ارتباط فعالیت بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) با فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (CH50) و پروتیین‌های آن

کبری بامداد مهربانی،[1*] محمود اکبریان،[2] منصور ثالثی،[2] ساناز توسلی،[2] زهرا غفلتی[1]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی
۲- مرکز تحقیقات روماتولوژی، بیمارستان شریعتی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
تلفن: ۶۶۴۰۲۰۹۵ داخلی ۲۲۶۶
email: bamdad_mehr@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: اجزای مسیر کلاسیک کمپلمان در پاتوژنز بیماری SLE دخالت دارند، لذا بر آن شدیم تا برای ارزیابی فعالیت بیماری به بررسی فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (CH50) و اندازه‌گیری C4d, C3d, C4, C3، SC5b-9، در بیماران بپردازیم و نتایج را در بیماران مرحله غیرفعال (inactive) با بیماران مرحله فعال (flare) مقایسه نماییم. ***روش بررسی:*** در این مطالعه تعداد ۷۸ بیمار زن که ۲۴ نفر از آنها در گروه فعال (SLEDAI.2K>6) و ۵۴ نفر در گروه غیرفعال (SLEDAI.2K≤6) بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. CH50 سرمی بر اساس همولیز و C4, C3، به روش نفلومتری و C3d، C4d، SC5b-9 با روش ELISA اندازه‌گیری شدند. اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS بررسی شده و نتایج با هم مقایسه گردیدند. ***یافته‌ها:*** با توجه به آنالیز اطلاعات، صرفاً میانگین C4d (Mean±SE) در گروه فعال و غیرفعال اختلاف معنی‌داری را نشان داد. (غیرفعال: ۱/۱±۲۳/۳۹µg/ml، فعال: ۱/۶±۱۶/۹µg/ml، p=۰/۰۰۳) بدین معنی که در گروه غیرفعال میزان C4d در مقایسه با فعال بیشتر بوده است. اما در میانگین سایر فاکتورها یعنی: C3، C4، SC5b-9، CH50، C3dCic-raji، اختلاف معنی‌داری دیده نشد: (به ترتیب در گروه غیرفعال: ۶/۸±۸۹/۳mg/dl، ۲/۳±۱۸/۳mg/dl، ۱۱۴/۹۴±۱۴۱۴ng/ml، ۴/۳±۱۴۹u، ۰/۹۶±۹/۴۳cicµgEq/ml و در گروه فعال: ۷/۶±۸۵/۵mg/dl، ۲/۴±۲۰/۴۵mg/dl، ۲۱۶/۹±۱۴۷۱/۱ng/ml، ۴/۲±۱۵۷u، ۳/۱۶±۱۳/۳۱cicµgEq/ml، p>۰/۰۵). ضمناً همبستگی معنی‌داری بین سطح C3 و C4 مشاهده شد (ρ=۰/۸۰۷). ***نتیجه‌گیری:*** چون میانگین C4d در دو گروه فعال و غیرفعال اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد، شاید بتوان از آن به عنوان بیومارکر برای نشان دادن فعالیت بیماری استفاده کرد. به علاوه وجود همبستگی بین سطح C3 و C4 به نوعی می‌تواند موید فعال بودن مسیر کلاسیک در این بیماران باشد.

کلمات کلیدی: لوپوس اریتماتوز سیستمیک، CH50، C4, C3، C3d، C4d، SC5b-9، غیرفعال (inactive)، فعال (flare)

مقدمه

لوپوس اریتماتو سیستمیک Systemic Lupus Erythematous (SLE) یک بیماری التهابی مولتی سیستم مزمن با علت ناشناخته است که به صورت درگیری کلیوی، پوستی- مخاطی، مفصلی، خونی، قلبی- ریوی، عصبی و یا ایمونولوژیک ظاهر می‌شود. چنان که اختلال ایمونولوژیک اتو آنتی‌بادی‌ها علیه اجزای سلولی منجر به فعال شدن سلسله‌ای از واکنش‌های ایمونولوژیک و التهابی شده و در نهایت موجب بروز تخریب سلولی و بافتی می‌گردد. مطالعات نشان داده، اجزای مسیر کلاسیک کمپلمان که در شرایط عادی باعث حذف کمپلکس‌های ایمنی می‌شوند، در پاتوژنز این بیماری دخالت دارند. بدین معنی که به دلیل عدم حذف، کمپلکس‌های ایمنی در اعضاء و ارگان‌های مختلف از جمله کلیه رسوب کرده و شرایط برای بروز آسیب فراهم می‌شود. لذا برای بررسی فعالیت بیماری، همواره اندازه‌گیری C4 C3, C1q که از پروتئین‌های سیستم کمپلمان هستند مد نظر بوده است. با وجود این، به دلیل وجود پلی‌مورفیسم در اجزای مربوطه و نیز وجود سیستم کنترل‌کننده کاتابولیسم و آنابولیسم برای آن‌ها و یا حتی کمبود ارثی برخی از این اجزاء، میزان هر یک به تنهایی نمی‌تواند بیانگر فعالیت بیماری باشد.[3] ضمناً چون SLE یک بیماری هتروژن است، همواره تشخیص آن چه از نظر مراقبت‌های روزمره بالینی و چه از نظر تحقیقات مربوط به کارآزمایی بالینی در

Archive of SID
www.SID.ir

گذشته با مشکل روبرو بوده است، لذا یافتن بیومارکری مناسب برای رفع این مشکل همواره مد نظر محققین بوده است.[۱] بررسی‌های گذشته در خصوص ارتباط بیماری با سیستم کمپلمان نشان می‌دهد پروتئین‌های سیستم مذکور در این بیماران دستخوش تغییر می‌شوند. این سیستم دارای ۳۰ نوع پروتئین با کارایی‌های مختلف می‌باشد،[۲] که در پاتوژنز و اتیولوژی بیماری دخالت دارند. بنابراین مطالعات وسیعی برای بررسی نقش اجزای کمپلمان در این بیماران انجام شده است. در یکی از مطالعات، سطح C3 در ۴۵٪ و سطح C4 در ۶۴٪ از بیماران در مرحله فعال بیماری کاهش پیدا کرده بود.[۴] گروهی برای نشان دادن روند بیماری C3a و C5a و C3d را اندازه‌گیری کرده و آن‌ها را فاکتور سرمی مناسب برای پی‌گیری بیماری و نیز فعالیت آن اعلام کرده‌اند.[۵] وعده‌ای دیگر اندازه‌گیری C4d متصل به اریتروسیت را برای تشخیص فعالیت بیماری پیشنهاد می‌کنند.[۳] برخی پس از اندازه‌گیری C3,C1s,C1r,C1q در مرحله غیرفعال بیماری به این نتیجه رسیدند که پایین بودن پروتئین‌های مربوطه می‌تواند ریسک ابتلاء به درگیری کلیوی را افزایش دهد.[۶] در لندن پس از اندازه‌گیری هفت پروتئین از اجزای کمپلمان نظیر: C3، C4، C3a، C4a، iC3b، Factor B و Terminal Complement Complex (TCC) در ۲۲ بیمار در مرحله فعال و ۳۹ بیمار غیرفعال، مقادیر CC, C4a, C3a را در ارتباط با فعالیت بیماری معرفی کردند.[۷] مشابه چنین مطالعه‌ای با اندازه‌گیری فاکتورهای کمپلمان در بیماران لوپوس اریتماتوز سیستمیک دارای درگیری کلیوی انجام شد. در این بررسی مقادیر C3a/C3, C3, C2 در گروهی که در مرحله فعال بیماری بودند در مقایسه با گروه غیرفعال کمتر شده بود، اما مقدار C5 و نسبت C4a/C4 تفاوتی نشان نمی‌داد.[۸] این در حالی است که گروهی دیگر با مطالعه ۷۹ بیمار مبتلا به لوپوس اریتماتوز سیستمیک، C3d و به‌خصوص نسبت C3a/C3 را به‌عنوان فاکتوری مناسب برای تعیین مرحله فعال بیماری معرفی کرده‌اند.[۹] در برزیل با بررسی پلاسمای ۴۱ بیمار، نشان دادند که میزان SC5b-9 بیشترین ارتباط را با مرحله حاد بیماری دارد.[۱] در یک بررسی به این نتیجه رسیدند که اندازه‌گیری C3d ادراری راه حلی احتمالی برای نشان دادن فعالیت کمپلمان در لوپوس کلیوی است.[۱۱] با توجه به موارد اشاره شده در بالا بر آن شدیم تا ارتباط این بیماری با میزان فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (CH50) و پروتئین‌های C4, C3 و فرآورده‌های پروتئینی مسیر (C3d، C4d، SC5b-9) را ارزیابی نموده و نتایج را در دو دسته از بیماران در مرحله غیرفعال (inactive) و در مرحله فعال (flare) بیماری، مقایسه نماییم، تا بلکه به وسیله آن‌ها بتوانیم مرحله فعال بیماری را پیش‌بینی کنیم.

روش بررسی

در این طرح بنیادی- کاربردی که از تابستان ۱۳۸۴ آغاز و تا بهار ۱۳۸۶ ادامه داشت ،به طور کلی نمونه‌گیری بیماران بیش از یک سال به طول انجامید. نوع تحقیق Case control و جامعهٔ مورد تحقیق بیماران زن مبتلا به SLE بودند. دسته‌ای از این بیماران که اندیس فعالیت بیماری (SLEDAI.2K) (جدول ضمیمه) در آن‌ها مساوی و یا کمتر از شش بود غیرفعال و بیمارانی که این اندیس در آن‌ها بیش از شش بود فعال تلقی شدند. پس افراد مورد مقایسه، بیماران در مرحله غیرفعال و فعال بودند بدین سبب، گروه کنترل افرادی بودند که در مرحله غیرفعال قرار داشتند و توسط پزشک معالج، از بین مراجعه‌کنندگان به مرکز انتخاب و جهت خونگیری معرفی شدند. لازم به ذکر است، به منظور جلوگیری از بروز اشکال در نتایج، دست‌اندرکاران طرح اعم از مجری طرح و فرد خون گیرنده و نیز آزمایش‌کننده از وضعیت بیماران یعنی فعال و غیرفعال بودن بیماری، اطلاعی نداشتند. چون طبق مطالعات (Jill P Buyon)، مقادیر کمپلمان Bb و C4d در مرحله غیرفعال ۶۰٪ افزایش و یا در مرحله فعال حدود ۸۵٪ افزایش می‌یابد، بر اساس آن با در نظر گرفتن α=۰/۰۵ و β=٪۲۰ مقرر گردید، طبق فرمول، به عنوان حجم نمونه ۴۰ نفر از گروه فعال و ۴۰ نفر غیر فعال برای نمونه‌گیری (تعداد کل ۸۰ بیمار)در نظر گرفته شوند. گرچه نمونه‌های سرمی دو بیمار به دلیل لیز بودن بعداً از گردونه محاسبات خارج شدند. بدین منظور از بین مراجعه‌کنندگان به واحد لوپوس مرکز تحقیقات روماتولوژی بیمارستان شریعتی و یا بیماران بستری شده در بخش روماتولوژی بیمارستان شریعتی تعداد ۸۰ بیمار مبتلا به SLE که تشخیص بیماری آنها بر اساس معیارهای American College of Rheumatology (ACR) قطعی شده بود انتخاب شدند (۴۰ بیمار به عنوان case و ۴۰ بیمار به عنوان کنترل). اطلاعات دموگرافیک بیماران شامل سن، جنس و اطلاعات مربوط به بیماری شامل معیارهای تشخیص، مرحله فعال و یا غیرفعال بودن بیماری، عوارض بیماری، توسط پزشک همکار طرح در فرم ارزیابی مربوطه وارد می‌شد. بدین سبب بعد از به حد نصاب رسیدن تعداد

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌ها انجام آزمایش‌ها آغاز شد اما مجری طرح و افرادی که مسئول انجام آزمایش‌ها بودند، چون از فعال و یا غیرفعال بودن بیماری هر فرد اطلاعی نداشتند بر روی تمامی نمونه‌ها، آزمایشات لازم را انجام دادند که بعداً با مراجعه به پرونده‌ها معلوم شد، بیمارانی که علی‌الظاهر فعال معرفی شده بودند در اصل غیر فعال بودند از این رو از گروه فعال‌ها خارج گردیده و جزو غیر فعال‌ها محاسبه شدند. بدین علت تعداد بیماران فعال کمتر از حد در نظر گرفته درآمد. گرچه این تعداد از نظر آماری قابل قبول می‌باشد، چنانکه عده‌ای حتی با تعداد ۲۰ نفر بیمار فعال، نتایج خود را ارائه داده‌اند. ضمناً بیمارانی که به هر علتی دارای مشکلات التهابی از قبیل (سرماخوردگی، عفونت ادراری، ...) بودند در گروه بیمار قرار نگرفتند. روش نمونه‌گیری آسان بود و نمونه سرم و پلاسما از بیماران بستری در بخش روماتولوژی بیمارستان شریعتی و نیز از مراجعین به درمانگاه روماتولوژی که کریتریای ورود را داشتند گرفته شد. مرکز تحقیقات روماتولوژی بیمارستان شریعتی، گروه ایمونولوژی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه تهران مکان‌هایی بودند که تحقیق مذکور در آنجا انجام شد. بعد از آگاهی دادن به بیمار از طرح حاضر و کسب رضایت‌نامه از وی و این که عمل خونگیری از نظر علمی ضرری برای بیمار ندارد، از هر یک میزان شش میلی‌لیتر خون، توسط خون‌گیر خانم، گرفته شد (سه میلی‌لیتر برای تهیه پلاسما و سه میلی‌لیتر دیگر برای تهیه سرم) ضمناً از خونگیری افرادی که رضایت کامل نداشتند صرف‌نظر گردید. نمونه‌ای که قرار بود برای تهیه پلاسما مورد استفاده قرار گیرد بلافاصله بعد از خونگیری (در لوله حاوی EDTA)و مخلوط شدن، به یخچال انتقال یافت اما نمونه مربوط به سرم حداکثر ۳۰ دقیقه بعد از قرار گرفتن در دمای محیط و لخته‌شدن به یخچال ۴+ انتقال یافت. هر دو نمونه حداکثر بعد از ۲-۱ ساعت در دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوز و در ۲۰- منجمد گردیدند. نمونه‌ها توسط یخدان به آزمایشگاه گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردید تا آزمایش‌های لازم روی هر یک انجام شود. برای اندازه‌گیری C3 و C4 از دستگاه نفلومتری شرکت Bindingsite و برای CH50 از روش همولیز در ژل و برای اندازه‌گیری C4d و C3d و SC5b-9 از کیت‌های ELISA مربوط به شرکت Quidel آمریکا استفاده شد. نفلومتری یا کدورت سنجی: روشی اتوماتیک است که به وسیله آن مقادیر پروتئین‌های مختلف از جمله C3 و C4 اندازه‌گیری می‌شود. بدین منظور سرم هر یک از نمونه‌های استاندار و بیمار (حاوی C3 و C4) را با آنتی‌بادی اختصاصی ضد هر یک از آن‌ها مخلوط می‌کنند تا کمپلکس آنتی‌ژن–آنتی‌بادی تشکیل شود، پس از آن نور لیزر به هر یک ازکمپلکس‌های مذکور تابانده شده و بازتاب هر یک از آن‌ها اندازه‌گیری می‌گردد. لذا با در دست داشتن غلظت C3 و C4 در نمونه استاندارد، منحنی استاندارد رسم و از روی آن غلظت پروتئین‌های مذکور در سرم بیماران اندازه‌گیری شد. CH50: روش مذکور فعالیت کلاسیک کمپلمان در سرم و مایعات بیولوژیک را نشان می‌دهد و بیانگر فعالیت آن مقدار کمپلمانی است که بتواند موجب تخریب ۵۰ درصد گلبول‌های قرمز گوسفند شود .بدین سبب انجام این روش به فعال شدن پی‌درپی اجزای مسیر کمپلمان و لیز کردن گلبول‌های قرمز وابسته می باشد یعنی گلبول‌های قرمزی که از پیش به وسیله مقادیر مناسبی از آنتی‌بادی‌های ضد آن حساس شده‌اند. لازم به ذکر است آنتی‌بادی‌های مذکور در خرگوش تولید می‌گردند. روش مذکور به دو صورت لوله‌ای و یا در ژل قابل اجرا است در روش اخیر (که مبنای طرح حاضر است) گلبول‌های قرمز گوسفند حساس به صورت مخلوط شده در ژل حضور دارند، لذا با ریختن 5µl از سرم بیمار و نیز رقت‌های متوالی از سرم استاندارد در حفرات مربوط به هر یک و نیز انکوباسیون در دمای $4^{o}c$ و $37^{o}c$ کمپلمان موجود در این نمونه‌ها فعال‌شده و گلبول‌های قرمز را لیز می‌کنند که این امر منجر به تشکیل حلقه در اطراف حفرات می‌شود. لذا با اندازه‌گیری قطر حلقه و مجذور آن در سرم‌های استاندارد و با داشتن میزان فعالیت هر یک از این استانداردها، منحنی استاندارد رسم می‌گردد. پس از آن با اندازه‌گیری قطر حلقه در نمونه‌های بیماران، میزان فعالیت هر یک از نمونه‌ها از روی منحنی مشخص می‌شود که آن را با U نشان می‌دهند ELISA به روش ساندویچ (برای اندازه‌گیری C4d و C3d و SC5b-9): در این روش‌ها C4d موجود در اجزای حاصل از فعالیت C4 (نظیر C4d و iC4d و C4b) و کمپلکس‌های ایمنی واجد C3d و نیز SC5b-9 که از اجزای محلول مسیر نهایی کمپلمان است، در سرم، پلاسما و سایر مایعات بیولوژیک اندازه‌گیری می‌شوند (لازم به ذکر است C3d طبق روش CIC-raji cell replacement که نوعی روش ELISA است اندازه‌گیری شد). هر یک از روش‌های فوق طی سه مرحله قابل اجرا هستند: مرحله‌ای که آنتی‌بادی مونوکلونال موشی و اختصاصی هر

Archive of SID

www.SID.ir

یک از این اجزا را در کف پلیت می‌پوشانند. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به‌طور اختصاصی به اجزای کمپلمان مربوط بـه خـود متـصل شـوند، یعنی اجزایی که در سرم یا پلاسما یـا در مایعـات بیولوژیـک وجـود دارند. البته در مورد CIC-raji cell replacement چون سلول‌های Raji برای کمپلکس‌هـای ایمنـی واجـد (C3d, C3dg, C3d, iC3b) رسـپتور CR2 را دارند می‌توان از این سلول‌ها (و یا جایگزین‌هـای مـشابه آن) برای پوشاندن کف پلیت استفاده کرد .چنـان کـه در روش حاضـر از این جایگزین‌ها استفاده شده است. مرحله‌ای که آنتـی‌بـادی ضـد هـر یک از اجزای مورد جستجو و کونژوکه شده بـه HRP مـورد اسـتفاده قرار می‌گیرد. مرحله‌ای کـه از سوبـسترا اسـتفاده مـی‌شـود. در روش ELISA: پس از آماده‌سازی میکروپلیت، مقـدار معینـی از هـر یـک از محلول‌های استاندارد، کنترل و نمونه‌ها به هر یک از چاهـک‌هـای در نظر گرفته شده اضافه گردید، پس از انکوباسیون در دمـای $30^{o}c$ -۱۵ به مدت ۱±۳۰ دقیقه، چاهک‌ها شستشو داده شده و بـه آن‌هـا مقـدار مناسـبی از کونژوکـه اضـافه شـد. در خـلال انکوباسـیون مجـدد و شستشوی چاهک‌ها سوبسترا آماده و به چاهک‌هـا اضـافه گردیـد. در مرحله نهایی محلول متوقف‌کننده اضافه و تغییر رنگ در طـول مـوج ۴۰۵nm خوانده شدند. اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آمـاری SPSS بررسی شدند و با استفاده آزمون t-students نتایج با هم مقایسه گردیدند. گر چه در مواردی که تعداد کم بود از روش کیفـی Mann-Whitney برای مقایسه استفاده شد. ضمناً برای بررسـی همبـستگی از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۷۸ بیمار مبتلا به SLE بر اساس فعـال یـا غیرفعـال بـودن بیمـاری در دو گـروه قـرار گرفتنـد. (جـدول ۱). بـر اسـاس معیار SLEDAI.2K (جدول ضمیمه) بـین دو گـروه فعـال و غیرفعـال اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۰۰۵) (جدول ۲). متوسط سن کل بیماران ۹/۶±۲۹ سال (حداکثر=۵۲ و حداقل=۱۳ سال) بود که ۲۴ نفر با میانگین سنی ۹±۲۹/۲ سال (حـداکثر=۵۱ و حـداقل=۲۰ سـال) در گروه فعال و ۵۴ نفر با میانگین سنی ۱۰±۲۸/۸ سال (حـداکثر=۵۲ و حداقل=۱۳ سال) در گروه غیرفعال قرارداشتند. از نظر سن اختلاف معنی‌داری بین این دو گـروه مـشاهده نـشد. در بیمـاران فعـال طبـق اندیس SLEDAI.2K، بیشترین درصد فراوانی به‌ترتیب مربوط بـود بـه وجود پروتئین در ادرار (۲۰/۵٪)، افـزایش باندشـدن DNA (۱۹/۲٪)، خـون در ادرار (۱۵/۴٪)، کمپلمـان پـایین (۱۴/۱٪)، راش (۱۱/۵٪)، کاهش گلبول‌های سفید، وجود کاست‌های ادراری (۱۰/۳٪)، آرتریت، سردرد لوپوسی (۹٪)، تشنج، اختلالات بینائی، پیوری، کاهش پلاکت، (۳/۸٪)، تب، اختلال اعـصاب مغـزی، زخـم‌هـای دهـانی، پلـورزی، پریکاردیت (۲/۶٪) بود. ضمناً مابقی معیارها در این گـروه از بیمـاران صفر گزارش شده بـود. در بیمـاران غیرفعـال نیـز بیـشترین در صـد فراوانی به‌ترتیب به معیار افـزایش باندشـدن DNA (۱۷/۷٪) و وجـود پروتئین در ادرار (۱۲/۸٪) و راش (۱۰/۳٪) و کاهش گلبول‌های سفید (۶/۵٪) و خون در ادرار (۵/۱٪) و کمپلمان پـایین (۳/۸٪) و آرتریـت (۲/۵٪) و واسکولیت (۱/۳٪) تعلق داشت. ضمناً مابقی معیارها در این گروه از بیماران صفر گزارش شده بود. به‌عـلاوه بـا توجـه بـه آنـالیز داده‌ها طبق آزمون غیرپارامتریک (Mann-Whitney)، بیشترین اختلاف معنـی‌دار را در دو گـروه فعـال و غیرفعـال، معیارهـای کاسـت‌هـای ادراری، خـون در ادرار، کمپلمـان پـایین، پـروتئین در ادرار بـه خـود اختصاص داده بودند (p=۰/۰۰۰۵) مابقی نتـایج در (جـدول ۱) آمـده است. با توجه به آنالیز اطلاعات، میانگین C4 و C3 و CH50 سرمی در هر دو گروه فعال و غیرفعال در طیف طبیعی قرار داشـت و اخـتلاف معنی‌داری بین ایـن دو گـروه مـشاهده نـشد p>۰/۰۵ (جـدول۲). بـا وجود این، با توجه به طیف طبیعی C3 (۱۷۷mg/dl–۸۳) در۲۸/۵٪ از کل بیماران (۸/۲۵٪ از گروه فعال و ۲۰/۲۵٪ غیرفعال) مقدار آن کمتر از حد طبیعی و نیز با توجه بـه طیـف طبیعـی C4 (۴۵mg/dl–۱۵) در ۲۷/۷۵٪ از کل بیمـاران (۸/۲۵٪ در گـروه فعـال و ۱۹/۵٪ غیرفعـال) مقدار آن پایین‌تر از حد طبیعی بود. به جز یک مـورد کـه CH50 وی صفر بود در بقیه بیماران این معیار در طیف طبیعی (۱۶۰u–۷۰) قـرار داشت. ضمناً مقدار C3 و C4و C4d و SC5b-9 و C3dcicRaji این بیمار بـــه‌ترتیـــــب ۳۳mg/dl و ۱۸mg/dl و ۳۵µg/ml و ۴۵۰۰ng/ml و ۷/۵۳cicµgEq/ml بود. به عـلاوه میـانگین C4d در دو گـروه فعـال و غیرفعال اخـتلاف معنـی‌داری را نـشان داد (فعـال ۱/۶µg/ml±۱۶/۹، غیرفعال= ۱/۱µg/ml± ۲۳/۳۹، p=۰/۰۰۳). یعنی اینکه در گـروه غیـر فعال، میـزان C4d در مقایـسه بـا گـروه فعـال بـالاتر و ایـن اخـتلاف معنی‌دار بود (جدول ۲). بـا توجـه بـه آنـالیز اطلاعـات بـین فعالیـت بیماری و میانگین SC5b-9, C3d, CH50, C4, C3 در دو گـروه بیمـاران فعال و غیر فعال اختـلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵). ضمناً

Archive of SID
www.SID.ir

جدول- ۱: فراوانی و در صد معیارها در بیماران گروه فعال و غیرفعال مبتلا به SLE: (بر اساس اندیس فعالیت بیماری SLEDAI.2K، ستون یک و ستون دو) + نتـایج آنـالیز داده‌ها در دو گروه مورد مطالعه، طبق آزمون غیر پارامتریک (Mann- Whitney).

معیار	امتیاز	فراوانی در گروه فعال	در صد فراوانی در گروه فعال	میزان فراوانی در گروه غیرفعال	در صد فراوانی در گروه غیرفعال	p
تشنج	۸	۳	٪۳/۸	۰	٪۰	۰/۰۸
پسیکوز	۸	۱	٪۱/۳	۰	٪۰	۰/۱۳۴
سندرم مغزی ارگانیک	۸	۱	٪۱/۳	۰	٪۰	۰/۱۳۴
اختلالات بینایی	۸	۳	٪۳/۸	۰	٪۰	۰/۰۰۸
اختلال اعصاب مغزی	۸	۲	٪۲/۶	۰	٪۰	۰/۰۳۳
سردرد لوپوسی	۸	۷	٪۹	۰	٪۰	۰/۰۰۰۵
حوادث عروقی مغزی	۸	۰	٪۰	۰	٪۰	۱
واسکولیت	۴	۰	٪۰	۱	٪۱/۳	۰/۵۰۵
آرتریت	۴	۷	٪۹	۲	٪۲/۵	۰/۰۰۱
میوزیت	۴	۰	٪۰	۰	٪۰	۱
کاست‌های ادراری	۴	۸	٪۱۰/۳	۰	٪۰	۰/۰۰۰۵
خون در ادرار	۴	۱۲	٪۱۵/۴	۴	٪۵/۱	۰/۰۰۰۵
پروتئین در ادرار	۴	۱۶	٪۲۰/۵	۱۰	٪۱۲/۸	۰/۰۰۰۵
پیوری	۴	۳	٪۳/۸	۱	٪۱/۳	۰/۰۵۱
راش	۲	۹	٪۱۱/۵	۸	٪۱۰/۳	۰/۰۲۶
آلوپسی	۲	۱	٪۱/۳	۰	٪۰	۰/۱۳۴
زخم‌های دهانی	۲	۲	٪۲/۶	۰	٪۰	۰/۰۳۱
پلورزی	۲	۲	٪۲/۶	۰	٪۰	۰/۰۳۳
پریکاردیت	۲	۲	٪۲/۶	۰	٪۰	۰/۰۳۳
کمپلمان پایین	۲	۱۱	٪۱۴/۱	۳	٪۳/۸	۰/۰۰۰۵
افزایش باند شدن DNA	۲	۱۵	٪۱۹/۲	۱۳	٪۱۶/۷	۰/۰۰۱
تب	۱	۲	٪۲/۶	۰	٪۰	۰/۰۳۳
کاهش پلاکت	۱	۳	٪۳/۸	۰	٪۰	۰/۰۰۸
کاهش گلبول‌های سفید	۱	۸	٪۱۰/۳	۵	۶/۵	۰/۰۰۹

جدول- ۲: میانگین C4، C3، CH50، C4d، C3d- CICRaji، SC5b -9 در بیماران گروه فعال و غیرفعال SLE

بیماران	فعال	غیر فعال	p*	جمع بیماران
تعداد	۲۴	۵۴		۷۸
SLEDAI.2K	۱۷/۳±۱۲/۷	۲/۲۸±۲	۰/۰۰۰۵	
میزان C3 بر حسب mg/dl، Mean±SE	۸۵/۵±۷/۶	۸۹/۳±۶/۸	۰/۷۳	
میزان C4 بر حسب mg/dl، Mean±SE	۲۰/۴±۲/۴	۱۸۳±۲۳	۰/۵۷	
میزان فعالیت CH50 کمپلمان بر حسب u، Mean±SE	۱۵۷±۴/۳	۱۴۹±۴/۳	۰/۲۵	
میزان C4d، بر حسب µg/ml، Mean±SE	۱۶/۹±۱/۶	۲۳/۳۹±۱/۱	۰/۰۰۳	
میزان C3d-CICRaji، بر حسب CIC µgEq/ml، Mean±SE	۱۳/۳۱±۳/۱۶	۹/۴۳±۰/۹۶	۰/۱۲۷	
میزان SC5b -9، برحسب ng/ml، Mean±SE	۱۴۷۱/۱۷±۲۱۶/۹	۱۴۱۴±۱۱۴/۹۴	۰/۸۰۴	

*Student t-test

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ضمیمه (SLEDAI.2K): این موارد باید در طی ۱۰ روز گذشته از ویزیت بیمار وجود داشته باشد

امتیاز	معیار	
۸	تشنج	اخیرا رخ داده باشد (علل متابولیک، عفونی یا داروئی رد شده باشد).
۸	پسیکوز	تغییر در توانائی فعالیت‌های طبیعی به علت اختلال در معاشرت فقر محتوای فکری افکار هذیانی واضح رفتار نابهنجار بی‌نظم و کاتاتونیک. (البته علل اورمی و داروئی باید رد شود).
۸	سندرم مغزی ارگانیک	تغییر عمل فکری، با اختلال در جهت‌یابی، حافظه با دیگر اعمال ذهنی با شروع ناگهانی و تظاهرات کلینیکی متغیر شامل اختلال هوشیاری با کاهش قدرت تمرکز و عدم توانائی در توجه پایدار به محیط به اضافه حداقل دو مورد از موارد زیر: اختلال درک، کلام بی‌ربط، بی‌خوابی یا خواب آلودگی در طی روز یا افزایش یا کاهش فعالیت پسیکوموتور (علل اورمی و داروئی باید رد شود).
۸	اختلالات بینائی	تغییرات چشمی لوپوس شامل اجسام سیتوئید، خونریزی شبکیه، یا اگزودا و خونریزی شدید در مشیمیه یا التهاب عصب بینائی (علل فشارخون، عفونت یا داروئی باید رد شود).
۸	اختلال اعصاب مغزی	نوروپاتی اخیر حسی یا حرکتی که اعصاب مغزی را درگیر می‌کند.
۸	سردرد لوپوسی	سردردهای شدید مداوم که ممکن است حالت میگرنی داشته باشد ولی به داروهای مخدر جواب ندهد.
۸	حوادث عروقی مغزی	حوادث جدید عروقی مغز (آتراسکلروز باید رد شود)
۴	واسکولیت	زخم، گانگرن، ندول‌های دردناک انگشتان، انفارکتوس‌های اطراف ناخن، خونریزی‌های splinter، یا بیوپسی یا آنژیوگرام واسکولیت را اثبات کند.
۴	آرتریت	بیش از دو مفصل با درد و علائم التهاب شامل (تندرنس، تورم و مایع مفصلی).
۴	میوزیت	درد عضلات پروگزیمال یا ضعف آن که با افزایش کراتین فسفو کیناز یا آلدولاز همراه است، با تغییرات الکترومیوگرام یا تغییرات میوزیت در نمونه‌برداری.
۴	کاست‌های ادراری	کاست‌های گرانولار یا کاست‌های گلبول قرمز.
۴	خون در ادرار	بیش از پنج گلبول قرمز در یک فیلد میکروسکوپ با درشتنمائی بالا (عللی مثل سنگ، عفونت یادیگر علل باید رد شود).
۴	پروتئین در ادرار	بیش از نیم گرم در ۲۴ ساعت که اخیرا ایجاد شده باشد یا افزایش پیدا کرده باشد (در بچه‌ها: بیش از ۳۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن در ۲۴ ساعت).
۴	پیوری	بیش از پنج گلبول سفید در یک فیلد میکروسکوپ با درشتنمائی بالا(علل عفونی باید رد شود).
۲	راش	راشی که اخیرا ایجاد شده و یا عود یک راش التهابی.
۲	آلوپسی	کاهش موها که اخیرا ایجاد شده، به صورت تکه‌ای و یا منتشر.
۲	زخم‌های دهانی	زخم‌های جدید یا عودکننده دهانی یا بینی.
۲	پلورزی	درد قفسه صدری با کیفیت پلورتیک با مالش پلوری یا تجمع مایع در پلوریا ضخیم شدن پلور.
۲	پریکاردیت	درد پریکاردی با حداقل یکی از این موارد: مالش پریکارد، ترشح یا تغییرات ECG یا اکو.
۲	کمپلمان پایین	کاهش سطح کمپلمان‌های CH50, C3, C4 به زیر سطح نرمال آزمایشگاه.
۲	افزایش باند شدن DNA	بیش از ۲۵٪ باند شدن DNA با روش farr یا بالای سطح نرمال آزمایشگاه.
۱	تب	بیش از ۳۸ درجه سانتی‌گراد. (علل عفونی رد شود).
۱	کاهش پلاکت	کمتر از ۱۰۰۰۰۰ در میلی‌لیتر.
۱	کاهش گلبول‌های سفید	کمتر از ۳۰۰۰ در میلی‌لیتر.

بیشترین همبستگی را C3 با C4 داشت (ρ=۰/۸۰۷).

بحث

معنی‌دار نبودن میانگین سن بیماران و نیز معنی‌دار بودن (p=۰/۰۰۰۵) اندیس فعالیت (SLEDAI.2K)، به نوعی موید مناسب بودن تقسیم‌بندی بیماران به دو گروه فعال و غیرفعال می‌تواند باشد.

نتایج به دست آمده از این مطالعه که بر اساس ارزیابی ارتباط فعالیت بیماری SLE با میزان فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (CH50) و پروتئین C3 و C4 و فرآورده‌های پروتئینی مسیر (SC5b-9، C4d، C3d) طرح‌ریزی شده بود، مقادیر C3 و C4 و نیز میزان فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (CH50) در هر دو گروه فعال و غیرفعال در طیف طبیعی قرار داشتند که این نتایج در راستای تحقیقات گروهی دیگر در

Archive of SID
www.SID.ir

این زمینه بود.[11] این گروه با مطالعه ۴۱ بیمار مبتلا بـه SLE بـه نتیجـه مذکور رسیده بودند. از آنجا که نقصان در پروتئین‌های مسیر کلاسیک کمپلمـان نظیـر C4، C2، C1q، C1r/ C1s موجـب صـفر شـدن CH50 می‌شود.[12] به نظر می‌رسد صـفر شـدن CH50 در یکـی از بیمـاران بـه علت نقص در یکی از پروتئین‌های C1 باشد و نه C4 زیرا میـزان ایـن پروتئین در بیمار مزبور در حد طبیعی بود. بالا بودن همبستگی C3 بـا C4 نیز به نوعی می‌تواند موید فعـال بـودن مـسیر کلاسـیک در ایـن بیماران در مقایسه با سایر مسیرها باشد. ضمناً در مطالعه حاضـر تنهـا فرآورده پروتئینی مسیر یعنی C4d با فعالیت بیماری مـرتبط بـود.[1] در مطالعه‌ای بالا بودن C4d را در مرحلـه غیرفعـال، بیومـارکری حـساس برای پیش‌بینی فعالیت بیماری اعلام شده بود.[13و 4] حتی عده‌ای دیگـر E- C4d را برای تشخیص بیماری و نشان دادن فعالیت بیماری مناسب دانسته‌اند.[14] مدت‌ها پـیش بـرای تـشخیص و روشـن شـدن فعالیـت بیماری، فاکتورهایی نظیر C4, C3 را اندازه‌گیری مـی‌کردنـد و ایـن در حالی است که کارآمدی ایـن روش هنـوز بـا شـک و تردیـد همـراه است.[4] در مطالعه حال حاضر نیز این مساله تایید شد یعنی بـه غیـر از C4d، میانگین CH50, C3, C4، C3d، SC5b-9 در دو گروه بیماران فعـال و غیرفعال اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، که شاید بتوان از آن بـه عنوان بیومارکری برای نشان دادن فعالیت بیماری استفاده کرد. همـان طور که می‌دانیم امروزه اکثر کشورهای دنیا، برای اهداف کـاربردی و صنعتی از دانش ایمونولوژی به فراوانی بهره می‌برند. بدین معنی کـه: به کمک این دانش کیت‌ها و فرآورده‌هـایی تولیـد مـی‌نماینـد کـه بـه سراسر دنیا ارسال می‌گردد، بدین وسیله نه تنها سطح اقتصادی، بلکـه با پژوهش‌های مستمر و پیوسـته (و نـه نقطـه‌ای)، بـار علمـی مراکـز تحقیقاتی آن کشورها ارتقا یافته و اشتغال نیز ایجاد می‌شود. از جملـه موارد اشاره شده، پژوهش‌های انجام شده در تهیه کیت‌هـای الایـزا (و به عنوان نمونه، کیت‌های اندازه‌گیری اجزای کمپلمان مثلاً C4d) است، چنان که تنها کشور امریکا و در مرحله بعد هندوستان از نظـر علمـی توان آن را دارند که کیت مذکور را با کیفیت بالا و قابـل قبـول تولیـد کنند. با توجه به نکات فوق و با در نظر گرفتن این که خریداری ایـن کیت‌ها با مشکل و تاخیر همراه بود پیشنهاد می‌شـود شـرایطی فـراهم شود تا بتوان آن‌ها را در داخل کشور تولید کرد. هر چند رونـد تولیـد آن سیار طولانی و دشوار باشد. البته این امر میسر نمی‌شود مگـر ایـن که آموزش و برپایی علـوم ریـشه‌ای و کـاربردی دانـش ایمونولـوژی یعنی آنچه که مد نظر و مورد استفاده این کشورها است مـورد توجـه بیـشتر قـرار بگیـرد. از جملـه ایـن علـوم مـی‌تـوان بـه شـاخه‌هـای ایمونوشیمی و ایمونوبیوشیمی، اشاره کرد یعنی حلقه‌هـای مفقـوده‌ای که سال‌هاست دانش آن به طور مستمر در کشورهای پیشرفته آموزش داده شده و در امور کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرد. لازم به ذکـر است این شاخه‌ها رشته بیوشیمی را بـه دانـش ایمونولـوژی و علـوم کاربردی پیشرفته دیگر در زمینه علوم پایه پزشکی پیوند می‌دهـد. راه دیگر این که: چون در اندیس فعالیت (SLEDAI.2K)، بر اساس آزمون غیرپارامتریـک (Mann-Whitney)، نتـایج معیارهـای (کاسـت‌هـای ادراری، کمپلمان پایین، پـروتئین در ادرار، خـون در ادرار)، بـرای دو گروه بیماران فعال و غیرفعال، معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۰۵)، در مـواقعی که تهیه این کیت‌ها (به عنوان مثال کیت اندازه‌گیری C4d) بـا مـشکل همراه می‌گردد، شاید بتوان از این معیارهـا بـرای نـشان دادن فعالیـت بیماری استفاده کرد. *سپاسگزاری:* بدینوسیله مراتب تشکر و قـدردانی خود را نسبت بـه سـرکار خـانم‌هـا دکتـر اعظـم بختیاریـان از گـروه فارماکولوژی و دکتر گلرخ ملیحی که در تهیه کیت‌ها یـاری نمودنـد، ابراز می‌دارم و نیز از همکارانم در گروه‌ایمونولوژی دانشکده پزشکی. مرکز تحقیقات روماتولوژی از سرکار خانم‌ها دکتر شهرزاد خسروی و دکتر بهار صادقی و نیـز پیونـد مغـز اسـتخوان کـه امکانـات خـود را بی‌دریغ برای جداسازی سرم و پلاسما، در اختیار بنده قرار دادند و از سـرکار خـانم دکتـر سوسـن فرشـی و آقـای دکتـر عاشـری کـه بـا مشاوره‌های‌خود، بنده را در امور آماری یاری نمودند سپاسگزارم.

References

1. Utz PJ. Multiplexed assays for identification of biomarkers and surrogate markers in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13: 304-11.
2. Liu CC, Manzi S, Danchenko N, Ahearn JM. New advances in measurement of complement activation: lessons of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: 375-81.
3. Manzi S, Ahearn JM, Salmon J. New insights into complement: a mediator of injury and marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13: 298-303.
4. Buyon JP, Tamerius J, Belmont HM, Abramson SB. Assessment of disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematous. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1028-37.
5. Spronk PE, Limburg PC, Kallenberg CG. Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995; 4: 86-94.
6. Sullivan KE, Wisnieski JJ, Winkelstein JA, Louie J, Sachs E, Choi R, et al. Serum complement determinations in patients with

Archive of SID
www.SID.ir

quiescent systemic lupus erythematous. *J Rheumatol* 1996; 23: 2063-7.
7. Prrcel JM, Ordi J, Castro-Salamo A, Vilardell M, Rodrigo MJ, Gene T, et al. The value of complement activation products in the assessment of systemic lupus erythematosus flares. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74: 283-8.
8. Milis L, Timmermans V, Morris CA, Pussell BA, Charlesworth JA. The value of complement measurements in the assessment of lupus activity. *Aust N Z J Med* 1992; 22: 338-44.
9. Röther E, Lang B, Coldewey R, Hartung K, Peter HH. Complement split product C3d as an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 1993; 120: 31-5.
10. Chiu YY, Nisihara RM, Würzner R, Kirschfink M, de Messias-Reason IJ. SC5b-9 is the most sensitive marker in assessing disease activity in Brazilian SLE patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998; 8: 239-44.
11. Manzi S, Rairie JE, Carpenter AB, Kelly RH, Jagarlapudi SP, Sereika SM, et al. Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1178-88.
12. Jamal S, Jolles S. The role of complement testing in dermatology. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 321-6.
13. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2048-65.
14. Liu CC, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 543-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 6, Sep 2008: 379-387

Correlation of systemic lupus erythematosus disease activity with classical complement (CH50) function and related protein levels

Bamdad Mehrbany K[*1]
Akbarian M[2]
Salesi M[2]
Geflati Z[1]
Tavassoli S[2]

1- Department of Immunology
2- Department of Rheumatology research Center, Shariati Hospital

Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding author: Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Iran.
Tel: +98-21-88026956
email: bamdad_mehr@yahoo.com

Abstract

***Background*:** The components of the classical complement pathway play an important role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) and are reportedly useful biomarkers of disease activity. In this study, we evaluate disease activity, complement function (total hemolytic complement, CH50) and complement protein levels (C3, C4, C3d, C4d, SC5b-9), comparing the results of patients with active disease versus those with inactive disease.

Methods: This cross-sectional study included 78 hospitalized women with SLE, 24 of whom were in the active group, with SLE disease activity indexes (SLEDAI.2K) of >6, and 54 in the inactive group, with SLEDAI.2K of ≤6. Serum CH50 was measured using a red blood cell hemolytic assay. C3 and C4 levels were determined by nephlometry and plasma levels of C3d, C4d, SC5b-9 by ELISA. The data were statistically analyzed using SPSS.

Results: The mean (±standard error) C4d levels of the inactive group were significantly higher than those of the active group (23.39±1.1µg/ml and 16.9±1.6µg/ml, respectively; p=0.003). There was also a significant correlation between C3 and C4 levels (p=0.807). The mean values of the other proteins (C3, C4, CH50, SC5b-9, and C3d circulating immune complex concentrations) were not significantly different between the inactive group vs. the active group: 89.35±6.8 vs. 85.54±7.6mg/dl, 18.33±2.3 vs. 20.45±2.4mg/dl, 149.03±4.3 vs. 157±4.3U, 1414.4±114.94 vs. 1471.1±216.9ng/ml, 9.43±0.96 vs. 13.31±3.16µgEq/ml, respectively (p>0.05).

Conclusions: According to our results, C4d levels may be used as a biomarker of disease activity. The significant correlation between C3 and C4 may confirm the activity of the classical pathway in SLE patients.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, CH50, C3, C4, C3d, C4d, SC5b-9, inactive, flare.

Archive of SID

www.SID.ir