعیین میزان کمپلکس IgA- α_1 -antitrypsin در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به عنوان شاخص مراحل پیشرفت بیماری پیشنهاد می‌شود که با روش الیزا قابل انجام است.

کلمات کلیدی: کمپلکس IgA - α_1 AT، الیزا، آرتریت روماتوئید

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۲۱

۱- مؤلف مسئول: PhD بیوشیمی بالینی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس - صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی - دانشگاه تربیت مدرس

۳- فوق تخصص روماتولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۴- PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۵- کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۶- PhD بیوشیمی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA)^۱ یا التهاب مفاصل، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های التهابی مزمن با علت ناشناخته است. نتیجه التهاب مفصل، تخریب غضروف، خوردگی استخوان و به دنبال آن تغییر شکل مفاصل می‌باشد. از نشانه‌های این بیماری می‌توان به تورم مفاصل بدن به صورت قرینه، سفتی صبحگاهی اطراف مفصل به مدت حداقل یک ساعت، وجود فاکتور روماتوئید در سرم، وجود ندول‌های زیرجلدی، تغییرات رادیولوژیکی از قبیل خوردگی و استئوپوروز در مفاصل دست یا پا اشاره نمود. شیوع بیماری آرتریت روماتوئید ۱٪ می‌باشد.

برای تشخیص این بیماری از آزمایش‌هایی نظیر وجود فاکتور روماتوئید (RF)^۲، آزمایش‌های کمکی و شاخص‌های ارزیابی بیماری از قبیل سرعت رسوب گلوبولی (ESR) و میزان CRP استفاده می‌گردد که هیچ یک از آن‌ها اختصاصی نمی‌باشند، به عنوان مثال حضور فاکتور روماتوئید مختص بیماری آرتریت روماتوئید نیست و در ۵٪ اشخاص سالم نیز یافت می‌شود (۱، ۲).

یکی از ترکیباتی که می‌توان از آن در تشخیص بیماری آرتریت روماتوئید استفاده نمود، کمپلکس IgA- α_1 AT است. این کمپلکس از اتصال دی سولفیدی بین گلیکوپروتئین آلفا-۱-آنتی تریپسین (α_1 AT) با ایمونوگلوبولین A تشکیل می‌شود که اتصال آن‌ها از طریق تنها سیستمین موجود در α_1 AT در موقعیت ۲۳۲ و سیستمین شماره ۴۷۱ زنجیره سنگین IgA می‌باشد. معمولاً ۱٪ از کل گلیکوپروتئین α_1 AT انسان به IgA متصل می‌گردد ولی در بیماری RA سطح سرمی این کمپلکس افزایش می‌یابد (۳-۸).

مواد و روش‌ها

انتخاب بیماران

مطالعه انجام شده تجربی، آزمایشگاهی بود. از تعداد ۳۷ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید مراجعه کننده به بیمارستان درمان شهرستان کرمان با تشخیص قطعی بیماری توسط پزشک با علائم بالینی و حذف موارد مداخله کننده و همچنین از تعداد ۴۴ فرد نرمال داوطلب، نمونه‌های سرمی تهیه شدند و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اطلاعات مورد نیاز بیماران از قبیل سن، جنس، طول مدت بیماری و غیره توسط پزشک متخصص مربوطه در اختیار قرار گرفت (جدول ۱).

سطح سرمی RF و CRP بیماران و افراد طبیعی توسط کیت انیسون (ENISON) تعیین گردید که نتایج آن در جداول شماره ۱ و ۲ درج شده است.

آزمایش الیزای ساندویچی

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد α_1 AT انسان^۳ با غلظت ۰/۵mg/ml در PBS^۴ (pH = ۷/۲) و ۱۰mM در چاهک‌های پلیت ریخته شد و پلیت به مدت ۱۶ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس توسط آب مقطر پلیت ۵ بار شستشو داده و در نهایت خشک شد.

مقدار ۳۰۰ میلی لیتر بافر بلاکینگ (محلول ۰/۵ درصد ژلاتین در آب مقطر) داخل هر یک از چاهک‌ها ریخته و به مدت ۱ ساعت در حمام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از عمل شستشو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم بیماران و افراد طبیعی با رقت ۱/۷۵ در بافر بلاکینگ (محلول ۰/۱٪ ژلاتین در آب) داخل چاهک‌ها ریخته و پلیت به مدت ۲ ساعت در حمام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از شستشو مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد IgA انسان کونژوگه شده با HRP (سیگما) داخل هر یک از چاهک‌ها ریخته و به مدت یک ساعت در حمام بخار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر سوبسترای سدیم - سیترات با pH=۵ بعد از عمل شستشو به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

پس از ایجاد رنگ، واکنش را توسط ۵۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ مولار متوقف نموده و جذب توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت شد.

1- Rheumatoid Arthritis

2- Rheumatoid Factor

3- Calbiochem

4- Phosphate Buffer Solution

یافته‌ها

منحنی استاندارد به این صورت بود که رقت‌های مختلفی از سرم بیمار مذکور تهیه نموده و در داخل چاهک‌های پلیت درکنار مابقی نمونه‌ها قرار داده شد. با استفاده از نتایج جذب قرائت شده منحنی رسم گردید. (نمودار شماره ۱).
جذب سایر نمونه‌ها را با استفاده از این منحنی بر حسب واحد قراردادی (au)^۱ به دست آورده که در نمودارهای شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است.

نتایج مقایسه سطح سرمی کمپلکس IgA- α_1 AT در بیماران و افراد طبیعی به تفکیک جنس، در افرادی که نتایج RF و CRP مثبت و یا منفی داشته‌اند و رابطه آن با مدت زمان بیماری در جداول ۱، ۲ و ۳ درج شده است.
یک منحنی استاندارد با استفاده از سرم فرد بیماری که بالاترین مقدار کمپلکس را داشت رسم شد. روش رسم

جدول ۱: میزان کمپلکس IgA- α_1 AT در افراد طبیعی و بیمار به تفکیک جنس*

	طبیعی			بیمار		
	مرد n=۹	زن n=۳۵	کل n=۴۴	مرد n=۸	زن n=۲۹	کل n=۳۷
سن	۳۷ ± ۱۷	۴۰ ± ۱۴	۳۹ ± ۱۴	۴۶ ± ۱۶	۴۴ ± ۱۴	۴۵ ± ۱۴
IgA- α_1 AT	۲۲ ± ۴	۲۱ ± ۹	۲۱ ± ۸	۵۰ ± ۲۳	۴۲ ± ۱۲	۴۴ ± ۱۵

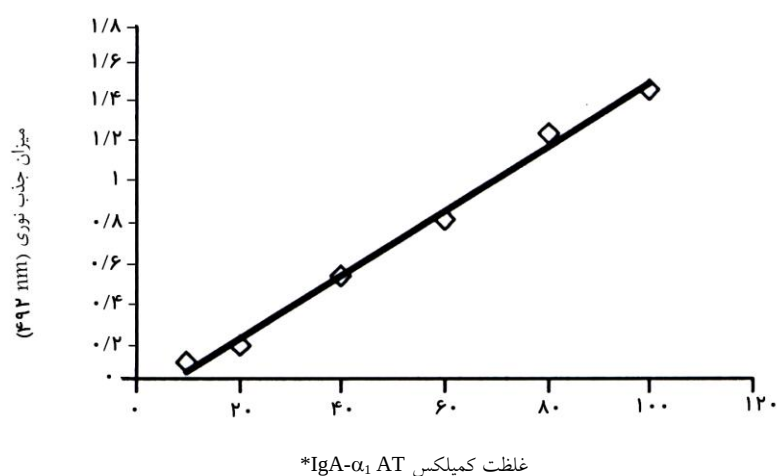
جدول ۲: میزان کمپلکس IgA- α_1 AT در بیمارانی که نتایج آزمایش CRP و RF مثبت داشته‌اند*

	CRP				RF			
	+	۲+	۳+	منفی	+	۲+	۳+	منفی
سن	۵۱ ± ۱۳	۴۹ ± ۱۳	۳۹ ± ۱۵	۴۴ ± ۱۶	۴۸ ± ۱۳	۲۹ ± ۱۴	۴۲ ± ۱۸	۴۰ ± ۱۳
IgA- α_1 AT	۴۰ ± ۷	۴۰ ± ۹	۴۹ ± ۲۱	۴۰ ± ۱۰	۴۸ ± ۱۸	۳۶ ± ۷	۴۹ ± ۱۴	۴۰ ± ۱۴

جدول ۳: رابطه میزان کمپلکس IgA- α_1 AT با مدت زمان بیماری*

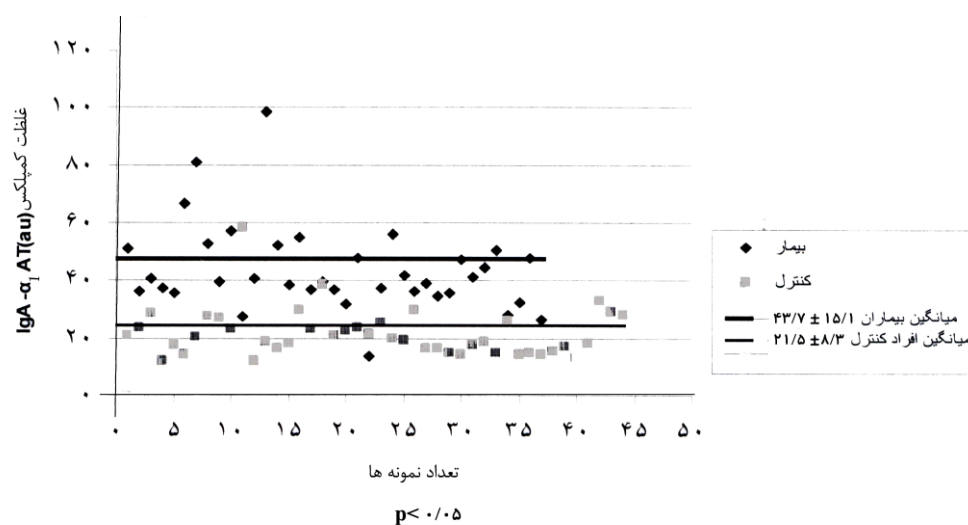
	مدت زمان بیماری		
	۱-۴ سال	۵-۹ سال	بیش از ۱۰ سال
IgA- α_1 AT	۴۱ ± ۷	۴۸ ± ۲۳	۴۲ ± ۱۰

* توضیح: در جداول ۱، ۲ و ۳ نتایج میزان کمپلکس بر حسب واحد قراردادی (au) به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

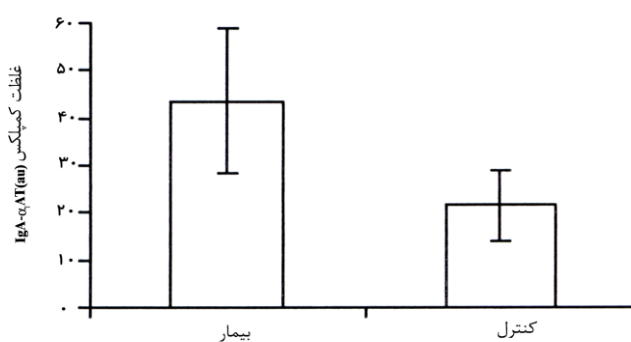


نمودار شماره ۱: خط استاندارد برای اندازه‌گیری میزان کمپلکس IgA- α_1 AT

*بیشترین میزان کمپلکس در خون بیماری که بیشترین مقدار را داشته ۱۰۰ واحد قراردادی (au) در نظر گرفته شده است.



نمودار شماره ۲: توزیع غلظت کمپلکس IgA- α_1 AT در بیماران و افراد کنترل نسبت به میانگین هر گروه



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین سطح کمپلکس IgA- α_1 AT در بیماران و افراد طبیعی (کنترل)

بحث

گلیکوپروتئین α_1AT در موقعیت ۲۳۲ یک ریشه سیستمین آزاد دارد لذا می تواند توسط آن با مولکول هایی که دارای سیستمین آزاد هستند پیوند دی سولفیدی برقرار نماید. مولکول IgA نیز در موقعیت ۴۷۱ خود دارای یک سیستمین است، این سیستمین محل اتصال زنجیره J می باشد که باعث ایجاد IgA دو مولکولی یا دیمر می شود. به طور طبیعی ۱٪ از α_1AT انسان به IgA متصل می شود ولی در بعضی از بیماری ها به دلیل افزایش اجزای کمپلکس، مقدار آن افزایش می یابد که دلایل زیر را می توان برای آن مطرح نمود:

- افزایش یافتن سطح IgA با گروه تیول فعال.
- سنتز زنجیره J غیرنرمال توسط تعدادی از کلون های پلاسماسل که نتیجه آن افزایش IgA با گروه تیول فعال می باشد.
- نقص در آنزیم β -لنفوسیت سولفیدریل اکسیداز، این آنزیم باعث اتصال زنجیره J به IgA می شود.
- اختلالات التهابی که با افزایش میزان IgA و α_1AT ، به ایجاد پروتئولیز یا وجود اکسیژن فعال و یا تغییرات گلیکوزیلاسیون در آن ها می انجامد (۳).

پزشکان روماتولوژیست برای تشخیص بیماری آرتریت روماتوئید از آزمایش هایی از قبیل تعیین RF و نیز آزمایش های کمکی و ارزیابی CRP و ESR استفاده می نمایند که آزمون RF اختصاصی تر می باشد اما این آزمایش به تنهایی نمی تواند نشان دهنده بیماری آرتریت روماتوئید باشد زیرا در ۵٪ افراد سالم نیز مثبت است (۱،۲).

در این تحقیق از بین ۳۷ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید قطعی، فقط تعداد ۲۶ نفر از آن ها دارای فاکتور روماتوئید مثبت و تعداد ۱۱ نفر نیز دارای RF منفی بودند ولی نتایج آزمون الیزا نشان داد که متوسط سطح سرمی کمپلکس IgA - α_1AT در ۳۶ بیمار بالاتر از متوسط آن در افراد طبیعی بود و فقط در یک مورد پائین تر بود.

باتوجه به این که در بیماری آرتریت روماتوئید، تشخیص سریع، مهم می باشد و در صورتی که تشخیص و درمان

به موقع صورت نگیرد باعث خوردگی غضروف و استخوان و حتی کاهش طول عمر می شود، لذا استفاده از آزمایش های دیگر جهت تشخیص سریع و صحیح بسیار ضروری به نظر می رسد.

همچنان که در جدول ۱ ملاحظه می شود با استفاده از محاسبات آماری مشخص شد، فاکتور سن و جنس در دو گروه بیمار و کنترل به طور جداگانه تاثیر معنی داری روی میزان کمپلکس مورد نظر ندارد. اما میزان این کمپلکس در بین کل افراد بیمار و افراد طبیعی تفاوت معنی داری نشان می دهد ($p \leq 0.05$).

اطلاعات موجود در جدول ۲ نشان می دهد میزان کمپلکس IgA - α_1AT در بیماران با درجات مختلف CRP و RF تفاوت چشمگیری ندارد. اگرچه نتایج آزمایش های CRP و RF در بین افراد بیمار تفاوت زیادی داشته است. با توجه به جدول ۳ مشاهده می شود که تفاوت معنی داری در میزان کمپلکس IgA - α_1AT در بیماران به لحاظ طول دوره بیماری وجود ندارد ($p \leq 0.05$).

نتیجه گیری

آزمایش معمول سرولوژیک RF در ۲۵٪ از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته اند منفی بوده است ولی موارد منفی کاذب آزمایش CRP کمتر از RF (۱۸٪) بوده است در حالی که می دانیم آزمایش CRP را به هیچ وجه نمی توان یک آزمایش اختصاصی محسوب نمود (۲). در تمام بیمارانی که از آرتریت روماتوئید رنج می بردند، میزان کمپلکس IgA - α_1AT حدود دو برابر افراد طبیعی بود و میزان این افزایش نیز تحت تاثیر سن بیمار و یا مدت زمان سابقه ابتلا به بیماری نبود (۱۱-۶). لذا با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان نتیجه گرفت که تعیین سطح سرمی کمپلکس IgA - α_1AT به روش ELISA می تواند آزمایش قابل اعتمادی برای تشخیص بیماری آرتریت روماتوئید باشد اگرچه تعداد بیشتری از بیماران برای اثبات قطعی این مسئله و نیز ارتباط آن با سابقه و شدت بیماری باید مورد مطالعه قرار گیرند.

منابع

- ۱- نورانی فرزاد، سینا شاهین، اسفندیار محسن. اصول طب داخلی هاریسون. بیماری‌های مفاصل بافت همبند و دستگاه ایمنی. انتشارات ارجمند. صفحه ۱۳۷۷، ۱۵۳-۱۳۶.
- ۲- فرید حسینی رضا. پاتوفیزیولوژی بیماری‌های روماتیسمی و خود ایمنی. چاپ سوم، مشهد: مؤسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی. صفحه ۱۳۷۱، ۲۲۱-۲۰۳.
- 3- Sriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. A1-antitrypsin deficiency. The metabolic basis of inherited. Sixth edition, 1989, 2: 2409-2437.
- 4- Scott LJ, Russel GI, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Oxidation of α_1 -proteinase inhibitor by the myeloperoxidase-hydrogen system promotes binding to immunoglobulin A. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1999; 255: 562-567.
- 5- Davis MJ, Dawes PT, Fowler PD, Shadforth MF, Lewin I, Stanworth DR. The association and predictive value of the complex immunoglobulin A- α_1 -antitrypsin in the development of erosion in early rheumatoid arthritis. Scan J. Rheumatol, 1991; 20: 23-27.
- 6- Ixana K, Aotsuka S. Prospective of the clinical of determining circulating IgA- α_1 -antitrypsin complexes using a prototype ELISA kit in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 1996; 55: 848-851.
- 7- Davis MJ, Dawes PT, Beswick E, Lewin IV, Stanworth DR. Sulphasalazine therapy in Ankylosing Spondylitis effect on disease activity, immunoglobulin A and complex immunoglobulin A- Alpha 1-antitrypsin. British Journal of Rheumatology, 1989; 28: 410-413.
- 8- Lacki JK, Schochat T, Klama K, Mackiewicz SH, Muller W. Does Methotrexate effect serum level of IgA- alpha- antitrypsin complex in early Rheumatoid Arthritis? Clinical Rheumatology, 1995; 14 (5): 566-569, 1995.
- 9- Scott LJ, Evans EL, Dawes PT, Russel GL, Matthey DL. Comparison of IgA- alpha 1-antitrypsin levels in rheumatoid arthritis and seronegative oligoarthritis: complex formation is not associated with inflammation per se. British Journal of Rheumatology, 1998; 37: 308-404.
- 10- Hutchinson D, O'leary C, Nixon NB, Matthey DL. Serum complexes of IgA- alpha-1 proteinase inhibitor in rheumatoid arthritis: association current cigarette smoking and disease activity. Clin Exp Rheumatol, 2002; 20(3): 387-391.
- 11- Janciaukiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. Biochemica et Biophysica Acta, 2001; 1535: 221-235.

Measurement of serum level of IgA- α_1 -AT complex in patients with rheumatoid arthritis

Sahebghadam Lotfi A.¹(PhD), Mottahari M.¹(MS), Shakibi M.R.²(MD),
Mousavi Hoseini M.K.³(PhD), Adibi Motlagh B.³(MS), Mahmoodi M.²(PhD)

¹Tarbiat Modarres University

²Kerman University of Medical Sciences

³Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

Abstract

Background and Objectives

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe chronic inflammatory disease that can not be easily rapidly treated. It can cause joint destruction and disability. Generally some laboratory tests, such as Rheumatoid Factor (RF), Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) or C-Reactive Protein (CRP) can be used for diagnosis and monitoring of the rheumatoid arthritis. However, they are not always ideal. In inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, the level of IgA will increase in serum; the surplus IgA can then react with some of the serum proteins such as Alpha-1-antitrypsin (α_1 AT) to form a non-immune complex. The complex IgA - α_1 AT is formed by disulfide bonding between an active thiol group available on the both proteins. Some reports suggested that this complex is a good marker for RA disease without false results, while RF test has some false negative results.

Materials and Methods

In this study the level of IgA- α_1 AT complex in thirty seven RA patients and in forty four normal subjects by ELISA methods using anti- α_1 -antitrypsin monoclonal and anti-IgA polyclonal HRP conjugated antibodies was evaluated. Routine laboratory tests of RF, CRP and ESR in patients and controls were also investigated.

Results

Our results showed that IgA- α_1 AT complex level in patients (43.7 ± 15.4) is significantly higher than controls (21.5 ± 8.3) ($p < 0.05$). There were significant differences between the sera complex levels in patients and controls. The RF results revealed eleven false negatives (30%) while the level of complex had only one false result (3%).

Conclusions

Instead of RF, a rapid and sensitive ELISA test for IgA- α_1 AT complex level in RA patients is strongly recommended.

Key words: IgA- α_1 AT complex, ELISA, Rheumatoid arthritis
SJIBTO 2005; 2(4): 65-71

Received: 9 Feb 2005

Accepted: 11 Jun 2005

Correspondence: Sahebghadam Lotfi A., PhD of Clinical Biochemistry, Tarbiat Modarres University
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88013030; Fax : (+9821) 88013030
E-mail: lotfi_ab@modares.ac.ir