مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی دهم، شماره‌ی ۴، صفحه‌های ۳۳۸ ـ ۳۳۱ (آبان ۱۳۸۷)

مقاله‌ی پژوهشی

گزارش اولیه در مورد وجود آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک تخریب‌کننده‌ی انسولین در پلاسمای دو بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲

ملیحه محمدی[۱]، دکتر منوچهر میرشاهی[۱]، دکتر مهدی هدایتی[۲]، مهسا رحیم‌زاده جهرمی[۱]

۱) گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران؛ ۲) مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی علوم پایه، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵، دکتر منوچهر میرشاهی؛ e-mail: mirshahi@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: اخیراً ارتباط آنتی‌بادی‌های کالیتیک (آبزیم‌ها)، با بروز برخی بیماری‌ها نشان داده شده است. با توجه به مطرح شدن پدیده‌ی اتوایمیون بودن بیماری در برخی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و وجود اتوآنتی‌بادی‌ها در پلاسمای این بیماران، وجود آنتی‌بادی‌هایی با خاصیت کاتالیتیک، در پلاسمای این بیماران بررسی شد. مواد و روش‌ها: ابتدا آنتی‌بادی‌های موجود در پلاسمای ۳ بیمار دیابتی و ۷ نمونه‌ی شاهد غیردیابتی، با استفاده از ستون تمایلی پروتئین ـ G و ژل فیلتراسیون با سفاکریل S300 تخلیص شدند و بعد از اطمینان از درجه‌ی خلوص آنها با SDS-PAGE و وسترن بلات، خاصیت پروتئازی آنها با استفاده از روش ژل ـ زیموگرام تأیید شد. سپس آنتی‌بادی‌های تخلیص شده به همراه انسولین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ روز مجاور شدند و اثر این آنتی‌بادی‌ها روی انسولین با استفاده از ژل آکریل آمید و اسید استیک ـ اوره بررسی شد. یافته‌ها: از بین ۳ فرد دیابتی، آنتی‌بادی‌های پلاسمای ۲ نفر، انسولین را به طور کامل تخریب کردند و این پدیده در ۷ نمونه شاهد و یک فرد دیابتی دیگر مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: تحقیق برای اولین بار تجزیه انسولین توسط آنتی‌بادی‌های جدا شده از دو فرد دیابتی را با خاصیت تجزیه انسولین، چنین پدیده‌ای نه تنها می‌تواند یکی از دلایل ایجاد مقاومت به انسولین در بیماران دیابتی باشد بلکه ممکن است سازوکار جدیدی برای بروز دیابت نوع ۲ باشد.

واژگان کلیدی: آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک، دیابت نوع ۲، انسولین، اتوایمیون، آبزیم
دریافت مقاله:۸۶/۸/۲۴ ـ دریافت اصلاحیه: ۸۶/۱۲/۱۵ـ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۱۴

مقدمه

دیابت نوع ۲ یا NIDDM[i]، یک بیماری شایع و مزمن است که سالانه جان میلیون‌ها نفر را در دنیا می‌گیرد و هر ساله نیز بر این تعداد افزوده می‌شود. تاکنون ماهیت و چگونگی بروز این بیماری کاملاً شناخته نشده است[۱]. صرف نظر از دلایل متعددی که برای بروز آن ذکر می‌شود، دخالت پدیده‌ی اتوایمیون در این بیماری نیز مشاهده شده است[۲]. به طوری که وجود اتوآنتی‌بادی‌ها علیه برخی اتوآنتی‌ژن‌های سلول‌های β در جزایر لانگرهانس پانکراس در این بیماران گزارش شده است.[۳-۵] این اتوآنتی‌بادی‌ها حتی سال‌ها قبل از بروز علایم بالینی دیابت در پلاسمای این افراد مشاهده شده‌اند.[۶] عمده‌ترین این اتوآنتی‌بادی‌ها ICA[ii] در ۳۳٪-۱۰

i- Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus

ii- Islet Cell Antibodies

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

بیماران دیابتی نوع۲، آنتی‌بادی بر ضد IA-2[i] در ۱۲٪ افراد[۳]، آنتی‌بادی بر ضد GAD[ii] در ۳۰/۳٪ افراد و IAA[iii] در ۳۴/۸٪ بیماران[۷] است.

در سال‌های اخیر، مطالعه‌های زیادی روی آنتی‌بادی‌های دارای خاصیت کاتالیتیک (آبزیم‌ها) انجام شد که ارتباط مستقیمی با بروز برخی بیماری‌ها دارند. نام آبزیم[iv] از دو واژه‌ی آنزیم و آنتی‌بادی گرفته شده است. اولین مثال از چنین آنتی‌بادی‌هایی، IgG یافت شده در پلاسمای بیماران آسمی با فعالیت هیدرولیز کننده VIP[v] است[۸] و به دنبال آن تنوع وسیعی از آنتی‌بادی‌های دارای خاصیت کاتالیتیک، در افراد با انواع بیماری‌های خودایمن مانند MS[vi] [۹] و لوپوس[۱۰] با فعالیت DNAase، RNAase، پپتیدازی، پروتئازی و آمیلازی[۱۳-۱۱] گزارش شده است. بر اساس مطالعه‌های وسیع انجام شده در این زمینه، آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک نقش مهمی در ایجاد شرایط پاتولوژی و بیماری خودایمن دارند.[۱۰] با توجه به دخالت پدیده‌ی اتوایمیون در بیماری دیابت نوع ۲، احتمال حضور آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک در پلاسمای افراد دیابتی نیز مطرح شده است.

تاکنون هیچ گزارشی در مورد اینکه در بیماران دیابتی، این آنتی‌بادی‌ها چرا و چگونه به وجود می‌آیند و نقش آنها در بروز دیابت چیست، منتشر نشده است.[۳،۴،۱۴] هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی حضور آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک در پلاسمای افراد دیابتی و اثر آنها بر انسولین بود.

مواد و روش‌ها

بررسی حاضر در ۳ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۷ هفت فرد سالم به عنوان گروه شاهد انجام گرفت. ۳ بیمار مذکور در دو اندازه‌گیری، قند خون ناشتای بیشتر از ۱۲۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر داشتند (کیت گلوکز، روش آنزیمی گلوکز اکسیداز، شرکت پارس‌آزمون، تهران، ایران، دستگاه اتوآنالایزر، سلکترای ۲، مرک، هلند). درصد ضریب تغییرات درون‌آزمونی سنجش قند ۲/۱٪ بود. هیچ‌کدام از ۳ فرد بیمار برای کنترل قند خون از انسولین استفاده نمی‌کردند. داروهای کاهنده‌ی قند خون (مت‌فورمین، گلی‌بن‌کلامید) قادر به کنترل میزان قند افراد مذکور بود. حضور آنتی‌بادی ضد اتوآنتی‌ژن‌های سلول‌های β جزایر لانگرهانس با استفاده از کیت الایزا کیفی (IAA kit, DRG Diagnostics, Marburg, Germany) بررسی شد. افراد شاهد از بین افرادی انتخاب شدند که سالم بوده، قند خون ناشتای کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر داشتند، و علایم بالینی دیابت نداشتند و هم‌چنین بر خلاف گروه مورد، آنتی‌بادی‌های ضد جزایر لانگرهانس در آنها یافت نشده بود.

برای تخلیص آنتی‌بادی‌های موجود در پلاسما، ابتدا پروتئین‌های موجود در پلاسمای ۱۰ داوطلب به طور جداگانه با آمونیوم سولفات اشباع (۵۰٪) رسوب داده و سپس با کمک ستون کروماتوگرافی تمایلی پروتئین G (تهیه شده از شرکت Amersham Pharmacia Biotech) و ژل فیلتراسیون با سفاکریل S300 (تهیه شده از شرکت Merck)، آنتی‌بادی‌ها تخلیص شدند. سپس ایمونوگلوبولین‌های تخلیص شده، در بافرPBS[vii] با pH ۷/۲ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد دیالیز شدند.

خلوص آنتی‌بادی‌های جدا شده با روش SDS-PAGE تأیید شد. در این روش پروتئین‌ها بر اساس تفاوت وزن مولکولی از هم تفکیک می‌شوند. خلوص حاصل در شرایط احیایی (با افزودن β- مرکاپتواتانول که باندهای دی‌سولفیدی را احیا و در نتیجه دو زنجیره‌ی انسولین را از یکدیگر جدا می‌کند) و غیراحیایی (بدون افزودن β- مرکاپتواتانول) با استفاده از روش Laemmli [۱۵] و رنگ‌آمیزی نیترات نقره و سپس وسترن بلات با استفاده از روش Towbin و همکاران[۱۶] تأیید شد. برای این منظور پس از انجام الکتروفورز، انتقال پروتئین‌ها به کاغذ نیتروسلولز انجام شد. سپس مرحله‌ی بلوک کردن با ۱٪ BSA[viii] در PBS با pH ۷/۲ به مدت ۱ ساعت انجام شد. بعد از آن کاغذ نیتروسلولز با Anti human IgG نشاندار با HRP[ix] (شرکت Sigma) به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق مجاور شد. باندهای IgG پس از افزودن ۰/۵ mg/mL دی‌آمینوبنزیدین و ۰/۰۵٪ پراکسیدهیدروژن به مدت ۱۰ دقیقه آشکار و مشخص شد که هیچ‌گونه آلودگی همراه آنتی‌بادی‌ها وجود ندارد. برای تعیین غلظت آنتی‌بادی‌ها از طیف‌سنجی UV استفاده شد.

i-Islet antigen-2
ii- Glutamic Acid Decarboxylase
iii- Insulin Autoantibodies
iv - Abzyme
v- Vasoactive Intestinal Peptide
vi- Multiple Sclerosis

vii - Phosphate Buffered Saline
viii - Bovine Serum Albumin
ix - Horseradish Peroxidase

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

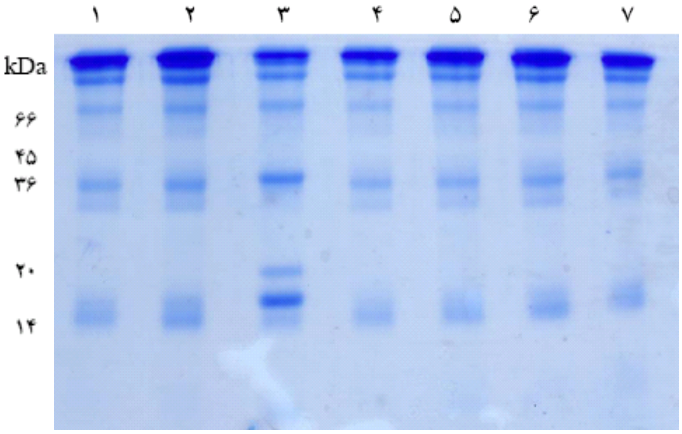
خاصیت پروتئازی آنتی‌بادی‌ها با روش ژل ـ زیموگرام با استفاده از ژلاتین (با غلظت نهایی ۰/۱٪) به عنوان سوبسترا انجام گرفت. پس از الکتروفورز، ژل در بافر تریس ۵۰ mM و اسیدیته‌ی ۹/۶ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. برای آشکار شدن باندهای دارای فعالیت پروتئازی، ژل با رنگ کوماسی‌بریلیانت بلو R-250 ۰/۵٪ رنگ‌آمیزی و با متانول ـ اسیداستیک ـ آب به نسبت (۴:۱:۵) رنگ‌بری شد.

از انسولین رگولار نوترکیب انسانی، (ساخت شرکت داروسازی اکسیر، بروجرد، ایران) استفاده شد. هر ویال انسولین محتوی ۱۰۰ U (واحد) انسولین در هر میلی‌لیتر بود. هر واحد انسولین معادل ۴۵/۵ µg انسولین خالص است. در هر ویال انسولین مواد نگهدارنده (متاکروزول و گلیسرول) وجود دارد و فاقد هر نوع پروتئین دیگری است. برای به دست آوردن غلظت مناسبی از انسولین که روی ژل قابل مشاهده باشد، محتویات ویال انسولین رگولار (۱۰ mL) به کیسه‌ی دیالیز مخصوص انسولین با برون‌ده ۲ کیلودالتون منتقل شد و سپس با سفادکس G- ۲۰۰ آبگیری شد.

برای بررسی اثر آنتی‌بادی‌ها روی انسولین، سه غلظت مختلف از آنتی‌بادی (۱۵ µg/mL، ۴۵ µg/mL، ۷۵ µg/mL) به همراه غلظت ثابتی از انسولین انتخاب شد. به همه‌ی ویال‌های حاوی آنتی‌بادی به اضافه‌ی انسولین و ویال‌های شاهد (آنتی‌بادی بدون انسولین، انسولین شاهد بدون آنتی‌بادی) سدیم آزید ۰/۰۲٪ به عنوان نگهدارنده ضد قارچ افزوده شد تا از تخریب میکروبی انسولین و آنتی‌بادی‌ها جلوگیری به عمل آید. سپس نمونه‌ها به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از الکتروفورز ژل آکریل آمید اسید استیک ـ اوره گرادیان (۱۵٪ و ۱۲٪) اثر آنتی‌بادی‌ها روی انسولین مورد بررسی قرار گرفت. برای آشکارشدن بهتر باندها، رنگ‌آمیزی نیترات نقره‌ی ژل‌ها نیز انجام شد.

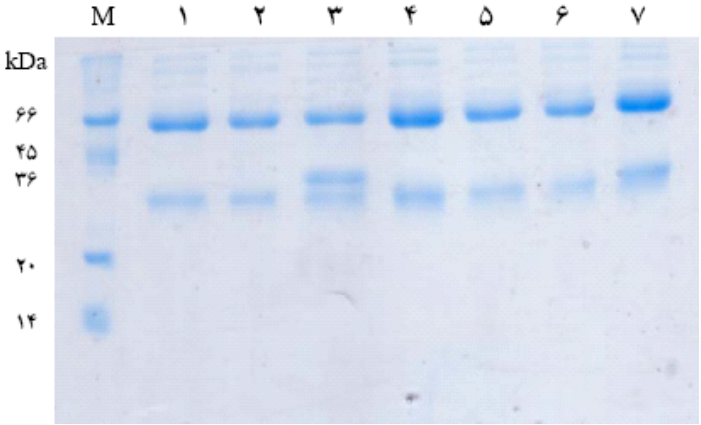
یافته‌ها

گروه دیابتی مورد دارای قند پلاسمای بیشتر از ۱۲۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و افراد گروه کنترل قند پلاسمای کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر داشتند. اتوآنتی‌بادی‌ها در گروه مورد با کیت کیفی مذکور مثبت و در افراد گروه شاهد، منفی بودند. نتیجه‌ی خلوص آنتی‌بادی‌های موجود در پلاسمای ۳ بیمار دیابتی و ۷ نمونه‌ی شاهد، با ستون کروماتوگرافی تمایلی پروتئین G و ژل فیلتراسیون با روش SDS-PAGE روی ژل ۱۲/۵٪ در شرایط غیراحیایی (شکل۱–الف) و احیایی (شکل۱– ب) نشان داده شده است. در شرایط احیایی ۲ زنجیره‌ی سبک و سنگین ایمونوگلوبولین‌ها از هم جدا می‌شوند. رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره این ژل‌ها نیز انجام شد که در اینجا نشان داده نشده‌اند.



شکل ۱ – الف

شکل ۱ – ب

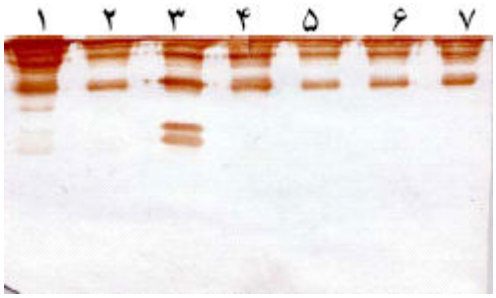


شکل ۱– SDS-PAGE آنتی‌بادی‌های خالص شده با پروتئین G در شرایط غیراحیایی (الف) و احیایی (ب) بر روی ژل ۱۲/۵٪ و رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌بلو. ستون‌های ۱ تا ۳ مربوط به بیماران دیابتی و ستون‌های۴ تا ۷ مربوط به نمونه‌های شاهد می‌باشند. در شکل ۱– ب، ستون M مربوط به مارکر وزن مولکولی پروتئین است.

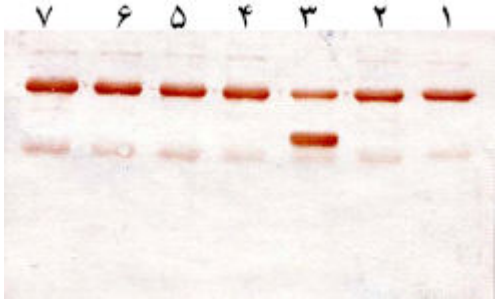
همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در شرایط احیایی، باندهایی با وزن مولکولی پایین در نمونه‌های خالص شده وجود دارد که از نظر وزن مولکولی معادل ۲۵ و ۵۵

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

کیلودالتون هستند این باندها در شرایط SDS-PAGE غیراحیایی از بین رفته و فقط در مورد یک بیمار دیابتی (شکل ب، ستون۳) باندهای اضافی مشاهده می‌شود. نتیجه‌ی بررسی این سؤال که «آیا این باندها در اثر خودتخریبی آنتی‌بادی‌ها ایجاد شده‌اند یا در اثر آلودگی»، با استفاده از روش وسترن بلات در شرایط احیایی و غیراحیایی، با استفاده از Anti human IgG در شکل ۲ نشان داده شده است. نتیجه‌ی ذکر شده با انجام آزمون وسترن بلات تأیید شد و نشان داد که همه‌ی این باندها قطعه‌های آنتی‌بادی هستند و در نتیجه‌ی آلودگی ایجاد نشده‌اند.



شکل ۲ – الف



شکل ۲ – ب

شکل ۲- وسترن بلات آنتی‌بادی‌های تخلیص شده در شرایط غیراحیایی (الف) و احیایی (ب) با استفاده از Anti human IgG. ستون‌های ۱ تا ۳ مربوط به افراد دیابتی و ۴ تا ۷ مربوط به نمونه‌های شاهد هستند. باندهای اضافی در ستون ۳ قطعه‌های آنتی‌بادی هستند که با Anti human IgG آشکار شدند.

در شکل ۳ نتیجه فرآیند جداسازی IgG کاملاً خالص، آنتی‌بادی‌های خالص شده با ستون تمایلی پروتئین G، از ستون ژل فیلتراسیون به عنوان نمونه آورده شده است. خلوص آنتی‌بادی‌ها در شرایط غیراحیایی (شکل ۳-الف) و احیایی (شکل ۳-ب)، روی ژل‌آکریل‌آمید ۱۲/۵٪ با رنگ‌آمیزی نیترات نقره نشان داده شده‌اند. برای تأیید یافته‌های حاصل، وسترن‌بلات مربوط به آنتی‌بادی‌ها نیز در شرایط غیراحیایی (شکل ۳- ج) و احیایی (شکل ۳-د) انجام شد.



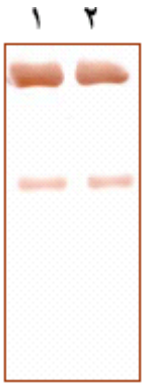
شکل۳- ب



شکل۳- الف



شکل۳- د



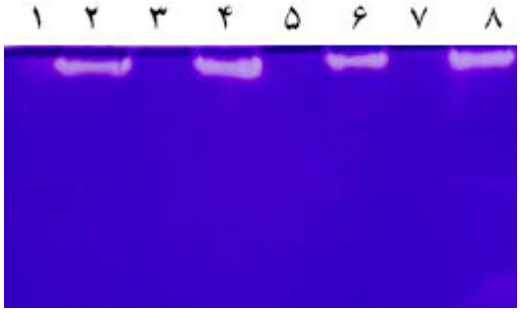
شکل۳- ج

شکل۳- رنگ‌آمیزی نیترات نقره مربوط به ژل SDS-PAGE آنتی‌بادی‌های تخلیص شده دو نمونه‌ی شاهد با ستون تمایلی پروتئین - G و سپس ژل فیلتراسیون با سفاکریل S-300 در شرایط غیراحیایی (الف) و احیایی (ب). اشکال (ج) و(د) به ترتیب مربوط به وسترن بلات آنتی‌بادی‌های همان دو فرد در شرایط غیراحیایی و احیایی است.

برای سنجش خاصیت پروتئازی آنتی‌بادی‌ها از روش ژل- زیموگرام با استفاده ازسوبسترای ژلاتین استفاده شد. آنتی‌بادی‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و فعالیت پروتئازی آنها در مقایسه با آنتی‌بادی‌های انکوبه نشده سنجش شد. یافته‌ها نشان دادند که آنتی‌بادی‌های انکوبه نشده‌ی افراد بیمار و شاهد، خاصیت پروتئازی نشان نمی‌دهند ولی مشاهده‌ها در مورد آنتی‌بادی‌ها پس از یک هفته انکوباسیون، نشان داد که فعالیت پروتئازی در هر سه بیمار در مقایسه با

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

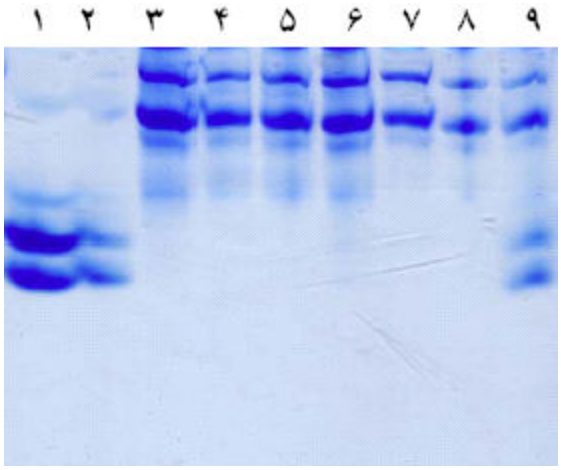
آنتی‌بادی‌های انکوبه نشده و آنتی‌بادی‌های افراد شاهد، به شدت افزایش یافته است در حالی که این پدیده فقط در مورد یکی از نمونه‌های شاهد مشاهده شد که یافته‌ها در شکل ۴ آورده شده است.



شکل۴- زیموگرافی در شرایط غیراحیایی روی ژل حاوی سوبسترا. ژل-ز یموگرام IgGهای تخلیص شده با ستون تمایلی پروتئین- G و ژل فیلتراسیون با S300. ستون ۱ مربوط به آنتی‌بادیهای انکوبه نشده یک نمونه شاهد، ۲: آنتی‌بادی‌های همان فرد پس از یک هفته انکوباسیون. ستون ۳ و ۴ به همین ترتیب در مورد بیمار شماره‌ی ۱ دیابتی، ۵ و ۶ بیمار شماره‌ی ۲ دیابتی و ۷ و ۸ بیمار شماره‌ی ۳ دیابتی هستند.

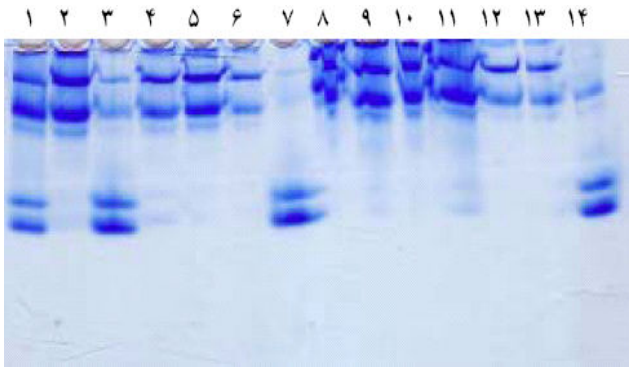
نتیجه‌ی بررسی فعالیت کاتالیتیک آنتی‌بادی‌های خالص شده در شکل ۴ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، آنتی‌بادی‌های انکوبه نشده‌ی افراد بیمار و شاهد، خاصیت پروتئازی نشان نمی‌دهند ولی مشاهده‌ها در مورد آنتی‌بادی‌ها پس از یک هفته انکوباسیون، نشان داد که فعالیت پروتئازی در هر سه بیمار در مقایسه با آنتی‌بادی‌های انکوبه نشده و آنتی‌بادی‌های شاهد، به شدت افزایش یافته است در حالی‌که این پدیده فقط در مورد یکی از نمونه‌های شاهد مشاهده شد.

در خصوص فعالیت تخریبی انسولین توسط آنتی‌بادی‌های تخلیص شده، همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، پس از شش روز آنتی‌بادی‌های بیمار شماره‌ی ۳ قادر بودند در دو غلظت بالای استفاده شده‌ی آنتی‌بادی، آن را به طور کامل تخریب کنند و در غلظت پایین آنتی‌بادی این اثر کمتر بود. آنتی‌بادی‌های بیمار شماره‌ی ۲ در دو غلظت ۴۵µg/mL و ۷۵µg/mL آنتی‌بادی، انسولین را تخریب کردند، ولی در غلظت پایین چنین اثری نداشتند. این پدیده در مورد بیمار شماره‌ی ۱ و همچنین ۷ نمونه‌ی شاهد مشاهده نشد (شکل۵). همه‌ی این آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و تکرارپذیری این نتایج تأیید شد. رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره این ژل‌ها نیز انجام شد که نشان داده نشده‌اند.



شکل۵-الف

شکل۵ الف- الکتروفورز ژل اسیداستیک- اوره‌ی آنتی‌بادی‌های ۶ روز انکوبه شده با انسولین در شرایط احیایی. شکل ۵- الف: ستون۱) انسولین شاهد انکوبه نشده، ۲) انسولین شاهد پس از ۶ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ستون‌های ۳ تا ۹ مربوط به بیمار شماره‌ی ۳ دیابتی هستند. ۳) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت ۷۵ µg/mL، ۴) آنتی‌بادی شاهد انکوبه شده با غلظت ۷۵ µg/mL، ۵) آنتی‌بادی شاهد انکوبه شده با غلظت ۴۵ µg/mL، ۶) آنتی‌بادی مجاورشده با انسولین با غلظت ۴۵ µg/mL، ۷) آنتی‌بادی شاهد با غلظت ۱۵ µg/mL انکوبه نشده، ۸) آنتی‌بادی شاهد انکوبه شده با غلظت ۱۵ µg/mL، ۹) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت۱۵ µg/mL.



شکل۵-ب

شکل ۵ ب- ستون‌های ۱ تا ۷ مربوط به یک نمونه‌ی شاهد و ستون‌های ۸ تا ۱۴ مربوط به بیمار شماره‌ی ۲ دیابتی است. ستون۱) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت ۷۵ µg/mL ۲) آنتی‌بادی شاهد انکوبه شده با همین غلظت ۳) آنتی‌بادی مجاورشده با انسولین با غلظت۴۵ µg/mL ۴) آنتی‌بادی شاهد انکوبه شده با همین غلظت ۵) آنتی‌بادی شاهد با غلظت ۱۵ µg/mL انکوبه نشده ۶) آنتی‌بادی شاهد انکوبه شده با همین غلظت ۷) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت ۱۵ µg/mL، ۸) آنتی‌بادی شاهد بیمار شماره‌ی ۲ دیابتی با غلظت ۷۵ µg/mL، ۹) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت ۷۵ µg/mL، ۱۰) آنتی‌بادی کنترل انکوبه شده با غلظت۴۵ µg/mL، ۱۱) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت ۴۵ µg/mL، ۱۲) آنتی‌بادی شاهد با غلظت۱۵ µg/mL انکوبه نشده ۱۳) آنتی‌بادی کنترل انکوبه شده با غلظتAb ۱۵، ۱۴) آنتی‌بادی مجاور شده با انسولین با غلظت ۱۵ µg/mL

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

بحث

در سال‌های اخیر دیابت نوع ۲ گسترش بسیار زیادی پیدا کرده است. عمده‌ترین دلایل این گسترش، تغذیه‌ی نامناسب، زندگی ماشینی و عدم تحرک هستند. طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، در سال ۲۰۰۰ تعداد مبتلایان به دیابت قندی بیش از ۱۷۱ میلیون نفر تخمین زده شده و پیش‌بینی می‌شود که این تعداد تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۳۶۶ میلیون نفر برسد.[۱۷] از بین افراد ذکر شده تقریباً ۱۰٪ آنها دیابت نوع ۱ داشته، مابقی مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند.[۱۸،۱۹] هزینه‌ی درمان و مراقبت از بیماران دیابتی به طور متوسط رقمی معادل ۱۳۲ بیلیون دلار در سال است.[۱۸] بیماری دیابت نوع ۲ در کودکان و نوجوانان هم روند رو به افزایشی را نشان می‌دهد. به طوری‌که در دهه‌ی اخیر ۱۰ برابر شده است[۷]. تاکنون علل مختلفی برای بروز دیابت نوع ۲ عنوان شده است. برخی دیابت نوع ۲ را یک بیماری چند ژنی (پلی‌ژنیک) می‌دانند که ژن‌های مختلفی مؤثر بر ترشح و عملکرد انسولین در ایجاد آن دخالت دارند. مشخص نیست کدام علت نقش اول را دارد ولی اغلب معتقدند که اختلال در عملکرد انسولین (مقاومت به انسولین) تقدم دارد.[۲۰] ارتباط این بیماری با چاقی، نژاد، سن، و هم‌چنین عوامل محیطی اثبات شده است.[۲۱،۲۲]

طی چند سال اخیر، با اثبات وجود اتوآنتی‌بادی علیه برخی اتوآنتی‌ژن‌های سلول‌های β جزایر لانگرهانس، دخالت پدیده‌ی اتوایمیون در این بیماری نیز مطرح شد و امروزه به طور قوی روی این موضوع تأکید می‌شود.[۲،۳،۵].این اتوآنتی‌بادی‌ها نه تنها در پلاسمای افراد دیابتی دیده شده‌اند، بلکه در پلاسمای افراد مستعد به دیابت، سال‌ها قبل از بروز علایم بالینی دیابت هم قابل ردیابی‌اند.[۱۴] تاکنون نقش پاتوژنیک این اتوآنتی‌بادی‌ها شناخته نشده است. به نظر می‌رسد که این اتوآنتی‌بادی‌ها در نتیجه‌ی تخریب سلول‌های β به وجود می‌آیند. مطالعه‌های جدیدتر نشان داده‌اند که آنتی‌بادی ضد GAD می‌تواند در شناسایی آنتی‌ژن‌ها شرکت کند و از این طریق در پاتوژنز بیماری نقش داشته باشد[۶]. در این بیماران به تدریج حجم توده‌ی سلول‌های β کاهش پیدا می‌کند و بنابراین معمولاً این بیماران نیاز به استفاده از انسولین پیدا می‌کنند.[۶،۲۳] از سوی دیگر مشخص شده هر چه تعداد اتوآنتی‌بادی‌ها در فرد بیشتر باشد، احتمال این‌که در آینده نیاز به مصرف انسولین پیدا کنند، بیشتر خواهد بود.[۲۴-۲۶] هنوز جایگاه واقعی این دسته از بیماران دیابتی مشخص نشده است. برخی منابع این نوع دیابت را، دیابت نوع ۱/۵ یا LADA[i] می‌نامند.[۳،۴،۲۲]

در این مطالعه، اثر آنتی‌بادی‌های تخلیص شده از پلاسمای ۳ بیمار دیابتی ـ که وجود این اتوآنتی‌بادی‌هایی در آن‌ها با روش الایزای کیفی (Qualitative IAA ELISA Kit) نشان داده شده بود ـ به همراه ۷ نمونه‌ی شاهد منفی بر انسولین بررسی شد. یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهند که آنتی‌بادی‌های به دست آمده از دو بیمار دیابتی (از مجموع ۳ بیمار) قادر هستند انسولین را تخریب نمایند، به طوری که آنتی‌بادی‌های پلاسمای یک بیمار دیابتی توانست انسولین را در دو غلظت مورد استفاده، از آنتی‌بادی به‌طور کامل و در غلظت پایین (۱۵μg/mL) به طور جزیی تخریب کند. در یک بیمار دیگر در غلظت‌های بالاتر آنتی‌بادی (۷۵μg/mL ،۴۵μg/mL) این اثر مشاهده شد. جالب اینجا است که این پدیده در هیچ‌کدام از افراد گروه شاهد دیده نشد. به این ترتیب برای اولین‌بار نشان داده شد که آنتی‌بادی‌های موجود در پلاسمای افراد دیابتی می‌توانند انسولین را تخریب کنند. این‌که چه عاملی باعث به وجود آمدن چنین آنتی‌بادی‌هایی با این خاصیت می‌شود (یا خاصیت کاتالیتیک را در آنها القا می‌کند) ناشناخته است. چنین پدیده‌ای در شرایط آزمایشگاهی با غلظت ۱۵μg/mL و یا در مورد فرد دیگر با غلظت ۴۵μg/mL از آنتی‌بادی پلی‌کلونال، در مدت ۶ روز مشاهده شده است که در مقایسه با شرایط in vivo که غلظت آنتی‌بادی‌ها (IgG) بسیار بیشتر است (بین ۹/۵ تا ۱۲/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر خون)[۲۷] بسیار کم است. بنابراین با توجه به نیمه عمر پایین انسولین در بدن، قابل تصور است که این آنتی‌بادی‌ها بتوانند به محض ورود انسولین به خون، چنین اثری روی آن بگذارند و انسولین را از سیستم گردش خون خارج کنند. به این ترتیب می‌توان حالت مقاوم به انسولین و نیاز به انسولین درمانی را که در این دسته از افراد به وجود می‌آید، توجیه کرد. در مورد بیماران دیابتی، طبقه‌بندی صحیح بیماران به منظور انتخاب روش درمانی مناسب برای هر فرد اهمیت ویژه‌ای دارد.[۲،۲۸] افرادی که دچار بیماری دیابت نوع ۱ هستند، ویژگی‌های بالینی متفاوتی با سایر بیماران دیابتی دارند. ولی با افزایش تعداد بیمارانی که به خاطر نداشتن دیابت نوع، جزو

i- Latent autoimmune diabetes in adults

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

خانواده‌ی بزرگ و هتروژن دیابت نوع ۲ طبقه‌بندی می‌شوند و ویژگی‌های بالینی بسیار متفاوتی نسبت به هم دارند، طبقه‌بندی صحیح این بیماران مشکل است.[۲۳،۲۸،۲۹] با کشف پاتوفیزیولوژی و پاتوژنز بیماری دیابت و درک هر چه بهتر سازوکار بروز آن، می‌توان به طبقه‌بندی صحیح این بیماری و در نتیجه درمان هرچه بهتر بیماران کمک کرد. در این مطالعه وجود اتوآنتی‌بادی‌هایی که بتوانند با اثر بر انسولین آن‌را تخریب کنند، برای اولین‌بار گزارش می‌شود. بررسی دقیق این موضوع که ارتباط این اتوآنتی‌بادی‌ها با کاهش فعالیت انسولین و ایجاد حالت مقاومت به انسولین در این دسته از بیماران چیست، و این پدیده مسؤول به وجود آمدن چند درصد انواع دیابت است، نیاز به بررسی‌های بیشتر و کار در جامعه‌ی آماری بزرگ‌تری دارد که هم اکنون در حال انجام است و یافته‌های آن اعلام خواهد شد.

References

1. Williams R, Herman W, Kinmonth AL, Wareham NJ, editors. The evidence base for diabetes care. Chichester: John Wiley; 2002.
2. Kohn LD, Wallace B, Schwartz F, McCall K. Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system? Endocrinology 2005; 146: 4189-91.
3. Pietropaolo M, Barinas-Mitchell E, Pietropaolo SL, Kuller LH, Trucco M. Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. Diabetes 2000; 49:32-38
4. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. Diabetes 2005; 54 Suppl 2: S52-61.
5. Boitard C, Efendic S, Ferrannini E, Henquin JC, Steiner DF, Cerasi E. A tale of two cousins: type 1 and type 2 diabetes. Diabetes 2005; 54 Suppl 2: S1-3.
6. Padoa CJ, Crowther NJ, Thomas JW, Hall TR, Bekris LM, Torn C, et al. Epitope analysis of insulin autoantibodies using recombinant Fab. Clin Exp Immunol 2005; 140: 564-71.
7. Hathout EH, Thomas W, El-Shahawy M, Nahab F, Mace JW. Diabetic autoimmune markers in children and adolescents with type 2 diabetes. Pediatrics 2001; 107: E102.
8. Andrievskaya OA, Buneva VN, Baranovskii AG, Gal'vita AV, Benzo ES, Naumov VA, et al. Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus. Immunol Lett 2002; 81: 191-8.
9. Polosukhina DI, Kanyshkova TG, Doronin BM, Tyshkevich OB, Buneva VN, Boiko AN, et al. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis. J Cell Mol Med 2004; 8: 359-68.
10. Nevinsky GA, Buneva VN. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. J Immunol Methods 2002; 269: 235-49.
11. Ivanen DR, Kulminskaya AA, Shabalin KA, Isaeva-Ivanova LV, Ershova NA, Saveliev AN, et al. Catalytic properties of IgMs with amylolytic activity isolated from patients with multiple sclerosis. Med Sci Monit 2004; 10: BR273-80.
12. Saveliev AN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Ershova NA, Kanyshkova TG, Buneva VN, et al. Amylolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis. Immunol Lett 2003; 86: 291-7.
13. Mirshahi M, Shamsipour F, Mirshahi T, Khajeh K, Naderi-Manesh H. A novel monoclonal antibody with catalytic activity against beta human chorionic gonadotropin. Immunol Lett 2006; 106: 57-62.
14. Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, et al. A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. J Clin Invest 2001; 107: 173-80.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76: 4350-4.
17. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27: 1047-53.
18. Gambert SR, Pinkstaff P. Emerging Epidemic: Diabetes in Older Adults: Demography, Economic Impact, and Pathophysiology . Diab Spectr 2006; 19: 221-8.
19. Salami M, Hosseinpanah F, Azizi F. Correlation of Insulin Resistance and impaired glucose metabolism in Tehranian adults: Tehran Lipid and Glucose Study. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2006; 8: 259-68.
20. Azhari P, Rajabian R. Maturity-onset diabetes of the young. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 1999; 1: 229-33.
21. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. Endocr Rev 1998; 19: 491-503.
22. Rosenbloom AL. Obesity, Insulin Resistance, beta-Cell Autoimmunity, and the Changing Clinical Epidemiology of Childhood Diabetes. Diabetes Care 2003; 26: 2954-6.
23. Borg H, Fernlund P, Sundkvist G. Measurement of antibodies against glutamic acid decarboxylase 65 (GADA): two new 125I assays compared with [35S]GAD 65-ligand binding assay. Clin Chem 1997; 43: 779-85.
24. Grasso YZ, Reddy SK, Rosenfeld CR, Hussein WI, Hoogwerf BJ, Faiman C, et al. Autoantibodies to IA-2 and GAD65 in patients with type 2 diabetes mellitus of varied duration: prevalence and correlation with clinical features. Endocr Pract 2001; 7: 339-45.
25. Davis TM, Wright AD, Mehta ZM, Cull CA, Stratton IM, Bottazzo GF, et al. Islet autoantibodies in clinically diagnosed type 2 diabetes: prevalence and relationship with metabolic control (UKPDS 70). Diabetologia 2005; 48: 695-702.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

26. Purnell JQ, Dev RK, Steffes MW, Cleary PA, Palmer JP, Hirsch IB, et al. Relationship of family history of type 2 diabetes, hypoglycemia, and autoantibodies to weight gain and lipids with intensive and conventional therapy in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes 2003; 52: 2623-9.
27. William EP, editor. Fundamental immunology. 4th ed. New York: Raven Press; 1998.
28. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. Diabetes Care 2000; 23: 381-9.
29. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2007; 30 Suppl 1: S42-7.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

Original Article

The Presence of Insulin Catalytic Antibodies in Plasma of Two Type 2 Diabetes Patients

Mohammadi M[1], Mirshahi Mc[1], Hedayati M[2], Rahimzadeh Jahromi M[1]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Tarbiat Modares University & [2]Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University (MC); Tehran, I.R.Iran
e-mail:mirshahi@modares.ac.ir

Abstract:

Introduction: Recent studies have reported the role of catalytic antibodies in the pathogenesis pattern of some diseases. Autoimmune reactions playing a role in some type 2 diabetic patients and the β- cell autoimmune markers were found to be present in some of these patients. The presence of such antibodies was assessed in the plasma of patients suffering from type 2diabetes. Material and Methods: Antibodies in 3 diabetic patients and 7 non-diabetic control subjects were purified using protein-G sepharose affinity column chromatography and S-300 gel filtration methods; purity of the IgG antibodies was confirmed by SDS-PAGE and in western blot analysis and proteolytic activity of electrophoretically homogenous IgG antibodies was confirmed with zymogram analysis. The purified antibodies were incubated with insulin at 37°C for 6 days and the effect of antibodies on insulin degradation was assessed by Acetic Acid-Urea polyacrylamide gel electrophoresis. Results: Insulin degradation effect was observed only in purified antibodies in the 2 diabetic patients and it was not seen in the 7 control subjects and the remaining diabetic patients. Conclusion: Our data revealed, for the first time, insulin degradation by isolated IgG from 2 diabetic patients. This finding may not only explain the insulin resistance observed in some diabetic patients, but may most likely propose also a new mechanism for occurrence of the disease.

Key Words: Catalytic antibodies, Type 2 diabetes, Insulin, Autoimmune, Abzyme

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]