

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

٥٤٩٤

۱۳۸۲ / ۱ / ۲۰



دانشگاه تربیت مدرس

وزارت اطلاعات و ارتباطات  
تعمیرات  
تعمیرات

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

موضوع

اندازه گیری سطح سرمی کمپلکس  $IgA-\alpha_1$ -antitrypsin توسط روش الیزا در بیماران

مبتلا به آرتریت روماتوئید

نگارش

مجید مطهری

استاد راهنما

دکتر عباس لطفی

سال تحصیلی

زمستان ۱۳۸۰

۴۵۴۴۵

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد»

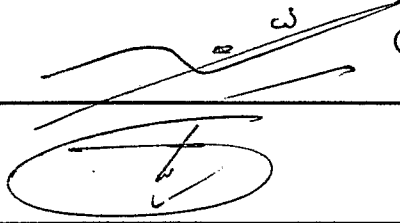
بدینوسیله پایان نامه کارشناسی ارشد آقای مجید مطهری

رشته: بیوشیمی بالینی گرایش:

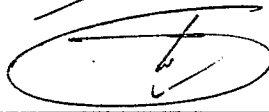
تقدیم می شود. اینجانبان نسخه نهائی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی (استاد راهنما)



جناب آقای دکتر محمدجواد رسائی (استاد مشاور)



جناب آقای دکتر علیرضا مصباح (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)



جناب آقای دکتر محمد انصاری (استاد ناظر)





بسمه تعالی

وزارت اطلاعات وزارت علوم  
جمهوری اسلامی ایران

## آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بختی از فعالیت های علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:  
(کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشته \_\_\_\_\_ است که در سال \_\_\_\_\_ در دانشکده \_\_\_\_\_ دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر \_\_\_\_\_، مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر \_\_\_\_\_ و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر \_\_\_\_\_ از آن دفاع شده است.)

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر سوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجوی تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب محمد علی دانشجوی رشته سورئوبالستری مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: محمد علی  
تاریخ و امضا: ۸۱/۱۰/۱۱

تقدیم به :

همسر

پدر و مادر

و

فداکارم

عزیز

## تقدیر و تشکر:

با سپاس پروردگار یکتائی را که به انسان نعمت تفکر و تعقل را عنایت فرمود، بر عهده خود میدانم که که مراتب تشکر و قدر دانی خویش را نسبت به اساتید و عزیزان زیر اعلام نمایم:

- جناب آقای دکتر لطفی مدیر محترم گروه بیوشیمی بالینی و استاد راهنما
- جناب آقای دکتر رسائی، ریاست محترم دانشکده پزشکی و استاد مشاور
- جناب آقای دکتر علامه
- جناب آقای دکتر کاظم نژاد
- و همچنین دوستان و دانشجویان گرامی :
- آقایان: محسنی فر - مشکانی
- خانمها: کاشانیان - پاک نژاد - رهبری زاده - رجبی - افشار - اعتمادی - محسنی

## چکیده:

آرتریت روماتوئید بیماری مزمن التهابی شدیدی است که نمیتوان آنرا سریع درمان نمود و نتیجه ی آن از بین رفتن مفصل ، ناتوانی و حتی مرگ میباشد. لذا تشخیص سریع، درمان صحیح و کامل بیماری خیلی مهم میباشد. معمولاً از چند تست آزمایشگاهی از قبیل : ESR, CRP, RF جهت تشخیص و ارزیابی بیماری آرتریت روماتوئید استفاده میشود. ولی این تستها در تشخیص بیماری، همیشه کار آمد نیستند.

کمپلکس IgA-  $\alpha_1$ AT توسط اتصال دی سولفیدی بین یک گروه فعال تیول از اسید آمینه Cys بر روی زنجیره سنگین IgA و یک Cys از  $\alpha_1$ AT در موقعیت ۲۳۲ تشکیل میشود.

بر اساس چند تحقیق ، مشخص شده است که در بیماری آرتریت روماتوئید میزان این کمپلکس افزایش می یابد و سطح این کمپلکس در بیمارانی که توسط داروهای ضد روماتوئیدی درمان میشوند کاهش می یابد، لذا می توان از آن به عنوان یک عامل تشخیصی بیماری آرتریت روماتوئید استفاده نمود و تاکنون ارتباط بین سطح سرمی کمپلکس IgA-  $\alpha_1$ AT با بیماری آرتریت روماتوئید در کشورمان بررسی نگردیده است .

در این تحقیق سطح سرمی کمپلکس IgA-  $\alpha_1$ AT در ۳۷ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید و ۴۴ فرد طبیعی به عنوان کنترل توسط روش الایزا اندازه گیری شد. در این تست از آنتی بادی مونوکلونال ضد  $\alpha_1$ AT و آنتی بادی پلی کلونال ضد IgA کونژوگه شده با HRP استفاده گردید. همچنین سنجش سطح سرمی ESR, CRP و RF که تستهای آزمایشگاهی روتین جهت تشخیص بیماری می باشند در همه ی افراد انجام شد. نتایج نشان داد که سطح کمپلکس IgA-  $\alpha_1$ AT در بیماران به مقدار زیادی بالاتر از افراد کنترل میباشد (  $15/4 \pm 43/7$  در مقابل  $8/3 \pm 1/5$  ) مربوط به افراد طبیعی (Pvalue < 0.05). همچنین علیرغم اینکه RF در ۱۱ بیمار منفی بود (۳۰٪ کل بیماران)، کمپلکس IgA-  $\alpha_1$ AT تنها در یک بیمار (۳٪) از میانگین افراد طبیعی پائینتر بود و نشاندهنده ی این است که پاسخهای منفی کاذب تعیین سطح سرمی کمپلکس IgA-  $\alpha_1$ AT توسط روش الایزا نسبت به تست RF پائینتر است. نتیجه اینکه استفاده از تست الایزا که یک تست حساس و سریع می باشد برای تعیین سطح این کمپلکس در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به عنوان شاخص مراحل پیشرفت بیماری پیشنهاد میشود .

## فهرست مطالب

شمارهء صفحه	عنوان
۱	فصل اول-مقدمه
۲	تاریخچه
۳	۱-۱ آرتریت روماتوئید
۳	۱-۱-۱ اپیدمیولوژی
۴	۱-۱-۲ ژنتیک
۵	۱-۱-۳ اتیولوژی (علت شناسی)
۷	۱-۱-۴ پاتولوژی و پاتوژنز
۹	۱-۱-۵ تظاهرات بالینی
۱۰	۱-۱-۶ نشانه ها و علائم بیماری مفصلی
۱۲	۱-۱-۷ تظاهرات خارج مفصلی
۱۳	۱-۱-۸ تستهای آزمایشگاهی
۱۳	۱-۸-۱-۱ Rheumatoid Factor ,RF
۱۴	۱-۸-۱-۲ Erythrocyte Sedimentation Rate, ESR



فهرست مطالب

شمارهء صفحه	عنوان
۱۵	C-Reactive Protein ,CRP ۳-۸-۱-۱
۱۵	۴-۸-۱-۱ آنالیز مایع سینوویال
۱۶	۵-۸-۱-۱ ارزیابی رادیوگرافیک
۱۷	۹-۱-۱ تشخیص بیماری آرتريت روماتوئيد
۲۰	۱۰-۱-۱ درمان
۲۰	۱-۱۰-۱-۱ درمان با داروهای شیمیائی
۲۳	۲-۱۰-۱-۱ ژن درمانی
۲۴	۲-۱ ألفا ۱-آنتی تریپسین $\alpha_1$ -AT
۲۵	۱-۲-۱ نقش فیزیولوژیک $\alpha_1$ -AT
۲۶	۲-۲-۱ آلهای $\alpha_1$ -antitrypsin
۲۷	۳-۲-۱ $\alpha_1$ -Antitrypsin , بیماریهای روماتوئیدی
	فصل دوم
۲۹	مروری بر مطالعات گذشته

فهرست مطالب

شماره صفحه	عنوان
۳۰	۱-۲ کمپلکس IgA- $\alpha_1$ AT
۳۱	۲-۲ کمپلکس IgA- $\alpha_1$ AT و ارتباط آن با آرتریت روماتوئید
۳۲	۳-۲ ارتباط کمپلکس IgA- $\alpha_1$ AT با سایر بیماریها
	فصل سوم
۳۳	مواد و روشها
۳۴	۳-۱ بخش اول - تولید آنتی بادی پلی کلونال بر علیه $\alpha_1$ AT انسان
۳۵	۳-۱-۱ آماده سازی ایمونوژن تزریقی
۳۵	۳-۱-۲ تزریق آنتی ژن به خرگوش
۳۷	۳-۱-۳ خونگیری
۳۸	۳-۱-۴ تست Double Diffusion
۴۰	۳-۱-۵ تخلیص آنتی بادی
۴۰	۳-۱-۶ رسوب پروتئین های سرم
۴۱	۳-۱-۷ دیالیز

فهرست مطالب

شمارهء صفحه

عنوان

۴۱	۸-۱-۳ کروماتوگرافی تعویض یونی Ion Exchange Chromatography
۴۳	۹-۱-۳ تائید جدا سازی Ig ها
۴۴	۱۰-۱-۳ تعیین تیتراژ آنتی بادی تخلیص شده توسط روش الیزا
۴۸	۲-۳ اندازه گیری سطح سرمی RF و CRP افراد سالم و بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید
۴۸	۳-۳ بخش دوم- راه اندازی تست الیزا برای اندازه گیری کمپلکس IgA- $\alpha_1$ AT
۴۸	۱-۳-۳ تهیه سرم انسان بدون $\alpha_1$ AT به عنوان سرم بلانک
۵۰	۲-۳-۳ انجام تست الیزا
	فصل چهارم
۵۴	نتایج
	فصل پنجم
۶۵	بحث و پیشنهادات
۷۰	فهرست منابع

# Introduction

مقدمه

## تاریخچه:

اصطلاح Rheumatoid Arthritis (RA) را اولین بار شخصی به نام Garrod AB به کار برد. او در سال ۱۸۹۲ در این باره گفت:

“مطالعه در ۳۰ سال اخیر مرا به این نتیجه رسانده است که اصطلاحاتی که تحت عنوان Rheumatic Gout به کار می روند اشتباه بوده و در اصل نه بیماری نقرس بوده و نه روماتیسم بلکه یک سیر پاتولوژیک خاص دارد. لذا من ترم Rheumatoid Arthritis را مناسبتر میدانم که بیان کننده یک گرفتاری مفصلی می باشد”

در سالهای بعد Rheumatoid Factor (RF) کشف شد. کشف آن موجب انتشار نظریه Frank Billings (۱۸۵۴-۱۹۳۲) در این مورد شد که بیماری RA نوعی پاسخ نسبت به عفونتهای متعدد مزمن موضعی است.

به واسطه تحقیقات باکتریولوژیکی ، Russel L. Cecil (۱۸۸۱-۱۹۶۵) این نظریه را بسط داد و اعلام داشت که بیماری به علت عفونت استرپتوکوکی ایجاد می شود و معتقد بود که از خون و مفصل دو سوم بیماران مبتلا به RA می توان استرپتوکوک را استخراج نمود و اینکه سرم ۵۰ درصد مبتلایان قادر به منعقد ساختن باکتری است. غیر اختصاصی بودن این نتایج توسط Martin H. Dawson (۱۸۹۷-۱۹۴۵) نشان داده شد و علیرغم اینکه وی نتوانست یافته های باکتریولوژیک را تأیید کند اما نشان داد که سرم بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید میتواند بسیاری از باکتریها را منعقد سازد. [۱]

## ۱-۱ آرتريت روماتويد:

آرتريت روماتويد يکي از شايعترين بيماريهاي مزمن با علتی ناشناخته و مسبب عمده ی ناتوانیها مخصوصاً در سنين بزرگسالی می باشد به همین جهت تشخيص و درمان به موقع در کاهش ناتوانیهای جسمانی ناشی از بيماری نقش بسیار موثري دارد. اگرچه تظاهرات سيستمیک متفاوتی دارد ولی نمای ویژه آن سينوويت التهابی مداوم است که معمولاً مفاصل محیطی را به صورت قرينه درگیر می کند. توانائی التهاب سينوويوم در ایجاد تخریب غضروف، خوردگی استخوان و به دنبال آن تغییر شکل بعدی مفصل نشانه بارز این بيماری می باشد. علیرغم توانائی تخریبی آن ممکن است سير RA کاملاً متغیر باشد. بعضی از بيماران ممکن است فقط درگیری خفیف و کوتاه مدت چند مفصل (oligoarticular) را همراه با آسیب مختصری در مفصل داشته باشند، در حالی که عدهای دیگر در مفصل خود پلی آرتريت پیشرونده شدیدی همراه با تغییر شکل بارز دارند. [2,3,4,5]

## ۱-۱-۱ اپیدمیولوژی:

شیوع RA تقریباً ۱٪ می باشد؛ در برخی از قبایل بومی شمال آمریکا در حدود ۵٪ و در چین کمتر از ۳٪ می باشد. زنان تقریباً ۳ برابر مردان گرفتار می شوند. شیوع بيماری با افزایش سن زیاد می شود و تفاوت بين زن و مرد (از نظر ابتلا) در گروه سنی مسن تر کاهش می یابد. RA در سراسر دنیا و تمامی نژادها دیده می شود؛ با این وجود ظاهراً شیوع و شدت بيماری در ساکنین زیر صحرای بزرگ افریقا و سیاهان کارائیب کمتر می باشد. شیوع بيماری در غالب موارد در طی دهه چهارم و پنجم عمر می باشد و ۸۰ درصد تمامی بيماران بين سنين ۳۵ تا ۵۰

سالگی به بیماری مبتلا می‌شوند. بروز RA در زنان ۶۰ تا ۶۴ ساله ۶ برابر بیشتر از زنان ۱۸ تا ۲۹ ساله می‌باشد. [2,3,4,5,8]

### ۱-۱-۲ ژنتیک:

مطالعات انجام شده بر روی خانواده‌ها، یک استعداد ژنتیکی را نشان می‌دهد. مثلاً در اقوام درجه اول بیماران ( در صورتی که بیماری آنها به همراه اتوآنتی بادی و فاکتور روماتوئید باشد ) شدید تقریباً ۴ برابر میزان مورد انتظار یافت می‌شود. حدود ۱۰٪ از مبتلایان به RA یک خویشاوند درجه اول مبتلا دارند. علاوه بر آن احتمال وجود همزمان RA در دو قلوهای تک تخمی تقریباً ۴ برابر دوقلوهای دو تخمی می‌باشد ( که از نظر خطر ابتلا به RA مانند خواهر و برادر غیر دوقلو می‌باشند ) اما در مورد RA تنها ۱۵ تا ۲۰ درصد دوقلوهای تک تخمی همگرایی دارند. یکی از عوامل ژنتیکی اصلی در اتیولوژی این بیماری ارتباط بین محصول کمپلکس سازگاری نسجی<sup>(۱)</sup> اصلی کلاس II یا HLA-DR4 با RA می‌باشد ( جدول ۱-۱ ) در مقایسه با ۲۸ درصد افراد کنترل، ۷۰ درصد بیماران مبتلا به RA کلاسیک یا قطعی HLA-DR4 را بروز می‌دهند. [2,3,4,5,8]

---

1-Major histocompatibility complex