

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

چکیده

کبری بامداد مهربانی^{۱*}، محمود اکبریان^۲، منصور ثالثی^۲، ساناز توسلی^۲، زهرا غفلتی^۱

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

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی
تلفن: ۶۶۴۰۲۰۹۵ داخلی ۲۲۶۶

email: bammad_mehr@yahoo.com

مقدمه

لوپوس اریتماتوز سیستمیک Systemic Lupus Erythematosus (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 ایمنولوژیک ظاهر می‌شود. چنان که اختلال ایمنولوژیک اتو آنتی‌بادی‌ها علیه اجزای سلولی منجر به فعال شدن سلسله‌ای از واکنش‌های ایمنولوژیک 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 پاتوزن این بیماری دخالت دارند.

زمینه و هدف: اجزای مسیر کلاسیک کمپلمان در پاتوزن بیماری SLE دخالت دارند، لذا بر آن شدیم تا برای ارزیابی فعالیت بیماری به بررسی فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (CH50) و اندازه‌گیری C3، C4، C3d، C4d، SC5b-9، در بیماران پیردازیم 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 C3، C4، به روش نفلومتری و C3d، C4d، SC5b-9 با روش ELISA اندازه‌گیری شدند. اطلاعات به دست 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: ۱۴۹±۴/۳u، ۱۴۱۴±۱۱۴/۹۴ng/ml، ۱۸/۳±۲/۳mg/dl، ۲۰/۴۵±۲/۴mg/dl، ۱۳/۳۱±۳/۱۶cicμgEq/ml، ۱۵۷±۴/۲u، ۱۴۷۱/۱±۲۱۶/۹ng/ml، ۲۰/۴۵±۲/۴mg/dl، ۸۹/۳±۶/۸mg/dl، ۸۵/۵±۷/۶mg/dl، ۹/۴۳±۰/۹۶cicμgEq/ml و در گروه فعال: ۲۳/۳۹±۱/۱μg/ml، ۱۶/۹±۱/۶μg/ml، p=۰/۰۰۳). ضمناً همبستگی معنی‌داری بین سطح C3 و C4 مشاهده شد (p=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، C3، C4، C3d، C4d، SC5b-9، غیرفعال (inactive)، فعال (flare)

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 C3، C4، 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.^۳ 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

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 جامعه 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 خون‌گیرنده 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 $\alpha=0/05$ و $\beta=0/20$ 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

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 اتولوژی 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.^۳ 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.^۴ 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, C4b, C3b, Factor B و Terminal Complement Complex (TCC) در ۲۲ بیمار در مرحله فعال و ۳۹ بیمار غیرفعال، مقادیر C3a, C4a, Cc 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 C2, C3, C3a/C3 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 C3, C4 و فرآورده‌های پروتئینی مسیر (C3d, C4d, SC5b-9) را ارزیابی نموده و

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 اداری، ...) 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 دانشکده 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 لخته شدن به یخچال +۴ انتقال یافت. هر دو نمونه حداکثر بعد از ۲-۱ ساعت در دور ۲۵۰۰ rpm 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 استاندارد 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 از کمپلکس‌های 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 می‌باشد 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 ۵μl از سرم بیمار و نیز رقت‌های متوالی از سرم استاندارد در حفرات مربوط به هر یک و نیز انکوباسیون در دمای ۴۰°C و ۳۷°C کمپلمان موجود در این نمونه‌ها فعال شده 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

وجود پروتئین در ادرار (۲۰/۵٪)، افزایش باندشدن DNA (۱۹/۲٪)، خون در ادرار (۱۵/۴٪)، کمپلمان پایین (۱۴/۱٪)، راش (۱۱/۵٪)، کاهش گلبول‌های سفید، وجود کاست‌های ادراری (۱۰/۳٪)، آرتریت، سردرد لوپوسی (۹٪)، تشنج، اختلالات بینایی، پیوری، کاهش پلاکت، تب، اختلال اعصاب مغزی، زخم‌های دهانی، پلورزی، پریکاریت (۲/۶٪) بود. ضمناً مابقی معیارها در این گروه از بیماران صفر گزارش شده بود. در بیماران غیرفعال نیز بیشترین در صد فراوانی به ترتیب به معیار افزایش باندشدن DNA (۱۷/۷٪) و وجود پروتئین در ادرار (۱۲/۸٪) و راش (۱۰/۳٪) و کاهش گلبول‌های سفید (۶/۵٪) و خون در ادرار (۵/۱٪) و کمپلمان پایین (۳/۸٪) و آرتریت (۲/۵٪) و واسکولیت (۱/۳٪) تعلق داشت. ضمناً مابقی معیارها در این گروه از بیماران صفر گزارش شده بود. به‌علاوه با توجه به آنالیز داده‌ها طبق آزمون غیرپارامتریک (Mann-Whitney)، بیشترین اختلاف معنی‌دار را در دو گروه فعال و غیرفعال، معیارهای کاست‌های ادراری، خون در ادرار، کمپلمان پایین، پروتئین در ادرار به خود اختصاص داده بودند ($p=0/0005$) مابقی نتایج در (جدول ۱) آمده است. با توجه به آنالیز اطلاعات، میانگین C3 و C4 و CH50 سرمی در هر دو گروه فعال و غیرفعال در طیف طبیعی قرار داشت و اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد ($p>0/05$) (جدول ۲). با وجود این، با توجه به طیف طبیعی C3 (۱۷۷-۸۳ mg/dl) در ۲۸/۵٪ از کل بیماران (۸/۲۵٪ از گروه فعال و ۲۰/۲۵٪ غیرفعال) مقدار آن کمتر از حد طبیعی و نیز با توجه به طیف طبیعی C4 (۴۵-۱۵ mg/dl) در ۲۷/۷۵٪ از کل بیماران (۸/۲۵٪ از گروه فعال و ۱۹/۵٪ غیرفعال) مقدار آن پایین‌تر از حد طبیعی بود. به جز یک مورد که CH50 وی صفر بود در بقیه بیماران این معیار در طیف طبیعی (۱۶۰-۷۰) قرار داشت. ضمناً مقدار C3 و C4 و SC5b-9 و C3dCicRaji این بیمار به ترتیب ۳۳ mg/dl و ۱۸ mg/dl و ۳۵ μg/ml و ۴۵۰۰ ng/ml و ۷/۵۳ ciccμgEq/ml بود. به علاوه میانگین C4d در دو گروه فعال و غیرفعال اختلاف معنی‌داری را نشان داد (فعال ۱۶/۹±۱/۶ μg/ml، غیرفعال ۱/۱±۲۳/۳۹ μg/ml، $p=0/003$). یعنی اینکه در گروه غیر فعال، میزان C4d در مقایسه با گروه فعال بالاتر و این اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۲). با توجه به آنالیز اطلاعات بین فعالیت بیماری و میانگین C3، C4، CH50، SC5b-9، C3d، C4، C3 و میانگین فعال و غیر فعال اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). ضمناً

یک از این اجزا را در کف پلیت می‌پوشانند. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به‌طور اختصاصی به اجزای کمپلمان مربوط به خود متصل شوند، یعنی اجزایی که در سرم یا پلاسما یا در مایعات بیولوژیک وجود دارند. البته در مورد CIC-raji cell replacement چون سلول‌های Raji برای کمپلکس‌های ایمنی واجد (C3d, C3dg, C3d, iC3b) رسپتور CR2 را دارند می‌توان از این سلول‌ها (و یا جایگزین‌های مشابه آن) برای پوشاندن کف پلیت استفاده کرد. چنان‌که در روش حاضر از این جایگزین‌ها استفاده شده است. مرحله‌ای که آنتی‌بادی ضد هر یک از اجزای مورد جستجو و کونژوکه شده به HRP مورد استفاده قرار می‌گیرد. مرحله‌ای که از سوبسترا استفاده می‌شود. در روش ELISA: پس از آماده‌سازی میکروپلیت، مقدار معینی از هر یک از محلول‌های استاندارد، کنترل و نمونه‌ها به هر یک از چاهک‌های در نظر گرفته شده اضافه گردید، پس از انکوباسیون در دمای ۳۰-۱۵°C به مدت ۳۰±۱ دقیقه، چاهک‌ها شستشو داده شده و به آن‌ها مقدار مناسبی از کونژوکه اضافه شد. در خلال انکوباسیون مجدد و شستشوی چاهک‌ها سوبسترا آماده و به چاهک‌ها اضافه گردید. در مرحله نهایی محلول متوقف‌کننده اضافه و تغییر رنگ در طول موج ۴۰۵nm خوانده شدند. اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماري SPSS بررسی شدند و با استفاده آزمون t-students نتایج با هم مقایسه گردیدند. گر چه در مواردی که تعداد کم بود از روش کیفی Mann-Whitney برای مقایسه استفاده شد. ضمناً برای بررسی همبستگی از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۷۸ بیمار مبتلا به SLE بر اساس فعال یا غیرفعال بودن بیماری در دو گروه قرار گرفتند. (جدول ۱). بر اساس معیار SLEDAI.2K (جدول ضمیمه) بین دو گروه فعال و غیرفعال اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p=0/0005$) (جدول ۲). متوسط سن کل بیماران ۲۹±۹/۶ سال (حداکثر=۵۲ و حداقل=۱۳ سال) بود که ۲۴ نفر با میانگین سنی ۲۹/۲±۹ سال (حداکثر=۵۱ و حداقل=۲۰ سال) در گروه فعال و ۵۴ نفر با میانگین سنی ۲۸/۸±۱۰ سال (حداکثر=۵۲ و حداقل=۱۳ سال) در گروه غیرفعال قرار داشتند. از نظر سن اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. در بیماران فعال طبق اندیس SLEDAI.2K، بیشترین درصد فراوانی به‌ترتیب مربوط بود به

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) + نتایج آنالیز داده‌ها در دو گروه مورد مطالعه، طبق آزمون غیر پارامتریک (Mann-Whitney).

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

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

بیماران	فعال	غیر فعال	P*	جمع بیماران
تعداد	۲۴	۵۴		۷۸
SLEDAI.2K	۱۷۳±۱۲/۷	۲۲۸±۲	۰/۰۰۵	
میزان C3 بر حسب .mg/dl	۸۵/۵±۷/۶	۸۹۳±۶/۸	۰/۷۳	
میزان C4 بر حسب .mg/dl	۲۰/۴±۲/۴	۱۸۳±۲/۳	۰/۵۷	
میزان فعالیت CH50 کمپلمان بر حسب .u	۱۵۷±۴/۳	۱۴۹±۴/۳	۰/۲۵	
میزان C4d بر حسب .µg/ml	۱۶/۹±۱/۶	۲۳/۳۹±۱/۱	۰/۰۰۳	
میزان C3d-CICRaji، بر حسب .µgEq/ml	۱۳/۳۱±۳/۱۶	۹/۴۳±۰/۹۶	۰/۱۲۷	
میزان SC5b-9، بر حسب .ng/ml	۱۴۷۱/۱۷±۲۱۶/۹	۱۴۱۴±۱۱۴/۹۴	۰/۸۰۴	

*Student t-test

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

امتیاز	معیار
۸	تشنج
۸	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
۸	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
۸	تغییرات چشمی لوپوس شامل اجسام سیتوئید، خونریزی شبکیه، یا آگزودا و خونریزی شدید در مشیمیه یا التهاب عصب بینائی (علل فشارخون، عفونت یا داروئی باید رد شود).
۸	اختلال اعصاب مغزی
۸	نوروباتی اخیر حسی یا حرکتی که اعصاب مغزی را درگیر می‌کند.
۸	سردرد لوپوسی
۸	سردردهای شدید مداوم که ممکن است حالت میگرنی داشته باشد ولی به داروهای مخدر جواب ندهد.
۸	حوادث عروقی مغزی
۴	وااسکولیت
۴	زخم، گانگرن، ندول‌های دردناک انگشتان، انفارکتوس‌های اطراف ناخن، خونریزی‌های splinter یا بیوپسی یا آنژیوگرام وااسکولیت را اثبات کند.
۴	آرتريت
۴	بیش از دو مفصل با درد و علائم التهاب شامل (تندرنس، تورم و مایع مفصلی).
۴	میوزیت
۴	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
۴	کاست‌های گرانولار یا کاست‌های گلبول قرمز.
۴	خون در ادرار
۴	بیش از پنج گلبول قرمز دز یک فیلد میکروسکوپ با درشتنمائی بالا (عللی مثل سنگ، عفونت یا دیگر علل باید رد شود).
۴	پروتئین در ادرار
۴	بیش از نیم گرم در ۲۴ ساعت که اخیراً ایجاد شده باشد یا افزایش پیدا کرده باشد (در بچه‌ها: بیش از ۳۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن در ۲۴ ساعت).
۴	پیوری
۲	بیش از پنج گلبول سفید در یک فیلد میکروسکوپ با درشتنمائی بالا (علل عفونی باید رد شود).
۲	راش
۲	راشی که اخیراً ایجاد شده و یا عود یک راش التهابی.
۲	آلویسی
۲	کاهش موها که اخیراً ایجاد شده، به صورت تکه‌ای و یا منتشر.
۲	زخم‌های دهانی
۲	زخم‌های جدید یا عودکننده دهانی یا بینی.
۲	پلورزی
۲	درد قفسه صدری با کیفیت پلورتیک با مالش پلوری یا تجمع مایع در پلوریا ضخیم شدن پلور.
۲	پرریکاردیت
۲	درد پرریکاردی با حداقل یکی از این موارد: مالش پرریکارد، ترشح یا تغییرات ECG یا اکو.
۲	کمپلمان پایین
۲	کاهش سطح کمپلمان‌های CH50, C3, C4 به زیر سطح نرمال آزمایشگاه.
۲	افزایش باند شدن DNA
۲	بیش از ۲۵٪ باند شدن DNA با روش Farr یا بالای سطح نرمال آزمایشگاه.
۱	تب
۱	بیش از ۳۸ درجه سانتی‌گراد. (علل عفونی رد شود).
۱	کاهش پلاکت
۱	کمتر از ۱۰۰۰۰۰ در میلی‌لیتر.
۱	کاهش گلبول‌های سفید
۱	کمتر از ۳۰۰۰ در میلی‌لیتر.

بیشترین همبستگی را C3 با C4 داشت ($p=0/807$).

بحث

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

معنی‌دار نبودن میانگین سن بیماران و نیز معنی‌دار بودن ($p=0/005$) اندیس فعالیت (SLEDAI.2K)، به نوعی موید مناسب بودن تقسیم‌بندی بیماران به دو گروه فعال و غیرفعال می‌تواند باشد.

توان آن را دارند که کیت مذکور را با کیفیت بالا و قابل قبول تولید کنند. با توجه به نکات فوق و با در نظر گرفتن این که خریداری این کیت‌ها با مشکل و تاخیر همراه بود پیشنهاد می‌شود شرایطی فراهم شود تا بتوان آن‌ها را در داخل کشور تولید کرد. هر چند روند تولید آن بسیار طولانی و دشوار باشد. البته این امر میسر نمی‌شود مگر این که آموزش و برپایی علوم ریشه‌ای و کاربردی دانش ایمونولوژی یعنی آنچه که مد نظر و مورد استفاده این کشورهاست مورد توجه بیشتر قرار بگیرد. از جمله این علوم می‌توان به شاخه‌های ایمونوشیمی و ایمونوبیوشیمی، اشاره کرد یعنی حلقه‌های مفقوده‌ای که سال‌هاست دانش آن به طور مستمر در کشورهای پیشرفته آموزش داده شده و در امور کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرد. لازم به ذکر است این شاخه‌ها رشته بیوشیمی را به دانش ایمونولوژی و علوم کاربردی پیشرفته دیگر در زمینه علوم پایه پزشکی پیوند می‌دهد. راه دیگر این که: چون در اندیس فعالیت (SLEDAI.2K)، بر اساس آزمون غیرپارامتریک (Mann-Whitney)، نتایج معیارهای (کاست‌های ادراری، کمپلمان پایین، پروتئین در ادرار، خون در ادرار)، برای دو گروه بیماران فعال و غیرفعال، معنی‌دار بود ($p=0/0005$)، در مواقعی که تهیه این کیت‌ها (به عنوان مثال کیت اندازه‌گیری C4d) با مشکل همراه می‌گردد، شاید بتوان از این معیارها برای نشان دادن فعالیت بیماری استفاده کرد. سپاسگزاری: بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به سرکار خانم‌ها دکتر اعظم بختیاریان از گروه فارماکولوژی و دکتر گلرخ ملیحی که در تهیه کیت‌ها یاری نمودند، ابراز می‌دارم و نیز از همکارانم در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی. مرکز تحقیقات روماتولوژی از سرکار خانم‌ها دکتر شهرزاد خسروی و دکتر بهار صادقی و نیز پیوند مغز استخوان که امکانات خود را بی‌دریغ برای جداسازی سرم و پلاسما، در اختیار بنده قرار دادند و از سرکار خانم دکتر سوسن فرشی و آقای دکتر عاشری که با مشاوره‌های خود، 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 erythematosus. *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, Wisniewski JJ, Winkelstein JA, Louie J, Sachs E, Choi R, et al. Serum complement determinations in patients with

این زمینه بود.^{۱۱} این گروه با مطالعه ۴۱ بیمار مبتلا به SLE به نتیجه مذکور رسیده بودند. از آنجا که نقصان در پروتئین‌های مسیر کلاسیک کمپلمان نظیر C4، C2، C1q، C1r/ C1s موجب صفر شدن CH50 می‌شود.^{۱۲} به نظر می‌رسد صفر شدن CH50 در یکی از بیماران به علت نقص در یکی از پروتئین‌های C1 باشد و نه C4 زیرا میزان این پروتئین در بیمار مزبور در حد طبیعی بود. بالا بودن همبستگی C3 با C4 نیز به نوعی می‌تواند موید فعال بودن مسیر کلاسیک در این بیماران در مقایسه با سایر مسیرها باشد. ضمناً در مطالعه حاضر تنها فرآورده پروتئینی مسیر یعنی C4d با فعالیت بیماری مرتبط بود.^۱ در مطالعه‌ای بالا بودن C4d را در مرحله غیرفعال، بیومارکری حساس برای پیش‌بینی فعالیت بیماری اعلام شده بود.^{۳،۴} حتی عده‌ای دیگر E- C4d را برای تشخیص بیماری و نشان دادن فعالیت بیماری مناسب دانسته‌اند.^{۱۴} مدت‌ها پیش برای تشخیص و روشن شدن فعالیت بیماری، فاکتورهای نظیر C3، C4 را اندازه‌گیری می‌کردند و این در حالی است که کارآمدی این روش هنوز با شک و تردید همراه است.^۴ در مطالعه حال حاضر نیز این مساله تایید شد یعنی به غیر از C4d، میانگین C3، C4، CH50، C3d، SC5b-9 در دو گروه بیماران فعال و غیرفعال اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، که شاید بتوان از آن به عنوان بیومارکری برای نشان دادن فعالیت بیماری استفاده کرد. همان طور که می‌دانیم امروزه اکثر کشورهای دنیا، برای اهداف کاربردی و صنعتی از دانش ایمونولوژی به فراوانی بهره می‌برند. بدین معنی که: به کمک این دانش کیت‌ها و فرآورده‌هایی تولید می‌نمایند که به سراسر دنیا ارسال می‌گردد، بدین وسیله نه تنها سطح اقتصادی، بلکه با پژوهش‌های مستمر و پیوسته (و نه نقطه‌ای)، بار علمی مراکز تحقیقاتی آن کشورها ارتقا یافته و اشتغال نیز ایجاد می‌شود. از جمله موارد اشاره شده، پژوهش‌های انجام شده در تهیه کیت‌های الایزا (و به عنوان نمونه، کیت‌های اندازه‌گیری اجزای کمپلمان مثلاً C4d) است، چنان که تنها کشور آمریکا و در مرحله بعد هندوستان از نظر علمی

- quiescent systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 2063-7.
7. Prcel 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, Nishihara 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.

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

Bamdad Mehrbany K^{*1}
Akbarian M²
Salesi M²
Geflati Z¹
Tavassoli S²

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

Tehran University of Medical
Sciences

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 nephelometry 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.

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