خون
فصلنامه پژوهشی
تابستان ۸۴ دوره ۲ شماره ۴

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 به‌دنبال آن IgA اضافی می‌تواند بابرخی از پروتئین‌های موجود درسرم از جمله آلفا-۱-آنتی تریپسین (α_1AT) میانکنش داشته و تشکیل کمپلکس غیرایمنی بدهد. آزمایش‌های سرولوژی رایج تشخیصی برای آرتریت روماتوئید از جمله RF، ESR وCRP 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 به‌عنوان یک عامل تشخیصی استفاده نمود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده تجربی، آزمایشگاهی بود. در این تحقیق میزان کمپلکس IgA – α_1AT در سرم ۳۷ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید (با تشخیص قطعی پزشک) و ۴۴ فرد طبیعی به‌عنوان کنترل توسط روش الیزا با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد α_1AT 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_1AT در سرم بیماران نسبت به افراد کنترل به لحاظ آماری معنی‌دار است (۱۵/۴ ± ۴۳/۷ در بیماران و ۸/۳ ± ۲۱/۵ در افراد طبیعی) ($p < ۰/۰۵$). همچنین علیرغم این‌که RF در ۱۱ بیمار (۳۰٪ کل بیماران) منفی به‌دست آمد، کمپلکس IgA – α_1AT تنها در یک بیمار (۳٪) از میانگین افراد طبیعی گزارش شده کمتر بود. این امر نشان‌دهنده این است که پاسخ‌های منفی کاذب درمورد میزان سرمی کمپلکس IgA–α_1AT توسط روش الیزا نسبت به آزمایش RF به‌شدت پایین است.

نتیجه گیری

از مطالعه انجام شده نتیجه‌گیری می‌شودکه تعیین میزان کمپلکس IgA-α_1-antitrypsin در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به‌عنوان شاخص مراحل پیشرفت بیماری پیشنهاد می‌شودکه با روش الیزا قابل انجام است.

کلمات کلیدی: **کمپلکس IgA – α_1AT ، الیزا، آرتریت روماتوئید**

تاریخ دریافت : ۸۳/۱۱/۲۱
تاریخ پذیرش : ۸۴/ ۳/۲۱

۱- مؤلف مسؤول: 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA)[1] یا التهاب مفاصل، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های التهابی مزمن با علت ناشناخته است. نتیجهٔ التهاب مفصل، تخریب غضروف، خوردگی استخوان و به‌دنبال آن تغییر شکل مفاصل می‌باشد. از نشانه‌های این بیماری می‌توان به تورم مفاصل بدن به‌صورت 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)[2]، آزمایش‌های کمکی و شاخص‌های ارزیابی بیماری از قبیل سرعت رسوب گلبولی (ESR) و میزان CRP استفاده می‌گردد که هیچ یک از آن‌ها اختصاصی نمی‌باشند، به‌عنوان مثال حضور فاکتور روماتوئید مختص بیماری آرتریت روماتوئید نیست و در ۵٪ اشخاص سالم نیز یافت می‌شود (۲، ۱).

یکی از ترکیباتی که می‌توان از آن در تشخیص بیماری آرتریت‌روماتوئیداستفاده نمود، کمپلکس IgA–α_1AT است. این کمپلکس از اتصال دی سولفیدی بین گلیکوپروتئین آلفا–۱– آنتی تریپسین (α_1AT) با ایمونوگلوبولین A تشکیل می‌شود که اتصال آن‌ها از طریق تنها سیستئین موجود در α_1AT در موقعیت ۲۳۲ و سیستئین شماره ۴۷۱ زنجیره سنگین IgA می‌باشد. معمولاً ۱٪ ازکل گلیکوپروتئین α_1AT انسان به IgA متصل می‌گردد ولی در بیماری RA سطح سرمی این کمپلکس افزایش می‌یابد (۸– ۳).

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 علایم 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 شمارهٔ ۱ و ۲ درج شده است.

آزمایش الیزای ساندویچی

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال ضد α_1AT انسان[3] باغلظت ۰/۵mg/ml در PBS[4] (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 هریک از چاهک‌ها ریخته و به مدت ۱ ساعت درحمام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از عمل شستشو، مقدار۱۰۰ میکرولیتر از سرم بیماران و افراد طبیعی با رقت ۱/۷۵در بافر بلاکینگ (محلول ۰/۱٪ ژلاتین در آب) داخل چاهک‌ها ریخته و پلیت به‌مدت۲ ساعت در حمام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از شستشو مقدار۱۰۰ 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

یافته‌ها

نتایج مقایسه سطح سرمی کمپلکس IgA–α_1AT 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 و۳ درج شده است.

یک منحنی استاندارد با استفاده از سرم فرد بیماری که بالاترین مقدار کمپلکس را داشت رسم شد. روش رسم 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 ازنتایج جذب قرائت شده منحنی رسم گردید. (نمودارشماره۱).

جذب سایر نمونه‌ها را با استفاده از این منحنی بر حسب واحد قراردادی (au)[1] به‌دست آورده که در نمودارهای شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱ : میزان کمپلکس IgA-α_1AT 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_1AT	۲۲ ± ۴	۲۱ ± ۹	۲۱ ± ۸	۵۰ ± ۲۳	۴۲ ± ۱۲	۴۴ ± ۱۵

جدول ۲ : میزان کمپلکس IgA-α_1AT در بیمارانی که نتایج آزمایش CRP و RF مثبت داشته‌اند*

	CRP				RF			
	+۱	+۲	+۳	منفی	+۱	+۲	+۳	منفی
سن	۵۱ ± ۱۳	۴۹ ± ۱۳	۳۹ ± ۱۵	۴۴ ± ۱۶	۴۸ ± ۱۳	۲۹ ± ۱۴	۴۲ ± ۱۸	۴۰ ± ۱۳
IgA-α_1AT	۴۰ ± ۷	۴۰ ± ۹	۴۹ ± ۲۱	۴۰ ± ۱۰	۴۸ ± ۱۸	۳۶ ± ۷	۴۹ ± ۱۴	۴۰ ± ۱۴

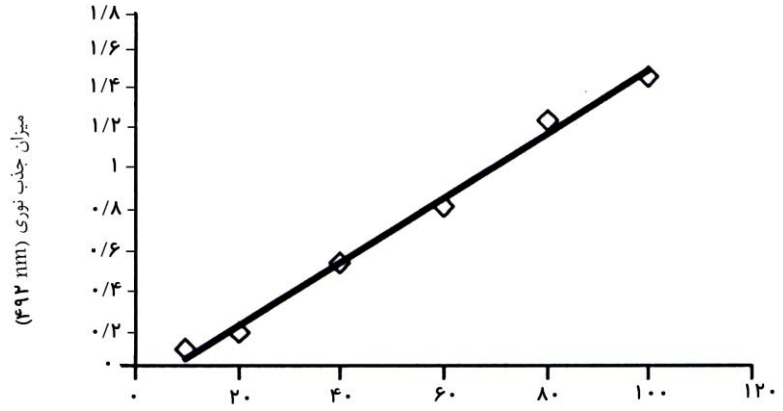
جدول ۳ : رابطه میزان کمپلکس IgA-α_1AT با مدت زمان بیماری*

	مدت زمان بیماری		
	۱-۴ سال	۵-۹ سال	بیش از ۱۰ سال
IgA-α_1AT	۴۱ ± ۷	۴۸ ± ۲۳	۴۲ ± ۱۰

* توضیح: در جداول ۱، ۲ و ۳ نتایج میزان کمپلکس برحسب واحد قراردادی (au) به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

1- arbitrary unit

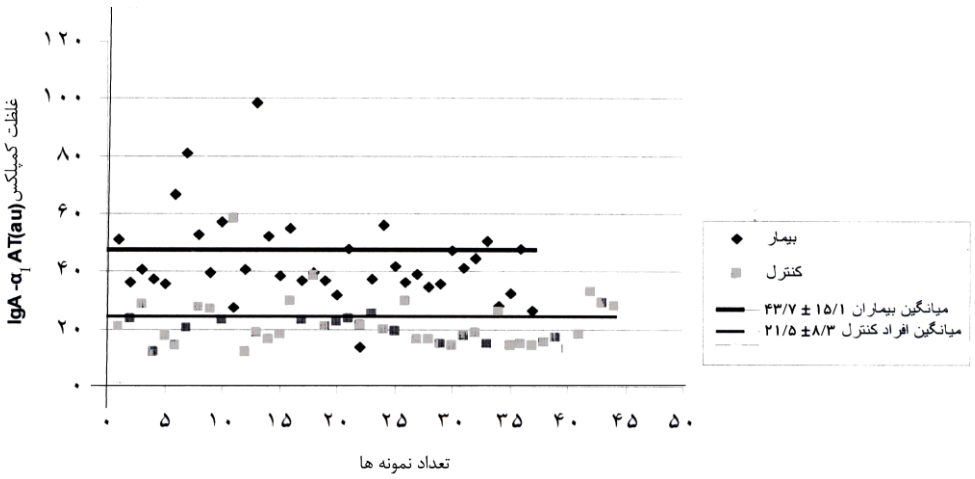
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]



غلظت کمپلکس IgA-α_1 AT*

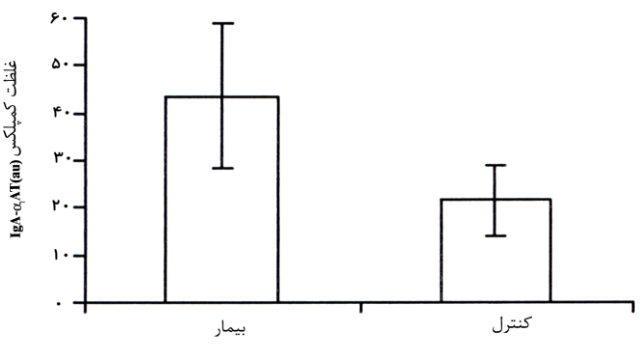
نمودار شماره ۱ : خط استاندارد برای اندازه‌گیری میزان کمپلکس IgA-α_1AT

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



p< ۰/۰۵

نمودار شماره ۲ : توزیع غلظت کمپلکس IgA-α_1AT در بیماران و افراد کنترل نسبت به میانگین هر گروه



نمودار شماره ۳ : مقایسه میانگین سطح کمپلکس IgA-α_1AT در بیماران و افراد طبیعی (کنترل)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

بحث

گلیکوپروتئین α_1AT در موقعیت ۲۳۲ یک ریشه سیستئین آزاد دارد لذا می‌تواند توسط آن با مولکول‌هایی که دارای سیستئین آزاد هستند پیوند دی سولفیدی برقرار نماید. مولکول IgA نیز در موقعیت ۴۷۱ خود دارای یک سیستئین است، این سیستئین محل اتصال زنجیرهJ می‌باشد که باعث ایجادIgA دو مولکولی یا دی‌مر می‌شود.

به‌طور طبیعی ۱٪ از α_1AT انسان به IgA متصل می‌شود ولی در بعضی از بیماری‌ها به‌دلیل افزایش اجزای کمپلکس، مقدار آن افزایش می‌یابد که دلایل زیر را می‌توان برای آن مطرح نمود:

- افزایش یافتن سطح IgA با گروه تیول فعال.
- سنتز زنجیرهٔ J غیرنرمال توسط تعدادی ازکلون‌های پلاسما سل که نتیجه آن افزایش IgA با گروه تیول فعال می‌باشد.
- نقص در آنزیم β- لنفوسیت سولفیدریل اکسیداز، این آنزیم باعث اتصال زنجیرهٔ J به IgA می‌شود.
- اختلالات التهابی که با افزایش میزان IgA و α_1AT، به ایجاد پروتئولیز یا وجود اکسیژن فعال و یا تغییرات گلیکوزیلاسیون در آن‌ها می‌انجامد (۳).

پزشکان روماتولوژیست برای تشخیص بیماری آرتریت روماتوئید از آزمایش‌هایی از قبیل تعیین RF و نیز آزمایش‌های کمکی و ارزیابی CRP و ESR استفاده می‌نمایند که آزمون RF اختصاصی‌تر می‌باشد اما این آزمایش به تنهایی نمی‌تواند نشان‌دهندهٔ بیماری آرتریت روماتوئید باشد زیرا در ۵٪ افراد سالم نیز مثبت است (۱،۲).

در این تحقیق از بین ۳۷ بیمار مبتلابه آرتریت روماتوئید قطعی، فقط تعداد ۲۶ نفر از آن‌ها 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 پائین‌تر بود.

باتوجه به‌این‌که در بیماری آرتریت روماتوئید، تشخیص سریع، مهم می‌باشد ودرصورتی‌که تشخیص و درمان به‌موقع صورت نگیرد باعث خوردگی غضروف و استخوان و حتی کاهش‌طول عمر می‌شود، لذا استفاده از آزمایش‌های دیگر جهت تشخیص سریع و صحیح بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد.

همچنان‌که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود با استفاده از محاسبات آماری مشخص شد، فاکتور سن و جنس در دو گروه بیمار و کنترل به‌طور جداگانه تاثیر معنی‌داری روی میزان کمپلکس مورد نظر ندارد. اما میزان این کمپلکس در بین کل افراد بیمار و افراد طبیعی تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($p\leq ۰/۰۰۵$).

اطلاعات موجود در جدول ۲ نشان می‌دهد میزان کمپلکس IgA –α_1AT در بیماران با درجات مختلف CRP و RF تفاوت چشمگیری ندارد. اگرچه نتایج آزمایش‌های CRP و RF در بین افراد بیمار تفاوت زیادی داشته است.

با توجه به جدول ۳ مشاهده می‌شود که تفاوت معنی‌داری در میزان کمپلکس IgA–α_1AT در بیماران به لحاظ طول دوره بیماری وجود ندارد ($p\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری

آزمایش معمول سرولوژیک RF در ۲۵٪ از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند منفی بوده است ولی موارد منفی کاذب آزمایش CRP کمتر از RF (۱۸٪) بوده است در حالی‌که می‌دانیم آزمایش CRP را به هیچ وجه نمی‌توان یک آزمایش اختصاصی محسوب نمود (۲). در تمام بیمارانی که از آرتریت روماتوئید رنج می‌برند، 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 به‌دست آمده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که تعیین سطح سرمی کمپلکس IgA–α_1AT به‌روش ElISA، می‌تواند 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

منابع

۱- نورانی فرزاد، سینا شاهین، اسفندبد محسن. اصول طب داخلی هاریسون. بیماری‌های مفاصل بافت همبند و دستگاه ایمنی. انتشارات ارجمند. صفحهٔ۱۳۷۷، ۱۵۳- ۱۳٦.

۲- فرید حسینی رضا. پاتوفیزیولوژی بیماری‌های روماتیسمی و خود ایمنی. چاپ سوم، مشهد: مؤسسهٔ چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی. صفحهٔ ۱۳۷۱، ۲۲۱-۲۰۳.

3- Scriver 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, Mattey DL. Oxidation of α_1-proteinase inhibitor by the myeloperoxidase–hydrogen system pronotes 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 comples 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 Spondilitis 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, Mattey 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, Mattey 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

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)

[1]*Tarbiat Modarres University*
[2]*Kerman University of Medical Sciences*
[3]*Iranian 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-antirypsin (α_1AT) to form a non-immune complex. The complex IgA – α_1AT 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_1AT complex in thirty seven RA patients and in forty four normal subjects by ELISA methods using anti-α_1-antirypsin 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_1AT 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_1AT complex level in RA patients is strongly recommended.

Key words: IgA-α_1AT 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]