اثرات دیابت بر سیستم ایمنی هومورال (IGG, IGA, IGM)

دکتر عباس اکبری بیوشیمیست عضو هیت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان

خلاصه :

****

وجود عفونت در بیماران مبتلا به دیابت بالا بوده وطیف گسترده ای از میکروبهای بیماری زا را در اینگونه افراد نشان میدهد. که بعد از گذشت چندین سال از بیماری دیابت، سیستم ایمنی دچار نقص میگردد. و به دستگاه ایمنی آسیب وارد می‌آید. در مورد نوع آسیب که به دستگاه ایمنی وارد میگردد هنوز ابعاد مختلف آن به درستی معلوم نشده ولی در جریان بیماری دیابت در سیستم ایمنی سلولی اعمالی از قبلی فاگوسیتوز وکموتاکسی مختل شده و سیستم ایمنی هومورال هم تحت تأثیر قرار گرفته و غلظت سرمی ایمنوگلبولین ها تغییر پیدا می کند.

مقدمه :

****

پاتوژنزآسیب دستگاه ایمنی در دیابت :

۱- اختلال در متابولیسم سلولهای ایمنی : منبع اصلی انرژی در سلولهای ایمنی گلوکز می باشد. و این سلولهای در هنگام فعال شدن نیاز زیادی به گلوکز پیدا می کنند. به همین دلیل در هنگام فعال شدن لنفوسیت ها تعداد گیرنده های انسولینی زیاد می شود. تا نیاز به گلوکز تأمین گردد. حال اگر انسولین وجود نداشته باشد. و یا در مقابل عمل انسولین مقاومتی صورت گیرد. در این عمل اختلال به وجود میآید بعلاوه در بیماری دیابت علاوه بر کربوهیدرات در متابولیسم بقیه مواد لازم برای حیات سلول نیز اختلال ایجاد میشود بدیهی است سلولهایی که در متابولیسم عادی خود مشکل دارند در هنگام انجام وظیفه نیز با مشکل روبرو خواهند بود.

۲- قندی شدن پروتین ها: قندی شدن، glycation موضوع مهمی است که در دیابت وجو د دارد. نقش پروتئین ها در ساختمان سلول که اعمال حیاتی را بر عهده دارند، پس از قندی شدن در جریان بیماری دیابت از دست رفته و یا به شدت کاهش می یابد. به عنوان مثال سیتوکین ها انتقال پیام میان سلولهای صلاحیت دار ایمنی به عهده داشته در اثر قندی شدن سیتوکین ها و گیرنده های سلولی آنها که ساختمان پر وتینی دارند. فعالیت بیولوژیکی خودرا از دست داده وبه این نحو در اعمال سلولهای ایمنی اختلال ایجاد می شود.

۳-اختلال کمی و کیفی در زیر گروههای لنفوسیت T: مشخص شده که دیابت باعث اختلالات کمی و کیفی در بعضی از زیر گروههای لنفوسیت T میگردد. Plouffe و همکاران پیشنهاد نموده اند. که نقص پاسخدهی لنفوسیت ها در افراد دیابتی ممکن است مربوط به افزایش فعالیّت سلولهای Tباز دارنده باشد. (Ts) مطالعات دیگر نشان دهنده نوعی لنفوسیت های B است که بروی عملکرد سلولهای T اثر بازدارندگی دارند. (۹)

۴- آسیب ماکروفاژها: توانایی پاسخدهی لنفوسیت به بسیاری از آنتی ژن ها به عملکرد صحیح ماکروفاژها دارد. ماکروفاژ های افراد دیابتی در آماده سازی وپروردن آنتی ژن و عرضه آن به سلولهای T دچار اختلال می باشند.

۵- اختلال در متابولیسم روی: فلز روی بر عملکرد طبیعی دستگاه ایمنی لازم می باشد. در بعضی از افراد دیابتی بخصوص NIDDM* سطح سرمی آن کاهش می یابد تجویز روی به آن دسته از بیمارانی که در ابتدا فعالیّت میتوژنی کمی را در پاسخ به فیتوهما گلوتین (PITA) داشته قدرت پاسخ دهدهی آنها را افزایش میدهد. دوزهای فا رماکولوژیکی روی، متابولیسم مس را تغییر داده و مقدار HDL-Cرا نیز می کاهد.

به هر حال شیوع و بروز عفونت در اینگونه بیماران بالاست به علت اختلالات کمی و کیفی دستگاه ایمنی و همین طور اختلالات عروقی عارض می شود. بررسی افراد دیابتی از جنبه های مختلف عملکرد دستگاه ایمنی میتواند در کنترل وپیشگیری عفونت در این بیماران اثرات سودمندی داشته باشد. وبا تشخیص زود و به موقع اختلال ایمنی میتوان در کنار کنترل بهتر دیابت و تجویز آنتی بیوتیکها به صورت پروفیلاکسی و سعی در رفع این اختلالات موجب تأمین سلامتی بیشتر و طول عمر بیماران دیابتی باشد.

مواد و روش آزمایش

ژل گرادیان الکتروفوزریس :

Gradiaut gel Electrophoresis

جهت جداسازی نسبتاً کامل زیر واحد های پروتیئن ها بر اساس وزن مولکولی در سطح وسیع از

*Non Insulin dependent diabetes Mellitus(NIDDM)

روش $(G.G.E)^2$ استفاده می شود بدین ترتیب که باعبور نمونه ای از داخل آکریل آمید که به تدریج در حال افزایش می باشد. دیفوزیون درباند در حال گسترش از بین خواهد رفت اگر یک نمونه را که به صورت یک باند درژل در حال حرکت می باشد در نظر بگیریم قسمت جلوباند نسبت به عقب آن با غلظت بیشتر ی از ژل در تماس و سرعت کمتر ی نیز دارا می باشد. بنابر این به تدریج که باند در حال حرکت است باژلی که غلظتش به تدریج در حال افزایش می باشد مواجه گشته و اختلاف سرعت جلو با عقب باند باعث فشردگی آن گشته بنابراین باندهای در حال حرکت به طور دائم در مناطقی اززل فشرده و در نتیجه با قدرت تفکیک بالایی تجزیه خواهند شد. بالا خره حرکت باند کند گشته و سیستم به حال تعادل میرسد. برای تفکیک بهتر میتوان تغییرات انتخابی در شکل گرادیان به وجود آورد. غلظت های آکریل آمید که میتوان به کار برد بین ۳ تا ۲۵ درصد می باشد.

روش گرادیان غلظت مدل صفحه ای (Slab) متد O Farrll .

دستگاههای و موّاد مورد نیاز :

۱- دستگاهها و لوازم: دستگاه الکتروفورز دستگاه تشکیل دهنده ژل گرادیان دانسیتومتر الکتروفورز، دستگاه PH متر، صفحات ژل سرنگ ها میلتون و انواع پیپتها .

۲- موآد :

موادLKB شامل آکریل آمید: X1 متیلن بیس آکریل آمید، آمونیم پرسولفات تمدTEMED، سدیم دورسیل (SDS) - تریس برموفنل بلو، گلیسین مرکاپتو اتانل - کوماسی بلو، اتانل، اسید استیک گلاسیال .

تهّیه محلولهای لازم :

بافرالکترود تریس -گلسین :

۱۵/۵ گرم تریس
۷۲ گرم گلیسین
۵ گرم SDS

مقادیر ذکر شده را در مقداری آب مقطر حل کرده PH آن را با ۸/۳ = CPH تنظیم می کنیم. سپس حجم نهایی را به ۵۰۰ میلی لیتر میرسانیم .

-بافرژل بالایی :

Upper .gel
تریس ۰/۵ مولار PH=۶/۸
تریس ۳۰/۲ گرم
۲ گرم SDS

مقادیر ذکر شده را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده PH را در ۶/۸ تنظیم می کنیم سپس حجم نهایی را به ۵۰۰ میلی لیتر میرسانیم .

- بافرژل پائینی Lower gel ۱۱/۸ گرم تریس تریس ۱/۵ مولار PH=۸/۸ ، ۲ گرم SDS

مقادیر فوق را در ۲۰۰cc، آب مقطر حل کرد ه PH آن را در ۸/۸ تنظیم می نمائیم. و حجم نهایی را به ۵۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

- محلول آکریل آمید غلیظ ۲۹/۲ گرم آکریل آمید .

۸/. گرم بیس آکریل آمید
آب مقطر تا ۱۰۰cc

محلول را پس از تهیه در ظرف تیره ریخته و در ۴ درجه سانتیگراد نگه داری می کنیم .

-محلول ژل Stacking :

بافرژل بالایی ۵ میلی لیتر
محلول آکریل آمید رقیق ۳ میلی لیتر
آب مقطر ۱۲ میلی لیتر

مقادیر فوق را در یک ارلن ریخته پس از اگازه کردن ۶۰ میکرولیتر محلول آمونیوم پرسولفات و۲۰ میکرولیترتمد TEMEd اضافه کرده و به ملایمت تکان میدهیم تا خوب مخلوط شود .

نحوه الکتروفورز نمونه ها :

۵۰ میکرولیتر از سرم ۱ با،هم حجم آن بافر نمونه مخلوط می کنیم پس از چند دقیقه مخلوط به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار میدهیم. این نمونه آماده برای قرار دادن برروی ژل میباشد. پس از پلیمریزه شدن ژل Stacking شانه ها را خارج کرده و آب روی ژل را خارج می کنیم. سپس چند بار سطح ژل رابا بافرالکترود می شوئیم بار آخر بافر را خارج نمی کنیم آنگاه ۵۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط بابافر را که معادل ۲۵ میکرو گرم پروتئین است در محل- های مخصوص زیر بافر تزریق می کنیم سپس صفحات ژل را به مخزن الکتروفورز منتقل می نمائیم و Powor را طبق جدول زیر روشن می کنیم

نصب Power برای دوژل ۱/۵ میلی متری

درجه حرارت	۱۰+درجه سانتیگراد
جریان ثابت	۶۰+ میلی آمپر
حداکثر ولتاژ	۵۰ ولت
زمان آزمایش	۵ ساعت

مرحله رنگ آمیزی و تثبیت ژل ها

روش Anderson,s :

۱- محلول رنگ آمیزی غلیظ :

کوماسی بلو (LKB)250 ۲/۵ گرم .

اتانل ۹۵٪ .

کوماسی بلورا در اتانل ۹۵٪ حل کرده یک ساعت روی مخزن همزن گذاشته و بعداً صاف می کنیم .

۲- اسید استیک ۱۰٪

اسید استیک گلاسیال ۱۰۰ میلی لیتر

آب مقطر ۹۰۰ میلی لیتر

۳- اسید استیک ۵٪

اسید استیک گلاسیال ۵۰۰ میلی لیتر

آب مقطر ۱۰ میلی لیتر

برای رنگ آمیزی ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۱۰٪ را با ۱۰۰cc محلول رنگ آمیزی غلیظ مخلوط کرده سپس یک شب ژل ها را درون آن قرار میدهیم .

مرحله شستشو :

۱- مرحله اول :

اتانل ۹۵٪ ۲۰۰cc

اسید استیک ۵٪ ۳۰۰cc

مدت رنگ ۲-۱ ساعت

- محلول آکریل آمید رقیق :

آکریل آمید ۲۹/۲ گرم

بیس آکریل آمید ۰/۸ گرم

آب مقطر تا ۱۰۰cc

محلول را پس ازتهیه در ظرف تیره ریخته در ۴ در جه سانتیگراد نگه داری می کنیم .

- محلول آمونیم پر سولفات :

آمونیم پرسولفات ۱ گرم

آب مقطر تا ۱۰ میلی لیتر

محلول فوق بایستی روزانه و تازه تهیه شود.

بافر نمونه :

بافر ژل بالایی	۱۲/۵ میلی لیتر
SDS	۲/۳ گرم
گلیسرول	۱۰ میلی لیتر
مرکاپتواتانل	۵ میلی لیتر

محلول برموفنل بلو	۰/۱ میلی لیتر
آب مقطر تا	۱۰۰ میلی لیتر
مرحله دوم اتانل ۹۵٪	۱۰۰ میلی لیتر
اسید استیک ۵٪	۳۵۰ میلی لیتر

مدت رنگ بری ۲-۱ ساعت

مرحله سوم :

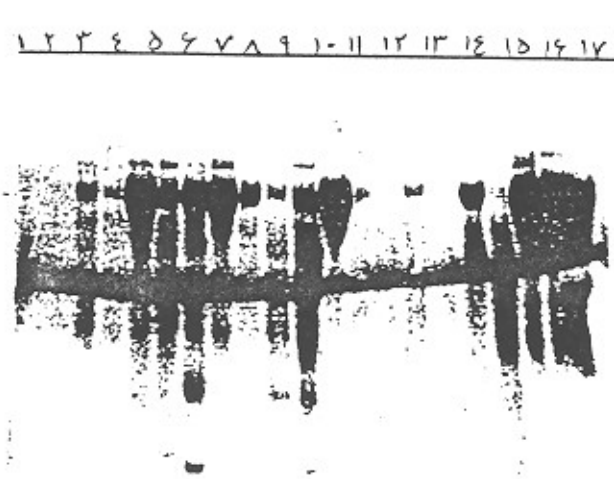
تکرار مرحله دوم

مرحله چهارم :

Scan نمونه ها :

برای اینکه بتوانیم تعداد باندهای موجود در روی ژل های رنگ آمیزی شده را کاملاً مشخص نمائیم. آنها را به وسیله دستگاه دانسیتومتر الکتروفورز Scan می نمائیم.

(طول موج ۵۹۵ نانومتر)

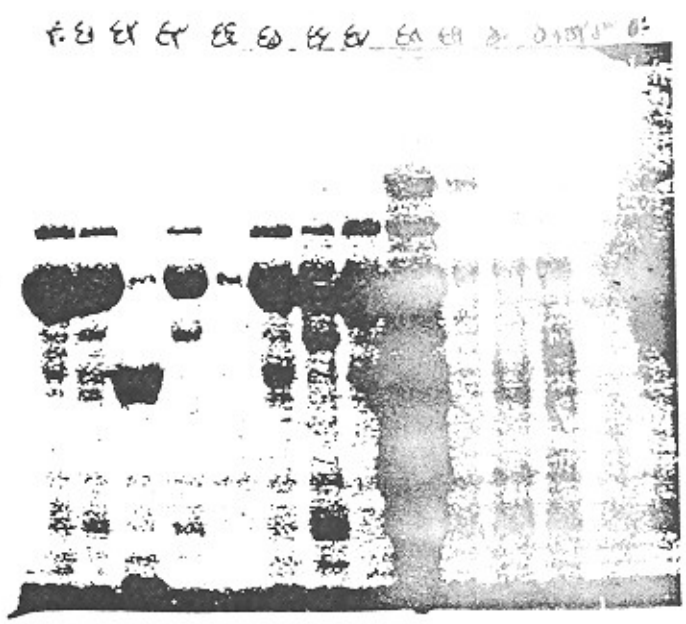


الکتروفورز به روش (G.G.E) ژل گرادیان الکتروفورز .

نمونه های مورد مطالعه از شماره ۲۰-۱

الکتروفورز به روش (G.G.E) ژل گرادیان الکتروفورز .

نمونه های مورد مطالعه از شماره ۳۹-۲۲



الکتروفورزیه روش (G.G.E) ژل گرادیان الکتروفورز
نمونه های مورد مطالعه از شماره (۵۴- ۴۰)

نتایج:

این مطالعه برروی ۵۰[1] نفر از افراد مبتلا به دیابت، که دارای بیماری عفونی (زخم عفونی در سطح بدن اعم از نوك انگشتان پا و یا دست و احیاناً دیگر نقاط بدن) می باشد تهیه گردیده و غلظت سرمی ایمونوگلبولین ها(IGM, IGA, IGG) به وسیله تکنیک ژل گرادیان الکتروفورزیس ، (Gel- Gradiant.Electrophore sis) مدل صفحه ای، متد O.farrel اندازه گیری شده است. در مطالعه باد شده میانگین غلظت سرمی IgG کاهش چشم گیر داشته (Ig=٪۵۸ /۷) و نشان میدهد که با طولانی شدن و پیشرفت بیماری،کاهش میزان IgG در بیماران بیشتر است، که بستگی به طول دوره بیماری دارد. و هم چنین مقادیر IgA و IgM نیز کاهش یافته و این کاهش برای IgA=٪۱۲۵ و IgM=٪۱۵/۷ می باشد.

ایمنی سلولی بررسی های مختصر در صورت گرفته است این امر به دلیل خاص بوده است که در بررسی عملکرد سلولی وجود دارد تعداد این مطالعات به کار برده است.در بیماران دیابتی مبتلا به

(۲۳نفر مذکر گروه سنی از ۴۰ سال به بالا)

عفونت های معینی که بخصوص در ایمنی سلولی نقش مهمی را در دفاع علیه آنها ایفا می کند، مانند قارچها و باکتریومها نشانگر این است که در جریان بیماری ایمنی سلولی به احتمال زیاد دچار اختلال میگردد. طی مطالعات انجام شده در IDDM[2] تعداد لنفوسیتهای T کاهش می یابد. که مستقل از درجه کنترل قند است. ولی تعداد سلولهای قاتل (Killer) افزایش نشان میدهد . در مورد وضعیت لنفوسیت های T در NIDDM اطلاعات کمی در دست است. مطالعات برروی لنفوسیت های B نیز وجود بعضی از ناهنجاریهایی ایمنی شناختی را بخصوص در NIDDM نشان داده ست. مسئله بسیار مهمی که در دیابت وجود دارد. قند ی شدنglycation پروتین- های بدن می باشد. نقش پرو تیئن ها در ساختمان سلول و هم چنین نقش تنظیم کنندگی اعمال حیاتی، نشان میدهد. که فعالیت بیولوژیکی بسیاری از پرو تیئن ها پس از قندی شدن در جریان بیماری دیابت از دست رفته و یاکاهش می یابد. Plouffe و همکاران پیشنهاد کرده اند، که نقص پاسخ دهی لنفوسیت ها در افراد دیابتی ممکن است، مربوط به افزایش فعالیّت سلولهای T باز دارنده باشد. مطالعات دیگرمبیّن وجود نوعی لنفوسیت های B است که بر روی عملکرد سلولهای T اثر باز دارندگی دارد. مطالعات جدید نشان داده که در اغلب بیماران سلول B دچار نوعی نقص درونی است. بعضی از مطالعات نشان دهنده طیفی از ناهنجاریها در تکامل سلولهای B است، که از پرو- لیفراسیون نرمال سلولهای B و ترشح طبیعی IgM گرفته تا توقف کامل پرولیفراسیون سلولهای B متفاوت است. مهمترین خصوصیات ایمونو لوژیک این بیماران به شرح ذیل است:

۱-عفونت های پیوژن مکّرر در هر سنّی میتواند شروع شود.

۲- افزایش انسیدانس بیماریهای اتوایمون.

۳- مقدار مجموع ایمونو گلبولین ها کمتر از ۳۰۰ mg/di ومقدار IgG<۲۵۰mg/di است.

در روش استفاده از الکتروفورز ژل گرادیان غلظت باعث تفکیک خیلی بالای زیر واحد های پروتئینی با دامنه وسیع وزن مولکول میشود. با عبور اجزاء نمونه از غلظت های آکریلامید در حال افزایش، اثرات دیفوزیون در باند خنثی می شود. در یک باند در حال حرکت، دارای اجزاء نمونه میتوان تصور کرد که قسمت جلو باند در ناحیه با غلظت بیشتر ژل واقع شده و نسبت به قسمت عقب باند کند تر حرکت می کند. و این در حالتی است که هنوز در

۲-(Insulin Dependent Diabetes Mellitus)

ناحیه با محدودیت کمتر واقع شده است، سپس باند های متحرك در نواحی سخت ژل فشرده می شوند ، و در نهایت حرکت آهسته شده و سیستم به تعادل میرسد . به علت دامنه وسیع سوراخهای موجود (برای مثال در یک گرادیان از ۴ تا ۲۲ درصد آکریل آمید)نمونه دارای اجزایی با وزن مولکولی مختلف میتواند با موفقیت تفکیک شود . در مطالعات قبلی که توسط plouffe و همکاران انجام گرفته تکنیک مورد استفاده به روش ایمونودیفوزیون شعاعی بوده و مقادیر عددی بدست آمده کمتر از روش ژل گرادیان $(G.G.E)^2$ می باشد . البته با توجه به جدید بودن تکنیک مورد استفاده که از درجه جدا سازی بالاتری برخوردار می باشد . مقادیر عدد بدست آمده ایمونوگلوبرین IG و IgA و IgM درصد های بالاتری را نشان میدهد . و با توجه به اهمیت موضوع استفاده از روش (G.G.E) پیشنهاد میگردد .

Rferen ces

1) - Link H.and Tiblling .8 principles of albumin and IgG analyses neuroloy-ieal disorders. Il Relation of concentration of proteins in Serum and cerbro Spi-nal fluid Scand. g. clin. lab Invest 37.391-396(1977) .

2)- O, farrell,p.h 1973 High resolution two dimensional. Electrophoresis of proteins .). biol. chem .

3)- Mancini. G Carbonara, A.o. Hermans /J F.1975: ImmunoChemi.cal. xuantitation. of antigen. by. Single. Radial immuno - diffasion. Immunochemis-try.2:235.o .

4) - ANDRESEN AR, christinnsen gs, Andersen Jk Kreiners Deckert T. 1983 Diabetic nephropathy. in Typ I(insulin - dependent) diabts: an epidmiological. study 25:496 5ol .

5)- Mogensen OE. 1982:long term antihyper. tensive. treatment. inhibiting. progression. of diabetic nephropaty. br.med.y.285:685-8 .

6)- MarShall Sm ALberti KGMa. 1986 Screening. for. early . diabetic. nephro Pathy. Ann clin Biochem 23:1957 .

7)- TIETZ. norber T w. 1986: TEXT book . of clinical chemistry. W .B. Saun-ders - company . chapter.4.p.6.2-7 .

۸- اثرات دیابت بر دستگاه ایمنی - تألیف دکتر محمد رضا بختیاری . سال ۱۳۷۵ .

۹- ایمونولوژی بالینی- از انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران- ترجمه ، زیر نظر اعضاء هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و تهران آقای دکتر عبدالحسین کیهانی .