

تعیین سطح آنتی بادی ضد پروتئین شوک حرارتی -۶۰ (Hsp60) انسان

در بیماران دیابتی نوع ۱

دکتر امراله مصطفی‌زاده^{۱*}، دکتر محمدباقر اسلامی^۲، دکتر نانت اشلوت^۳، دکتر پژمان حنفی مقدم^۴، دکتر هوبرت کلب^۴

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران ۳- محقق مرکز

تحقیقات دیابت دوسلدورف آلمان ۴- استاد گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات دیابت دوسلدورف آلمان

سابقه و هدف: دیابت ملیتوس نوع ۱ بیماری مزمن غده پانکراس و حاصل تخریب واکنش‌های خود ایمنی سلول‌های بتا تولید کننده انسولین می‌باشد. واکنش‌های ایمنی مدت‌ها قبل از بروز تظاهرات بالینی بیماری شروع می‌شود. از این رو یافتن مارکر نشان دهنده شروع واکنش‌های خود ایمنی از ارزش خاصی برخوردار است. از آنجائیکه آنتی ژن شوک حرارتی - ۶۰ (Hsp60) از آنتی ژن‌های مطرح در دیابت نوع ۱ می‌باشد بر آن شدیم تا کلاس‌ها و زیر کلاس‌های مختلف آنتی‌بادی ضد این مولکول را بعنوان مارکر ایمونولوژیک برای پیش‌بینی ابتلا به دیابت نوع ۱ مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روشها: در این مطالعه ۴۹ بیمار تازه مبتلا شده به دیابت نوع ۱، ۵۰ فرد سالم، ۲۳ نفر از بستگان بیماران با احتمال بالا و ۲۲ نفر با احتمال پائین ابتلا به بیماری شرکت داشته‌اند. از ۱۷ بیمار و ۱۵ فرد سالم سه ماه بعد مجدداً خونگیری بعمل آمده و نمونه سرم تهیه شد. سرم‌ها تا روز انجام آزمایش در ۲۰°C- نگهداری شده و سطح سرمی آنتی بادی توتال، IgA، IgG، IgG1، IgG4 اختصاصی Hsp60 توسط تکنیک Elisa اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین آنتی بادی توتال در بیماران $182/8 \pm 218/5$ Au/ml بوده در حالیکه این میانگین در گروه کنترل $142/5 \pm 146/6$ Au/ml می‌باشد ($p > 0/05$). افزایش معنی‌داری در سطح آنتی بادی توتال ضد hsp60 در فاصله زمانی سه ماه در بیماران دیده نشده است. بین غلظت آنتی بادی توتال ضد Hsp60 در دو گروه بستگان بیماران با احتمال ابتلای بالا ($82/6$ Au/ml) و بستگان بیماران با احتمال ابتلای پائین ($133/4$ Au/ml) اختلاف معنی‌داری وجود دارد اما ارتباط هیچیک از دو گروه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. هیچ یک از گروه‌های مورد مطالعه در میانگین آنتی‌بادی ضد Hsp60 از کلاس‌های IgA، IgG، و زیر کلاس‌های IgG1 و IgG4 اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

نتیجه‌گیری: آنتی بادی ضد Hsp60 به میزان قابل توجهی در بیماران دیابتی نوع ۱ و افراد سالم بصورت خودبخودی تولید می‌گردد. این آنتی بادی از دسته آنتی بادی‌های طبیعی بوده که نقش اساسی در پاتوژنز دیابت نوع ۱ ندارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین شوک حرارتی -۶۰ (Hsp60)، دیابت نوع ۱، آنتی‌بادی، الیزا.

مقدمه

پروتئین شوک حرارتی -۶۰ (Heat shock protein 60) به خانواده‌ای از پروتئین‌های استرس تعلق دارند که دارای وزن مولکولی ۶۰ کیلو دالتون هستند. علاوه بر Hsp60 انسان، پروتئین GroEL

باکتری اشرشیاکلی، Hsp60 کلامیدیا و Hsp65 مایکوباکتریوم نیز در این خانواده قرار دارند(۱). در انسان Hsp60 در میتوکندری و سطح سلول‌ها وجود دارد. نقش اصلی آن تعیین آرایش فضائی

و نمونه سرم تهیه شد. سطح سرمی آنتی بادی توتال بر ضد Hsp60 انسان و همچنین آنتی بادی از کلاسهای IgG, IgG1, IgG4 بر ضد این مولکول با استفاده از روش (Enzyme linked immuno sorbent assay) تعیین شد (۶).

در آزمایشگاه پنج سیستم Elisa برای تعیین سطح سرمی آنتی بادی توتال، IgG, IgG1, IgG4, IgG ضد Hsp60 انسان پایه ریزی شد. در ابتدا سرمها از نظر آنتی بادی توتال اختصاصی Hsp60 مورد ارزیابی قرار گرفتند و نمونههای مثبت برای اندازه گیری غلظت آنتی بادی از کلاسهای IgG, IgG1, IgA, IgG4 انتخاب شدند. به این منظور میکروپلیتهای الیزا (Nunc, Denmark) با ۵/۰ میکروگرم در هر چاهک (برای پلیتهای آنتی بادی توتال و IgG) و ۵/۲ میکروگرم در هر چاهک (برای پلیتهای IgG1, IgG4, IgA) از آنتی ژن Hsp60 انسان (Stress Gen, Canada) محلول در بافر کربنات با pH=۹/۵ پوشانده شدند. پلیت ها در ۴۰°C به مدت یک شب انکوبه شدند. سپس چهار بار با بافر PBS دارای ۰/۱٪ (V/V) تونین - ۲۰ مورد شستشو قرار گرفتند. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱٪ (W/V) آلبومین سرم گاو یا شیر خشک (Sigma, Germany) در بافر PBS اضافه کرده و سپس یک ساعت در آزمایشگاه انکوبه شدند. بعد از شستشو ۵۰ میکرولیتر نمونههای سرم رقیق شده به هر چاهک اضافه شد و بعد یک ساعت روی شیکر در آزمایشگاه انکوبه شدند. بعد از ۴ بار شستشو بطور جداگانه پلیتها با آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین انسان (Sigma, Germany)، آنتی بادی ضد IgG انسان (Sigma, Germany) و آنتی IgG1 انسان (Zymed laboratories, USA) و آنتی IgG4 انسان (Pharmingen, USA) کونژوگه با آنزیم آلكالین فسفاتاز انکوبه شدند. بعد از شستشو به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای آنزیم آلكالین فسفاتاز (پارانیتروفنیل فسفات) آماده برای مصرف (Sigma, Germany) اضافه شد. بعد از ۶۰-۳۰ دقیقه، واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۲۵ میکرولیتر محلول سود ۳ نرمال متوقف و میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Titertek multiscan UK) تعیین شد، غلظت آنتی بادیهای مورد مطالعه برحسب واحد (Arbitrary unite, Au) از Au/ml از منحنیهای استاندارد مربوط به هر آنتی بادی محاسبه شد.

پروتئینها است. از نظر فیلوژنی Hsp60 انسان قرابت ساختمانی زیادی با Hsp60 میکرواورگانسیم دارد و بخاطر این قرابت بالا خصوصیات آنتی ژنیک مشابهی نیز دارند. بنابراین مولکول Hsp60 بعنوان آنتی ژنی در نظر گرفته می شود که نقش مهمی را در پاتوژن بیماری خود ایمنی از جمله دیابت نوع ۱ بازی می کند (۲).

درمدل موش NOD (Non-obese Diabetic) شواهد قانع کننده ای مبنی بر نقش پاسخ لنفوسیت های T به آنتی ژن Hsp60 باکتری و Hsp60 انسان در پاتوژن دیابت نوع ۱ وجود دارد (۳). تزریق پیتیدی از مولکول Hsp60 انسان که شامل اسیدهای آمینه شماره ۴۶۰-۴۳۷ می باشد و پیتید ۲۷۷ نامگذاری شده باعث کاهش نیاز به تزریق انسولین و افزایش سطح پیتید C- در خون مبتلایان به دیابت نوع ۱ شده است (۴) این پیتید باعث تغییر فعالیت لنفوسیت Th1 به Th2 می شود (۵). در حالیکه مطالعات زیادی در زمینه نقش واکنش ایمنی سلولی به Hsp60 انسان در مبتلایان به دیابت نوع ۱ انجام شده است (۵-۳) پاسخ ایمنی هومورال به این آنتی ژن بطور وسیع مطالعه نشده است. در مطالعه حاضر پاسخ آنتی بادی به مولکول Hsp60 انسان در سطح آنتی بادی توتال، IgG، IgA و زیر کلاسهای IgG1 و IgG4 مورد ارزیابی قرار گرفت، به این امید که شاید بتوان از آنها بعنوان مارکرهایی برای پیش بینی زمان بروز بیماری دیابت نوع ۱ استفاده کرد.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی ۴۹ بیمار تازه مبتلا شده به دیابت نوع ۱ (۲۲ زن، ۲۷ مرد با میانگین سنی ۲۸/۹ سال)، ۲۲ نفر (۲۲ زن و ۱۰ مرد با میانگین سنی ۲۶/۹ سال) از بستگان بیماران که در آنها احتمال ابتلا به بیماری دیابت نوع ۱ (براساس منفی بودن آزمایشهای IA-2, GAD65, ICA) پائین است، ۲۳ نفر (۱۶ زن، ۷ مرد با میانگین سنی ۱۵/۱ سال) از بستگان بیماران که در آنها احتمال ابتلا به بیماری دیابت نوع ۱ بالا است، انجام شد. از همه افراد خونگیری بعمل آمد و سرمهای تهیه شده تا هنگام انجام آزمایش در ۲۰°C نگهداری شد. از ۱۷ بیمار (۹ زن و ۸ مرد با میانگین سنی ۳۱/۱ سال) و همچنین از ۱۵ فرد سالم (۷ زن و ۸ مرد با میانگین سنی ۲۷/۳ سال) سه ماه بعد مجدداً خونگیری بعمل آمده

۱ میزان آنتی بادی توتال ضد Hsp60 برای هر نمونه سرم را نشان می دهد. خط وسط منحنی نشان دهنده میانگین غلظت است. میانگین آنتی بادی توتال ضد Hsp60 در افراد با احتمال پائین ابتلا به بیماری دیابت نوع ۱۳۳/۴ Au/ml بیشتر از افراد با احتمال بالا ابتلای بیماری (۸۳/۶ Au/ml) است ($p=0/03$). تفاوت معنی داری در سطح کلاسها و زیر کلاسهای مختلف آنتی بادی Hsp60 در بین گروههای مختلف مورد مطالعه دیابت دیده نشده است.

داده ها با استفاده از روش آماری Kruskal-Wallis H-test تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

جدول ۱ میانگین غلظت آنتی بادی توتال و آنتی بادی بر ضد Hsp60 از کلاس های IgG4, IgG1, IgA, IgG در گروههای مختلف مورد مطالعه دیابت نوع ۱ را نشان می دهد. همچنین نمودار

جدول ۱. میانگین (انحراف معیار) سطح سرمی آنتی بادی (توتال، IgG, IgA, IgG1, IgG4) اختصاصی

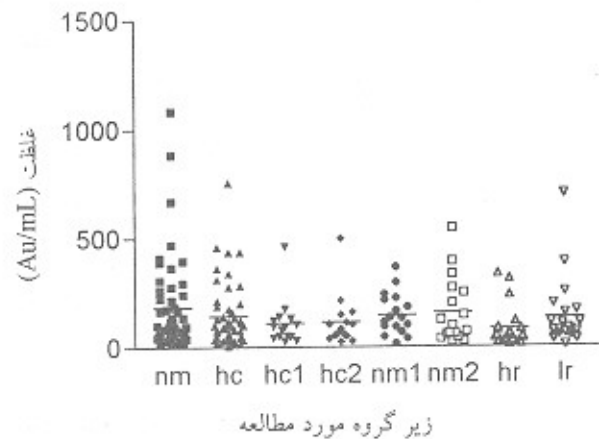
آنتی ژن Hsp60 در گروههای مختلف دیابت نوع ۱ و کنترل سالم

IgG4	IgG1	IgG	IgA	توتال	میانگین آنتی بادی (انحراف معیار)
(Au/ml)	(Au/ml)	(Au/ml)	(Au/ml)	(Au/ml)	گروه
۳۲۳/۳۷	۳۰۰/۴۹	۱۱۴/۸۲	۶۲۸/۰۳۷	۱۸۲/۲۸	بیماران تازه مبتلا شده
(۷۲۷/۰۳)	(۳۸۹/۰۴)	(۱۴۸/۸۲)	(۵۴۵/۶۱)	(۲۱۸/۴۷)	
۲۰۲/۲	۲۳۷/۸۹	۱۷۴/۲۱	۲۲۷/۴۵۰	۱۴۲/۴۵	کنترل سالم
(۳۰۹/۷۲)	(۱۹۷/۲۲)	(۱۷۲/۷۹)	(۱۷۰/۰۹)	(۱۴۶/۶۲)	
۳۷۲/۶۲	۱۸۰/۹۵	۶۷/۹۳	۵۸۶/۶۸	۱۴۵/۳۹	بیماران تازه مبتلا (ویزیت اول)
(۹۰۷/۹۶)	(۱۷۵/۴۳)	(۶۶/۶۸)	(۵۰۲/۵۷)	(۹۵/۰۳)	
۱۱۳/۲۵	۳۶۰/۸۳	۶۹/۱۱	۶۷۳/۸۱	۱۵۷/۴۹	بیماران تازه مبتلا (ویزیت دوم)
(۱۹۰/۷۲)	(۴۱۲/۶۲)	(۶۳/۶۲)	(۴۹۹/۷۲)	(۱۵۰/۴۱)	
۵۹/۹۴	۱۶۳/۲۱	۷۴/۶۸	۸۷۸/۵	۱۱۰/۶۴	کنترل سالم (ویزیت اول)
(۴۶/۶)	(۶۳/۷۹)	(۷۵/۶۱)	(۸۴۹/۷۹)	(۱۰۶)	
۱۳۱/۷	۲۵۸/۱۳	۱۲۵/۷۵	۵۸۸/۷۶	۱۱۵/۹۳	کنترل سالم (ویزیت دوم)
(۱۴۵/۶۳)	(۱۶۶/۸۵)	(۸۴/۳۸)	(۳۶۳/۴۷)	(۱۱۴/۱۲)	
۸۲/۸۳	۲۳۹/۰۵	۴۸/۴۱	۶۱۱/۰۳	۱۱۳/۴۴	بستگان بیماران با احتمال ابتلا پائین
(۷۱/۴۸)	(۲۵۲/۱)	(۳۴/۵۹)	(۷۷۵/۰۹)	(۱۵۲/۵۶)	
۱۰۲/۵	۴۴۹/۹	۱۲۹/۳۲	۵۷۴/۰۳	۸۳/۵۷	بستگان بیماران با احتمال ابتلا بالا
(۱۲۵/۵۱)	(۵۷۴/۴۱)	(۱۱۳/۱۹)	(۵۳۴/۴۸)	(۸۹/۳۷)	

معنی دار آنتی بادی AD65, Hsp60 و انسولین همراه بوده است (۵). میزان آنتی بادی ضد Hsp60 در سطح کلاس IgA و زیر کلاس های IgG1, IgG4 در انسان مطالعه نشده است در این تحقیق اختلاف معنی داری در میانگین سطح آنتی بادی توتال IgG, IgG1, IgG4, IgA بین بیماران دیابتی نوع ۱ که اخیراً علائم بیماری را نشان دادند، وابستگان آنها که شانس ابتلا به بیماری بالایی داشته، بستگانی که شانس ابتلا پائین داشته اند با افراد سالم مشاهده نشده است.

همچنین اختلاف معنی داری در سطح آنتی بادی توتال، کلاسهای IgG, IgA و زیر کلاسهای IgG1, IgG4 در فاصله زمانی سه ماه وجود نداشت، بنابراین از آنتی بادی ضد Hsp60 انسان نمی توان بعنوان مارکر ایمونولوژیک برای پیش بینی زمان بروز بیماری و یا تفسیر سیر بالینی آن استفاده کرد و می توان گفت پاسخ ایمنی هومورال به آنتی ژن Hsp60 انسانی در پاتوژنز دیابت نوع ۱ نقشی ندارد. همانند این مطالعه، گروه GRAEFF MEEDER نیز عدم وجود تفاوت در میانگین سطح آنتی بادی ضد Hsp60 در دو گروه مبتلایان به دیابت نوع ۱ و افراد کنترل سالم گزارش کردند (۱۰). گروه Horvath نیز اختلاف معنی داری در سطح آنتی بادی توتال ضد Hsp60 در دو گروه تازه مبتلایان به دیابت نوع ۱ و افراد سالم مشاهده نکردند (۸).

اما برخلاف این تحقیق که آنتی بادی از کلاس و زیر کلاسهای مختلف بر علیه کل مولکول Hsp60 سنجیده شد، این گروه آنتی بادی توتال را بر علیه یک اپی توپ خاص این مولکول (اپی توپ غالب برای سلول T) تعیین نمودند و اختلاف معنی داری را گزارش کردند ($p=0.002$) و نتیجه گیری نمودند که ممکن است پاسخ ایمنی هومورال در پاتوژنز دیابت نوع ۱ دخالت داشته باشد. با توجه به این نکته که اخیراً گزارش شده است که مبتلایان به بیماری بروتون (این بیماران دارای نقص ژنتیکی اند که در نتیجه آن هیچگونه ایمونوگلوبولینی تولید نمی کنند) می توانند به دیابت نوع ۱ هم گرفتار شوند نقش پاسخ ایمنی هومورال در پاتوژنز این بیماری کم رنگ تر شده است (۹) اما می توان گفت همانند آنتی بادی ضد IA-2 و GAD-65 از آنتی بادی ضد P277 نیز می توان بعنوان مارکری برای ابتلا به دیابت نوع ۱ نام برد.



شکل ۱. سطح سرمی توتال آنتی بادی ضد HSP60 از زیر

گروه های مختلف مورد مطالعه

nm = بیمار تازه مبتلا شده	hc = کنترل سالم
hc1 = کنترل سالم ویزیت اول	hc2 = کنترل سالم ویزیت دوم
hm1 = بیمار ویزیت اول	nm2 = بیمار ویزیت دوم
hr = افراد با احتمال بالای ابتلا	lr = افراد با احتمال پایین ابتلا

بحث

نتیجه تحقیق حاضر نشان می دهد که آنتی بادی ضد Hsp60 از کلاس های IgG, IgA و زیر کلاس های IgG1, IgG4 در انسان تولید می شود. وجود این آنتی بادی در سرم می تواند با توجه به حضور باکتری اشرشیاکلی بعنوان فلور نرمال روده و سطح بالای همولوژی بین GroEL (Hsp60 اشرشیاکلی) و Hsp60 انسانی توجیه می گردد (۷).

همچنین نتیجه تحقیق حاضر بیانگر پائین تر بودن سطح آنتی بادی توتال ضد Hsp60 در افراد با احتمال بالای ابتلا نسبت به افراد با احتمال پائین ابتلا است. افراد با احتمال بالا ابتلا افرادی هستند که دارای آنتی بادی بر علیه حداقل یکی از آنتی ژن های مطرح در دیابت نوع ۱ (GAD65، انسولین، ICA) می باشند. بنابراین می توان گفت طبق نظریه رقابت آنتی ژنیک، آنتی بادی کمتری بر علیه دیگر آنتی ژن مطرح یعنی Hsp60 ساخته می شود. نتیجه مشابهی نیز گروه Cohen با تزریق P277 (پپتیدی از Hsp60 - انسان) به موشهای NOD گرفتند. به دنبال تزریق، آنتی بادی ضد پپتید P277 بطور معنی داری افزایش یافت که این افزایش با کاهش

References

1. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. Trends in immunology 2001; 22: 665-9.
2. Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, et al. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. Hypertension 1996; 36: 303-7.
3. Cohen IR, Elias D. Immunity to 60 kDa heat shock protein in autoimmune diabetes. Diab Nutr Metab 1996; 9: 229-32.
4. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, et al. β -cell function in new – onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat shock protein peptide (Diapep 277): A randomise , double blind , phase II trial. Lancet 2001; 358: 1749-53.
5. Elias D, Meilin A, Ablamunits V, Birk OS, et al. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and down regulates auto immunity to various β -cell antigens. Diabetes 1997; 46: 758-64.
6. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti – Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. Cell Stress and Chaperones 1999; 4(1): 29-35.
7. Handley HH, Yu J, Yu DT, Singh B, Gupta, et al. Autoantibodies to human heat shock protein (hsp) 60 may be induced by escherichia col: Groel Clin Exp Immunol 1996; 103: 429-35.
8. Horvath L, Cervenak L, Oroszlan M, Prohasaka Z, et al. Antibodies against different epitopes of heat – shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. Immunol lett Mar 2002; 80(3): 155-62.
9. Martin S, Waif Tichbaum D. Duinkerken GO. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. N Eng J Med 2001; 345: 1036-40.
10. Greeff Meeder ER, Rijkers GT, Voorhorst Ogink Kuis W, Van Der Zee R, Van Eden W, Zegers BJM. Antibodies to human Hsp60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. Pediatric Research 1993; 34(4): 424-8.