مقاله علمی

مرتضی ملازاده- مدرس و متخصص تکنیک های تشخیص ایمونولوژی
مدیر واحد علمی و تحقیق و توسعه شرکت نیما پویش طب

بیماری های خودایمن کبد و سیستم صفراوی

بخش اول: اهمیت اتوآنتی بادی ها در تشخیص و طبقه بندی هپاتیت خودایمن

بیماری های خودایمن کبد و سیستم صفراوی، اختلال های التهابی مزمنی است که به واسطه پاسخ های کنترل نشده سیستم ایمنی تظاهر می یابد و معمولاً با حضور اتوآنتی بادی های اختصاصی مشخص می شود. درحال حاضر سه بیماری هپاتیت خودایمن (AIH)، کلانژیت صفراوی اولیه (PBC) و کلانژیت اسکلروزی اولیه (PSC) در زمره بیماری های خودایمن کبد و سیستم صفراوی دسته بندی می شود. AIH شایع ترین بیماری در این دسته است و شیوع آن ۱۷مورد در ۱۰۰هزار تخمین زده شده است و پس از PBC قرار دارد. هر دوی این بیماری ها بیشتر در خانم های جوان رخ می دهد، در حالی که PSC اغلب در مردان ۲۰ تا ۴۰ سال مشاهده می شود. شناسایی اتوآنتی بادی های اختصاصی، افتراق بیماری های خودایمن کبد را از سایر بیماری های التهابی همچون هپاتیت ویروسی، توکسیک و الکلی ممکن می سازد. از سوی دیگر این بیماری ها ممکن است در قالب سندروم های overlap با یک اختلال خودایمن روماتوئید همچون لوپوس، سندروم شوگرن و اسکلروزیز به طور همزمان تظاهر می یابد که این اهمیت شناسایی اتوآنتی بادی های را به وضوح نشان می دهد.

هپاتیت خودایمن

این بیماری که پیش تر هپاتیت لوپوئید و هپاتیت مزمن فعال خوانده می شد ممکن است در هر سنی رخ دهد اما بیشتر در زنان جوان و میانسال (بیش از ۷۵٪ موارد) مشاهده می شود. یافته های بیوشیمیایی شامل افزایش بیلی روبین خون، آنزیم های کبد و ایمونوگلوبولین های سرم است. یافته های سرولوژیک شامل ردیابی اتوآنتی بادی های اختصاصی در گردش است. از سوی دیگر، تغییرات بافت شناسی شامل نکروز سلول های پارانشیمی کبد و ارتشاح لنفوسیت ها و پلاسماسل در نمونه بیوپسی شاخص پاتولوژیک بیماری محسوب می شود اما تشخیص قطعی و افتراقی آن را از سایر اختلال های التهابی کبد را فراهم نمی کند. در صورت عدم درمان، بیماری به سرعت به سمت سروز کبد پیش می رود. هر چند با درمان های سرکوب کننده ایمنی، پیش آگهی بیماری مطلوب است و این در صورت تشخیص به موقع و صحیح بیماری ممکن خواهد بود. افتراق AIH از هپاتیت ویروسی، مهم ترین جنبه تشخیص افتراقی بیماری به حساب می آید و این مهم با تایید حضور اتوآنتی بادی های اختصاصی در گردش میسر می شود.

نقش اتوآنتی بادی در تشخیص هپاتیت خودایمن

اتوآنتی بادی های در گردش، نقش اساسی در تشخیص و افتراق AIH دارند. این آنتی بادی ها در عمده بیماران یافت می شود، هر چند ارتباط مشخصی بین شدت و پیش آگهی بیماری و تیتر آنتی بادی وجود ندارد. اتوآنتی بادی هایی که با AIH مرتبط است در جدول ۱ آورده شده است.

Associated autoantibodies	Prevalence
Type-1 AIH	
ASMA type F-actin	70 – 80 %
ANA	70 – 80 %
SLA / LP	~ 20 %
Type-2 AIH	
LKM-1	1– 3 %
LC-1	1 – 3 %
SLA / LP	~ 20 %

جدول ۱) اتوآنتی بادی ها در اشکال مختلف هپاتیت خودایمن

از بین این آنتی بادی ها، اتوآنتی بادی های ضدSLA/LP، دارای بیشترین ارزش تشخیصی برای AIH است. این اتوآنتی بادی ها هم به تنهایی و هم همراه با سایر اتوآنتی بادی ها قابل ردیابی است. هر چند شیوع این آنتی بادی ها در مبتلایان تنها ۱۰ تا ۳۰ ٪ است، اما ارزش پیش بینی (predictivevalue) تقریبا ۱۰۰٪ است، به عبارتی یافتن

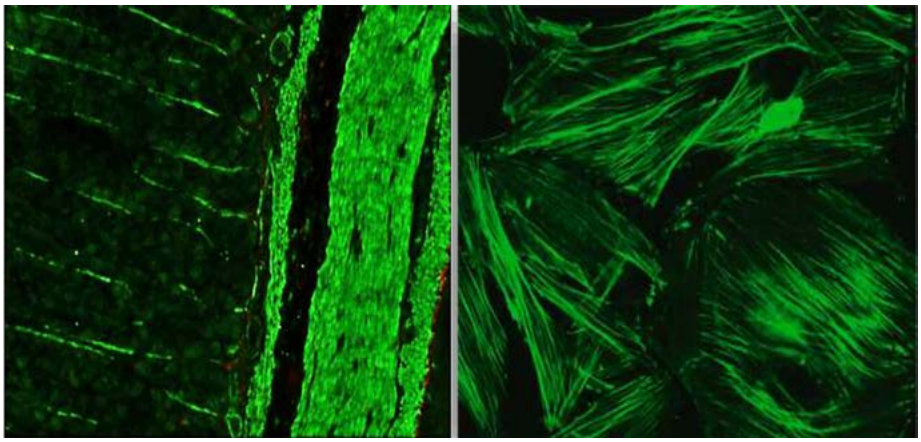
این آنتی بادی ها در سرم بیماران، تشخیص قطعی AIH را مطرح می نماید. Anti-SLA/LP را در هر نوع ۱ و ۲ بیماری می توان یافت.

همچنین حضور Anti-SLA/LP در نمونه بیمار می تواند نشان دهنده خطر عود مجدد بیماری باشد، بنابراین به عنوان یک شاخص برای مانیتورینگ بیماری کاربرد دارد. از دیگر ویژگی های بارز این آنتی بادی می توان به حضور آن در اشکال بیماری با سیر پیشرونده اشاره کرد.

تکنیک های تشخیص موجود برای شناسایی Anti-SLA/LP شامل الایزا و ایمونوبلات است که حساسیت و اختصاصیت تقریبا ۱۰۰ درصدی را نشان داده است.

غلظت های بالای اتوآنتی بادی های ضدعضله صاف (ASMA) نیز AIH را قطعی می کند. ASMA آنتی بادی است که اجزا مختلف اسکلت سلولی را (میکروتوبول ها و میکروفیلامت ها) را هدف قرار می دهد اما آنتی ژن اصلی که توسط این گروه از آنتی بادی ها مورد شناسایی قرار می گیرد، شکل پلی مریزه شدن پروتیین اکتین یعنی F. actin است. نخستین بار در سال ۱۹۶۵ Johnson و همکارن، ASMA را در سرم برخی بیماران مبتلا به التهاب کبد توصیف نمودند، اما در ۱۹۷۳ این Gabbiani بود که F.actin را به عنوان آنتی ژن هدف اصلی برای این گروه از آنتی بادی ها معرفی کرد.

یک بخش از این آنتی بادی ها بر علیه اپی توپ های سه بعدی پروتئین F.actin تولید می شود که تنها در مقاطع بافتی و با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسنس یا ایمونوهیستوشیمی قابل ردیابی است، لذا تکنیک های ایمونولوژی بر پایه آنزیم همچون الایزا و ایمونوبلات به هیچ عنوان برای شناسایی ASMA طراحی نشده است و قابل استفاده نیست. به منظور تایید حضور ASMA در روش ایمونوفلورسنس غیرمستقیم (IIFT) می توان از مقاطع بافتی تهیه شده از بافت های Rat استفاده کرد. مقاطع بافتی معده (Rat Stomach) به عنوان سوبسترای اصلی برای شناسایی ASMA معرفی شده است (تصویر ۱)، هر چند بافت های دیگر شامل کلیه، کبد و مری Rat نیز برای این منظور قابل استفاده است.



(تصویر۱) تصویر سمت چپ) الگوی فلورسنت مرتبط با حضور AMSA بر روی مقطع بافتی معده taR با استفاده از تکنیک IIFT - تصویر سمت راست) الگوی مثبت فلورسنت با استفاده از اسلاید تهیه شده از سلول های VSM-47

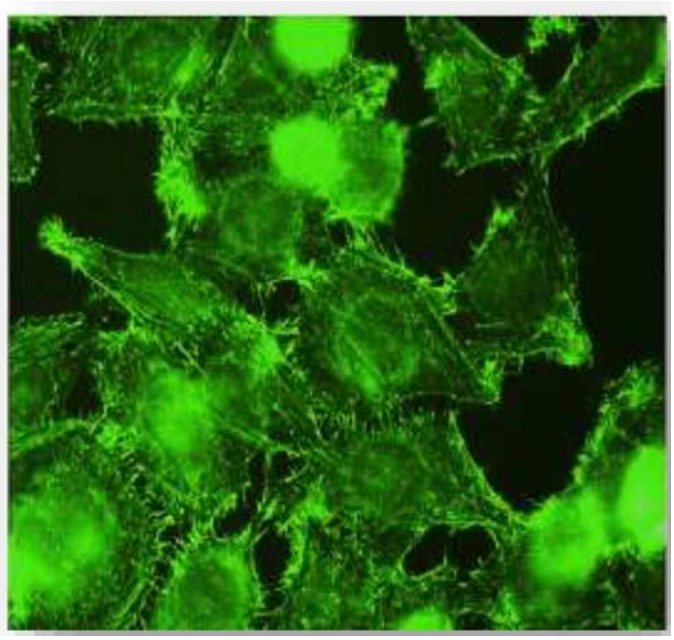
نکته قابل توجه در مورد ASMA این است که برخلاف سایر آنتی بادی های ASMA، آنتی بادی های ضد F.actin یک مارکر بسیار اختصاصی برای هپاتیت خودایمن نوع ۱ (AIH-1) محسوب می شود.

با استفاده از لاین سلول های ویژه ای تحت عنوان VSM47(vascular smooth muscle) در تکنیک ایمونوفلورسنس، به سادگی می توان حضور آنتی بادی های ضد F.actin و در نتیجه AHI-1 را تشخیص داد (تصویر۱).

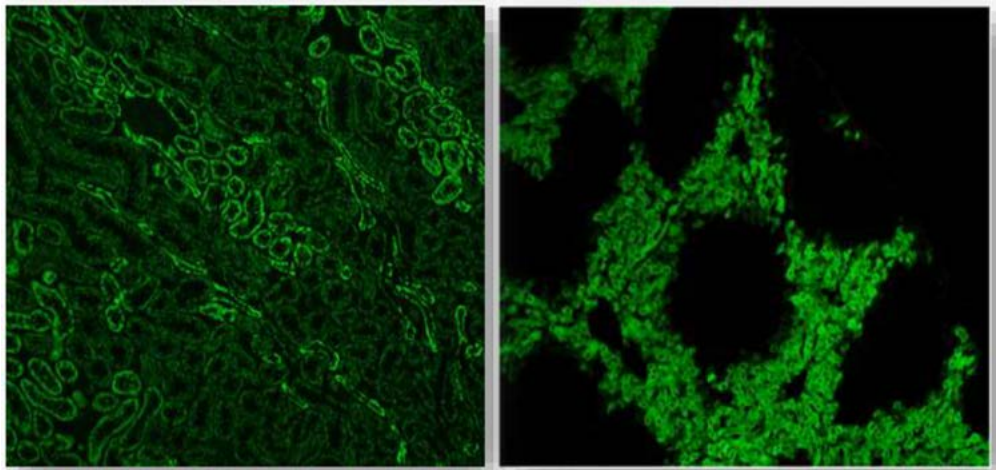
آنتی بادی های ضد هسته (ANAs) نیز در درصد بالایی از مبتلایان به نوع ۱ هپاتیت خودایمن یافت می شود. هر چند که حضور این گروه از آنتی بادی ها در اکثر موارد یک اختلال اتوایمیون سیستمیک را مطرح می نماید، در مواردی که بیمار درگیری کبد داشته باشد، می تواند بیانگر حضور سندروم های overlap باشد. روش ارجح برای شناسایی ANAs، ایمونوفلورسنس غیرمستقیم با استفاده از سلول های HEp-2 است. در مواردی که آنتی بادی اختصاصی علیه F.actin در نمونه باشد، الگوی ویژه ای را در ANA-HEp-2 ایجاد می کند (تصویر ۲).

درسال ۱۹۷۳ در گروهی از بیماران مبتلا به هپاتیت خودایمن، آنتی بادی شناسایی شد که علیه ترکیبات شبکه اندوپلاسمی سلول های کبد و کلیه واکنش می داد. این گروه از بیماران از نظر حضور ASMA و ANA منفی بود. این آنتی بادی ها را Anti-LKM نامگذاری کردند و بعدها آنتی ژن هدف آن که یک آنزیم از خانواده سیتوکروم P-450 بنام CYP2D6 است، شناسایی شد.

Anti-LKM درحدود ۱ تا ۳ درصد از مبتلایان به هپاتیت خودایمن نوع ۲ گزارش شده است. این آنتی بادی را به



تصویر ۲) الگوی سیتوپلاسمیک **Fibrillar Linear** بر روی سوبسترای **HEp2** بیانگر حضور آنتی بادی ضد **F.actin**. رشته های ضخیم اکتین که در امتداد سیتوپلاسم سلول کشیده شده اند به شدت با آنتی بادی ها واکنش نشان می دهند.



(تصویر ۳) الگوی فلورسنت Anti-LKM برروی سوبسترای Rat Kidney (سمت چپ) و Anti-LC-۱ برروی سوبسترای Rat Liver (سمت راست)

سه روش الایزا، ایمونوفلورسنس غیرمستقیم و ایمونوبلات می تواند شناسایی کرد. روش های موجود حساسیت و ویژگی بالای ۹۸ درصد را نشان می دهند. در تکنیک IIFT با استفاده از دو سوبسترای کلیه (سوبسترای اصلی) و کبد Rat می توان حضور Anti-LKM را تایید بررسی نمود، هر چند افتراق الگوی فلورسنس از الگوی AMA (آنتی بادی های ضد میتوکندری) نیاز به تجربه و تخصص دارد (تصویر ۳).

اتوآنتی بادی های اختصاصی ضد یک پروتیین آنزیمی ۵۸ کیلودالتونی به نام FCTD را Anti-LC-1 می گویند که با وجود شیوع کم، از اختصاصیت ۱۰۰ درصدی در تشخیص نوع۲ AIH برخوردار ند. Anti-LC-1 را نیز می توان با استفاده از الایزا، IIFT و ایمونوبلات تشخیص داد. برای شناسایی این آنتی بادی ها در روش IIFT می بایست از سوبسترای Rat Liver استفاده نمود (تصویر ۳).

منابع

1-Strassburg C et al., Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen, AWMF-Reg. Nr. 021-27, Zeitschrift für Gastroenterologie 55(11):1135-1226 (2017).

2-Vergani D et al., Unusual Suspects in Primary Biliary Cirrhosis, Hepatology 39(1):38-41 (2004).

3-Hennes E et al., Simplified Criteria for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis, Hepatology 48(1):169-176 (2008).

4-Dähnrich C et al., New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies, Clinical Chemistry 55(5):978–85 (2009).

5-Terziroli Beretta-Piccoli B et al., Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach, European Journal of Internal Medicine 48:35-43 (2018).

6- Efe C et al., Antibodies to soluble liver antigen in patients with various liver diseases: A multicentre study, Liver International 33(2):190-196 (2013).

7-Xiang D et al., Detection of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis: Clinical significance evaluation, Hepatology Research 41(9):867-876 (2011).

8-Villalta D et al., Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplexed line-blot assay, Clinica Chimica Acta 438:135-138 (2015).