

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

**تحديد مستوى بروتين سي التفاعلي والعامل الرثياني والتحري عن الأضداد
الذاتية ضد الببتيد الستيروليني الحلي في مرضى التهاب المفاصل
الروماتويدي في مدينة الديوانية**

بحث مقدم الى

مجلس كلية العلوم قسم علوم الحياة كجزء من

متطلبات نيل شهادة البكالوريوس

من قبل الطالبة

عذراء عبد الأمير عبد الرب

بإشراف الدكتورة

غيداء جهادي محمد

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يَعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ مَا فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا تَسْقُطُ مِنَ
وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٍ فِي ظُلُمَاتِ الْأَرْضِ وَلَا رَطْبٍ وَلَا يَابِسٍ إِلَّا فِي
كِتَابٍ مُبِينٍ

صدق الله العلي العظيم
الانعام : ٢٩

إلى التي حملتني وهنا على وهن
وتحملت مشاق الحياة وهموم الدنيا من أجل أن تراني مسروراً
في ديني ودنياي
أمي الغالية

إلى أبي الذي تحمل أعباء وثقل العيش
في سبيل أن يراني سعيدة وأمراً صالحاً في بيتي وأمتي

إلى زوجي العزيز الذي تحمل أعباء ومشاق دراستي
وكان لي سنداً وعوناً خلال فترة دراستي
إلى كل أخوتي وأخواتي وزملائي وأصدقائي بدون استثناء
إلى كل الذين في قلبي ونسأهم قلبي

الشكر والتقدير

الحمد لله سبحانه وتعالى الذي أكرمنا بنعمة الوالدين ، وأعزنا بنعمة الدين ، وأمرنا بنعمة العقل والصحة وأتم علينا بنعمة القلم واليقين وسخر لنا كل شئ .

اشكر الله تعالى على منه وفضله الذي أنار لي دربي ويسر لي أمري وأعاني على الصبر والشكر لله أولاً و آخراً.

أشكر أستاذتي ومشرفتي وأختي الدكتورة غيداء جهادي محمد التي تفضلت بالإشراف على هذا البحث وكانت لي عوناً وسنداً في جميع الأطوار ، اشكرها على روحها العلمية العالية وإرشاداتها ونصائحها ودعمها المتواصل لي طوال فترة البحث وتحفيزها المستمر لي على انجازه.

كما أتقدم بجزيل الشكر والتقدير إلى أساتذتي جميعاً في كلية العلوم / قسم علوم الحياة وكذلك شكري وتقديري إلى اعضاء لجنة المناقشة الذين تفضلوا بمناقشتي لهذا البحث والشكر إلى جميع الزملاء والأصدقاء في جامعة القادسية .

الخلاصة Abstract

التفاعلات المناعية والألتهابية تلعب دور حيوي في بداية وإدامة التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis . أجريت هذه الدراسة للتحري عن وجود الأجسام المضادة الرثوية Rheumatoid Factor من نوع (IgG) و معايرة مستوى البروتين النشط C-reactive Protein والتحري عن الأضداد الذاتية ضد الببتيد الستيرولييني الحلقي Anti-cyclic citrullinated peptide من نوع IgG في الدم كدليل على التهاب المفاصل الروماتويدي.

شملت الدراسة (50) مريض بالتهاب المفاصل الرثوي تراوحت أعمارهم (٥-٧٥) لكلا الجنسين. كما شملت الدراسة (25) شخص غير مصاب كضابط للسيطرة. استخدم C-Reactive protein (CRP) Latex kit في تشخيص البروتين النشط و RF Latex kit في تشخيص العامل المصلي الرثوي و Anti-CCP ELISA (IgG)kit في الكشف عن الأجسام المضادة ضد الببتيد الستيرولييني الحلقي. كانت نتائج بروتين سي المتفاعل الموجبة ١٧/٥٠ (٣٤%)، بينما نتائج العامل الرثوي والأجسام المضادة ضد الببتيد الستيرولييني الحلقي فكانت ٥/٥٠ (١٠%) من حالات التهاب المفاصل الروماتويدي.

١-١ المقدمة Introduction

التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis

مصطلح التهاب المفصل Arthritis مزيج من الكلمتين اليونانيتين "arthron" التي تعني مفصل و "itis" التي تعني التهاب. ويشمل الالتهاب: Inflammation: التورم Swelling والألم والتيبس Stiffness (البحر وجماعته، ٢٠٠٩). التهاب المفاصل الروماتويدي هو مرض مناعي ذاتي جهازي غير معروف السبب، يتصف هذا المرض بالتهاب مفصلي وتشكل الالتهاب المزمن للغشاء الزليلي وغزو النسيج المحيط. يسبب الالتهاب الروماتويدي في النهاية تخريب

وتدمير المفاصل (البحر وجماعته، ٢٠٠٩) هناك عوامل وراثية وبيئية مؤهبة لهذا المرض إضافة لعوامل أخرى، مثل العمر والجنس والهرمونات وعوامل خمجية والتدخين ، وعوامل متعلقة بالنظام الغذائي (Gabriel,2001). يحدث التهاب المفاصل الروماتويدي غالباً بين عمر ٢٥ و ٥٥ عاماً (البحر وجماعته، ٢٠٠٩). يصيب التهاب المفاصل الروماتويدي حوالي ١% من سكان العالم، وهو شائع في البلدان الصناعية والمتقدمة وأقل شيوعاً في البلدان الأقل تقدماً، ويحدث عند النساء أكثر بمرتين منه عند الرجال، وخاصة في بداية عمر البلوغ ، ويمكن تفسير هذه الظاهرة بازدياد استخدام مانعات الحمل الفموية وحياة الرفاهية (Gabriel,2001). الصفة الأكثر شيوعاً في مرض التهاب المفاصل الروماتويدي هي وجود العامل الروماتويدي RF في مصل المرضى، ويتواجد بحساسية تصل إلى ٨٠% من مرضى الـ RA ونوعية أقل ، ومن سيئاته أنه يتواجد أحياناً حتى عند الأشخاص السليمين بتراكيز منخفضة، في السنوات الأخيرة وجدت أضعاف أكثر نوعية من الـ RF مثل أضعاف CCP حيث تصل النوعية إلى ٩٦-١٠٠% (البحر وجماعته، ٢٠٠٩) .

أما بروتين سي التفاعلي، أو CRP ، هو اختبار دم بسيط يعكس المستوى العام للالتهاب في الجسم، وفي اختبار البروتين المتفاعل (C) يتم فحص عيار (Titer) البروتين المتفاعل (CRP) في الدم، حيث يتم إنتاج هذا البروتين في حالات التهابات مختلفة وهو لا يعتبر نوعياً (Specific) لنوع معين من الالتهاب، ولذلك يتم استخدام هذا الاختبار لتشخيص ومتابعة السير الطبيعي للعديد من الالتهابات أو رد فعل المريض عقب تلقيه العلاج ، وهذا الإختبار مفيد لتتبع النشاط من الاضطرابات المزمنة مثل مرض التهاب المفاصل، وأمراض المناعة الذاتية وينخفض مستوى CRP مع نجاح العلاج وتقليل الالتهاب ويزيد بسرعة مرة أخرى إذا تكرر الإلتهاب (Danesh et al.,2004 and Milovanoic et al.,2004).

الهدف من الدراسة

تحديد مستوى بروتين سي التفاعلي C-reactive protein والعامل الرثياني Rheumatoid factor والتحري عن الأضداد الذاتية لضعد الببتيد الستيروليني الحلقى (Anti-CCP) من أجل تشخيص التهاب المفاصل الروماتويدي.

٢-١. استعراض المراجع Literatures Review

١-٢-١ - التهاب المفاصل الروماتويدي (Rheumatoid Arthritis)

مرض مناعي ذاتي (ZiFF, 1990 and Asmael , 2009) وهو مرض مزمن والتهابي الذي يصيب المفاصل بشكل أساسي ، ويعتبر من أكثر الأمراض المفصالية انتشاراً (Gabriel *et al.* , 1999 and , Asmael , 2009)

يتميز (RA) بإصابة التهابية متناظرة للمفاصل خاصة الصغيرة منها مثل اليد والقدم وقد تؤدي إلى تآكل وتخريب المفصل وينتج عن هذا التخريب إعاقة وظيفية للمصاب بشكل خطير

تشكل خطراً على حياته (Cohndelara , 2006 , and Asmael , 2009) ، ومن مميزات (RA) التهاب السائل الزلالي وتآكل الغضروف والعظم ، مراحل تطور هذا المرض جداً معقدة حيث يتم تكاثر الخلايا الزلالية التي تتليف وتشكل Pannus ثم تآكل العظم والغضروف ، وتنتم هذه المراحل المختلفة عن طريق تدخل العديد من الوظائف تذكر منها الساييتوكينات ، البروستاغلوندينات والإنزيمات المحللة ، تعتبر الساييتوكينات المحفزة للالتهاب جداً مهمة في (RA) (Feledman *et al.*, 1996 and Asmael , 2009) ، يصيب (RA) أي مرحلة عمرية من الطفولة إلى الشيخوخة ، وأكثر المراحل العمرية التي يمكن إن يظهر فيها المرض هي الفترة ما بين سن ٤٠ و ٤٥ عاماً ، ومع ذلك يمكن أن يتطور المرض عند الشباب والكبار في السن على حد سواء ، علاوة على ذلك يمكن إن يصيب المرض الأطفال ، وعادة ما يصاب به الطفل في الفترة الذي يتراوح فيها عمره بين ١١ و ١٦ عاماً ونادراً ما يحدث ذلك ، (الين وماري ، 2005) .

١-٢-٢-وبائية المرض

يبلغ معدل انتشار (RA) نحو 3% من السكان ، حيث لوحظت إصابة النساء بنحو 2-3 أضعاف الرجال قبل سن اليأس وبعده ، وتصبح النسبة متساوية مما يدل على وجود دور للهرمونات الجنسية ، وهو إن نسبة الهرمون الجنسي الذكري (testosterone) تكون ضعيفة لدى الرجال المصابين ب (RA) وكما أن المرض يتحسن أثناء فترة الحمل ويعود أثناء المرحلة المبكرة من النفاس وان حدوثه يكون بنسبة قليلة لدى السيدات اللواتي يتناولن حبوب منع الحمل (Brennan *et al.*, 1994 and Asmael , 2009).

نزوة حصول و حدوث المرض تحدث بين ٣٥-٥٠ سنة ومن الممكن في حالات نادرة أن يظهر المرض منذ الطفولة ، يعتبر التدخين أحد العناصر التي تعمل على تحريض ارتفاع إنتاج العوامل الروماتيزمية مما يساعد على تطور المرض خصوصاً عند الرجال (Tuomi ., 1994 and Asmael , 2009).

كما أعتبر عدد من العوامل الجرثومية (الفيروسات والبكتريا) من ممرضات (RA) ويعتبر الأشخاص ذوي المستضدات HLA- DRU الأكثر شيوعاً وظهوراً ووجودها دليل على داء رثوي شديد وحاد ، كما يتميز المرضى ايجابيو عامل الرثية (Rheumatoid factor) إن لديهم أعراض مرضية اشد بالإضافة إلى تآكلات عظيمة والإصابة لانتوقف على المفاصل كما هو معروف بل تتعداها إلى أعضاء أخرى وهذا يسمى بالظواهر خارج مفصلية (O'Gradigh *et al.*, 1994 and Asmael , 2009).

١-٢-٣ أسباب المرض

التغيرات المناعية المؤدية إلى حدوث المرض ويمتاز مرض المفاصل الرثوي بظهور أضرار عدة عبر مختلف آلياتها ، وتكون بداية تآكل الغضروف والعظام مصحوبة بتشكيل Pannus يكون السطح المشترك بين Pannus والغضروف مشغولاً بشكل أساسي بالبالعات الكبيرة النشطة وخلايا Fibroblasts التي تنتج الأنزيمات الحالة للبروتينات و Cothoepsines (Ernest *et al.*, 2001 and Asmael , 2009).

يعمل IL-1 و TNFa على تحفيز إنتاج جزئيات الالتصاق على الخلايا الطلائية وزيادة تجريد الخلايا المتعادلة في المفاصل حيث تقوم بتحليل Proteases و elastase التي تقوم بهدم Protoglucaues في الطبقات السطحية للغضروف مما يؤدي إلى تفاقم الوضع وترسب الكولاجين والخلايا الغضروفية (Ernest *et al.*, 2001 and Asmael , 2009). يؤدي تحفز الخلايا الغضروفية الزلالية وخلايا Fibroblastes بواسطة IL-1 TNFg أو Tcnp+ إلى تحرير الإنزيمات الحالة المرتبطة للبروتينات وتعد كل من Stromelysine و Collagenases من الإنزيمات الهادمة للأنسجة المرتبطة بالحشوة لذلك يعتقد انها الوسيطان الأساسيان في إصابة المفصل في الداء الرثوي ، كما إن تنشيط TCD4+ يمكنه أيضا تحفيز توليد الخلايا الكاسرة للعظم - osteoclastogenesis (Ernest *et al.*, and Asmael , 2009).

وقد يكون بسبب خلل في الجهاز المناعي ، إذ تقوم بعض خلايا المناعة المنوط بها مهاجمة المايكروبات بمساهمة الخلايا المبطنة للمفصل ، وهناك أسباب قد تعود لعوامل جينية أو بيئية أو إلى أنواع من الفايروسات (أيمن ، 2008) .

1-2-4- الأعراض والعلامات السريرية

تتمثل الأعراض بمظاهر مفصلية ترافق المرض وتحدث تورمات مع آلام على مستوى المفاصل المصابة وقد يحدث في مفصل ولكن عادة تؤثر على المفاصل الصغيرة لليد والقدم وكذلك الرسغين والركبتين والمرفقين والكاحل ، تصلب المفاصل لأكثر من 30 دقيقة في الصباح عند الاستيقاظ من النوم وتشوهات على مستوى المفصل خاصة الصغير (كاليد) وكذلك ارتفاع درجة الحرارة والتعب والإرهاق ونقص في الوزن خصوصاً في ازدياد نشاط المرض (Clavel 2009 and Asmael , 2004) . رغم تأثير التهاب المفاصل الريفثاني على المفاصل بشكل رئيسي لكنه يؤثر على أعضاء أخرى ويكون بشكل حاد مع أعراض جهازية عند المصابين، حيث يعتبر RA مرضاً جهازياً مصحوباً بفقدان شهية (anorexia) ونقص الوزن وآلام عضلية (myalgia) وفي بعض الحالات تسبق الأعراض المرضية . (Scott *et al.*, 1981 and Asmael , 2009). وظهور عقيدات تحت الجلدية (Subcutioeous nodules) عند 20%

من المرضى (Dreano *et al.*, 2002 and Asmael , 2009). عادة العقيدات ما تكون مرفقة بإيجابية عامل الرثية (Eyguem *et al.*,1981 and Asmael , 2009). حدوث التهاب ظاهرة الصلبة (Episcritis) شائع في الداء الرثوي وهو عادة غير مؤلم ، كما يترافق مع خلل في الرؤية ولايحتاج علاجاً خاصاً ويحدث التهاب الصلبة (Scleritis) ، بشكل اقل لكثرة أكثر خطورة مؤدياً إلى أن تصبح العين حمراء (Berney and Kharan 2005 Asmael,) (2009). ومظاهر قلبية حيث يظهر التهاب التامور (Pericarditis) غير العرضي عند ثلث المرضى (delRincon *et al.*, 1994 and Asmael , 2009). وأيضاً اعتلالات عصبية انحصارية (Entra Oment Nearopathy) شائعة يسببها الضغط الشائع عن نمو وزيادة حجم الغشاء الزلالي كما يحدث التهاب الأوعية وكذلك التهاب الأعصاب نتيجة انسداد الأوعية المغذية لها في حالة الالتهاب ، كما يحدث انضغاط النخاع الشوكي الرقبي (Vaillan court , 1990) (and Asmael , 2009).

يترافق فقر الدم مع المرض المزمن وكذلك يترافق مع فقر الدم وكذلك مع نقص في الحديد نتيجة نزيف هضمي ناتج عن مضادات الالتهابية غير الستيرويدية المستخدمة في العلاج (PiPer *et al.*, 2006 and Asmael , 2009).

5-2-1-1 التشخيص

يتم التشخيص من خلال أخذ الطبيب لتاريخ الحالة المرضية بالتفصيل وكذلك وقت بدء الأعراض لدى المريض وبعدها يجري الطبيب للمريض الفحص السريري ولايوجد فحص خاص لتشخيص المرض .

الفحوصات المختبرية التي تساعد في التشخيص :

اختبار (Erythrocyte sedimentation)(ESR) وهو قياس سرعة تنقل كريات الدم الحمراء واختيار (CRD) الأحدث (قياس كمية البروتينات التي تظهر في الدم نتيجة وجود الالتهابات الخطيرة مثل الحمى الروماتيزمية) ومن الجدير بالذكر إن كلا الاختبارين يحققان النتيجة نفسها وبالتالي يعتمد الاختبار الذي سنقوم به على رأي الطبيب المختص (ألين وماري ، 2005) .

فحص الدم أيضاً من اجل البحث عن وجود نوع من البروتينات يسمى (العامل الريثاني) الذي يظهر في الدم عند نسبة تتراوح بين ٧٠ و ٨٠% عند المصابين بالمرض ، كما إن هذا العامل يوجد في بعض الناس غير المصابين بالمرض ، كما إن بعض الناس لا يوجد لديهم هذا العامل في بداية الإصابة بالمرض (ألين وماري ، 2005) .

يتم إجراء أشعة اكس من أجل اختبار حالة المفاصل والبحث عن أي إشارات مبكرة تحذر من تلف العظام الذي يسمى تآكل . وأيضا إجراء أشعة بالرنين المغناطيسي أحدى وسائل التشخيص التي تظهر خلالها صور ثلاثية الأبعاد للهيكل الداخلي الموجود داخل الجسم دون استخدام أشعة اكس أو أي أشعة أخرى (الين وماري ، 2005) .

1-2-6- المضاعفات

زيادة شدة المرض ، الشعور بالإعياء والألم الشديد والتيبس والتورم في المفصل أكثر من المعتاد ، تآكل المفصل أنيميا حادة ، تتميل في الأصابع لأن الطبقة الملتهبة المبطنة للمفصل تضغط على العصب الأوسط في المكان ، زيادة كمية السوائل حول القلب والرئتين وعدم القدرة على القيام بالأشياء التي كان يقوم بها من قبل (الين وماري ، 2005) .

1-2-7- العلاج

علاج تحفظي للفصال الرثوي يحتوي على التمارين والمساند للمحافظة على وظيفة المفصل بالإضافة للعلاج الدوائي وقد تجري عملية جراحية لإزالة النسيج المصاب (نظير ، ١٩٨٧) وهناك عدة عقاقير عادة يتم استخدامها منها المسكنات كالباراسيتامول والأسبرين وكوديين وكذلك العقاقير المضادة للالتهاب الخالية من الاستيرويد (NON- NSATD – in Flammatory drugs) وهذه المسكنات والعقاقير يتم اللجوء إليها عند علاج المرض وتستخدم لعلاج أعراض الشعور بالألم والالتهاب (ألين وماري ، 2005) .

وهناك عقاقير مضادة للالتهاب المفاصل وتستخدم للسيطرة على المرض (Disease – modi Fying) وهي (DMARD 0 anti rhumaticdrugs) وتستخدم هذه العقاقير لمنع تطور المرض وسوء الحالة المرضية وهي عقاقير قوية المفعول وأيضاً الاستيرويد (Steroids) يستخدم لعلاج هذا المرض وتقليل الالتهاب والشعور بتحسن كبير وهناك بعض الأدلة تشير إلى إن هذا المركب قد يحد من تآكل المفاصل (الين وماري ، 2005) ، ويراعى في اختيار نوع العقار جنس المريض وعمره ووجود أمراض أخرى يحملها يمكن أن تسبب الأدوية مضاعفات أخرى له وكذلك إذا كانت المصابة سيدة فيراعى هل إنها مرضعة أو راغبة في الحمل أو حاملا ، (أيمن ، 2008) ، عقار الميثوتريكسات وكذلك الكورتيزن الذي يستخدم في حالات التهيج المفاجئة للأعراض ويؤخذ بجرعة منخفضة وبشكل يومي لوقف نشاط المرض ، أدوية بالوريد أو حقن تحت الجلد أو عن طريق الفم وعلاج جراحي (أيمن ، 2008) .

المواد وطرق العمل Materials & Methods

٢-١-المواد

٢-١-١-المرضى Patients

لقد تم جمع ٥٠ عينة دم وريدي من مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis (٣٣ أنثى و١٧ رجل) والمراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي وللفترة من كانون الثاني ٢٠١٥ إلى آذار ٢٠١٦. وكانت أعمار المرضى تتراوح من (٥-٧٥ سنة) لفحص مستوى بروتين سي التفاعلي C-reactive protein والتحري عن أضداد عامل الروماتويد Rheumatoid Factor من نوع (IgG) والتحري عن الأضداد الذاتية ضد الببتيد الستيروليبي الحلقي (Anti-CCP (Anti-)) من نوع Anti-cyclic citrullinated peptide من نوع IgG.

٢-١-٢-الأجهزة والأدوات المستخدمة Equipments and Instruments

أستخدمت في هذه الدراسة الأدوات والأجهزة التالية:

جدول (٢-١) الأدوات والأجهزة المستخدمة

Origin	الشركة Company	الأداة Device
Germany	Slamed	Automatic Pipette 5, 50, 100, 500 µl
Europe	Belgium	Glass/Plastic tubes
Germany	Heareus	Centrifuge
Australia	Liebher	Freezer
Russia	Lomo	Microscope
Italia	TKA	Kahn-Shaker
Germany	Heareus	Plate Reader

جدول (٢-٢) العدة التجارية

الشركة/القطر Company/Origin	المحتويات Contents	نوع العدة Kit type	ت
Aeskullsa- Germany	<p>1. Microplate wells coated with antigens coated with antigens: 12 microplate strips each containing 8 individual break-off wells in a frame, ready for use</p> <p>2. Calibrators 1 to 5 1, 5, 20, 100, 200 RU/ml (IgG, human), ready for use (Red color)</p> <p>3. Positive control (IgG, human), ready for use (Blue color)</p> <p>4. Negative control (IgG, human), ready for use (Green color)</p> <p>5. Enzyme conjugate peroxidase-labelled anti-human IgG (rabbit), ready for use (Green color)</p> <p>6. Sample buffer ready for use (Violet color)</p> <p>7. Wash buffer 10x concentrate (Colorless)</p> <p>8. Chromogen/substrate solution TMB/H₂O₂, ready for use (Colorless)</p> <p>9. Stop solution</p>	Anti-CCP ELISA (IgG)	١

	<p>0.5 M sulphuric acid, ready for use(Colorless)</p> <p>10. Test instruction</p> <p>11. Quality control certificate</p>		
Spinreact-Spain	<p>1.CRP Latex Reagent</p> <p>2.Positive Control</p> <p>3.Negative Control</p> <p>4-Test Slide</p> <p>5-Pip-Strirrers</p> <p>6-Procedure Sheet</p> <p>7-Glycine Buffer x10 Concentrat</p>	<p>C-Reactive protein (CRP) Latex Slide agglutination</p>	२
Spinreact –Spain	<p>1.RF Latex Reagent</p> <p>2.Positive Control(Red cap)</p> <p>3.Negative Control(Blue cap)</p> <p>4-Test Slide</p> <p>5-Pip-Strirrers</p> <p>6-Procedure Sheet</p>	<p>RF-Latex Slide agglutination</p>	३

3-2-3-1-2 طريقة العمل Procedure

1-3-2-1 جمع عينات الدم وحفظها

تم جمع ٥ مل من عينات الدم الوريدي من المرضى المراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي بعد تنظيف الجلد ب ٧٠% كحول ثم وضعت في أنابيب بلاستيكية وتركت لتتخثر لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة بعدها تم فصل عينات المصل من عينات الدم عن طريق وضعها بجهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق عند ٣٠٠٠ دورة/دقيقة ثم نقلت عينات المصل إلى أنابيب أخرى (Voller & Bidwell,1985) بعد جمع عينات المصل حفظت بدرجة -٢٠م° حتى يتم فحصها بطريقة التلازن لبروتين سي التفاعل C-reactive Protein و العامل الرثوي Rheumatoid factor وطريقة الأليزا لتحديد الأجسام المضادة للمادة النووية ANA.

٢-٣-٢-٢ تحديد بروتين سي التفاعلي C-reactive protein

١-٢-٣-٢-٢ فحص تلازن اللاتكس Latex Agglutination Test(LAT test)

٢-٣-٢-١-٢-٣-٢ مبدأ الإختبار A-The principle of the test

إستخدام معلق من دقائق اللاتكس المحمول عليها الأجسام المضادة من نوع IgG الخاصة ببروتين سي التفاعلي الذي يلازن المستضدات (بروتين سي التفاعلي C-reactive protein) إذا ما وجدت في عينة المصل للشخص المصاب.

٢-٣-٢-١-٢-٣-٢ خطوات العمل Procedures

تم إجراء خطوات العمل متبعين تعليمات الدليل كالاتي:-

١-تركت الكواشف وعينات المصل حتى تصل إلى درجة حرارة الغرفة.

٢-رجت عبوة الكاشف لنشر و تعليق جزيئات اللاتكس في محلول ال Buffer.

٣- وضعت قطرة من المصل على شريحة زجاجية مع قطرة من الكاشف (Latex Reagent) ومزجت جيدا بواسطة عيدان خشبية Sticks وحركت لمدة دقيقتين وفحصت بعدها بالعين المجردة ونلاحظ حدوث التلازن agglutination في الحالات الموجبة ولغرض الفحص الدقيق يتم الإستعانة بالمجهر وباستخدام القوة الصغرى X ٤٠ للتأكد من حدوث التلازن.

٢-٣-٢-١-٢-٣-٢ تفسير النتائج C-

المظهر المتجانس (تفاعل سلبي) يجب أن تفسر على عدم وجود بروتين سي التفاعلي في المصل حيث يكون مستوى CRP أقل من ٦mg\L وهو المستوى الطبيعي.

التجمع أو التكتل الواضح(تفاعل موجب) يجب أن يفسر على وجود بروتين سي التفاعلي بمستوى ≥ 6 mg\L في المصل.

*التفاعلات الموجبة

٣ أو +++- تجمعات كبيرة مع خلفية واضحة (معتمدة).

٢ أو ++- تجمعات متوسطة مع خلفية سائلة غامقة قليلاً.

١ أو +- تجمعات صغيرة مع سائل معتم في الخلفية.

*التفاعلات السلبية:- لا توجد تجمعات مرئية (معلق متجانس).

٣-٣-٢-٣- تحديد العامل الرثياني Rheumatoid Factor

٣-٣-٢-١- فحص تلازن اللاتكس (Latex Agglutination Test (LAT test)

٣-٣-٢-١-٣- مبدأ الإختبار A- The principle of the test

يستخدم فحص اللاتكس للتحديد شبه الكمي والنوعي للعامل الرثوي في مصل الإنسان. حيث أن جزيئات اللاتكس مغلفة بالكاما كلوبوليولين التي تتلازن عندما تخلط مع العينات المحتوية على العامل الرثوي .

٣-٣-٢-١-٣-٢- خطوات العمل B- Procedures

تم إجراء خطوات العمل متبعين تعليمات الدليل كالاتي:-

١- تركت الكواشف و عينات المصل حتى تصل إلى درجة حرارة الغرفة.

٢- وضع ٥٠ µl من العينة وقطرة واحدة من السيطرة الموجبة والسالبة في دوائر منفصلة على شريحة الأختبار.

٣- رجت عبوة الكاشف RF بلطف قبل الاستخدام وإضيفت قطرة واحدة (٥٠ µl) للعينة المفحوصة.

٤- خلطت القطرات بال stirrer ونشرت على السطح الكلي للحلقة. مستخدمين عصا خلط مختلفة لكل عينة.

٥- وضع السلايد على الدوار الميكانيكي بسرعة (١٠٠-٨٠٠ r.p.m.) لمدة دقيقتين. النتائج الموجبة الكاذبة يمكن أن تظهر إذا قرأت بعد أكثر من دقيقتين.

٣-٣-٢-١-٣-٢-٢- القراءة وتفسير النتائج C-

بعد إزالة السلايد من الدوار فحص مباشرة بالمجهر لملاحظة وجود أو غياب التلازن. وجود التلازن يعني أن تركيز العامل الرثوي يكون مساوي أو أكثر من 8 IU/ml.

٣-٣-٢-١-٣-٢-٢-٢- الحسابات d-

تركيز العامل الرثوي التقريبي في عينة المريض تحسب كالاتي: $8 \times \text{RF Titer} = \text{IU/ml}$

٣-٢-٤- تحديد الأضداد الذاتية ضد الببتيد الستيرويدي الحلقي (Anti-CCP) Anti-cyclic
citrullinated peptide [*anti-CCP*]

٣-٢-٤-١- فحص Anti-CCP (IgG) ELISA

٣-٢-٤-١- مبدأ الإختبار A-1-٤-٣-٢ The principle of the test

عدة الإختبار تحتوي على ١٢ شريط (Microtiter strips) ب ٨ حفر تسحيح دقيقة قابلة للكسر مغلفة بببتيدات citrullinated الحلقية الاصطناعية. في الخطوة الأولى من التفاعل تحضن عينات المريض المخففه والمقياس والضوابط في الحفر. الأجسام المضادة لـ CCP سوف ترتبط مع المستضدات المغلفة لحفر التسحيح الدقيقة. تغسل الحفر لإزالة أي بروتين غير مرتبط والأجسام المضادة الغير متخصصة. في الخطوة الثانية من التفاعل . يضاف مركب الأقتران الأنزيمي (rabbit anti-human IgG HRP enzyme conjugate) لكل حفرة. مركب الأقتران سوف يرتبط لأي حفرة تحوي IgG الأنسان المرتبط مع مستضد CCP. تغسل الحفر لإزالة أي مركب اقتران غير مرتبط. تضاف المادة الأساس للأنزيم 3,3,5,5 (tetramethylbenzidine ,TMB). إذا أنزيم HRP موجود بالحفرة (تفاعل موجب)، أنزيم HRP سوف يتفاعل مع المادة الأساس TMB وينتج لون أزرق. تحضن لوقت إضافي للسماح بتطور اللون. يضاف محلول التوقف الذي يحول اللون الأزرق الى اللون الأصفر ويثبط تكوين المزيد من اللون للسماح بثبوت قراءة الطيف الضوئي. أشرطة الإختبار توضع في قارئ الصفيحة الدقيقة وتقاس الكثافة الضوئية للون. كمية الجسم المضاد المرتبط والخاص بالمستضد يكون متناسب مع شدة اللون .

٣-٢-٤-١- B-1-٤-٣-٢ خطوات العمل Procedures

١- حضانة العينة **Sample incubation**: نقل ١٠٠ µl من المقياس أو الضابط والسيطرة الموجبة والسالبة أو عينات المرضى المخففة في حفر الصفيحة المنفردة. النقل لم يتجاوز ال ١٥ دقيقة وحضنت لمدة ٦٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (١٨-٢٥ °م).

الغسل Washing يدوياً. تفرغ الحفر وتغسل بعد ذلك ٣ مرات مستخدمين ٣٠٠ µl من محلول الغسل القوي لكل دورة غسل.

ترك محلول الغسل في كل حفرة لمدة ٣٠-٦٠ ثانية لكل دورة غسل. بعدها أفرغت الحفر. بعد الغسل يطرح كل السائل من الصفيحة الدقيقة بواسطة قلبها على ورقة أمتصاص لها جهة مفتوحة للأسفل لأزالة كل محلول الغسل المتبقي.

٢- حضانة مركب الأقتران Conjugate incubation

نقل ١٠٠µl من مركب الأقتران الأنزيمي (أنزيم البيروكسيدز المعلم المضاد للأجسام المضادة من نوع G للأنتسان (peroxidase-labelled anti-human IgG) إلى كل حفر الصفيحة الدقيقة. حضنت لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (٢٥-١٨م°).
الغسل: فرغت الحفر وغسلت كما موضح أعلاه.

٣- حضانة المادة الأساس Substrate incubation. نقل ١٠٠µl من محلول المادة الأساس المولدة للون إلى كل حفر الصفيحة الدقيقة. وحضنت لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ((١٨-٢٥م°). جميت من ضوء الشمس المباشر.
التوقف-Stop: نقل ١٠٠µl من محلول التوقف لكل حفر الصفيحة الدقيقة بنفس النظام وب نفس السرعة.

٢-٣-٤-١-C- القياس Measurement

قياس الكثافة الضوئية لشدة اللون بطول موجي nm ٤٥٠ والطول الموجي الموصى به يقع بين nm ٦٢٠-٦٥٠ خلال ٣٠ دقيقة من إضافة محلول التوقف. هزت الصفيحة الدقيقة قبل القراءة لضمان التوزيع اللوني للمحلول.

٢-٣-٤-١-d- حساب النتائج Calculation of results

إذا كانت الكثافة الضوئية لعينة المريض أعلى من قيمة المقياس, (200 RU/ml) النتيجة يجب أن تسجل “>200 RU/ml”
الحد الأعلى للمعدل الطبيعي (المقياس) الموصى به من قبل (EUROIMMUN) هو ٥ وحدة نسبية /ml (RU).

الشركة المنتجة (EUROIMMUN) أوصت بتفسير النتائج كالتالي:

≤5 RU/ml: negative

> 5 RU/ml: positive

التحليل الإحصائي Statistical analysis

بيانات الدراسة (العمر والجنس) حلت إحصائياً باستخدام اختبار Student t-test عبر عنها باستخدام المعدل والانحراف المعياري Mean and Standard Deviation.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

٣, ١. النتائج Results

شملت الدراسة ٥٠ مريضاً بالتهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis والمُشخصين بصورة تأكيدية بواسطة الفحص السريري في مستشفى الديوانية التعليمي حيث تم تحديد مستويات بروتين سي التفاعلي والعامل الروماتويدي والأضداد الذاتية لصد الببتيد الستيرلوني الحلقي في أمصالهم وهذه النتائج موضحة بشكل أكثر تفصيلاً بالتالي:

١.١.٣. العمر والجنس Age & Sex

في هذه الدراسة، كانت أعمار مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي تتراوح بين (٥-٧٥ سنة). من بين ٥٠ مريضاً كان هناك (١٧ ذكر و ٣٣ أنثى) وكما مبين في جدول (٣-١). أن المعدل والانحراف المعياري للأعمار في الذكور كان (١٧,٧٠٢±٣٤,٣٥) سنة وفي الإناث (١٣,٢٨±٣٨,٤٨) سنة. أما في مجموعة السيطرة كان (٣٥,٣٢±١٤,٠٢) سنة. لا يوجد فرق معنوي بين الذكور والإناث بالنسبة لأعمار المرضى مقارنة بأعمار مجموعة السيطرة (P>0.05).

جدول (٣-١) عمر و جنس مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي

المعدل والانحراف المعياري Mean ±Standard deviation	الجنس Sex	عدد حالات التهاب المفاصل الروماتويدي No. Of cases of rheumatoid arthritis
٣٤,٣٥±١٧,٧٠٢	ذكر	١٧
٣٨,٤٨±١٣,٢٨	أنثى	٣٣

١.٢.٣. مستوى بروتين سي التفاعلي C-reactive protein levels

من ٥٠ عينة مصل جمعت من مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي فحصت لتقدير مستويات بروتين سي التفاعلي C-reactive protein levels بطريقة التلازن كان هناك (٣٤%) ١٧ عينة موجبة لهذا الفحص بينما كل مجموعة السيطرة كانت سالبة. تم تخفيف عينات المصل لتحديد عيارية بروتين سي التفاعلي في كل الحالات الموجبة. وهذه النتائج موضحة بشكل أكثر في جدول (٣-٢) و (٣-٣).

جدول (٣-٢): C-reactive protein لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي والسيطرة

المجاميع	عدد الحالات الكلي	عدد الحالات الموجبة	النسبة المئوية
----------	-------------------	---------------------	----------------

مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis patients	٥٠	١٧	(%٣٤)
السيطرة Control	٢٥	٠	(%٠)

جدول (٣-٣): التحليل شبه الكمي لمستويات بروتين سي التفاعلي لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي

التخفيف dilution	عدد الحالات الموجبة +ve for CRP No=17	التسحيح - Titer of C-reactive protein
1:2	٧	١٢
١:٤	٥	٢٤
١:٨	٢	٤٨
١:١٦	٣	٩٦

٣,١,٣. مستوى عامل الروماتويد Rheumatoid factors levels

مستوى العامل الرثوي لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي والسيطره فحص بطريقة التلازن وكانت النتيجة كما مبين في جدول (٤-٣) و(٥-٣).

جدول (٤-٣): عامل الروماتويد Rheumatoid factor لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي والسيطرة

المجاميع	عدد الحالات الكلي	عدد الحالات الموجبة	النسبة المئوية
مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis patients	٥٠	٥	(%١٠)
السيطرة Control	٢٥	٠	(%٠)

جدول (٥-٣): التحليل شبه الكمي لمستويات العامل الرثوي لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي (IU/ML)

التخفيف dilution	عدد الحالات الموجبة +ve for CRP No.=5	التسحيح للعامل الرثوي Titer of RF
1:2	٣	٢٤
١:٤	٢	٤٨
١:٨	٠	٩٦
١:١٦	٠	١٩٢
١:٣٢	٠	٣٨٤

٣, ١, ٤. تحديد الأضداد الذاتية ضد الببتيد الستيرولييني الحلقي (Anti-CCP) من ٥٠ عينة فحصت لكشف وجود الأضداد الذاتية ضد الببتيد الستيرولييني الحلقي (Anti-CCP) من نوع IgG بتقنية ELISA كان هناك ٥ (١٠%) عينه فقط موجبة للفحص كما موضح في جدول (٦-٣). وكانت القراءات (79 U/ml، 260، 78، 118، ٤٠) حيث تعتبر النتائج موجبة إذا كانت (> 5 RU/ml).

جدول (٦-٣): Anti-CCP: لمرضى التهاب المفاصل الروماتويدي والسيطرة

النسبة المئوية	عدد الحالات الموجبة	عدد الحالات الكلي	المجاميع
(%١٠)	٥	٥٠	مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis patients
(%٠)	٠	٢٥	السيطرة Control

يبدأ التهاب المفاصل الروماتويدي باستعداد (أهبة) وراثي يتميز بفعالية مناعية شديدة ضد عوامل بيئية غير محددة بعد. تلعب الخلايا المناعية التالية دوراً في بداية المرض وهي الخلايا المتغصنة والأرومات الليفية fibroblast والبلاعم Macrophage والخلايا البدينة Mast cells وهي جزء من عناصر المناعة الفطرية للغشاء الزليلي (Gary et al.,2008). يمكن أن يتم التعرف على المستضدات الغريبة أو مستضدات الذات في الغشاء الزليلي من قبل البلاعم ومن ثم تقدم هذه المستضدات إلى الخلايا المتغصنة الموجودة أصلاً في الغشاء الزليلي، بعدها يتم تحرر الكيموكينات والسيتوكينات من قبل خلايا المناعة الفطرية (مثل البلاعم)، وكذلك سيتوكينات وكيموكينات مسؤولة عن تولد الأوعية، ويؤدي ذلك إلى ازدياد التعبير عن جزيئات الالتصاق مبكراً في الأوعية الدموية للغشاء الزليلي ومن ثم ارتشاح (دخول) الخلايا وحيده النواة والمفاويات إلى الغشاء الزليلي وتتأذى الخلايا البطانية وتحدث الأوعية (تشكل أوعية دم جديدة). ويحدث فرط تنسج (توسع طبقة خلايا الغشاء الزليلي) يتضمن تكاثراً موضعياً لخلايا الأرومة الليفية مثل الخلية الزليلية (Gary et al.,2008). يعد تخرب المفصل (تآكل الغضروف والعظم) مرحلة متأخرة ويتوسط ذلك الإنزيمات الحالة للبروتين المفترزة من قبل الأرومات الليفية، وناقضات العظم (Gary et al.,2008). في 20% من الحالات تتجمع الخلايا البائية مرافقة للخلايا التائية التي تنضم إلى بنية تشبه مراكز منتشرة بشكل طبيعي في الغشاء الزليلي (نسيج لمفاوي يعاني استجابات مناعية فعالة). ويرتبط التهاب الغشاء الزليلي الجريبي هذا مع درجة عالية من الفعالية المناعية وازدياد خطر تخرب المفصل (البحر وجماعته، ٢٠٠٩).

العملية الالتهابية تلعب دور فعال في أمراضية التهاب المفاصل الروماتويدي. أنتاج بروتين سي الفاعلي C-reactive protein في الكبد يشجع بواسطة الساييتوكينات الالتهابية الأولية المتنوعة تنتج من أما الخلايا وحيده النواة أو الخلايا البلعمية. الاستجابة الأولية الالتهابية تنتج من زيادة إفراز الأنترلوكين ١ بيتا (Interleukin 1Beta) وعامل التنخر ألفا Tumor necrosis factor- α ينتج عنه تحرر الساييتوكينات المرسله، أنترلوكين ٦ الذي يحفز الكبد على إفراز CRP. مستويات عالية من الأنترلوكين ٦ سجلت في مصل المريض بالتهاب المفاصل الرثوي والنسيج الزلالي (Wood et al.,1992). يعتقد كمؤشر قياسي للالتهاب بدون دور مباشر في العملية الالتهابية. فرضت الدراسات الحديثة بأن ال CRP ربما يساهم بشكل مباشر في الحالة الالتهابية الأولية.

CRP يحفز الخلايا وحيده النواة لتحرير الساييتوكينات الالتهابية مثل (IL-1B,IL-6) و TNF- α) وربما كذلك تعمل بشكل مباشر كمحفزات التهابية أولية للخلايا البلعمية (Bharadway et al.,1999).

في الدراسة الحالية كانت مستويات CRP عالية في المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة والذي يشير الى التهاب حاد في مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي (Milovanoic et al.,2004). وهذه النتائج تتفق مع نتائج دراسة سابقة من قبل (Al-khafaji,2009) حيث كانت نتائج CRP عالية (٨٤/٨٩) من حالات التهاب المفاصل الرثوي.

تحليل معامل روماتويد (Rheumatoid Factor) يكون إيجابي بنسبة ٧٠% إلى ٨٠% في مرضى الروماتويد ومعنى ذلك أن كون هذا التحليل سلبى لا يستبعد تماماً وجود المرض. ونوضح هنا أيضاً أن كون هذا التحليل إيجابياً لا يثبت قطعياً وجود المرض وذلك لحدوث إيجابية هذا التحليل في حالات أخرى غير الروماتويد (Nishimura et al.,2007).

تحليل (Anti- CCP) ويكون هذا التحليل إيجابي في نسبة من المرضى ذوي تحليل معامل الروماتويد السلبى ومعنى ذلك أن هذا التحليل يكون ذا قدرة أعلى في المساعدة على تشخيص الروماتويد من تحليل معامل الروماتويد (Ger et al.,2005).

المصادر العربية

١. البحر ، غنام ، أبو خميس ، عماد ، القوتلي ، خليل . (2009) . دور كل من الـ Anti RA33 و Anti – CCP في التشخيص المبكر عند مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي ، المجلد 5 العدد 4 .
٢. بودن ، إسماعيل . (2009) . تأثير المستخلص الميثانولي لنبتة الشندكوره (Ajuqaivacl) على التهاب المفاصل الممرض بواسطة الكولاجين لنمط II عند جردان ، رسالة ماجستير ، الفصل الأول : 15-30 .
٣. سميث ، إلين ، ميسون ، ماري كلير . (2005) . كيف تتعايش مع التهاب المفاصل الريثاني ، الفصل الأول : 9-40 .
٤. عبد الديم ، أيمن محمد . (2008) . الفاصل والنقوس ، التهاب المفاصل : 87-88 .
٥. مطلوب ، نضير . (1987) . الموجز في جراحة اليد والقدم والعظام والمفاصل والكسور ، الأسباب والأمراض : 71 .

English References:-

المصادر الأجنبية

- 1-Al-khafaji,Z.A.E.(2009). Determination The Levels Of C-Reactive Protein In Rheumatoid Arthritis Patients In Babylon Province/ Iraq .QMJ.Vol.5.No.8.
- 2-Bharadway, D.;Stein, M.P.; Vozer, M.; Mold, C. and Duclos, T.W .(1999).The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is FC-γ receptor II. J Exp Med;190:585-590.
- 3- Brennan , P. and silman , A.(1994). Breast – Feeding and the onest OF rheumatoid arthritis arthritis and Rheam . 37.

4-Cancel . (2000) . La poly arthriti s rheumatique aide oust – on ? Assai phar. Bulletin . 15.

5-Clavel. (2004). Lapolyarthrite rhumatoideoue St –on ? Assi Phar. Bulletin , 15.

6-Cohn DeLara . (2006) . Rumatologie arthropdie traumalogi Arnett , F.C . American Rheumatism Association revised criteria For the classification OF rheumatoid arthritis . 31.

7- Danesh, J. ; Wheeler, J.G.; Hirschfield, G.M.; Eda, S.; Eiriksdottir, G.; Rumley, A.; Lowe, G.D.; Pepys, M.B. and Gudnason, V.(2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1387–1397.

8- Del Rincon , I.; Williams , k .; Stern , M.p.; Freeman . G.L and Escalante , A . (2001) . High INCIDENCE of Cardiovascular events in a. rheumatoid arthritis Cohort not explained by rational cardiac risk Factors . *Arthritis and Rheum* . 44.

9-Drano ,T.; Rollout , K.; Remand ,Baleen Do,Sevest , F.X ., Guilleux , C. Valtin , B. ; Siete , G. and Lauran, J. (2000) . Laving – pied rheumatoid . Table Ronda Siesta directiondet Drano Ann . Orthop . oust . 34.

10-Dreano , T.; Rollot , K. ; Rrnond , B.;Len , D .; Siete , G. and Laulan ,J. (2002) . Lavant – pied rhumatoide . Table Ronde Sousta dl recton det Dreano . Ann . orthop . Ouest /. 34.

11-Ernest , HO .; Choy, M.D.O. and Gabriel , S.O. and Panay , M.D . (2001) . Cytokine pathways and joint inflammation in rheum mastoid arthritis .Nugget MED . 344.

12-Eyquem , A.O. and Etsaint M .(1981) . Immunorhumatologie – Rhumatismes lupus arthemateux dissemine connectivties . 2 emee ed . Maloine . S.124.

13-Feledman , M .; Brennan , F.M and Maini R.N.(1996) Role OF cytokines in Rheumatoid Arthritis , cell . 85.

14-Gabriel , S.E.; crowson , C.S. and O'Fallon,W .M.(1999) . The epidemiology OF rheumatoid arteries in Ro Chester . 42.

15-Gabriel, S.E.(2001). The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 27: 269-281.

16-Gary, S. ; Firestein, and Kishimoto,T.(2008).Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Clinical Trial and Consulting Services P*: 9.

17-Ger, J.M. ;Pruijn, et al.(2005). Anti-CCP Antibody Detection Facilitates Early Diagnosis and Prognosis of Rheumatoid Arthritis. *Current Rheumatology Reviews*.

18-Khurana , R. and Berney , A.M . (2005) . cline cal aspect OF Rheumtoid arthritis. Pathos physiology . 12 .

19-Milovanoic, M.; Nilson, E. and Jaremo, P .(2004).Relationship between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis . ;Clin Chim Acta,343(1-2):237-240.

20-Nishimura, K.; Sugiyama, D.; Kogata, Y.; Tsuji, G.; Nakazawa, T.; Kawano, S.; Saigo, K.; Morinobu, A.; Koshiha, M.; Kuntz, KM.; Kamae, I. and Kumagai, S. (2007). "Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis.". *Annals of Internal Medicine*, 146 (11): 797–808.

21-Nissinen,R.(2003).Immunological features of chronic active rheumatoid arthritis. Chemokine receptor and cytokine profile in synovial fluid, peripheral blood and gut in patients with rheumatoid arthritis. Faculty of Science. University of Helsinki.

22-O'Gradaigh , D.; Watts , R. and Scott , D. (2001). Extra – articular Features of rheumatoid arthritis in firestein,G.; Panay, and wollueim ,F. .A, eds . Rheumatoid Arthritis . Frontiers in pathogenesis and Treatment OXFORD Press , Newyork . 227.

23-Piper , Ho .; Mulheim and DoND Hardwick , N.(2006) . Multiple hematology malignancies in aoatient with rheumatoid arthritis without exposure to disease modifying therapy Ann Rheum Dies . 65.

24-Tuomi , T.O.; Heliovaara ,M.O. ; Palosuo , T . and Aho, K. (1990). Lung function and rheumatoid Factors , Ann Rheum . Dis. , 49.

25-Vaillaucourt , G. (1990) . Arthritis . et rheumatism . les pressed l'universite de Montreal . 27 .

26-Wood, N.C.;Symons, J.A. ;Dickens, E.;Duff, G.W.(1992).In situ hybridization of IL-6 in rheumatoid arthritis .Clin Exp Immunol .1992; 87 :183-9. [PubMed].

27-Ziff, M.(1990) . The rheumatoid Nodule .Arthritis and Rheum . 33 .