شماره پایان نامه: ۲۱۶۹

دانشگاه تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه

برای دریافت درجه دکتری از دانشگاه تهران

موضوع :

تغییرات کمپلمان سرم در جریان شیمی درمانی سرطانها

براهنمائی

جناب آقای دکتر حسین سعادت زاده

نگارش

گلرخ ملیحی

سال تحصیلی ۲۵۳۷-۲۵۳۶

۱۱۴۷۱

تقـــــدیـــم بـــــه :

پدر عزیزم که همیشه مدیون زحمات ایشان بوده ام .

مادر عزیزم که مرهون فداکاریهای ایشان هستـــــم .

عموی عزیزم که پیوسته مشوق من در امر تحصیـــل بوده انـــد .

۱۳۷۱

سپاسگـــزاری :

بدین وسیله ازخدمات ارزندهٔ استاد ارجمند جناب آقای دکترحسین سعادت زاده که در پیمودن مراحل گذراندن پایان نامه با اینجانب بنحواحسن همراهی نموده اند ، کمال تشکررا دارم .

سپاسگزاری :

از استادان ارجمند جنابان آقایان :

دکتر غلامرضا نظری (بخش ایمونولژی دانشکده پزشکی) ،

دکتر اسکندر اخوان (بخش بیماریهای خون مرکز پزشکی پهلوی) ،

دکتر محمد زمانی (مرکز طبی کودکان)

وکلیه همکاران دیگر بویژه خانم پریوش مصطفوی (بخش ایمونولژی دانشکده پزشکی) که هریك با راهنمائیها و کمك های ارزنده خود در بثمر رسانیدن این پایان نامه بامن یاری نموده اند صمیمانه تشکر مینماید .

فهرست مطالب :

فصل اول	عنوان	صفحه
۱-۱	تعریف کمپلمان و تاریخچه مختصر پیدایش آن	۱
۱-۲	کمپلمان سرم حیوانات	۲
۱-۳	کمپلمان انسان و اجزاء آن	۲
۱-٤	روشهای جدا کردن و تخلیص اجزاء کمپلمان	۷
۱-٥	تولید کمپلمان در بدن	۸
۱-٦	نقش بیولوژی کمپلمان	۱۱
۱-۷	میزان کمپلمان سرم و اجزاء آن در حالت طبیعی	۱۲
۱-۸	تغییرات کمپلمان سرم در حالت بیماری	۱۳
۱-۹	مصایب ارثی و مادرزادی کمپلمان	۱٦
فصل دوم		
۲-۱	اساس شیمی درمانی سرطان	۲۱
۲-۲	انواع داروهای مصرفی در درمان سرطانها	۲۲
۲-۳	روشهای درمانی مشترک سرطانها	۲۹
۲-٤	سرطان و ایمونولوژی	۳۲
۲-٥	ایمونوسوپرسیون و پدیده‌های آن	٤٤
فصل سوم		
۳-۱	تغییرات کمپلمان سرم در انواع سرطانها	٤۸

عنوان	صفحه
۳-۲ تغییرات کمپلمان سرم در سرطان خون (لوسمی ها) بعد از شیمی درمانی	۵۹
فصل چهارم	۶۱
۴-۱ روش کار	۶۱
۴-۲ تهیه شرح حال و گزارش بیماران	۶۴
۴-۳ آمار و مشاهدات آزمایشگاهی	۶۵
۴-۴ بحث و بررسیهای لازم	۶۹
خلاصه و نتیجه	۷۱
رفرانسها و مدارک و مآخذ	۷۵

بنام خداوند بخشاینده مهربان

ـ الف ـ

مقـــدمه ـ هر چند در جهان امروز بسیاری از مـردم سرطان را یك بیماری درمان ناپذیری می پندارند ولی چون اساس دانش پزشکی متکی بر پیدایـــش راه درمان و پیشگیری است، لذا از روزی که بشر با کیفیت بروز چنین بیمـــاری مواجه شد، اهل تحقیق و پزشکان در صدد معالجه و ریشه‌کن کردن آن بـر- آمدند و برای مبارزه با این بیماری تمام امکانات خود را بسیج کرده‌اند.

از آنجا که ثابت شده است که اگر دستگاه ایمنی بدن انسان و فاکتورهای آن بطور صحیح و کامل عمل خود را انجام دهند، در مقابله با بیماری سهـــم بسیار مهمی را عهده دار میشوند، امروز این اصل در مورد بیماری سرطان نیز اهمیت زیادی پیدا کرده و یکی از راههای مهم در بهبود بیماران را شامل میشود و دانشمندان پزشکی معتقدند که یکی از طرق درمان بیماران سرطانی تقویت سیستم ایمنی میباشـد.

خوشبختانه در کشور ما نیز علوم پزشکی آنچنان انبساط و توسعه یافته است که پزشکان و محققین ما هم میتوانند همگام با سایر دانشمندان سهمی در این زمینه داشته باشند. اینجانب نیز در دوران دانشجویی به کارهای آزمایشگاهی علاقه خاصی پیدا کردم و در صدد برآمدم تا از اینراه تحقیق کوچکی در یکی از شاخه های علم پزشکی انجام دهم و در مورد ایمونولژی، کارهای آزمایشگاهی خود را آغاز نمایم. لـذا، مدت دو سال و نیم است که در بخش بیماریهـای خون دانشکده پزشکی پهلوی به بررسی بیماران پرداخته ام و در این مدت از تجربیات و نظرات ارزنده جناب آقای دکتر اخوان بهره گرفته ام. موضوع تحقیق، مطالعه تغییرات کمپلمان سرم (مکمل) در لنفوم و لوسمی بعـد از شیمی درمانی است تا شناخت این بخش از دستگاه ایمنی بدن بیشتر شده و آیندگان با آگاهی بیشتر نتایج بدست آمده را تعقیب نمایند. باشد که از این راه وظیفه و دین خود را به میهن عزیز و همگان بشکل ارزنـــده ای ایفـــا نمایـــم.

۱-۱ تعریف کمپلمان و تاریخچه: کمپلمان از مجموعه پروتئینهایی از دسته گلوبولین‌ها تشکیل شده که بطور طبیعی در خون حیوانات و انسان وجود دارد . اولین بار بنام الکسین توانستند آنرا از سرم جدا کنند . در غالب پدیده های ایمنی حضـــــورش ضروری بوده و در واکنشهای گوناگون سرمی شرکت مینماید . (۲)

در سال ۱۸۸۹ بوخنر (Buchener) نشانداد که خون اثر منهدم کننده ای در برابر میکربهای گرم منفی مثل شیگلا (Schigella) و اشریشیا کلی (E. Coli) دارد . ولی اگر سرم را در ٥٦ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ دقیقه حرارت دهیم این فعالیت از بین میرود . بعدا دانشمندی بنام پفیفر (Pfeifer) مشاهده کرد که خوکچه هندی مصون بر ویبریون کلرا میتواند میکرب زنده وبا راد رصفاق خـــود بدانه های ریز تبدیل نموده لیز کند . این عمل با سرم تازه همان کوپی ها قابـل انجام بود ولی با سرم کهنه یا حرارت دیده (حدود نیمساعت در بن ماری ٥٦ -- درجه سانتیگراد) میکربهای وبا لیز پیدا نمیکردند . اما پس از افزودن کمی ســرم تازه حتی از حیوان غیر مصون واکنش انحلال میکربی دوباره حاصل میشد بهمیـــن جهت علت نابودی و انحلال میکربها را بر اثر دو ماده دانستند . این دو عامـل را بورده (Bordeh) نیز در انحلال گلبولی (همولیز) موثر دانست. اولـــــی ماده ای است گرمی فرسا بنام انتی کور از دسته ایمون گلوبولین‌ها که بطـــــور طبیعی در سرم وجود ندارد اما پس از ایمونیزاسیون در بدن پیدا میشود و حرارت ٥٦ درجه سانتیگراد بمدت نیمساعت را بخوبی تحمل میکند که در مورد گلبول قرمز همولیزین مینامنـــد .عامل دوم ماده ای است از دسته گلوبولین های گرمی نافرسا که حرارت ٥٦ درجه سانتیگراد بمدّت نیمساعت فعالیت آنرا از بین میبرد . روی

میکرب یا سلول یا گلبول که تحت‌تاثیر آنتی‌کور مخصوص قرار گرفته باشند پیوست پیدا می کند و سبب پیدایش پدیده باکتریولیز (Bacteriolyse) ، سیتولیز (Cytolyse) یا انحلال سلولی و همولیز یا انحلال گلبولی میشود ، این ماده را کمپلمان نامند .

۱-۲ کمپلمان سرم حیوانات: کمپلمان در خون بیشتر مهره داران وجود دارد . (۲) از همه بیشتر در سرم کوبی (خوکچه هندی) یافت میشود . کمپلمان کوبی از طرفی ترکیباتش به کمپلمان انسان نزدیکتر است . و از طرفی سرم کوبی همولیزین طبیعی بر ضد گلبول سرخ گوسفند ندارد . بهمین جهت منبع اصلی کمپلمان سرم خوکچه هندی است . نسبت به سن ، وزن ، و وضع تغذیه حیوان مقدار کمپلمان فرق میکند . کوبی نر بیشتر از کوبی ماده کمپلمان دارد . کوبی آبستن و بچه شیرده کمپلمان ناچیزی دارد . حیوان هرچه جوانتر ، کوچکتر و وضع تغذیه بدتری داشته باشد کمپلمانش کمتر است . در بسیاری موارد آزمایشهای ثبوت کمپلمان از کمپلمان کوبی استفاده میشود .

۱-۳ کمپلمان انسان و اجزاء آن: کمپلمان انسان سابقا فقط بعنوان عامل کمکی در همولیز گلبولهای قرمز پوشیده از پادتن شناخته میشد ولی اکنون معلوم شده است که این عامل تنها یك ماده نیست بلکه بصورت مجموعه‌ای از عوامل انزیمی است که اعمال فیزیولوژیکی آن کاملا با آنچه سابق شناخته میشد متفاوت است . این عوامل آنزیمی ، با علامت اختصاری C مشخص میشود و اجزاء آن را با زیر نویس از یك تا نه بصورت C1, C2, ... C9 شماره گذاری میکنند . (۲ و ۸) . C1 که معرف کمپلمان یك است خود از سه واحد $C1_q$, $C1_r$, $C1_s$ تشکیل شده ، بنابراین در مجموع کمپلمان شامل ۱۵ (پانزده) عامل آنزیمی میباشد .

بطور خلاصه فعال شدن این عوامل آنزیمی باین ترتیب است که عامل اول یا C1 در برابر کمپلکس آنتی ژن آنتی کر و یون کلسیم فعال میشود و این فعالیت تا C9 پیش میرود تا منجر به همولیز شود . این طریق فعالیت سیستم کمپلمان را فعالیت از راه اصلی یا کلاسیك مینامند . باید خاطرنشان ساخت که وقتی این آنزیمها فعال میشوند ، ترتیب فعالیت مطابق با ترتیب شماره گذاری نیست، بدینمعنی که فعالیت C1 منجر به فعالیت C4 و بعد C2 و C3 میشود . بعد از C3 نوبت فعالیت C5 فرا میرسد سپس فعال شدن بترتیب شماره گذاری پیش میرود تا در جدار گلبول اثر همولیز فراهم شود .

اخیرا راه فرعی برای فعالیت کمپلمان کشف شده است و آن بدینترتیب است که عوامل دیگری غیر از کمپلکس آنتی ژن آنتی کر موجب فعالیت C3 میشوند و بقیه راه بهمان ترتیب کلاسیك است . با روشهای مختلفی اجزاء کمپلمان را بطور جداگانه خالص نموده و غلظت و وزن مولکولی و سایر خواص آنرا تعیین نموده اند که در جدول (۱) برآوردی از این مشخصات نمایش داده شده است . (۱۰)

خواص	C_{1q}	C_{1r}	C_{1s}	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9
غلظت سرم µg/ml	190	—	22	20-40	1200	430	75	—	—	<10	<10
ترکیب سه زنجیرانی	11,1	7,0	4,0	55	9,5	100	8,7	5-6	5-6	8,0	4,5
وزن مولکولی تقریبی اجزاء	400000	—	79000	117000	195000	240000	—	—	—	150000	79000
تحرک الکتروفورتیکی	γ_2	β	α_2	β_2	β_1	β_1	β_1	β_2	β_2	γ_1	α
درصد کربوهیدرات	15	—	—	—	2,7	14	19	—	—	—	—
SH فعال	—	—	—	2(?)	1-2	—	—	—	—	—	—

جدول (۱)

در اینجا لازم است وظایف و اعمال فیزیولوژیکی و بیولوژیکی اجزاء کمپلمان را پس از فعال شدن مورد بررسی قرار دهیم. (٢٦) که بترتیب عبارتند از :

الف $C_{1,4}$: تنها فعالیت بیولوژیك $C_{1,4}$ در مقابل هرپس ویروسها نشان داده شده است که با اضافه نمودن ٨M آنتی بادی ویروس حساس میشود و با پیوست C1 و C4 به خنثی کردن ویروس میانجامد ، یعنی قابلیت رشد ویروس در کشتبافت از بین میرود اضافه نمودن دو جزئی که بعداً فعال میشوند (C2,C3) خنثی نمودن را افزایش نمیدهد . اثر و تحریك به علت ملکولهای کمپلمان میباشد که متصل به سطح ویروس میشود . گرچه هیچ دلیل مستقیمی برای این بحث مشاهده نشده و نیز هیچ اطلاعی از اثر C1 و C4 در خنثی شدن ویروس در دست نیست.

ب $C_{1,4,2}$: با استفاده از وسایل غیر مستقیم مشاهده شده است که ماده ای شبیه کینین در یکی از مراحل مستقیم کمپلمان که اولین دو جزء یا سه جزء را در بر دارد ساخته میشود . این ماده شبه کینین میتواند ماهیچه صاف را تحریك کند و افزایش نفوذ پذیری (Permeability) عروقی را ایجاد نماید که مقاوم به اثر داروهای آنتی هیستامینیك میباشد . چنین تصور میشود که فاکتور شبه کینین یك محصول مشتق از C4 باشد ، ولی هنوز این فرضیه ثابت نشده است .

ج C3 : جزء C_3 تحت تاثیر $C_{1,4,2}$(C3Convertase)فعال میشود و یکی از مراحل اختصاصی و بسیار مهم سیستم کمپلمان است که بدو عامل (Fragment) تقسیم میشود . عامل بزرگتر $C3_b$ نام دارد . ٩٦٪ مولکول اصلی متعلق به این عامل بوده و بقیه باند غشائی است . بلافاصله در لکوسیت حساس سبب فاگوسیتوز میشود و پس از تولید شدن با آنتی ژن حساس ترکیب میگردد که برای فاگوسیتوز مفید

میشود بخصوص اگر سلول پوشیده شده یك باکتری و یا گلبول قرمز باشد بلافاصله به خرابی و تباهی آن منجر میشود که از نظر کلینیکی شناخته شده و بنام یك کسالت اتوایمون همولیتیك (خود ایمن) نامیده میشود . بعلاوه وجود $C3_b$ در سطح سلول مانند یك پلاکت یا یك گلبول قرمز یا یك لکوسیت پدیده چسب ایمنی را فراهم خواهد کرد که مثلاً آنتی ژن حساس برای چسبیدن به گلبولهای قرمز و یا ذرات دیگر(Invitro) هدایت میشود . و نیز ویروس میتواند بتوسط آنتی بادی و کمپلمان پوشیده شود و به گلبولهای قرمز و پلاکتها بچسبد . نتیجه آن بوجود آمدن یك تجمع بزرگ ترکیبی میباشد که بوسیله سیستم تورین توهوشی(Reticuloendothelial) از بین میرود . پدیده چسب ایمنی ممکنست هیچگونه اتفاقات بوجود آمده در داخل بدن را (Invivo) بیان نکند ولی برای اندازه گیری C_3 میتواند روش غیر همولیتیك باشد .

قسمت کوچکتر C3 عبارتست از $C3_a$ که حداقل دو فعالیت بیولژیك دارد . یکی ایجاد آنافیلاتوکسین (Anaphylatoxin) و دیگری برقراری شیمیوتاکسی لکوسیتهاست . در حالت اول این پپتید سه عمل جداگانه دارد : تحریك ماهیچه صاف، افزایش نفوذ پذیری رگی و آزاد کردن هیستامین از ماست سلها است .

دومین فعالیت بیولژیکی شیمیوتاکسی لکوسیت یعنی جذب گرانولوسیتهای نوتروفیل بمحل ورود آنتی ژن استکه در حیوان یا انسان چنانچه رگها معیوب نباشند هردوی این فعالیتهای بیولژیکی بروز خواهد کرد . به تعبیر دیگر در انفلاماسیون حاد $C3_b$ ممکنست از ملکول C_3 اصلی بوسیله اثر مستقیم آنتی بادی بر سیستم کمپلمان یا توسط اثر جداسازنده تریپسین ، پلاسمین و یك نوع فاکتور از زهر مار کبری (یا یك سرم بتا گلوبولین کوفاکتور) و یا بوسیله یك پروتئاز طبیعی که در بعضی بافتها موجود

است جدا شده و این اعمال انجام میگیرد .

د_ C5: مانند C3 از تجزیه C5 ماده $C5_a$ دیده شده است که یك عمل آنافیلاتوکسیك دارد

$C5_b$ یك پپتید مشتق شده بعد از فعال شدن اولین پنج جزء کمپلمان ویا عمل مستقیم تریپسین و یا اثر آنزیمی که در گرانول های لیزوزومال لکوسیتهای نوتروفیل وجود دارد تهیه میشود و میتواند عین واکنشهای بالا را نشان دهد . پس مطالب فوق نشان میدهد که نوتروفیل ها در محل خارج سلولی آنزیمی را با خود حمل میکنند که در تماس با سوبسترای مربوط به C5 میتواند تولید مدیاتوری را بنماید که قادر است به راکسیون های التهابی شدت بیشتری بدهد . آزمایشها نشان میدهند که کمبود C5 در موش باعث حساسیت خیل زیاد این حیوان به منگوکوك و پنموکوك میشود . در واقع موشهائی که از همان ژن باشند و مقدار کافی C5 دارند برخلاف آنرا نشان میدهند . بنابراین C5 احتمالا" در شکل $C5_b$ در بعضی سیستمهای فاگوستیك نقش مهمی دارد .

C5,6,7 : این سه جزء یك کمپلکس طبیعی اند که اگر فعال شوند فعالیت شیمیوتاکتیك را برای نوتروفیلها سبب میشوند . در یك چنین حالتی ترکیب C5,6,7 بنام کمپلکس سه مولکولی فعال نامیده میشود این ماده که با $C3_a$ و $C5_a$ فرق دارد . وزن مولکولی نسبتا" بزرگی داشته احتمالا" بصورت آزاد نیست که در محل تولید خود نمیتواند بطور سریع پخش شود، از طرف دیگر اگر C5,6,7 در یك محل و موضع خارج رگی تولید شود به غلظت مناسبی که رسید منجر به فعالیت بیولوژیکی خود خواهد شد . این آنزیم در ذخیره لکوسیت دخالت داشته با واکنش شیمیوتاکتیك ارتباط دارد شناخت کامل و صحیح از این آنزیم و درك ارتباط بیوشیمیائی آن میتواند

باعث توسعه درمان ضد التهاب یا انتی انفلاماتوار باشد که در آینده ممکن است برای درمان التهابات ایمونولوژیکی استفاده شود .

و C8,9 : در آخرین قسمت که در نزدیکی سطح سلولی رخ میدهد تاثیر این کمپلکس دخالت دارد که یك اثر سیتوتوکسیك بوده موجب تغییرات الکترومیکروسکپی در مامبران سلول میگردد . در اثر این فاکتور نفوذ پذیری مامبران سلول تغییر خواهد نمود و تمام مواد ترکیبی سلول به خارج خواهند ریخت و در داخل سلول آسیبهای غیر قابل برگشتی ایجاد میگردد که بمرگ آن منجر خواهد شد . مثلاً" برای گلبول قرمز همولیز انجام خواهد شد .

۱-٤ <u>روشهای جداکردن و تخلیص اجزاء کمپلمان</u> : مطالعه بر اجزاء کمپلمان همچنان ادامه دارد بعضی را بطور خالص بدست آورده تحت بررسیهای فیزیکی و شیمیائی قرارداده اند . (۲و۱۰) ولی برخی را مانند $\acute{C}9$ و $\acute{C}8$ و $\acute{C}7$ هنوز بدرستی نشناخته اند .

الف- دیالیز در محلول تامپون فسفات و یا استات در صفر درجه سانتیگراد پس از دوازده تا بیست وچهارساعت دو قسمت حاصل شد. رسوب از جنس اوگلوبولین و شامل $\acute{C}1+\acute{C}3$ است مایه رویه از جنس پزود وگلوبولین و شامل $\acute{C}2+\acute{C}4$ است.

ب - نیمساعت در گرمای ٥٦ درجه سانتیگراد سبب تخریب $\acute{C}1+\acute{C}2$ و باقی ماندن اجزاء $\acute{C}3+\acute{C}4$ میشود .

ج - ترکیب با زیموزان (آنزیمی است که از لوور بدست میاید .) در حضور ژل منیزیم پس از یك ساعت ماندن در ۳۷ درجه سانتیگراد جزء $\acute{C}3$ تخریب و $\acute{C}1+\acute{C}2+\acute{C}4$ باقی میماند .

د - یکساعت ماندن در مجاورت آمونیاك یا هیدرازین در گرمای ۳۷ درجه سانتیگراد $\bar{C}1+\bar{C}2$ تخریب و قسمتی از $\bar{C}3$ بطور ناقص باقی میماند .

هـ - کروماتوگرافی روی سلولز مدیفیه (تغییریافته) مانند دی‌اتیل سلولز (DEAE) و کربوکسی متیل سلولز (CM) و تری اتیل آمینو اتیل‌سلولز (TEAE) که میتواند اجزاء کمپلمان را از هم مجزا نماید .

و - بکمك سولفو سیانور پتاسیم یا زهر مار کبری نیز میتوان بعضی اجزاء کمپلمان را تخریب کرده و باقیمانده را شناخت و خصوصیات هر یك را بررسی نمود .

۱-ه تولید کمپلمان در بدن : (بیوسنتز و متابولیسم) : کوششهای اولیه برای یافتن کانونهای ساخته شدن کمپلمان در بدن را از ۷۵ سال قبل آغاز کردند با اینحال برای این سوال اساسی هنوز جای اختلاف نظر وجود دارد در نتیجه پیشرفتهای اخیر محلهای سنتز خیلی از اجزاء کمپلمان شناخته شده است. (۹)

الف - بیوسنتز C1 : در سال ۱۹۶۶ یك سری آزمایشها نشان داد که روده بزرگ و کوچك قادر به سنتز C1 میباشند زیرا قطعه‌ای از روده کشت داده شده به طریقه (Short Term Organ) تنها بافتی بود که قادر به سنتز C1 فعال همولیتیك بود . سپس با فراهم ساختن روش کشت طبقات سلولی (Jerm Plaque Techniques) برای تهیه C1 فعال همولیتیك به توسط سلولهای منفرد دیدند که سلولهای طبقه پوششی سطحی (Epithelial) محل بیوسنتز C1 است . در مورد $C1_q$ دانشمندان (Day و همکارانش) عقیده دارند که در نوزاد خوك گرچه مسیر لوله گوارش محل اولیه مهمی برای تولید $C1_q$ است ولی فقط لوله گوارش مسئول تهیه نیست زیرا تولید $C1_q$ را در طحال و گرههای لنفاوی نیز مشاهده نموده‌اند و بمقدار کمتری در کبد