The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sc.
No. 11 , Autumn 1999

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین
شماره ۱۱ - پائیز ۱۳۷۸

تأثیر کمپلکس ایمنی استرپتوکیناز بر فعال شدن کمپلمان و واکنش آن با گلبول‌های قرمز

دکتر افشین افشاری* دکتر الیزابت هلم**

Effect of Streptokinase Immune Complex on activation of the complement and Intraction with Erythrocytes

A. Afshari E. Holme

Abstract

Background : *One of the major disadvantages of streptokinase , a commonly administered thrombolytic agent , is provocation of hypersensitivity.*

Objective : *To determine interactions of the complement and erythrocytes with streptokinase.*

Methods : *The interactions were studied by the measurement of complement activation products C1S : C1-INH and C3b-P , using modified techniques by Auda et al (1990). The kinetics and dose response of streptokinase immune complexes binding to erythrocytes were studied by flowcytometry.*

Findings : *The findings indicated that the binding of ICs to Es depended significantly on the extent of complement activation ($P<0.001$) and ICs dose of Ics ($P<0.001$).*

Conclusion : *It can be concluded that the complement system and Es have a central role in preventing the hypersensitivity reactions , in particular type III (Immune complex disease).*

Keywords : *Immune Complexes (ICs) , Complement , Streptokinase , Erythrocytes (Es)*

چکیده

زمینه : یکی از مشکلات تجویز استرپتوکیناز تحریک واکنش‌های افزایش حساسیت است. کمپلمان و گلبول‌های قرمز در پاک‌سازی کمپلکس‌های ایمنی و جلوگیری از عوارض جانبی فوق نقش اساسی دارند.

هدف : این مطالعه به منظور بررسی واکنش‌های کمپلمان و گلبول‌های قرمز با استرپتوکیناز انجام شد.

مواد و روش‌ها : محصولات فعال شدهٔ کمپلمان C1S : C1-INH و C3b-P با به کارگیری تکنیک Auda (۱۹۹۰) ، با اندکی تغییر ، اندازه‌گیری شد. کینتیک و پاسخ دوز در مقدار اتصال کمپلکس ایمنی با گلبول‌های قرمز توسط فلوسیتومتری بررسی گردید و ارتباط این اتصال با فرآورده‌های فعال شدهٔ کمپلمان ، تعیین شد.

یافته‌ها : افزایش کمپلکس‌های ایمنی باعث افزایش C1s : C1-INH به حداکثر مقدار خود در مدت ۵ دقیقه (فعالیت راه کلاسیک) و همچنین افزایش C3b-P به حداکثر مقدار خود در مدت ۱۰ دقیقه گردید. مطالعه نشان داد که اتصال کمپلکس‌های ایمنی به گلبول‌های قرمز در زمان ۵ دقیقه به طور چشمگیری به دامنهٔ فعالیت کمپلمان و مقدار این کمپلکس‌ها مربوط است ($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری : کمپلمان و گلبول‌های قرمز در جلوگیری از واکنش‌های افزایش حساسیت ، به خصوص افزایش حساسیت نوع سه نقش اساسی دارند.

کلید واژه‌ها : کمپلکس‌های ایمنی - کمپلمان - استرپتوکیناز - گلبول‌های قرمز

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** استادیار دانشگاه گلاسکو

◙ مقدمه :

تشکیل کمپلکس‌های ایمنی یک پدیدهٔ مهم در دفاع هومورال برای برطرف نمودن آنتی ژن‌های خارجی است. کمپلکس‌های ایمنی چنانچه خارج از سیستم رتیکولوآندوتلیال جایگزین شوند ، باعث بروز واکنش‌های التهابی مضر و آسیب سنجی می‌شوند. سرانجام این کمپلکس‌ها توسط عوامل متعددی مانند اندازه ، ماهیت و مقدار آنها ، نسبت آنتی ژن و آنتی بادی در ترکیب آنها ، کلاس آنتی بادی موجود در آنها و در نهایت فعال شدن کمپلمان تعیین می‌گردد. (۵)

در این راستا کمپلمان در جلوگیری از آسیب‌های بافتی ناشی از رسوب کمپلکس‌های ایمنی در اعضای مختلف نقش مرکزی را دارد. کمپلکس‌های ایمنی که با C3b نشان‌دار شده‌اند می‌توانند به گیرندهٔ کمپلمان CR1 ، که به مقدار فراوان روی گلبول‌های قرمز دیده می‌شوند ، اتصال یابند و از جریان خون پاکسازی و به سیستم رتیکولوآندوتلیال منتقل شوند.

بررسی سطح سرمی پروتئین‌های کمپلمان در بررسی بیماری‌های التهابی کمک شایانی می‌نماید. روش‌های زیادی برای تعیین فعال شدن کمپلمان وجود دارد که نفلومتری ، الکتروفورز ، ایمینو دیفوزیون ، الیزا (ELISA) ، رادیو ایمینواسی روش‌های همولیتیک (CH50 راه کلاسیک و CH50 راه آلترناتیو) از آن جمله است. اخیراً اندازه گیری محصولات فعال شدهٔ کمپلمان که از دقت بیشتری برخوردارند متداول گردیده است. فعال شدن راه کلاسیک و راه آلترناتیو کمپلمان را می‌توان با تعیین C1S : C1-INH و C3b-P به ترتیب مشخص نمود. کمپلکس C1S : C1-INH در جریان فعال شدن راه کلاسیک توسط یک پیوند کووالانس بین مهارکنندهٔ C1 (C1-INH) و ملکول فعال شده C1S به وجود می‌آید. کمپلکس C3b-P نیز در جریان فعال شدن راه آلترناتیو به وجود می‌آید.

استرپتوکیناز یک داروی نسبتاً پرمصرف است که با شکستن لخته‌های تشکیل شده در هنگام سکتهٔ قلبی، باعث بهبود جریان خون میوکارد می‌شود. استرپتوکیناز که برای انسان یک آنتی‌ژن خارجی است از استرپتوکک همولیتیک گروه C تهیه می‌شود. بسیاری از افراد در طول زندگی با این باکتری تماس پیدا می‌کنند. بنابر این در سرم آنها آنتی بادی‌های ضد استرپتوکیناز وجود دارد که استفادهٔ این دارو را در آنها تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات مختلف بیانگر این مطلب است که نوع واکنش ایجاد شده در این افراد واکنش افزایش حساسیت نوع سوم (بیماری‌های کمپلکس ایمنی) است. (۲ و ۸)

از آنجایی که کمپلمان نقش اساسی در پردازش کمپلکس‌های ایمنی و جلوگیری از آسیب نسجی دارد ، این مطالعه به منظور بررسی واکنش‌های کمپلمان و گلبول‌های قرمز با استرپتوکیناز انجام شد.

◙ مواد و روش‌ها :

برای تهیهٔ گلبول‌های قرمز ، ابتدا خون افراد داوطلب سالم دریافت و به EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) اضافه شد و سپس با دور ۱۲۰۰ در دقیقه و حرارت ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بافی‌کوت کاملاً برداشته شد و گلبول‌های قرمز سه بار در محلول یک‌درصد PBS/BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma) /Phosphate Buffered Saline 0.15 M شسته شد.

برای تهیهٔ سرم‌انسانی نرمال (Normal Human Serum)

خون در لوله‌های شیشه‌ای در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقهٔ دیگر در یخچال نگه‌داری گردید. سرم به دست آمده در حجم‌های کم در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

آنتی بادی کلاس IgG ضد استرپتوکیناز از سرم خرگوش ایمن شده بر علیه استرپتوکیناز، توسط روش اسید کاپریلیک تهیه شد. نقطهٔ اکی والانس با تست پرسیپیتاسیون لوله‌ای بین IgG ضد استرپتوکیناز و استرپتوکیناز تعیین گردید. برای انجام آزمایشات از کمپلکس‌های ایمنی آماده شده از قبل در شرایط اکی والانس استفاده شد. C1-INH : C1S و C3b-P به وسیلهٔ الیزا غیرمستقیم با تغییراتی در روش پیشین اندازه‌گیری شد. [1] به طور خلاصه میکروپلیت‌های الیزا (Dynatech) به ترتیب با anti C1-INH و anti properdin (Incstar) ثابت گردید تا به ترتیب ملکول‌های C1-INH : C1S و C3b-P به دام بیفتند. از آنتی بادی‌های ضد C1-INH و ضد C3 کنژوگه شده با Biotin (Incstar) برای تجسس کمپلکس‌های به دام افتاده استفاده گردید. برای برقراری رنگ، از avidin-HRP (Vector) و OPD (O-Phenylenediamine , Sigma) به عنوان Substrate استفاده شد. رنگ به دست آمده (Optical Density) توسط الیزا (Dynatech) در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. غلظت‌های مربوطه از رنگ به دست آمده برای C1-INH : C1S و C3b-P به ترتیب از منحنی‌های استاندارد C1-INH و C3 طبق شرح قبلی استخراج شد. [1]

تمام بررسی‌های فلوسیتومتری با یک دستگاه فلوسیتومتر (Beckton Dickinson) انجام شد و ۵۰۰۰ گلبول قرمز توسط نرم‌افزار Lysis II مورد مطالعه قرار گرفتند. با برقراری گیت‌های مناسب سلول‌های به هم چسبیده و سلول‌های سفید آلوده کنندهٔ موجود در سوسپانسیون گلبول‌های قرمز حذف گردید. برای هر آزمایش کنترل مناسب در نظر گرفته شد تا صحت و اختصاصی بودن آن آزمایش تخمین زده شود و سپس با قرار دادن گیت مناسب روی کنترل هر آزمایش، در جهت محور لگاریتم شدت و درصد فلوروسین گلبول‌های قرمز مورد آزمایش تعیین گردید.

برای مطالعه و آنالیز اتصال کمپلکس‌های ایمنی به گلبول‌های قرمز، یک آزمایش فلوسیتومتری تنظیم گردید که در آن گلبول‌های قرمز با سرم انسانی نرمال در حضور (تست) و یا عدم حضور (کنترل) کمپلکس‌های ایمنی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش در زمان‌های مختلف توسط EDTA (Merk) متوقف گردید. رویه‌ها جدا گردیده و جهت جستجوی محصولات فعال شدهٔ کمپلمان (C1-INH : C1S و C3b-P) مورد بررسی قرار گرفت. گلبول‌های قرمز برای بررسی اتصال کمپلکس‌های ایمنی به کمک آنتی بادی کنژوگه با FITC (Fluorescein Isothiocyanate) مورد امتحان قرار گرفت.

کینتیک اتصال کمپلکس‌های ایمنی استرپتوکیناز با دوزهای مختلف به گلبول‌های قرمز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مطالعه گردید. مقدار افزایش یابنده از کمپلکس‌های ایمنی در شرایط اکی والانس آماده شد. بین ۱۳۱ تا ۲۰۹۶ میکروگرم کمپلکس ایمنی به ۴۰۰ میکرولیتر سرم انسانی نرمال و گلبول‌های قرمز اضافه شد و حجم‌های هر لوله توسط محلول BSA/PBS یک درصد یکسان گردید و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه‌برداری در زمان‌های صفر، پنج، ده، بیست و پنج و سی دقیقه انجام شد واکنش در هر زمان با

اضافه نمودن حجم مساوی (20 mM) EDTA خنک شده توسط یخ متوقف گردید. گلبول‌های قرمز برای اتصال کمپلکس‌های ایمنی به آنها و رویه‌ها برای اندازه‌گیری محصولات فعال شده کمپلمان بررسی شدند.

کنترل شامل ۴۰۰ میکرولیتر سرم انسانی نرمال و گلبول‌های قرمز با حجم مساوی نمونه‌ها بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

یافته‌ها :

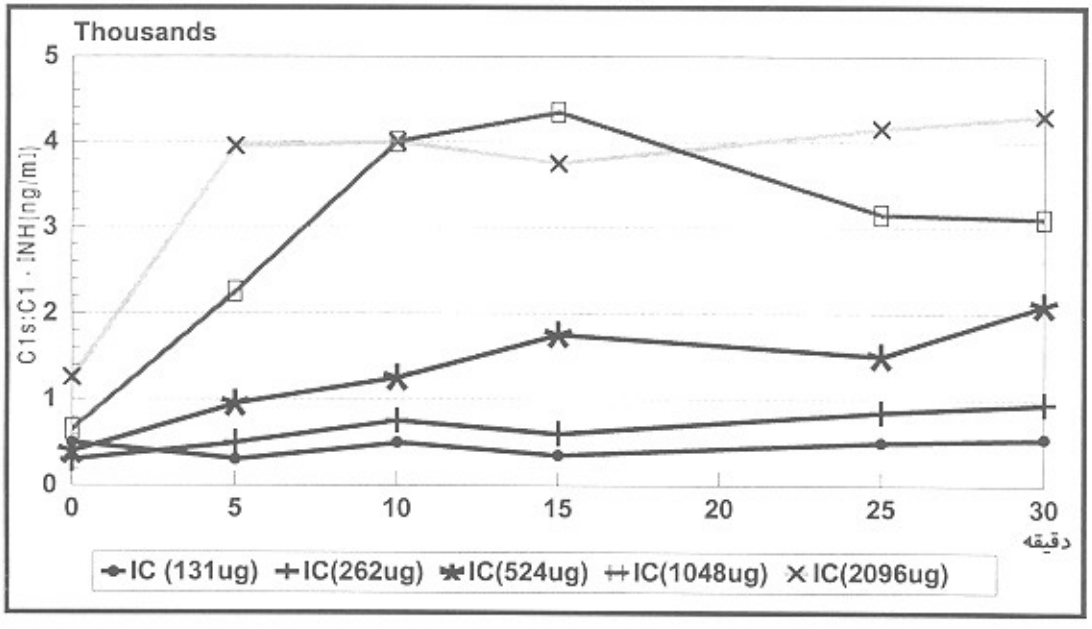
فعال شدن کمپلمان توسط کمپلکس‌های ایمنی استرپتوکیناز از قبل آماده در شرایط اکسی والانس در حضور گلبول‌های قرمز و سرم انسانی نرمال و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش مقدار کمپلکس‌های ایمنی از ۱۳۱ تا ۲۰۹۶ میکروگرم، باعث افزایش میزان C1S : C1-INH تولید شده توسط این کمپلکس‌ها گردید. میزان ۱۰۴۸ میکروگرم و ۲۰۹۶ میکروگرم کمپلکس ایمنی باعث افزایش شدید C1S : C1-INH گردید که در ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه به ترتیب به حداکثر میزان خود رسیدند و سپس به مرحلهٔ ثابت (Plateau) بدون تغییر رسیدند. مرحلهٔ حداکثر برای مقادیر کمتر کمپلکس‌های ایمنی دیده نشد (نمودار شماره ۱).

سطح C3b-P تولید شده نیز با مقادیر ۱۰۴۸ میکروگرم و ۲۰۹۶ میکروگرم کمپلکس‌های ایمنی از افزایش بیشتری برخوردار بود و در ظرف ۱۰ دقیقه به حداکثر سطح خود رسید. حداکثر میزان C3b-P برای مقادیر کمتر کمپلکس ایمنی مشاهده نشد. (نمودار شماره ۲).

نمودار ۱ :

کینتیک تولید C1S : C1-INH توسط کمپلکس‌های ایمنی استرپتوکیناز

(مقادیر C1S : C1-INH در کنترل)



فعالیت کمپلمان در حضور کمپلکس‌های ایمنی حاوی IgG و IgM ، وسیع‌تر بودن و در نتیجه نشان‌دار شدن آنها بهتر صورت گرفته و پاک‌سازی آنها تسهیل می‌شود.

مراجع :

1. Auda G , Holme ER , Davidson JE et al. Measurement of complement activation products in patients with chronic rheumatic diseases. Rheumatol Int 1990 ; 10 : 185-9

2. Davis KA , Mathieson P , Winearls CG et al. Serum sickness and acute renal failure after streptokinase therapy for myocardial infarction. Clin Exp Immunol 1990 ; 80 : 83-8

3. Lucisano YM , Lanch mann PJ. The effect of antibody isotype and antigenic density on complement-activity of immune complexes. Clin Exp Immunol 1991 ; 84 : 1-8

4. Medof ME , prince GM. Immune complex alterations occur on the red blood cell membrane. Immunology 1983 ; 50 : 11-7

5. Schifferli JA , Taylor RP. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. Kidney Int 1986 ; 35 : 993-1003

6. Schifferli JA , Estreicher Ng Y C , Walport MJ. The clearance of tetanus toxoid/anti-tetanus immune complexes from circulation of humans. J Immunol 1988 ; 140 : 899-904

7. Spottl F , Mosuni MS. Acute phase reaction following intravenous administration of streptokinase. Thrombos Diathes Haemorrh 1974 ; 31 : 429-34

8. Totty WG , Romano T , Beniun GM et al. Serum sickness following streptokinase therapy. AJR 1981 ; 138 : 143-4

9. Yokoyama I , Waxman F. Differential susceptibility of immune complexes to release from erythrocytes by factor I. Mol Immunol 1994 ; 31 : 227-40