عنوان : ارائه یک روش جدید مهار آنزیمی برای تشخیص دیابت نوع اول

نویسنده : دکتر منوچهر مصری پور (عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد آسلامی واحد خوراسگان)

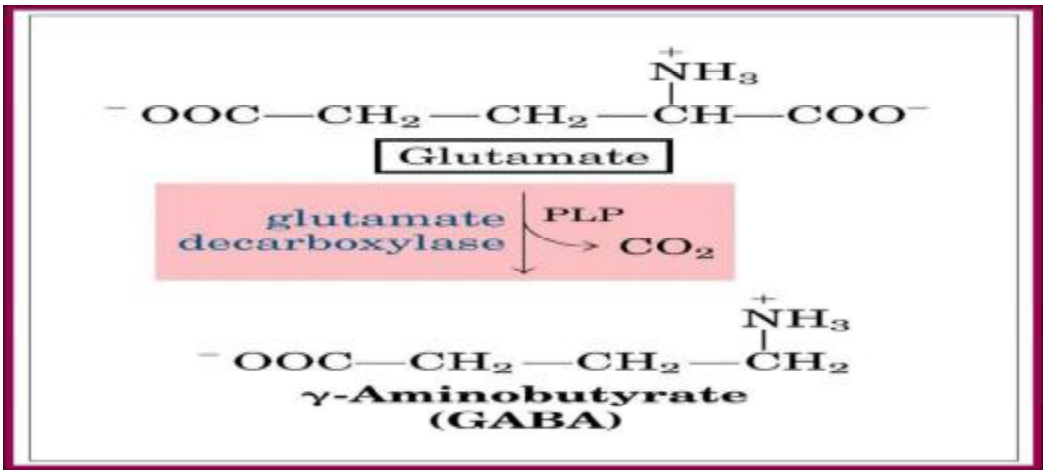
چکیده : دیابت نوع اول یا دیابت وابسته به انسولین بعنوان یک بیماری خودایمنی شناخته شده است. در این بیماری سلول های بتای پانکراس بطور پیشرونده معدوم می شوند. انزیم گلوتامات دکربوکسیلاز که یکی از پروتئین های غشائی سلول های بتای پانکراس است نقش یک اتوآنی ژن را در بیماری دیابت نوع اول بازی میکند و قبل ازانکه بیماری بصورت حاد بروز نماید باعث تولید اتوآنتی بادی بر علیه سلول های بتای پانکراس می شود.. کر چه شباهت ساختمانی بین آنزیمهای انسانی و رات بخوبی شناخته شده است ولی گزارش قابل توجهی در مورد واکنش های ایمنولوژیکی آنزیم جدا شده از مغز رات و آنتی سرم بیماران دیابتی انتشار نیافته است. لذا این پروژه با این هدف طراجی شد تا اثر سرم بیماران دیابتی بر فعالیت انزیم گلوتامات دکربوکسیلاز خالص از مغز رات را مورد بررسی قرار دهد. ابتدا مغز رات در بافر25 میلی ملار فسفات (pH=7) حاوی پریدوکسال فسفات هموژن گردید و سوپرناتانت حاصل و آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز با روش های کرماتوگرافی خالص گردید. سپس فعالیت ویژه آنزیم در حضور نمونه سرم بیمار شناخته شده مبتلا به دیابت نوع اول و افراد سالم اندازه گیری شد. اضافه نمودن سرم بیمار به مخلوط آنزیم/ سوبسترا باعث 66٪ کاهش در فعالیت ویژه آنزیم گردید در حالیکه اضافه نمودن سرم کنترل تغیر قابل ملاحظه ای در فعالیت آنزیم ایجاذ نکرد. علت کاهش فعالیت ویژه آنزیم پس اضافه نمودن سرم بیمار را میتوان اینگونه تفسیر نمود که احتمالا اتوآنتی بادی های ضد انزیم گلوتامات دکربوکسیلاز موجود در سرم بیمار فعالیت آنزیم را مهار نموده است.

کلید واژه ها: دیابت نوع اول - گلوتامات دکربوکسیلاز - بیماری خودایمنی – فلوریمتری - اتوآنتی بادی

مقدمه

بیماری قند یا دیابت نوعی اختلال در سوخت و ساز است که به علل مختلف تظاهر می کند که ممکن است با فقدان کامل انسولین و یا با درجات مختلف از کمبود انسولین یا عدم پاسخ به انسولین همراه باشد . نبود کامل انسولین که در کودکان و نوجوانان بروز می کند به دیابت وابسته به انسولین ویا دیابت نوع اول نامگذاری شده است. کمبود انسولین یا عدم پاسخ به انسولین دیابت غیر وابسته به انسولین یا دیابت نوع دوم نام دارد که بیشتر از 85 درصد کل بیماران دیابتی را تشکیل می دهد. در این نوع دیابت، زمینه ارثی عامل مهمی در بروز علائم بیماری تلقی می شود .علاوه بر این در فرادی که زمینه ارثی بیماری را داراند، رژیم غذائی می تواند در پیشرفت بیماری نقش داشته باشد(1).

دیابت نوع اول یا دیابت وابسته به انسولین بعنوان یک بیماری خودایمنی شناخته شده است. در این بیماری سلول های بتای پانکراس بطور پیشرونده معدوم می شوند(2). گزارشات انتشار یافته حاکی از آن است که انزیم گلوتامات دکربوکسیلاز که یکی از پروتئین های غشائی سلول های بتای پانکراس است نقش یک اتوآنی ژن را در این بیماری بازی میکند و قبل ازانکه بیماری بصورت حاد بروز نماید باعث تولید اتوآنتی بادی بر علیه سلول های بتای پانکراس می شود. این آنزیم واکنش تبدیل گلوتامات به میانجی شیمیائی گابا را در نرونهای مغز کاتالیز می کند(3). تا کنون دو ایزوفرم با وزن مولکولی متفاوت (65 و67 کیلو دالتون) از این آنزیم گزارش شده است که هر دو نوع هم در بافت مغز و هم در سلول های بتای پانکراس سنتز می شود ولی سنتز نوع 65 کیلودالتونی آن بیشتر در سلول های بتای پانکراس مشاهده شده است(4). کر چه شباهت ساختمانی بین آنزیمهای انسانی و رات بخوبی شناخته شده است ولی گزارش قابل توجهی در مورد واکنش های ایمنولوژیکی آنزیم جدا شده از مغز رات و آنتی سرم بیماران دیابتی انتشار نیافته است. لذا این پروژه با این هدف طراجی شد تا اثر سرم بیماران دیابتی بر فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز خالص از مغز رات را مورد برسی قرار دهد.



روش ها:

ابتدا مغز رات در بافر25 میلی ملار فسفات (pH=7) حاوی پریدوکسال فسفات هموژن گردید و با دور 70000 در دقیقه در دمای 4 درحه سانتیکراد سانتریفوژ گردید.

سوپرناتانت حاصل بترتیب از سه ستون کرماتوگرافی حاوی DEAE-Cellulose هیدروکسی آ پاتایت و ژل(Sephadex 200) فیلتراسیون عبور داده شد(6) . غلظت پروتئین درترکیبات عبور یافته از هر مرحله کرماتوگرافی به منظور ارزیابی پیشرفت تخلیص آنزیم در هر مرحله باروش اسپکتروفتومتر در طول280نانومتر و با روش لوری اندازه گیری شد(7) و فعالیت ویژه آنزیم هر مرحله خالص سازی با دو روش مانومتری وفلوریمتری اندازه گیری شد(8). سپس فعالیت ویژه آنزیم خالص شده (نمونه استخراج شده مرحله نهائی کرماتوگرافی) در حضور نمونه سرم بیمار شناخته شده مبتلا به دیابت نوع اول (تعداد=21نفر) و افراد سالم (تعداد=21نفر) با دو روش مانو متری و فلوریمتری اندازه گیری شد.

نتایج و بحث:

فعالیت ویژه آنزیم خالص شده حدود 140برابر فعالیت ویژه آنزیم در سو پرناتانت تهیه شده از مغز بود . اضافه نمودن سرم بیمار به مخلوط آنزیم/ سوبسترا باعث 66٪ کاهش در فعالیت ویژه آنزیم گردید در حالیکه اضافه نمودن سرم کنترل تغیر قابل ملاحظه ای در فعالیت آنزیم ایجاذ نکرد (جدول 1) .

جدول 1: مقایسه اثر سرم بیماران مبتلا به دیابت نوع اول وافراد سام بر فعالیت ویژه انزیم گلوتامات دکربوکسیلازمغز رات

Serum samples	*Manometeric assay*	*Fluorimeteric assay*
	% of Inhibition	*% of Inhibition*
IDDM serum	*59(9)**	*66(1)**
Control serum	*7(6)*	*7(5)*

فعالیت آنزیم با دو روش مانومتری وفلوریمتری اندازه گیری شد.غلظت پروتئین با روش لوری اندازه گیری شد. $p<0.005$ * تغیرات در مقایسه با نمونه سرم کنترل با معی است .

علت کاهش فعالیت ویژه آنزیم پس اضافه نمودن سرم بیمار را میتوان اینگونه تفسیر نمود که احتمالا اتوآنتی بادی های ضد انزیم گلوتامات دکربوکسیلاز موجود در سرم بیمار مانع تشکیل مجموعه انزیم/سوبسترا شده است که منجر به مهار فعالیت آنزیم شده است(66٪). از آنجا که روش فلوریمتری یک روش حساس و واکنش های آنزیمی کاملا اختصاصی هستد - کاربرد آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز خالص شده از مغز رات بعنوان یک روش کاربردی برای تشخیص دیابت نوع اول توصیه می شود.

منابع :

1- American Diabetes Association (1995). Office guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes Care (suppl. 18), 1, 4-7

2- Backkeskov S. Neiles JH. Marner B. Bile T. Ludvigsson J. Lernmark A. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children, Immunoprecipitate human pancreatic Islet cell. Nature, 298, 167-169

3- Maclren NK. Schatx DS. Drash A. Graves G. (1988). Initial pathogenenic events in IDDM. Diabetes, 38, 534-638

4- Todd JA. (1990). Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. Immonol. Today, 11, 122-127

5- Christie MR. Peipeleers DG. Lemmark A. Backkeskove S. (1989). Cellular and subcellular localization of an M64000 protein autoantigens in insulin dependent diabetes. J. Biol. Chem. 256, 376-381

6- Clare-Salzier MJ. Tobin AJ. Kaufman DL. (1992). Glutamate decarboxylase an autoantigen in IDDM. Diabetes Care, 15, 132-133

7- Erdo SL. Wolff JR. (199). Gama aminobutric acid outside the mammalian brain. J. Neurochem. 54, 363-372

8- Ding-Fang BU. Erlander MG. Benjiamin C. (1992). Two human glutamate decarboxylase 65Kda and 67 Kda are each encoded by a single gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 2115-2119.