✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۸، بهار ۱۳۷۷

استفاده از لوزالمعده موش صحرایی و میمون به منظور بررسی پادتن‌های ضد جزایر لانگرهانس در بیماران مبتلا به دیابت

● طاهره موسوی، ● عبدالفتاح صراف‌نژاد، ● مژده همت‌یار، ● باقر مینائی ● زهره جدلی، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

چکیده

از لوزالمعده موش صحرایی و میمون به دو روش Frosen section و Parqffin - embe dding مقطع‌گیری شده و به منظور ردیابی پادتن‌های ضد جزایر لانگرهانس و با روش ایمونو فلورسانس غیر مستقیم استفاده شده است. این آزمون بر روی سرم ۶۰ بیمار مبتلا به دیابت، ۱۰ نفر از وابستگان نزدیک آنها (خواهر یا برادر) و ۲۱ نفر از افراد سالم به عنوان کنترل انجام گرفت. علاوه بر این در نمونه‌هایی که از نظر وجود اتوپادتن مثبت بودند تیتر پادتن نیز تعیین گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که اولاً تفاوت کیفی بین لوزالمعده موش صحرایی و میمون وجود ندارد، ثانیاً مقطع‌گیری با روش پارافین بسیار مناسب‌تر است و ثالثاً انجام آزمون با حساسیت ۹۶٪ و ویژگی ۶۵٪ روش ارزشمندی در تشخیص بیماران مبتلا به دیابت وابسته به انسولین (IDDM) است.

مقدمه

بیماری دیابت ملی‌توس و ابسته به انسولین (Insulin dependent Diabetes Mellitus) از شایع‌ترین بیماریهای اندوکرین در دوران کودکی و نوجوانی است. این بیماری از دسته بیماریهای خود ایمنی بوده و به دلیل تخریب سلولهای بتای پانکراس و بوسیله عملکرد سیستم ایمنی بوجود می‌آید. در تخریب این سلولها هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولی و هومورال دخالت دارند. از بین پادتن‌های مختلفی که در روند این بیماری تولید می‌شوند. پادتن‌های ضد سلولهای جزایر حائز اهمیت هستند. این پادتن‌ها در بیش از ۶۰٪ از بیماران تازه تشخیص داده شده یافت می‌شوند (۱۲). شیوع این پادتن‌ها ۲ تا ۵ سال پس از تشخیص بیماری به کمتر از ۲۰٪ می‌رسد و پس از پیوند پانکراس دوباره پدیدار می‌شود (۳).

عقیده بر این است که به علت بروز ژنهای کلاس دو سازگاری نسجی، بعلل مختلف و ناشناخته، از جمله حضور ویروسها، در سطح سلولهای بتای مولد انسولین، این سلولها از حالت خودی خارج شده و باعث شروع روند خود ایمنی می‌شوند (۱۲ و ۱).

به منظور ردیابی اتوپادتن‌ها ضد جزایر لانگرهانس در سرم، با روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، از پادگنهای بافت سالم به عنوان منبع پادگن استفاده می‌شود. از آنجاکه این بافتها بایستی تا حد امکان دست نخورده و طبیعی باشند، یکی از روشهای مقطع‌گیری از آنها، استفاده از برشهای Cryostate می‌باشد (۵). روش دیگر تهیه سوبسترا یا برشهای بافتی، مقطع‌گیری از بافت قالب‌گیری شده در پارافین است.

معمولاً از لوزالمعده انسان، موش صحرایی، خوکچه هندی و میمون در این موارد استفاده می‌شود. ولی اختلاف کیفی قابل توجهی بین این گونه‌ها از نظر آزمون ایمونوفلورسانس وجود ندارد (۱ و ۶). در این تحقیق از لوزالمعده موش صحرایی و میمون برش‌گیری به عمل آمد و مشخص شد که استفاده از برشهای تهیه شده با روش پارافین، کیفیت بهتری در انجام آزمون دارند. علاوه بر این هزینه تهیه برشهای فریز شده بیشتر و نگهداری آنها نیز مشکل‌تر است.

مواد و روشها

سرمها

نمونه‌های سرمی مورد آزمایش شامل ۶۰ نمونه از سرم بیماران مبتلا به دیابت ملی‌توس وابسته به انسولین است که در درمانگاه تخصصی غدد تشخیص داده شده‌اند. به عنوان مقایسه سرم ۱۰ نفر از وابستگان نزدیک (خواهر یا برادر) این بیماران و همینطور ۲۱ نمونه از سرم افراد سالم نیز در شرایط یکسان مورد آزمایش قرار گرفتند.

تهیه برشهای بافت پانکراس

از بدن تعدادی موس صحرایی نوزاد و سالم، و همینطور یک میمون سالم، پس از اتوپسی بافت لوزالمعده خارج شده و پس از شستشوی مقدماتی در نرمال سالین خنک، با دو روش Paraffin embedding و Cryostat برش‌گیری به عمل آمد. برشهای تهیه شده از روش دوم را بلافاصله روی لام قرار داده و در ظروف مناسب در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار دادیم. برشهای تهیه شده با روش پارافین که قبلاً به روش بوان فیکس شده‌اند را می‌توان در حرارت آزمایشگاه یا یخچال معمولی نگهداری کرد.

آزمون ایمونوفلورسانس غیر مستقیم

قبل از انجام تست، تمام لامهای تهیه شده با روش پارافین، به طریق مرسوم پارافین‌زدایی می‌شوند. لامهای منجمد نیز از فریزر خارج شده و به دمای آزمایشگاه رسانده می‌شوند.

به منظور خنثی شدن پادتن‌ها ضد انسولین، سرمهای مورد آزمایش را به مدت ۰/۵ ساعت در مجاورت ۱۰۰ واحد انسولین انکوبه کردیم تا از بروز واکنشهای متقاطع جلوگیری به عمل آید.

از تمام نمونه‌های سرمی رقتهای متوالی تهیه شده و از (FITC - conjugated rabbit anti human IgG) ساخت شرکت داکو نیز رقت مناسب کار تهیه شد. در هر سری آزمون ایمونوفلورسانس غیر مستقیم که بر روی رقتهای مختلف سرم بیماران انجام می‌گیرد، با روش مشابه، سرم وابستگان نزدیک آنها، سرم کنترل سالم و یک نمونه با فرفسفات سالین نیز به عنوان کنترل منفی مورد آزمون قرار می‌گیرند تا وجود واکنشهای غیر اختصاصی کنترل شوند.

نتایج

سرم خون نمونه‌های مربوط به بیماران، وابستگان نزدیک آنها و همچنین افراد سالم به عنوان شاهد، پس از خون‌گیری جدا شده و در آزمایشگاه با روش ذکر شده

جدول شماره ۱- نتایج حاصل از آزمون ایمونوفلورسانس غیر مستقیم بر روی سرم خون گروههای مختلف

ردیف	گروه	مدت ابتلاء به بیماری	درصد موارد مثبت	درصد کل
۱	بیماران مبتلا به دیابت	در مرحله تشخیص	۱۲/۸	۶۶
۲	بیماران مبتلا به دیابت	کمتر از دوازده ماه	۱۸/۱۶	۸۸
۳	بیماران مبتلا به دیابت	۲۴-۱۲ ماه	۱۱/۶	۵۴
۴	بیماران مبتلا به دیابت	بیش از ۲۴ ماه	۱۹/۵	۲۶
۵	خویشاوندان درجه اول	-	۱۰/۱	۱۰
۶	افراد سالم	-	۲۱/۱	۴

مورد آزمون قرار گرفت. در نمونه‌هایی که از نظر وجود پادتن ضد سلولهای جزایر، مثبت بودند، مجدداً پس از تهیه رقتهای متوالی، عیار پادتن تعیین و سپس در جداول درجه‌بندی و ثبت گردید.

در جدول شماره ۱ نتایج حاصل از تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم بر روی تمام نمونه‌های سرمی، با توجه به مدت ابتلاء آنها به دیابت نشان داده شده است. این آزمون به طور همزمان بر روی برشهای منجمد و همینطور تهیه شده به روش پارافین که از لوزالمعده نوزاد موش صحرایی و میمون تهیه شده بود، انجام شد.

نتایج حاصل از بررسی پادتن‌ها در بیمارانی که کمتر از ۲۴ ماه از شروع بیماری آنها می‌گذرد در مقایسه با جمعیت شاهد، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه می‌باشد ($P\leq ۰/۰۱$).

حساسیت و ویژگی این تست در بیماران فوق‌الذکر به ترتیب ۹۶٪ و ۶۴/۵٪ می‌باشد. در مورد بیمارانی که بیش از ۲۴ ماه از شروع بیماری آنها می‌گذرد، مقایسه نتایج اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان نمی‌دهد ($P\leq ۰/۰۱$).

در نمودار شماره ۱ چگونگی توزیع موارد مثبت و منفی در بیماران، برحسب مدت ابتلا آنها به بیماری نشان داده شده است. همیطور نمودار شماره ۲ نشان دهنده چگونگی توزیع تیترهای مختلف پادتن در بیماران تازه تشخیص داده شده ($n=۳۰$) در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد.

بحث

دیابت ملی‌توس وابسته به انسولین یکی از بیماریهای خود ایمنی انسان است که بدنبال یک پاسخ آماسی در پانکراس (انسولیت) و ایجاد نوعی تغییر در سطح سلولهای بتا بوجود می‌آید (۳).

این دگرگونی‌ها باعث تبدیل سلولهای بتای جزایر از حالت خودی (Self) به بیگانه (Non self) می‌شود (۳). طی دوره پیشرفت بیماری تعدادی پادتن از جمله، پادتن‌ها ضد انسولین، پادتن‌ها ضد پروتئین - (Anti 64 (GAD و پادتن‌ها ضد سلولهای جزایر (Island cell antibodies. ICA) تولید می‌شود (۸، ۹ و ۱۰).

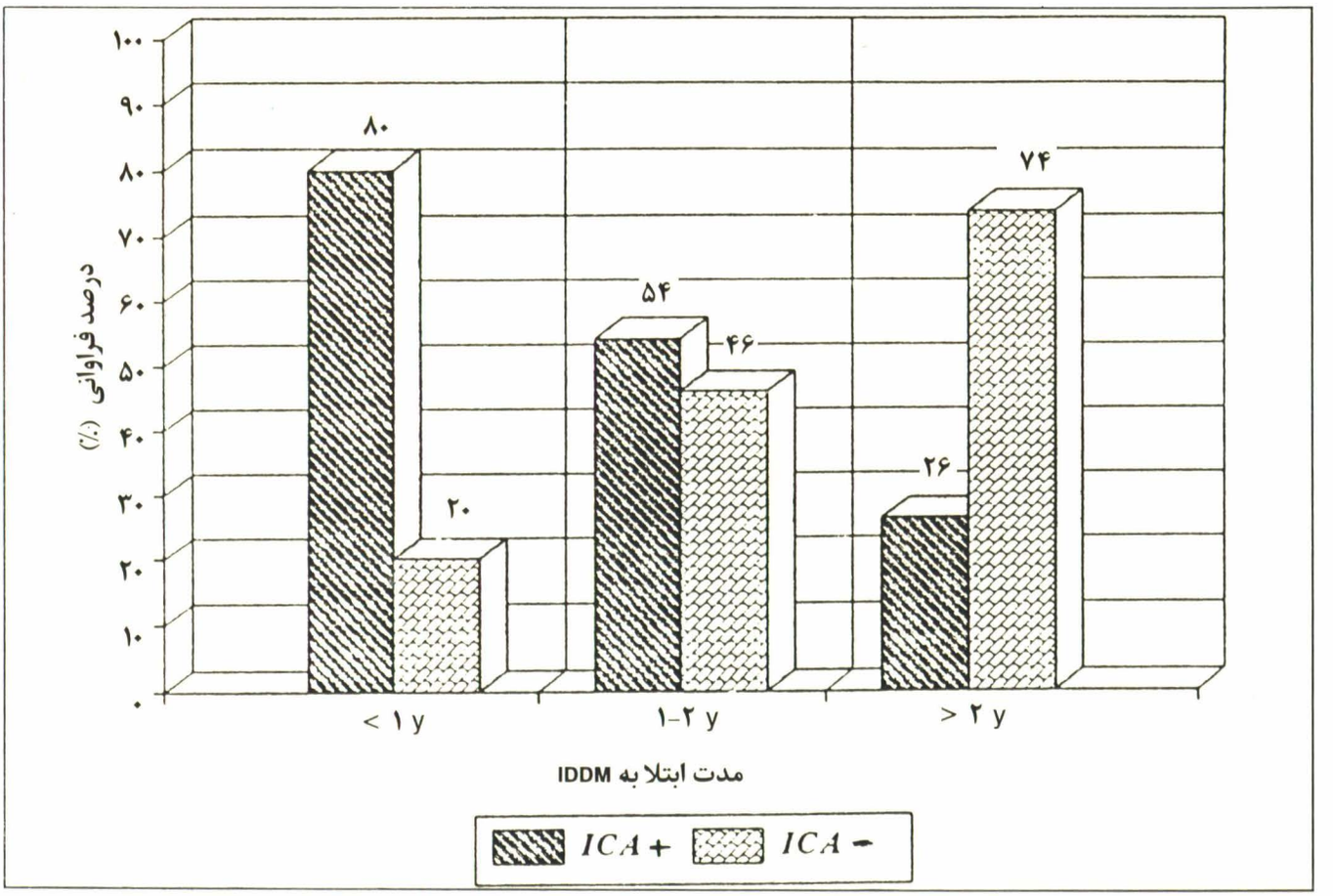
ردیابی پادتن‌ها ضد جزایر، جهت بررسی سیر درمان با داروهای مهار کننده ایمنی و پیگیری پاسخهای ایمنی پس از پیوند پانکراس یا سلولهای جزیره‌ای، بسیار مفید است (۲).

پادتن‌ها ضد جزایر به دو نوع ضد سیتوپلاسمی و سطحی جزایر دیده می‌شوند که ممکن است به تنهایی و یا بطور همزمان در خون بیمار ظاهر شوند. در تستهای بالینی، ردیابی پادتن‌ها سیتوپلاسمی جزایر به دلیل سهولت انجام کار شایع‌تر است.

به منظور ردیابی این پادتن‌ها می‌توان از پانکراس حیوانات مختلف از جمله میمون، موش صحرایی و خوکچه هندی استفاده کرد. برای تهیه سوبسترا یا برشهای بافتی نیز می‌توان از مقاطع فیکیس نشده کرایوستات و یا از فرم قالب‌گیری شده در پارافین استفاده کرد (۴). در بررسی انجام شده، انجام آزمون ایمونوفلورسانس با استفاده از پانکراس موش صحرایی نوزاد و با روش پارافین بهترین کیفیت را داشت و به همین دلیل تمامی تستها با این روش پی‌گیری و انجام شد.

از آنجاکه با روش فوق هم اتوانتی بادیهای ضد انسولین و هم اتوپادتن‌ها ضد سلولهای جزایر وارد واکنش می‌شوند، به منظور خنثی کردن پادتن‌ها ضد انسولین، نمونه‌های سرمی را قبل از انجام آزمون با انسولین جذب کردیم. در این بررسی برای افزایش حساسیت تست، مدت زمان انکوباسیون را تا ۴۵ دقیقه افزایش دادیم.

نمودار شماره ۱- چگونگی حضور پادتن ضد جزایر در سرم افراد مبتلا به IDDMبر حسب مدت ابتلاء به بیماری



نتایج نشان می‌دهد که بین درصد مثبت بودن پادتن‌ها ضد سلولهای جزایر و مدت ابتلاء به‌بیماری ارتباط معکوس وجود دارد.

این موضوع ممکن است به دلیل از بین رفتن سلولهای جزایر و حذف عامل محرک سیستم ایمنی باشد.

از آنجاکه ردیابی پادتن‌ها جزایر برای تشخیص بیماری دیابت تیپ یک و قبل از شروع علائم بالینی در خویشاوندان درجه اول بیماران و همینطور تشخیص افتراقی دیابت وابسته و غیروابسته به انسولین و بررسی سیر درمان با مهار کننده‌های ایمنی ارزشمند می‌باشد، انجام آن به عنوان یک تست روتین آزمایشگاهی همیشه مورد توجه بوده است.

سپاسگزاری

از آقای دکتر سیدمحمد شریعت پناهی، آقای دکتر اکبر عبداللهی، آقای دکتر بهروز نیک‌بین و خانم ناهید اسدی که در انجام این تحقیق ما را همیاری و راهنمایی کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Banatvaia J.E., 1987, Insulin dependent diabetes mellitus: Coxackie B viruses revisited. prog med. virol.: 34: 3.

2- Bizzaro A. et al. 1988. Effect of a prednisone and azathiaprine treatment on patient with impaired glucose tolerance. Diabetes res. clin. pract. 5 (suppl. 1) S 181.

3- Delprete G.F., 1977. Incidence and significance of islet cell autoantibodies in different types of diabetes mellitus. Diabetes 26: 909.

4- Debersen M.G. et al. 1979, Detection of Abs to islet cells and insulin with paraffin embedded pancreas as antigen. Lancet no 17: 1078.

5- Johnson G.D., 1978. Immuno-fluorescence techniques in: Hand book of experimental immunologg (3rd ed.), Blackwell scientific pu.

6- Kerpma Immunchemistry Labfax. Bios scientific publisher, 1977.

7- Kobayashi, 1986. The prevalence of islet cell antibodies in Japanes IDDM patients by indirect immunoflurescence., Diabetes 35: 335.

8- Naughton G.K. 1983, Detection of Abs to melanocytes in vitiligo by specific immunoprecipitation I. Invest. Dermatol. 81: 340.

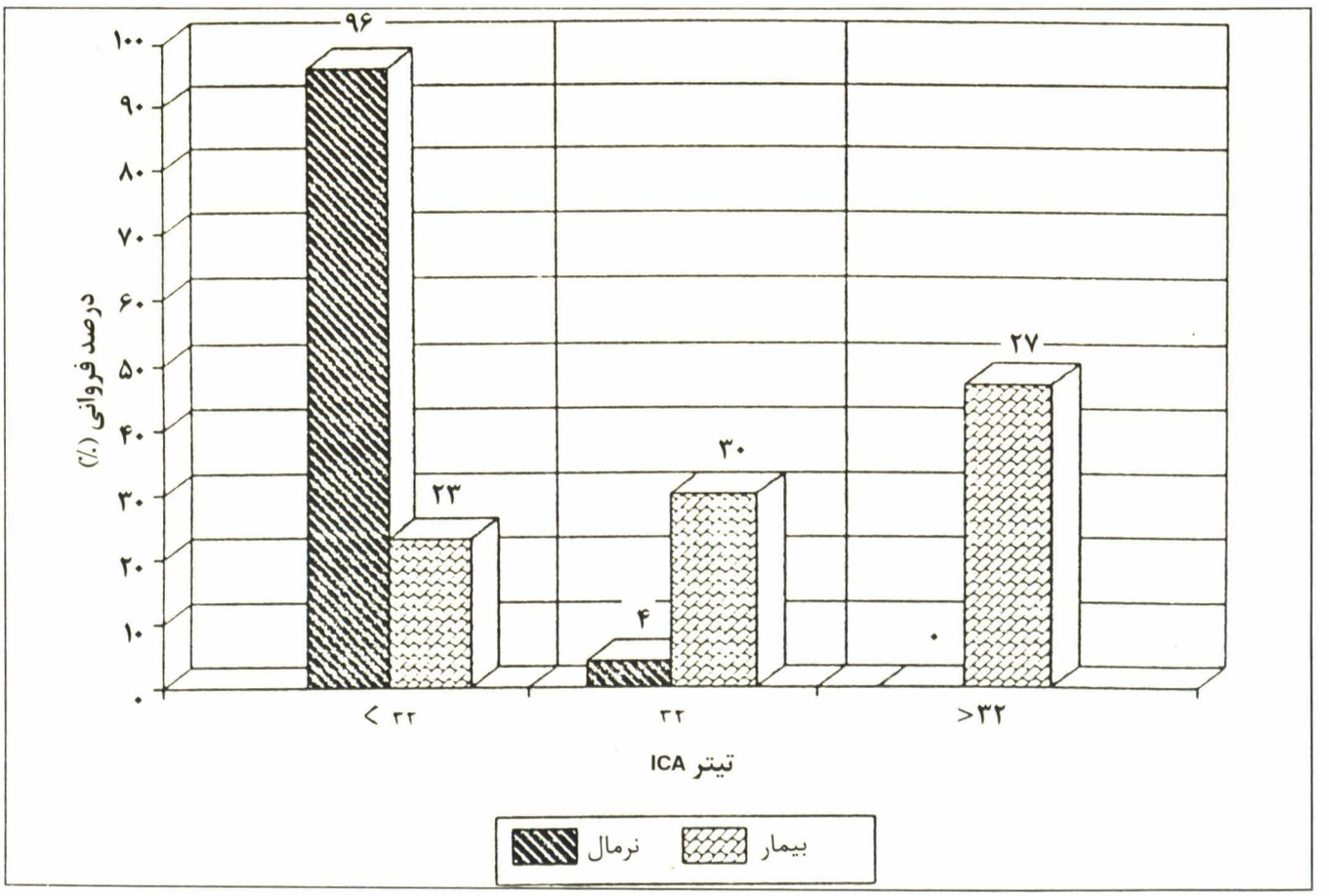
9- Plamer I.P. 1983. Insulin Abs in insulin dependent diabetes before treatment. Science 22: 1337.

10- Picherc C., 1988. The antogeny of islet cell antibodies in IDDM children. Immunology of diabetes, IX international workshop.

11- Wison I.D., Textbook of endocrinology (8th ed.) W.B. Saunders, 1992.

12- Wison I.D., 1994. Harrison's prinsiples of internal medicine (13th ed.) McGraw Hill.

نمودار شماره ۲- چگونگی توزیع پادتن ضد جزایر در افراد سالم و بیماران تازه تشخیص داده شده مبتلا به IDDM (n = ۳۰) و مدت ابتلاء کمتر از یکسال)



ش ۳۸/ب ۷۷