مقایسه فاکتور روماتوئید در سرم و مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

قاسم مسیبی[1] - دکتر فاضل شکری[2]

خلاصه:

با استفاده از روش حساس ELISA(Enzyme - linked Immunosorbent Assay) غلظت ایزوتیپ‌های IgMRF، IgARF و توتال IgM و IgA در سرم و مایع مفصل ۴۵ بیمار مبتلا به RA سنجیده شد. در سرم بیش از ۹۳ درصد این بیماران فاکتور روماتوئید وجود داشت. نتایج نشان می‌دهد که تفاوتی بین میزان IgMRF و IgARF در سرم و مایع مفصل وجود ندارد. بامحاسبه نسبت درصد غلظت RF به توتال ایمونوگلوبین مشخص گردید که نسبت درصد غلظت RF در سرم بیشتر از مایع مفصل است . این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود. ممکن است جایگاه اصلی تولید RF در مفاصل بیماران مبتلا به RA باشد.

مقدمه:

فاکتور روماتوئید (RF-Rheumatoid Factor) اتوآنتی‌بادی است که بر علیه قسمت FC مولکول IgG انسان و برخی از گونه‌های حیوانی ویژگی دارد. این اتوآنتی‌بادی ممکن است از ایزوتیپ‌های IgM،IgA،IgG و حتی IgE باشد. تولید RF از ویژگیهای بارز بیماری آرتریت روماتوئید (RA- Rheumatoid Arthritis) بوده و در سرم بیش از ۹۰ درصد از بیماران RA وجود دارد.

تیتر RF در بیماری RA در مقایسه با بیماریهای دیگر که RF مثبت هستند بیشتر می‌باشند. بنابراین سنجش کمی RF تا حدودی به تشخیص بیماری کمک می‌کند. RF می‌تواند با تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و رسوب در مفاصل در پاتوژنز بیماری RA نقش مؤثری داشته باشد. بنظر می‌رسد که جایگاه اصلی تولید RF در مفاصل باشد. اگرچه برخی از مطالعات و گزارشات نشان می‌دهند که تیتر کمی RF موجود در سرم و مایع مفصل بیماران RA تفاوت چندانی نمی‌کند. در مطالعه حاضر غلظت RF در سرم و مایع مفصل بیماران RA مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها:

۱- نمونه‌های مورد آزمایش:

سرم و مایع مفصلی ۴۵ بیمار مبتلا به RA جمع‌آوری و تا انجام آزمایش در 20°C- نگهداری شد. بیماران کسانی بودند که به بخش روماتولوژی بیمارستان حضرت رسول

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان‌مرکزی (اراک) - کارشناس ارشد ایمونولوژی

۲- استادیار و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم‌پزشکی تهران ـ دانشکده بهداشت

Scanned with CamScanner

دانشگاه علوم‌پزشکی ایران و بیمارستان امام رضا دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد مراجعه کردند و پس از تشخیص قطعی، توسط پزشک متخصص نمونه‌گیری انجام شد.

۲- اندازه‌گیری غلظت IgMRF و IgARF:

سرم و مایع مفصل بیماران RA جهت سنجش IgMRF و IgARF با روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت اختصاراً، میکروپلیت‌های ELISA با IgG پلی‌کلونال انسانی (غلظت ۲۰ μg.Ml) حساس شدند. پلیت‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ $^{\circ}$C انکوبه و سپس سه‌بار با بافر PBS حاوی ۰/۵٪ Tween20(Sigma) شسته شدند. نمونه‌ها با دقت مناسب و بصورت duplicate به حفره‌ها اضافه گردید. از آنتی‌بادیهای Fr و B_{27} به ترتیب به عنوان استاندارد برای سنجش IgMRF و IgARF استفاده شد. بعد از انکوباسیون و شستشوی پلیت‌ها همانند مرحله قبل کونژوگه‌های اختصاصی ضد IgM و IgA انسانی متصل به پراکسیداز با رقت مناسب اضافه و بعد از انکوباسیون و شستشوی پلیت‌های سوبسترای آنزیم پراکسیداز (OPD) اضافه و بعد از تغییر رنگ و توقف واکنش با اسید سولفوریک ۲۰ درصد، جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج 492nm با دستگاه ELISA Reader خوانده شد. از روی منحنی استاندارد مربوطه غلظت RF برای هر نمونه محاسبه گردید.(شکل-۱)

۳- اندازه‌گیری کمی توتال IgM و IgA با روش Capture ELISA:

میکروپلیت‌های ELISA با غلظت مناسب آنتی‌بادیهای منوکلونال ضد IgM (Af_6) و ضد IgA ($2D_7$) پوشانده شدند. نمونه‌های سرم و مایع مفصل با رقت مناسب به حفره‌ها اضافه گردید. از پاراپروتئین‌های kok و A_3 به ترتیب به عنوان استاندارد جهت اندازه‌گیری IgM و IgA استفاده شد. مراحل بعدی مانند روش فوق انجام شد.

نتایج:

اندازه‌گیری ایزوتیپ‌های IgMRF و IgARF.

غلظت فاکتور روماتوئید در سرم و مایع مفصل ۴۵ بیمار مبتلا به RA با روش حساس ELISA اندازه‌گیری شد. در این روش تا غلظت کمتر از 10 ng.ml فاکتور روماتوئید را می‌توان سنجید. نتایج نشان داد که بیش از ۹۳٪ (۴۳ - ۴۵ نفر) از بیماران RA، RF مثبت هستند.

میانگین غلظت IgMRF در سرم و مایع مفصل به ترتیب ۱۰۲ و ۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و میانگین غلظت IgARF در سرم و مایع مفصل به ترتیب ۶۲ و ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین غلظت RF در سرم و مایع مفصل مشاهده نشد.(جدول-۱)

سنجش IgM و IgA توتال:

(جدول -۱): غلظت فاکتور روماتوئید (RF) و توتال‌ایمونوگلوبولین(IgA,IgM) در سرم و مایع مفصل

	بیماران RA(n=۴۵)		اختلاف آماری بین سرم و مایع مفصل (p-value)
	سرم	مایع مفصل	
IgMRF (μg.ml)	۱۰۲ (۱۰۰)	۹۸ (۱۲۰)	NS
IgARF (μg.ml)	۶۲ (۸۹)	۶۴ (۸۷)	NS
IgM (Mg.ml)	۲/۳ (۱/۰۲)	۱/۴ (۰/۹۸)	<0.0001
IgA (Mg.ml)	۰/۹۹ (۰/۵۴)	۰/۶۴ (۰/۴)	<0.001

NS:No significant

اعداد داخل پرانتز انحراف معیار را نشان می‌دهند.

میانگین غلظت IgM در سرم (۲/۳ mg.ml) و مایع

Scanned with CamScanner

مفصل (۱/۴) بود. این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد($P < 0.0001$).

با مقایسه IgA موجود در سرم (۰/۹۹mg.ml) و مایع مفصل (۰/۶۴mg.ml) مشخص شد که اختلاف با $P<0.001$ معنی‌دار می‌باشد.(جدول -۱)

در مقایسه نسبت درصد غلظت RF به توتال ایمونوگلوبولین (به‌عنوان مثال $\frac{\text{IgMRF غلظت}}{\text{IgM غلظت}} \times ۱۰۰$) مشخص گردید که نسبت درصد غلظت IgMRF و IgARF در مایع مفصل بیشتر از سرم می‌باشد. بررسیهای آماری نشان می‌دهد که این تفاوت برای IgMRF ($P<0.02$) و IgMARF($P < 0.005$) معنی‌دار است(شکل -۲).

بحث و نتیجه‌گیری:

فاکتور روماتوئید(RF) یکی از معیارهای تشخیصی RA محسوب شده و اندازه‌گیری کمی آن ارزش کلینیکی دارد. ارتباط غلظت RF و ایزوتیپ‌های مختلف آن با شدت بیماری درمطالعات متعدد گزارش شده است.

در مطالعه حاضر: بااندازه‌گیری IgMRF و IgARF در سرم و مایع مفصل بیماران RA تفاوتی در غلظت این ایزوتیپ‌ها در سرم و مایع مفصل وجود نداشت (جدول-۱).

مطالعاتی که اخیراً انجام شده نیز نشان می‌دهد که سلولهای تک‌هسته‌ای مشتق از مغز استخوان، سینوویوم و خون محیطی بیماران RF قادر به تولید ایمونوگلوبولین و RF می‌باشند. با آنالیز مایع روی محیط کشت این سلولها مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری در غلظت RF درمحلهای مختلف (خون محیطی، مفصل و مغز استخوان) بیماران RA وجود ندارد.

این عدم تفاوت شاید بیانگر این مطلب باشد که سلولهای تولید کننده RF در خون و بافت سینوویال بیماران RA وجود دارد.

نتایج نشان داد که درصد IgMRF به کل IgM و درصد IgARF به کل IgA در مایع مفصل بیماران RA بیشتر از سرم می‌باشد و این اختلاف به ترتیب با $P < 0.02$ و $P< 0.005$ معنی‌دار است.

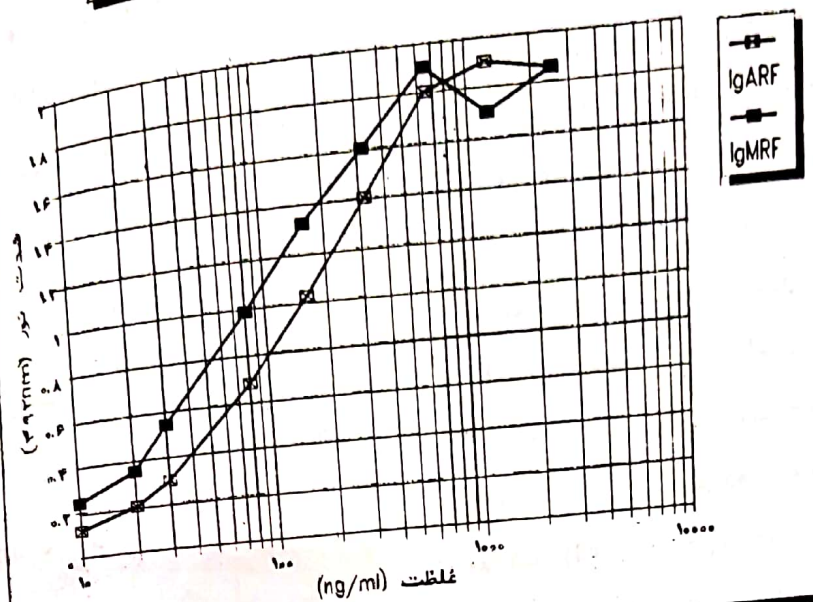
بیشتر بودن درصد RF در مایع مفصلی در مقایسه با سرم ممکن است بدلیل فعالتر بودن سلولهای تولیدکننده RF در مایع مفصل باشد و احتمالاً تعداد بیشتری از پلاسماسلهای سینوویالی در تولید RF شرکت دارند.

مطالعات قبلی نشان می‌دهد که فعالیت سلولهای T مهارکننده (Suppressor T cell) در بیماران RA بخصوص در مفاصل دچار نقص هستند. با این توصیف لنفوسیتهای B تولیدکننده RF در مفاصل بیماران RA احتمالاً فعالتر بوده و می‌توانند نقش مهمی در پاتولوژی ایفاکنند.

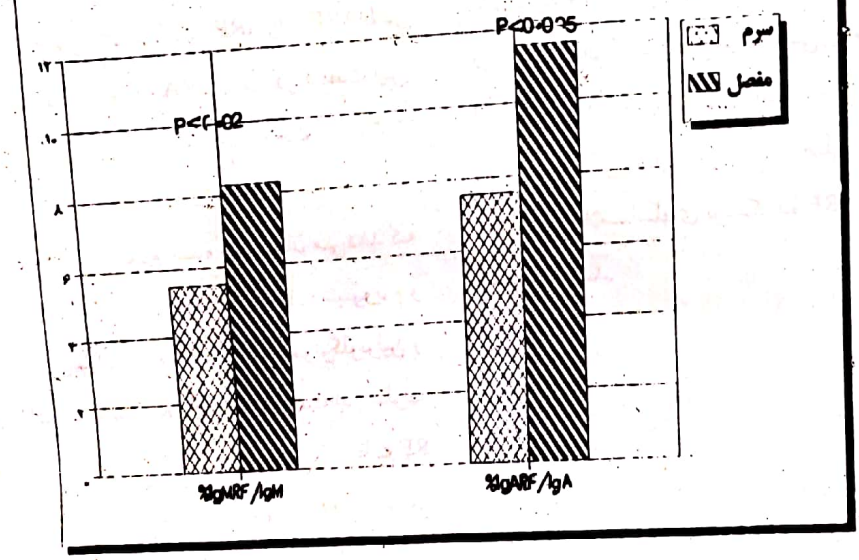
نتایج بدست آمده از این تحقیق مؤید این مطلب است که احتمالاً مفاصل به عنوان یک Origin site در تولید RF نقش دارند و با توجه به اینکه مفصل اولین عضوی است که در این بیماران گرفتار می‌شود، آنتی‌ژن محرک RF در ارتباط با بافت سینوویال میباشد. وجود RF در سرم می‌تواند به دلیل تراوش از مایع مفصلی و یا مهاجرت تعدادی از پلاسماسلهای تولیدکنندهٔ RF از مفصل به مغز استخوان باشد.

Scanned with CamScanner

شکل -۲: منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری IgMRF و IgARF



شکل -۳: درصد غلظت فاکتور روماتوئید به‌کل ایمونوگلوبولین درسرم ومایع مفصل بیماران RA



Scanned with CamScanner

SUMMARY:

The total of IgM and IgA in serum and synovial fluid of 45 patients with Rheumatoid Arthritis (RA) are measured by critical method of ELISA.

93% of the patients had RF in their serum.

The results show that there is no difference between the rate of IgMRF and IgARF in serum and synovial fluid. It was found that percentage RF the ratio in serum is higher than that of synovial fluid by the calculation of RF titre to total immunogloboline.

The difference is significant from statistical point of view.

The main place of RF production probably is in the joints of patient who are contracted to RA.

References:

1- Carson , D.A., Chen , P.P., Kipps , T.J.New roles for rheumatoid factor.J.Clin. invest . 87 , 379 - 383 (1991)

2- Clark , W.H., Fortin , P.R. Epidemiologic studies of rheumatoid arthritis.J. Rheomatol (supple) , 19. 74 - 79 (1992)

3- Harris , E.D., Phathogenesis of rheumatoid arthritis., In: Kelly , W.N. , Harris , E. D et al Textbook of Rheumatology. 905 - 942 (W.B.Saunders philadelphia , 1989)

4- Kalsen , I. S., Melief , M.J., Hazenberg , M. Responces of synovial fluid and peripheral blood mononuclear cells to bacterial antigens and autologus antigen presenting cells Ann. Rheumatol. Dis. 52 , 127 - 132 (1993)

5- Moazzeni , M., Mosayyebi , G., Stevenson , F.K., Abbot , S., Mageed , R.A. Shokri , F. Biased utilization of Immunoglobulin variable region heavy and light chain genes by the malignant CD_5^+ B lymphocytes from patients with Burkitt's lymphoma Int.J. Cancer., 57 , 1-7 (1994)

6- Otten , H.G., Daha , M.R . et al, Rheumatoid factor production by mononuclear cells from different sites of patient with rheumatoid arthritis. Clin . Exp. Immunol . 2,236 - 240 (1993)

7- Shokri , F., Mageed , R.A., Moziak , B.R., Talal , N., Amos , N., Jefferis , R. Lymphoproliferation in sjogren,s syndrome: Evidence of selective expansion of a B cell subset characterized by the expression of cross - reactive idiotypes. Arth. Rheum . 36 , 1128 - 1136 (1993).

8- Spector , T.D., Hort , D.J., Powell , R.J.prevalence of rheumatoid arthritis and rheumatoid factors in women. Ann. Rheum. Dis., 52, 254 - 257 (1993)

9- Koopman , W.J.Schrohenloher, R.et al: IgA rheumatoid factor synthesis by dissociated synovial cells: characterization and relationship to IgM rheumatoid synthesis Arth. rheum. 28 , 1219 - 1227 (1985)

Scanned with CamScanner