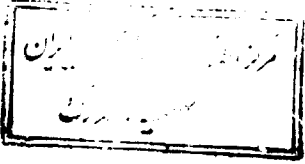


۳۸۰ / ۹ / ۲۰



دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
دانشکده پزشکی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه تخصصی در بیماریهای داخلی

موضوع:

**بررسی فاکتور روماتوئید و آنتی بادی ضد کلاژن نوع II
در مراجعه کنندگان به آزمایشگاههای تشخیص طبی**

استاد راهنما:

خانم دکتر فروزان کریمی

012040

استاد مشاور:

آقای دکتر تورج احمدی جویباری

نگارش:

دکتر نغمه فیروزمنش

سال ۱۳۷۷

۳۸۴۸۳

بنام خداوند جان و خرد کزین برتر اندیشه برنگذرد

تقدیم به :

دایی های عزیزم آقایان جمشید و دکتر هوشنگ شیخعلی پور
باین امید که ، اندک سپاسی باشد بر مهربانیهای بیکرانیشان

و تقدیم به :

استاد راهنما و دوست عزیزم خانم دکتر فروزان کریمی
باتشکر از استاد مشاور آقای دکتر تورج احمدی جویباری و
گروه محترم داخلی

و باتشکر از همکاران گرامی

سرکار خانم زمزم ، سرکار خانم شفیع زادگان ،
سرکار خانم خسروی ، سرکار خانم نقشی ، سرکار خانم ملکی
، سرکار خانم زندی ، سرکار خانم آناتول و سرکار خانم امیری
که در انجام آزمایشها یاریم فرموده اند.

و بایاد دوست فرزانه ام دکتر فرزانه خاکی که سراسر
عمر کوتاهش به مطالعه طب و معالجه بیماران و دردمندان
گذشت.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	پیشگفتار.....
	فصل اول
۳	الف - فاکتور روماتوئید.....
۷	ب- کلاژن نوع II.....
۸	ج - آنتی بادی ضد کلاژن نوع II.....
۱۱	د- حضور همزمان فاکتور روماتوئید و آنتی بادی ضد کلاژن نوع II....
	فصل دوم
۱۴	مواد و روشها.....
۱۴	الف - اندازه گیری فاکتور روماتوئید.....
۱۵	ب- روش اندازه گیری آنتی بادی ضد کلاژن نوع II.....
	فصل سوم
۱۸	نتایج.....
	فصل چهارم
۲۲	بحث.....
۲۳	پیشنهادات.....
۲۴	خلاصه.....
۲۶	منابع.....

پیشگفتار:

بیماریهای اتوایمیون بیماریهایی هستند که در نتیجه درگیر شدن عوامل سیستم دفاعی با آنتی ژنها و بافتهای خودی ایجاد می شوند حاصل این درگیری تولید اتوآنتی بادیهای مخرب و سلولهای سیتوتوکسیک است.

در تعدادی از این بیماریها فاکتورهای مخرب تا حدود زیادی شناسایی شده اند و در تعدادی دیگر، این عوامل همچنان ناشناخته باقی مانده اند.

از شناخته شده ترین این عوامل می توان به فاکتور روماتوئید اشاره نمود. مقدار این فاکتور در طیف وسیعی از بیماریها که نتیجه فعالیت بی رویه سیستم ایمنی و یا تخریب نسجی هستند به میزان قابل ملاحظه افزایش می یابد. از آنجاکه تیرترین آنتی بادی نشانه ای از وسعت فعالیت بیماری است معمولاً جستجو و اندازه گیری آن وسیله ارزیابی میزان فعالیت بیماری و یا پاسخ بیمار به درمان محسوب می شود.

از سوی دیگر در بسیاری از موارد در صورت بالابودن فاکتور روماتوئید در سرم ذهن، معطوف به وجود کانونی فعال از عناصر دفاعی در محل مفاصل می گردد.

آنچه که حجم عمده غضروف مفصلی را تشکیل می دهد کلاژن نوع II است.

بنابراین در بدوامر بنظر می رسد در چنین مواردی کلاژن نوع II مورد تخریب قرار گرفته و وارد گردش خون شود. با توجه به اینکه این پروتئین در طول دوره جنینی به سیستم ایمنی معرفی نمی گردد، در نتیجه رها شدن آن به گردش خون به سهولت در مقابل آن آنتی بادی ساخته می شود. لذا می توان انتظار داشت که در افراد RF^+ چنانچه دچار درگیری مفصلی شده باشند مقدار آنتی بادی ضد کلاژن نوع II نیز در سرم قابل سنجش باشد.

از سوی دیگر باتوجه به اینکه فاکتورهای متعددی در تولید انواع آنتی بادیها منجمله فاکتور روماتوئید و آنتی بادی ضد کلاژن نوع II می توانند نقش داشته باشند بازهم می توان انتظار داشت در سایر بیماریها و یا در افراد بظاهر سالم این آنتی بادیها قابل جستجو باشند.

در تحقیق حاضر بر آن شدید تادریک مطالعه بر روی تعداد محدودی از افراد حضور میزان و همراهی این دو آنتی بادی را بررسی کنیم برای رسیدن به این هدف اقدامات زیر انجام شد:

۱- تهیه سرم از افراد RF⁺

۲- تهیه سرم از افراد RF⁻

۳- جستجو و اندازه گیری آنتی بادی ضد کلاژن نوع II در کلیه افراد فوق الذکر

۴- بررسی همراهی بین RF و آنتی بادی ضد کلاژن نوع II

۵- بررسی همراهی بین تیتراژ آنتی بادی ضد کلاژن نوع II و RF

فصل اول:

الف: فاکتور روماتوئید (۱)

فاکتورهای روماتوئید اتوانتی بادیهای هستند که بر علیه قسمت ثابت روی قطعه FC ایمونوگلوبولین (IgG) ساخته شده اند. معمولاً همراه با آرتریت روماتوئید دیده می شوند ولی گاهی هم در افراد نرمال ویا انواعی از بیماریهای دیگر هم مشاهده می شوند.

فاکتورهای روماتوئیدی که همراه با بیماری آرتریت روماتوئید دیده می شوند ضد IgG می باشند. ولی بجز فاکتور روماتوئید علیه IgG فاکتورهای روماتوئید علیه IgA و IgE هم ساخته می شوند. گاهی در برخی از بیماریها انواعی از فاکتورهای روماتوئیدی ضد IgG و IgA و IgE همراه با هم دیده می شود در حالی که در آرتریت روماتوئید فقط فاکتورهای روماتوئید علیه IgG ساخته می شوند.

از جمله بیماریهای دیگری که منجر به تولید فاکتور روماتوئید می شوند عبارتند از: انواع بیماریهای روماتیسمی، بیماریهای حاد ویا مزمن التهابی، بیماریهای ویروسی لمفو پرولیفراتیو مانند لوسمی لمفوستیکی مزمن (CLL)، ماکروگلوبولینمی والدنشتروم، کرایوگلوبولینمی مختلط (Mixed cryoglobulinemia)، همینطور در بعضی از افراد نرمال هم دیده شده است. (2-7) بعضی از این حالات همراه با سایر هیپرگاما گلوبولینمیها هم دیده شده ویا حاکی از فعالیت پلی کلونال لنفوسیتهای B یا کمپلکسهای ایمنی در حال گردش در خون است.

درزیر بیماریهایی که در آنها مقدار فاکتور روماتوئید افزایش می یابند آورده شده است.

RHEUMATIC DISEASES

Rheumatoid arthritis
Systemic lupus erythematosus
Scleroderma
Mixed connective tissue disease
Sjogren syndrome

VIRAL INFECTIONS

AIDS
Mononucleosis
Hepatitis
Influenza
Afer vaccination(may yied falsely elevated titers of antiviral antibodies)

PARASITIC INFECTIONS

Trypanosomiasis
Kala - azar
Malaria
Schistosomiasis
Filariasis

CHRONIC BACTERIAL INFECTIONS

Tuberculosis
Leprosy
Syphilis
Brucellosis
Subacute bacterial endocarditis
Salmonellosis

NEOPLASMS

Tumors afer radiation therapy or chemotherapy

OTHER HYPERGLOBULINEMIC STATES

Hypergammaglobulinemic purpura
Cryoglobulinemia
Chronic liver disease
Sarcoid
Other chronic pulmonary disease

برخورد صحیح با وجود فاکتور روماتوئید در جمعیت بستگی به سیستم اندازه گیری و تیرانتخابی برای جدا کردن واکنش مثبت و منفی دارد.

با افزایش سن هم در صد افرادی با فاکتور روماتوئید افزایش می یابد البته اتوآنتی بادیهای دیگر هم افزایش می یابند.

سه محرک محیطی برای تحریک ساخت فاکتور روماتوئید در افراد نرمال بالغ که شناخته شده عبارتند از:

۱- ایمن سازی با کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی در طی پاسخ ایمنی (8-10).

۲- فعالیت پلی کلونال B Cell (11-12).

۳- واکنش متقاطع بین IgG اتولوگوس انسانی و آنتی ژن آگروژن.

روشهای تجربی که برای روشن ساختن چگونگی القاء ساخت سلولی فاکتور روماتوئید در طی پاسخ ثانویه ایمنی اتخاذ می شوند (9-13).

تولید فاکتور روماتوئید نیاز به فرآیندی دارد که در طی آن سلولهای T نسبت به یک آنتی ژن اختصاصی حساس شوند که خود این باعث ساخت آنتی بادی ضد آنتی ژن توسط سلولهای B می شود.

آنچه مهم است این است که فاکتور روماتوئیدی که در طی پاسخ ثانویه ایمنی تولید شده مستقیماً ضد ایزوتوپ IgG که کمپلکس های آنتی بادی - آنتی ژن غالباً زیاد ساخته می شود است.

رستپورهای سلولهای T بعکس آنتی بادیها قابلیت شناخت آنتی ژنهایی که بصورت پپتیدهای خطی کوچکی که در سطح سلولها هستند را دارا می باشند. وقتی پپتیدهای آنتی ژنیک از کمپلکسهای ایمنی آزاد می شوند در حضور آنها سلولهای B فاکتور روماتوئید را می سازند.

آنتی ژنهایی که لمفوسیتهای T را فعال میکنند می توانند جرقه شروع تولید فاکتور روماتوئید باشند. این فرآیند شکلی از زنجیره شناخت آنتی ژنها می باشد و بدین ترتیب سلولهای T کمک کننده (Helper T cell)، فاکتور روماتوئید ناشی از B Cell آنتی ژنهای مختلف را می شناسند.

روماتوئید فاکتور در طی دوره های حاد و مزمن بیماریهای التهابی افزایش می یابد (14-15). هر چند بیشترین مقدار آن از نوع IgM است. ولی گاهی هم نوع IgG فاکتور روماتوئید نیز تولید می شود. ادامه تولید فاکتور روماتوئید بستگی به حضور دائمی محرک ایمنولوژیک دارد. بهترین مثال در این زمینه آندوکاردیت باکتریال تحت حاد می باشد که محور باکتریها در ضمن درمان با آنتی بیوتیکها باعث کاهش تیترا فاکتور روماتوئید می شود.

غیر از چند استثنای کوچک در بیماریهای غیر روماتیسمی که در آنها فاکتور روماتوئید دیده می شود افزایش سطح کمپلکسهای ایمنی دیگری جز کمپلکسهای که فاکتور روماتوئید هم در تشکیل آن دخیل است دیده می شود و افزایش ایمنوگلوبولینهای سرمی دلالت بر فعالیت پلی کلونال لنفوسیتهای B دارد. نشان داده اند که فاکتور روماتوئید با فعال کردن سلولهای سایتوتوکسیک و تولید کمپلکسهای ایمنی روند التهاب را در مفاصل تشدید می کنند (11-12) در یکی از تحقیقات نشان داده اند که فاکتور روماتوئید که از انسان بدست آمده پس از تزریق به موش مبتلا شدت التهاب مفصلی را افزایش داده است. تاجایی که حیوان فوق الذکر پس از دریافت فاکتور روماتوئید دچار عوارض زیر گردیده است.

۱- تشدید التهاب مفاصل

۲- ارتشاح سلولهای لمفونیدی در مفاصل

۳- پرولیفراسیون غشای سینوویال

۴- تشکیل پانوس

۵- تخریب غضروف مفصلی

۶- زخمهای پوستی (16-17)

البته در یکسری دیگر از مطالعاتی که بر روی تأثیر فاکتور روماتوئید و آنتی بادی ضد کلاژن نوع II بر تورم مفصلی رت (Rat) انجام گردیده نشان داده اند که آنتی بادی فوق الذکر ارتباط مستقیمی با تورم مفصلی نداشته اند (18).

فعالیت پلی کلونال لئوسیتها B در القا تولید فاکتور روماتوئید در انسان اهمیت ویژه ای دارد. فعال کننده های پلی کلونال لئوسیتها B در واقع میتوز نهایی هستند که محرک لئوسیتها برای ترشح ایمونوگلوبین در فقدان تحریک بوسیله آنتی ژن اختصاصی می باشند. آنها طبعاً گسترش زیادی دارند و شامل پروتئینهای باکتریایی و لیپوساکاریدی و اجزای مایکوپلازما و ویروسهای خاص هم چون ایشتاین بار می باشند (11). در تعدادی از افراد سالم بعد از تحریک توسط میتوز EBV تمایل اندکی برای تولید فاکتور روماتوئید از نوع IgM دیده شده است. این فاکتورهای روماتوئید به دلیل عکس العمل متقابل ایدیوتایپهای در بیماری والدنستروم دیده می شوند با فعالیت اتوآنتی بادیهای ضد IgG بوجود می آیند و با همینطور ممکن است از زیرگروههای کوچکی از لئوسیتها B که CD₅ آنتی ژن را بظهور می رسانند ایجاد بشوند (19).

عکس العمل ای توپها روی آنتی ژن خارجی می توان محرک تولید فاکتور روماتوئید باشد. ویروس هرپس و سیتومگالو ویروس محرک ساخت گیرنده های IgG FC روی سلولهای عفونی هستند و در نتیجه ممکن است بالقوه باعث فعالیت آنتی ایدیوتایپ آنتی بادی و فاکتور روماتوئید شوند (20).

ب - کلاژن نوع II

کلاژنها خانواده ای از مولکولهای تخصص یافته با شکل ساختمانی مشابه هستند که چهارچوب خارج سلولی همه حیوانات پرسلولی را بوجود می آورند. کلاژنها فراوانترین پروتئین در بدن این موجودات بوده و بیش از ۲۰ درصد کل توده بدن را شامل می شوند و حداقل ۱۱ نوع کلاژن (از نوع XI تا XI) شناسایی شده و احتمالاً در آینده به تعداد آن افزوده می شود (21).

این مولکولهای مختلف هوموپلیمر یا هتروپلیمر فرآورده های پلی پپتیدی اختصاصی حداقل ۲۰ ژن مختلف سازنده کلاژن است.

کلاژن در بدن موجودات پرسلولی علاوه بردارای بودن نقش ساختمانی (مستحکم کردن بافت همبند) در روندهای مختلف و پیچیده تنظیمی که در خلال رشد، مورفوژنز کموتاکسی، چسبندگی سلولی و ترمیم زخمها رخ می دهد (22). و نیز تجمع و پیوستگی پلاکتها جهت هوستاز و ترمبوژنز دخالت دارد (22-24). معتقدند تغییراتی که در ساختمان و متابولیسم کلاژن اتفاق می افتد بطور مستقیم و یا غیر مستقیم در پاتوژنز بسیاری از بیماریها نقش دارد. (25-27)

ج: آنتی بادی ضد کلاژن نوع II Anti-CII Ab

اتوایمیونیتی نسبت به کلاژن نوع II

بمنظور شناخت و درک علت و چگونگی واکنش ایمنولوژیک نسبت به کلاژن نوع II لازم است بدانیم کجا و چه وقت شاخصهای قوی آنتی ژنیک برای شناسایی در دسترس سلولها و رسپتورهای سیستم ایمنی قرار می گیرند.

کلاژن نوع II عمده ترین عنصر ساختمانی غضروف و بخشی از ساختمان چشم است و همانطور که می دانیم این مناطق فاقد عروق خونی می باشند و نیز نرخ گردش زندگی این پروتئینها بطور طبیعی بسیار کم است. همچنین بجز مناطق ذکر شده، کلاژن نوع II در هیچ بافتی وجود ندارد. ضمناً تلاش محققین برای نشان دادن مقادیر ولوبسیار اندک کلاژن نوع II در جریان خون با شکست مواجه شده است (28).

مجموع شواهد فوق بیانگر این نکته است که کلاژن نوع II در مسیر ایجاد توکرانس نسبت به اجزای خودی بدن که در تیموس اتفاق می افتد قرار نگرفته است. بعلاوه در سطح غضروف نرمال اپی توپهای بخصوصی از کلاژن نوع II ظاهر می شوند که آنتی بادی به آنها متصل می شود (29).

نخستین بار David Trentham و Andrew kang نشان دادند که در میان مولکولهای متعدد و مختلف غضروف، کلاژن نوع II مستعد ایجاد واکنشهای مضراتوایمیون می باشد (30).

بیشتر مطالعات انجام شده در مورد رابطه این آنتی ژن و آنتی بادی ضد آن در بیماریهای التهابی خصوصاً آرتریت روماتوئید بوده است (31-32). از آرتریت تجربی ایجاد شده در موش صحرایی بمنظور مطالعه فیزیولوژی ویبوشیمی و فارماکولوژی التهاب و بعنوان مدلی از بیماری اتوایمیون با واسطه سلولی آرتریت انسانی و درد مزمن بطور گسترده ای استفاده می شود (33-41). در پاتوژنز آرتریت ایجاد شده توسط کلاژن ایمنی سلولی نقشی دارد (42,43) و چنانچه سلولهای T تحریک شده راه را از داخل وریدی به بدن حیوان وارد کنیم حیوان به آرتریت مبتلا می شود (44). از طرف دیگر ایمنی همورال نیز در پاتوژنز آن دخالت دارد. نشان داده اند که رتهای مبتلا به CIA¹ در سرم خود مقادیر زیادی IgG ضد کلاژن دارند. اما رتهایی که با کلاژن نوع II ایمونیزه شده ولی به آرتریت مبتلا نشده اند، مقادیر اندکی از این نوع آنتی بادی در سرمشان وجود دارد (45) حیوان سالم را می توان با تزریق داخل وریدی ایمنیون سرم (47) به آرتریت مبتلا نمود.

محققین معتقدند که در پاتوژنز CIA هر دو سیستم ایمنی سلولی و همورال دخالت دارند. در روند بیماری آنتی بادی ضد کلاژن IgG مهمترین عامل در آغاز بیماری و ایمنی سلولی موجب دوام ضایعه می شود (48,49). از آنجا که آنتی بادی ضد کلاژن نوع II را در بیماریهای التهابی خصوصاً در آرتریت روماتوئید می توان یافت (1,50). بررسیهای زیادی بر روی کلاژن نوع II انجام شده است. و نتایج بدست آمده از این بررسیها، بر روی کلاژن نوع II نشان داده که مصون سازی موشها و موشهای صحرایی با آن (که از نظر سیستم ایمنی بسیار شبیه به انسان می باشند) با آن می تواند باعث آرتریت شود و در ضمن این بیماری بطور پاسیو بوسیله نوعی IgG که شامل آنتی بادی ضد کلاژن نوع II است (51). از حیوان

¹ Collagen Induced Arthritis-

بیمار به حیوان سالم منتقل می شود و از طرفی انتقال لمفوسیت‌های حیوان بیمار، بیماری را منتقل می کند (52).

بطور کلی می توان اظهار نمود:

۱- نیاز به سلولهای T برای شروع آرتریت ایجاد شده با کلاژن ضروری است.

۲- بزرگترین اپی توبی که باعث فعالیت سیستم ایمنی می شود و در نهایت این فعالیت ایجاد آرتریت می کند روی قسمتی از زنجیره کلاژن نوع II قرار دارد (53).

آنتی بادی ضد کلاژن نوع II عمدتاً از گروه IgG بوده است و بسته به نوع بیماری از زیرگروه متفاوتی می تواند باشد. در آرتریت روماتوئید آنتی بادی ضد کلاژن نوع

II از نوع IgG1 و IgG3 و در بیماری SLE از نوع IgG4 است (54).

در مواردی که کلاژن نوع II به هرعلتی وارد گردش خون شود آنتی بادی ضد آن توسط سیستم ایمنی سنتز خواهد شد (55).

نقش آنتی بادی ضد کلاژن در مطالعه ای که توسط رودلفی و همکارانش روی سلولهای B مبتلایان به RA انجام شد مشخص گردید. از آنجایی که در مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید سلولهای B مختص به کلاژن نوع II انسانی و همینطور B Cell مختص به بخش IgG FC یافت شده اند، لذا می توان اظهار داشت که سیستم ایمنی اختصاصی با تجمع در محل ملتهب و تولید دوآنتی بادی RF و ضد کلاژن نوع II نقش مؤثری در بروز التهاب و تخریب دارد (56).

مطالعه ای که اسبوزن و کارتر (57) روی اسبهای مبتلا به اُستئوآرتریت، استئوکندریت، شکستگیهای استخوانی، ترومای مفصلی، سینوویت، عفونت مفصلی و اسبهای با مفاصل سالم (نمونه های کنترل) انجام دادند، به نتیجه زیر رسیدند:

26% اسبهای مبتلا به استئوآرتریت و 63% اسبهای دچار ترومای مفصلی دارای مقادیر زیادی از آنتی کلاژن نوع II در سرم بودند. جزدومورد اخیر، در سایر موارد،

آنتی بادی ضد کلاژن نوع II قابل جستجو نبوده است. یعنی آنتی بادی ضد کلاژن نوع II فقط در پاتوژناستوآرتریت و ترومای مفصلی نقش داشته است.

د- حضور همزمان فاکتور روماتوئید و آنتی بادی ضد کلاژن نوع II

در تحقیقات متعددی حضور همزمان Anti-CII Ab و RF را نشان داده اند. در یکی از این مطالعات که بر روی بیمارانی که مراحل اولیه آرتریت روماتوئید را می گذراندند صورت گرفت علاوه بر نشان دادن همزمانی حضور این آنتی بادی فرکانس و میزان این آنتی بادی را در این بیماران بررسی نموده اند. در این مطالعه که بر روی سرم ۴۴ بیمار مبتلا به مراحل اولیه روماتوئید آرتریت و در طی ۱۲ ماه انجام گردیده علاوه بر RF آنتی بادی ضد کلاژن نوع II از جنس IgG را اندازه گیری کردند و به این نتیجه رسیدند که Anti-CII Ab در بدوی بیماری روماتوئید آرتریت بالا بوده است و بمرور از میزان آن کاسته می شود. لذا این آنتی بادی در تخریب مفصلی نقشی ندارد. ولی با استفاده از اندازه گیری این آنتی بادی در بدوی بیماری می توان پیشرفت بیماری را پیش بینی کرد یعنی چنانچه این آنتی بادی در بیماران فوق الذکر قابل تشخیص بوده و مقدار آن بالا باشد نشانه پیشرفت سریع بیماری است (58). در حالی که این مقاله حضور همزمان RF و Anti-CII Ab را حداقل در مراحل اولیه یک نوع بیماری التهابی نشان داده در عین حال، تأکید کننده این موضوع است که برخلاف RF که معمولاً همیشه نقشی در تشدید التهاب بازی می کند، آنتی بادی ضد کلاژن نوع II چنین تأثیری ندارد.

از سوی دیگر اوماتا و همکارانش با تحقیقی که بر روی موش مبتلا به آرتریت روماتوئید انجام دادند (موشها با استفاده از سوپراآنتی ژن آنروتوکسین استافیلوکوکی نوع B به آرتریت مبتلا شده بودند) نشان دادند که در این نوع آرتریت، آنتی بادی ضد کلاژن نوع II و فاکتور روماتوئید تولید نمی شود (59). بنابراین بنظر می رسد که