

جستجوی پروتئین میلومی در بیماران

و گروه‌های آنتی ژنی پروتئین بنس جونس

دکتر شموئیل رهبر* دکتر پرویز بهادری* دکتر گیتی نوذری*

شرح حال: آقای ب. م. ۴۹ ساله اهل زنجان بعلت درد مفصل شانه و اندامهای فوقانی مراجعه کرده است. این دردها از دو ماه قبل شروع شده و اغلب به گردن انتشار می‌یابد، در ماه اخیر بیمار همیشه حال تهوع داشته است.

بیمار هیچگونه اعتیادی ندارد ولی گاهی مشروب می‌خورد. پنجسال قبل یک عمل جراحی روی ستون فقرات ایشان انجام شده است و توبر برداشته شده از یکی از مهره‌ها از لحاظ آسیب شناسی مورد آزمایش قرار گرفته است که پراز سلولهای پلاسما سیتی بوده است ولی پس از آن بیمار شکایتی نداشته است. آزمایشات انجام شده:

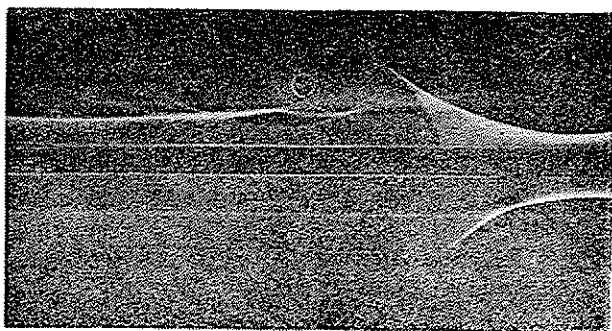
۳۲۸۰۰۰۰	گلوبولهای قرمز
۸۰۰۰	گلوبولهای سفید
۱۱۰	سدیماتاسیون ساعت اول
۱۲۴	سیلیمتر ساعت دوم
۱/۵ گرم	قند خون
۱/۲۸ گرم درلیتر	اوره
۸۱ میلی گرم درلیتر	اسید اوریک
۱/۲۸ گرم	کلسترول
۸ واحد بودانسکی	فسفاتاز الکالن
	الکتروفورز:
۳۷٪	آلبومین
۲٪	آلفایک گلوبولین
۱۵٪	آلفادو گلوبولین
۲۹٪	بتا گلوبولین
۱۷٪	گاما گلوبولین

بیماری میلوم سولتپل همراه با علائم کلینیکی مختلفی که دارد تقریباً همیشه با ازدیاد پلاسما سیت‌ها همراه است که این پلاسما سیت‌ها از یک رده سلولی (Clone) پلاسما سیتی ریشه گرفته‌اند (منوکلونال) و ازدیاد یک رده پلاسما سیتی همراه با ازدیاد یک نوع پروتئین خاصی است بنام پروتئین میلومی که از جنس ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد و میتوان هر نوع میلوم را با گروه پروتئین میلومی که در سرم بیمار ازدیاد می‌یابد تقسیم بندی کرد مانند میلوم از نوع Ig G و یا Ig A و غیره. چون پروتئین میلومی یک دست و از یک نوع و عبارت دیگر هموزن است در تمام مطالعاتی که برای ساختمان مولکول ایمونوگلوبولین‌ها انجام شده است یک نوع از این پروتئین‌های میلومی بکار رفته است زیرا ایمونوگلوبولین‌ها در شخص طبیعی بسیار مختلف و هتروژن هستند و بیماران میلومی و پروتئین میلومی از این لحاظ بسیار مورد استفاده است. در ادرار پنجاه درصد از بیماران مبتلا به میلوم مولتی پل یک پروتئین خاصی ظاهر می‌شود که بنام پروتئین بنس جونس نامیده می‌شود. این پروتئین دارای وزن مولکولی در حدود ۲۴۰۰۰ و از خصوصیات آن اینست که حرکت الکتروفورزی و بسیاری از خواص آن مانند گاما گلوبولین می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان داده است که پروتئین بنس جونس قسمتی از مولکول گاما گلوبولین می‌باشد یعنی زنجیره‌های پولی پپتیدی سبک (L) Light است که بصورت دوتائی (دی سر) در ادرار این بیماران خارج می‌شود.

در بیماری که اینک شرح حال آن ذکر می‌شود بیماری میلوم بشکل خاصی ظاهر شده که مطالعه سرم و ادرار بیمار و جستجوی پروتئین‌های میلومی تشخیص بیماری و نوع آنرا مشخص نموده است.

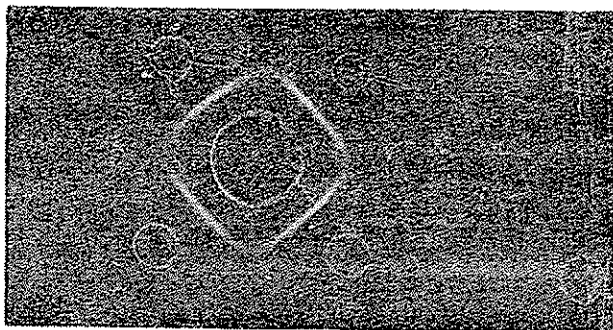
و پس از این مدت حجم ادرار به تقریباً ۲ cc / رسید که برای الکترو-فورز بکار رفت.

در الکتروفورز ادرار بیمار روی کاغذ صافی دو منطقه پروتئینی دیده شد یکی آلبومین و یک پروتئین دیگر در محل باند اضافی سرم بیمار که نزدیک به بتا گلوبولین میباشد (شکل ۱) ایمونوالکترو-فورز ادرار تغلیظ شده بیمار نیز همین مناطق را نشان میدهد ولی با وجود اینکه باند گاما گلوبولینی ادرار در الکتروفورز خیلی ضخیم بود در ایمونوالکترو فورز یک باند پرسی پیتاسیون ضعیف دیده میشود. علت آن این است که این پروتئین زنجیره سبک ایمونو گلوبولین یعنی پروتئین بنس جنس میباشد که با آنتی سرم ضد گاما بولین واکنش ضعیف و متقاطع (Cross Reaction) انجام میدهد. (شکل شماره ۲)



شکل ۲

پروتئین بنس جنس ادرار بیمار با اضافه کردن سولفات آمونیوم بغلظت نیمه اشباع (هم حجم ادرار از محلول اشباع اضافه شده است) رسوب داده شد و رسوب حاصله را در مقابل سرم فیزیولوژی در لوله های دیالیز، دیالیز نموده و سپس لیوفیلیزه گردید. برای تعیین نوع بنس جنس از لحاظ آنتی ژنی آزمایش ژل دیفوزیون انجام گردید. آنتی ژن همان بنس جنس تهیه شده از ادرار بیمار و آنتی سرم ضد بنس جنس از محصولات کارخانه بهرینگر آلمان (اهدائی نمایندگی هوخست در تهران) میباشد.

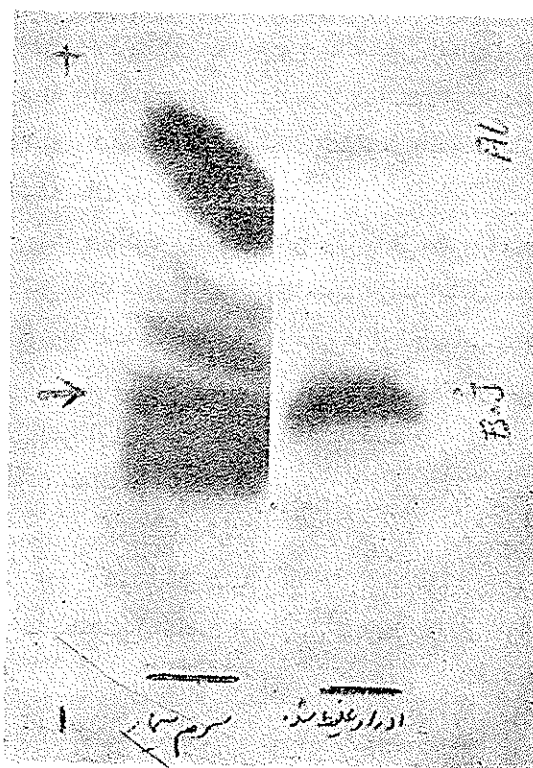


شکل ۳

بنس جنس خالص شده از ادرار بیمار فقط با آنتی سرم نوع کاپا (Kappa) پرسی پیتاسیون ایجاد کرد (شکل ۳) و با نوع آنتی- لامبدا واکنش نشان نمیدهد بنابراین بنس جنس ادرار بیمار از نوع کاپا میباشد.

آزمایش خون محیطی: هیپوکرومی و میکروسیتوز
آزمایش مغز استخوان: در مغز استخوان ۳ تا ۴ درصد پلاسما سیت دیده میشود و سلولهای مگا کاربوسیت اکثر آهیالینیزه شده اند.

جستجوی پروتئین سلومی در سرم و ادرار بیمار:
الکتروفورز سرم بیمار روی کاغذ صافی [۱] در $pH=8/6$ علاوه بر منطقه الکتروفورزی طبیعی یک باند پروتئینی اضافی خیلی نزدیک و چسبیده به بتا گلوبولین نشان میدهد که در حدود ۱۰ درصد پروتئین تام را تشکیل میدهد. ایمونوالکتروفورز سرم روی لام میکروسکپی با اگار ژل تاسپونه ورونال فقط کم شدن نسبی ایمونو-گلوبولین نوع Ig G و آلبومین را نشان میدهد (شکل شماره ۱)



شکل ۱

آزمایش بنس جنس روی ادرار بیمار با اضافه کردن تاسپون استات $2M$ $pH=4/7$ در حرارت $56^{\circ}C$ درجه رسوب سفید زیادی ایجاد میشود که این رسوب در حرارت $100^{\circ}C$ درجه بیش از نصف آن حل میشود و دلیل بر اینستکه علاوه بر پروتئین بنس جنس آلبومین زیادی نیز در ادرار وجود دارد.

برای الکتروفورز ادرار: ادرار بیمار با روش دیالیز در مقابل مواد جاذب آب تغلیظ گردید برای اینکار در حدود ۳ cc ادرار در یک لوله آزمایش بزرگ ریخته شد و ۵ گرم پولی وینیل پیرولیدون (P.V.P) در یک کیسه دیالیز (Visking ۲۳/۲۳) قرار داده و داخل لوله ادرار گذاشته و مدت ۱۰ ساعت در یخچال معمولی گذارده شد

یعنی کاپا و لامبدا به ترتیب به نسبت ۷ درصد و ۳۰ درصد وجود دارد ولی در پروتئین سیلومی و پروتئین بنس جنس فقط یک نوع از زنجیره‌های سبک وجود دارد. و پروتئین بنس جنس همیشه دارای یک تیپ آنتی ژنی خالص کاپا و یا لامبدا می‌باشد.

و یا تزریق هر کدام از دو نوع پروتئین بنس جنس به خرگوش می‌توان سرم آنتی بنس جنس کاپا و یا لامبدا را تهیه کرد و برای آزمایش ژل دیفوزیون بکار برد.

در این بیمار نوع پروتئین بنس جنس از نوع کاپا می‌باشد و در ادرار بیمار با وجود اینکه مقدار زیادی پروتئین بنس جنس وجود دارد در ایمونوالکتروفورز ادرار یک باند ضعیف پرسی - پیتاسیون دیده می‌شود (شکل شماره ۲) زیرا در ایمونوالکتروفورز آنتی سرم بکار رفته بر ضد مولکول کامل Ig G آنتی کور دارد که با زنجیره سبک فقط واکنش متقاطع وضعیفی ایجاد می‌کند.

وجود تیپ آنتی ژنی واحد و مشخص در پروتئین سیلومی و پروتئین بنس جنس دلیل بسیار خوبی بر این است که این پروتئین‌ها را یک نوع مشخص و یک رده واحد سلولهای پلاسما سیتی می‌سازند و از دلائل قوی بنفع فرضیه Selective theory آنتی کور سازی در بدن موجود زنده است. جستجوی پروتئین‌های سیلومی در سرم و ادرار کمک شایانی در تشخیص بیماری سیلوم و انواع مختلف آن می‌کند بخصوص در مواردی که علائم ثابت بیماری در بیمار دیده نمی‌شود و یا بعلمت عوارض کلیوی پروتئین‌های دیگری در ادرار بیمار وجود دارد این روش‌ها تشخیص و وضع بیمار را معلوم می‌کند.

با وجود اینکه در گاما گلوبولین طبیعی هر دو زنجیره سبک λ و k به نسبت ۷۰ و ۳۰ وجود دارد وجود یک نوع بنس جنس در ادرار این بیماران سیلومی دلیل محکمی برای سونوکلونال بودن نوع سیلوم می‌باشد.

بحث: در بیماری سیلوم سولتیپل که همراه با ازدیاد پلاسما سیت‌ها در مغز استخوان و حتی خون محیطی است در حقیقت یک رده پلاسما سیتی سرطانی شده و ازدیاد فوق‌العاده یافته است و چون پلاسما سیت‌ها محل ساخته شدن اکثر ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد با سرطانی شدن و ازدیاد این سلولها ایمونوگلوبولین خاصی که این پلاسما سیت‌ها می‌سازند در خون بیمار افزایش می‌یابد و می‌توان آنرا در سرم بیماران با ایمونوالکتروفورز تشخیص داد.

در ادرار نصف بیماران سیلومی پروتئین بنس جنس وجود دارد که از لحاظ آنتی ژنی شباهت زیادی با پروتئین سیلومی سرم بیماران دارد مگر اینکه وزن مولکولی پروتئین بنس جنس خیلی کمتر و در حدود ۴۰۰۰۰ می‌باشد. ساختمان مولکول ایمونوگلوبولین عبارت از اجتماع دو زنجیره پولی پپتیدی سنگین و یا H و دو زنجیره پولی پپتیدی سبک یا Light Chain (L) است.

زنجیره‌های سبک از لحاظ آنتی ژنی دو نوع هستند و این شاخص آنتی ژنی مربوط به ترتیب چند اسید آمینه بخصوص در طول زنجیره پولی پپتیدی سبک می‌باشد و بنام‌های کاپا (Kappa) و لامبدا (Lambda) نام‌گذاری شده است.

در گاما گلوبولین معمولی نوع Ig G هر دو نوع زنجیره سبک

REFERENCES

- 1- Edelman, G. M., Scientific American: 34, 42, 1970.
- 2- Cohen, S. and Milstein, C., Nature, : 214 : 449, 1967.
- 3- Edelman, G. M., in : «Annual Review of Biochemistry», 1969.