دکتر رهبر۱

بررسی پنج مورد ایمونوالکتروفورز در سرم مبتلایان به بیماریهای خونی

که برای اولین بار دردانشکده پزشکی انجام شده است

امروزه ایمونوالکتروفورز یک وسیله تحقیقی وتشخیصی بسیار دقیق در شناختن نوع پروتئین های سرم وتغییرات این پروتئین ها دربیماریهای مختلف گردیده است. اصول ایمونو الکنروفورز و مناطق مختلف ایمونوالکتروفورزی پروتئین های سرم انسانی را در مقاله قبلی [شماره۶ دوره بیست‌ودوم(۱)]مجله دانشکده‌پزشکی انتشارداده‌ام اینک نتایج حاصله ازبکار بردن ایمونوالکتروفورز درچندموردبیمارمبتلا به‌تغییرات پروتئین های‌سرمی(دیس پروتئین امی) که دراین بخش مورد مطالعه قرارگرفته شرح داده میشود.

روش‌کار ومواد لازم: دراینجا ایمونوالکتروفورز بروش میکرومتد که برروی‌لام میکرسکپی انجام میگیردبکار رفته است این طریقه بسیاردقیق است وبرای سهولت درانجام آن تغییراتی به‌روش های‌موجود قبلی بوسیله اینجانب درآن داده شده است وبرای محیط الکتروفورزازژل تصفیه شده آگار به نسبت یک درصد وتامپونه ورونال استفاده میشود.

تهیه ژل آگار: برای تهیه آگار تصفیه‌شده وخالص یک‌ژل۳٪از Difco Bacto Agar تهیه میشود واین ژل را مدت سه‌روز باآب مقطر خنثی دیالیز میکنیم تاکاملا سفید وشفاف گردد بعدازژل تصفیه شده تعیین عیار بعمل آمده وپس‌از مخلوط کردن باتامپون ورونال‌ژل تامپونه ۱٪ تهیه میشودکه برای ایمونوالکتروفورز ازاین‌ژل استفاده میگردد.

تامپون : تامپون ورونال PH—8/6 . 0/10 M

ورونال آسید	۳/۲ گرم
ورونال سدیک	۲۰ گرم
آب‌مقطر	مقدارلازم تا ۱ لیتر

برای‌تهیه ژل‌این تامپون‌رایک‌بار رقیق میکنیم‌ولی‌درمخازن الکترودها تامپون‌باهمین غلظت بکار میرود ودرحقیقت یک سیستم‌تامپونی متناوب بکار رفته است(2)

---

۱ - استادیار ایمونولوژی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19]

برای جلوگیری ازرشدمیکروبهاوقارچهامرتیولیت‌را به‌نسبت $\frac{1}{10000}$ به ژل اضافه کرده و آنرادرشیشه های کوچک تقسیم‌مینمایند ومیتوان آنرا دریخچال ٤ درجه بمدت ٦ ماه‌نگاهداری کردودرموقع لزوم ازآن‌ژل‌هابکاربرد .

تهیه لام پوشیده ازآگار : قبلا .لامهای میکرسکپی ۲٦×۷٦ میلیمتر راکاملا تمیز و چربی آنرا درمخلوط بیکرومات دوپتاس ۲٪ درآسیدسولفوریک ازبین برده و لامها را خوب شسته وخشک میکنیم وروی سطح افقی قرار داده وروی هرلام ml ۳ازژل تامپونه ۱٪مایع ریخته میگذاریم به‌بندد ولامهارا ٤ ۲ساعت دریخچال ٤ درجه نگاهداری میکنیم وبعد بکار میبریم دراین مدت تغییراتی درژل ایجاد میشود که نیروی الکتروآندوسمز رابحداقل‌میرساند (نیروی الکتروآندوسمز یاجریان حرکت‌آب داخل ژل بطرف کاتددرموقع الکتروفورز نیروئی است که ازحرکت‌الکتروفورزی مولکول پروتئین هاجلوگیری میکند وگاهی بقدری شدیداست که جهت الکتروفورزی پروتئین ها را عوض میکند) .

الکتروفورز : حفره‌های‌آنتی‌ژن را قبل‌از الکتروفورز بوسیله یک قالب الگوکه‌ازجنس پلکسی گلاس میباشد درژل ایجاد میکنیم .

این قالب که ابعادآن باندازه لام میکروسکپی است یک ناودان طولی درو سط دارد بعرض دومیلیمتر وطول ٦سانتیمتر وسوراخهائی‌بقطره/۱ میلیمتر بفاصله ٤ میلیمترازکناره‌های ناودان درخط وسط درآن ایجاد شده است وبوسیله این قالب میتوان محل‌سوراخهای‌آنتی‌ژن وناودان آنتی‌کور را در روی ژل‌بطوردقیقی برید .درسوراخهای طرفی‌معمولادرسوراخ بالاسرم شخص سالمی‌را بعنوان شاهد میریزیم ودرسوراخ پائین سرم بیمار را قرار میدهیم‌مقدارسرمی که بکار میرود ml ۰۱۰/. میباشد .

دستگاه الکتروفورز : دستگاه الکتروفورز شکل شماره۱ که درآن میتوان ٤ لام را باهم الکتروفورزکرد این دستگاه شبیه به دستگاه الکتروفورزی Wieme میباشد(3) ولی تغییراتی بوسیله اینجانب درآن داده شده است که کارکردن باآن سهل‌تر وارزان‌ترتمام میشود .

در روش Wieme درقسمت داخلی مخازن الکترودها مقدار زیادی ژلوز تصفیه شده وتامپونه بعنوان پل ارتباطی بکار میرود ولامهای آگار روی پل های ژلوزی قرارگرفته و با الکترودها ارتباط پیدا میکند .

اینجانب پل های ژلوزی‌را تبدیل به‌اسفنجی ازجنس پلی وینیل کرده‌ام که‌به‌تامپون آغشته میشود وباعث ارتباط لام باالکترودها میشود بدین ترتیب باولتاژی درحدود ۷۰ولت (۷۰میلی آمپر برای هرلام)الکتروفورز دره ۷۰دقیقه انجام میگیرد . نمونه الکتروفورز ساده‌رابا‌ین

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19]

طریقه درشکل شماره۲ می‌بینیم که مناطق آلبومین آلفا یک گلوبولین وآلفا دو گلوبولین وبتا و گاما گلوبولین ها درآن بخوبی دیده میشود. این لام باآمیدوشوارتز رنگ شده‌است.

پس‌از الکتروفورز باقراردادن قالب نامبرده بالا در روی سطح ژل‌ناودان‌وسطی‌رابریده وژل داخل آنرا خارج کرده‌وآنتی کور (آنتی سرم ضدانسانی) به‌اندازه ml ۰/۳. درآن‌میریزیم آنتی‌سرم ضد انسانی درانستیتوپاستور پاریس و کارخانه Behring werck آلمان‌تهیه شده است. برای ژل دیفوزیون‌وایجاد باندهای پرسی پیتاسیون لام‌ها را بمدت ۲٤ ساعت در اطاقک مرطوب‌درسطح کاملا افقی قرار داده وپس‌ازاین مدت برای‌خارج کردن‌پروتئین هائی که ایجاد پرسی پیتاسیون نکرده‌اند لام‌ها را درمحلول سرم فیزیولوژیک تامپونه فسفات PH—7/5 بمدت ۲٤ ساعت شستشومیدهیم. دراین مرحله که باندهای پرسی‌پیتاسیون کامل شده است وبصورت خطوط سفیدی در ژل شفاف نمایان‌اند ممکن است ازآنها عکس گرفته‌ویا اینکه پس‌از خشک کردن لام ورنگ‌آمیزی باآزوکارمین(3) ورنگ بری حاشیه‌آن‌عکسهای بزرگ شده گرفت و مورد مطالعه قرار داد و هنگام خشک کردن آگار معمولا برای اینکه کناره‌های بریده شده ناودان ترک نخورد وتغییری درشکل خطوط پرسی‌پیتاسیون ایجادنشود این ناودان را باژلوز ۱٪ پرمیکنیم وباگذاردن کاغذ صافی درسطح ژل آنرا دراتو ۳۷ درجه خشک میکنیم وژلوز بصورت فیلم نازکی در روی لام درمیاید که‌بارنگ‌آمیزی خطوط‌پرسی‌پیتاسیون بخوبی درآن دیده میشود.

نتایج و بحث: درشرائط الکتروفورزی فوق آلبومین وآلفا یک وآلفادو گلوبولین به‌طرف آنود حرکت میکند وبتا گلوبولین و گاما گلوبولین به‌طرف کاتد میرود دراین روش اغلب‌بتا یک ازبتا دو گلوبولین بخوبی جدا میشود. بنابراین باندهای پرسی‌پیتاسیون در طرف کاتد مربوط است به‌بتا گلوبولین ها و گاما گلوبولین ها وباندهای‌آلبومین وآلفا یک وآلفادو گلوبولین ها درطرف آنود دیده میشود (مأخذ شماره۱).

همینطور که ذکرشدازلحاظ مقایسه کانتی‌تاتیف‌درقسمت‌بالای هرلام‌ایمونوالکتروفورو-گرام‌شاهد طبیعی وجود دارد که‌بامقایسه آن میتوان به‌تغییرات‌پروتئین های سرم‌بیمارپی‌برد.

درمورد بیمار اول (شکل شماره۳) چنانچه دیده میشود باند گاما A با مقایسه‌با شاهد بسیار نازک وکم‌حجم وکوتاه‌تر است و همین خود دلیل برکمبود گاما گلوبولین A در سرم بیماراست. این بیمار مبتلا به‌آگاما گلوبولینمی‌اکتسابی است که بیماری نادری است.

واین اولین موردی است که دراین بخش مورد بررسی قرارگرفته است درموارد آگاما گلوبولینمی مطلق باند گاما اصلا دیده نمیشود.

درالکتروفورز کاغذی‌این بیماربانداگاما بسیارضعیف‌دیده‌میشود. ونسبت‌آن هفت‌درصداز

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19]

مجموع پروتئین های سرم است. درمورد بیماران مبتلا به میلوم مولتی پل نوع گاما پلاسموسیتوم باند YA بسیار ضخیم شده (بامقایسه شاهد) شکل شماره ٤ دراین بیماران گاهی باند β_2M و β_2X نیز واضح تراز معمول دیده میشود.

مقدار گاما گلوبولین دراین بیماران درحدود ۳۸٪ ازپروتئین تام بود.

درنوع آلفادوپلاسموسیتوم پروتئین های منطقه آلفا دوگلوبولین کم و بیش ازدیاد پیدا کرده‌اند. دومورد بسیارجالب دیگربیمارانی بودند که تشخیص معینی برای آنها داده نشده بود ویکی مبتلا به اسکلرودرمی ودیگری مشکوك به ابتلای به میلوم مولتی پل بودند. در الکتروفورز کاغذی سرم این بیماران یک باند اضافی و بسیار نزدیک به باند گاما گلوبولین دیده میشود. ایمونوالکتروفورز این دو بیمار (شکلهای شماره ٥ و٦) نشان میدهد که در هردو بیمار باند β_2M بسیار واضح وضخیم ترازشاهد شده است زیرا باند β_2M درحال طبیعی خیلی نازك دیده میشود مقدار گاما گلوبولین یاتغییری نکرده ویا کمتر شده است. وبالنتیجه تشخیص این دو بیمار ماکروگلوبولینی والداشتروم میباشد - مولکولهای β_2M را بوسیله اولتراسانتریفوژ جدا کرده‌اند واین مولکول ها مولکول سنگینی هستند ازنوع ۱۹S

بدین ترتیب دیده میشود که ایمونوالکتروفورز درتشخیص بیماریهای دیس پروتئین-امیک چه کمك باارزشی میکند.

خلاصه: پس از شرح دادن روش مخصوص ایمونوالکتروفورز که اینک دراین بخش معمول است نتایج بکاربردن ایمونوالکتروفورز در ۵ مورد بیمارانی که مبتلا به دیس پروتئین امی ازقبیل آگاما گلوبولینمی وبیماری کاهلروماکروگلوبولینمی والداشتروم بوده‌اند بررسی شده‌است.

مأخذ:

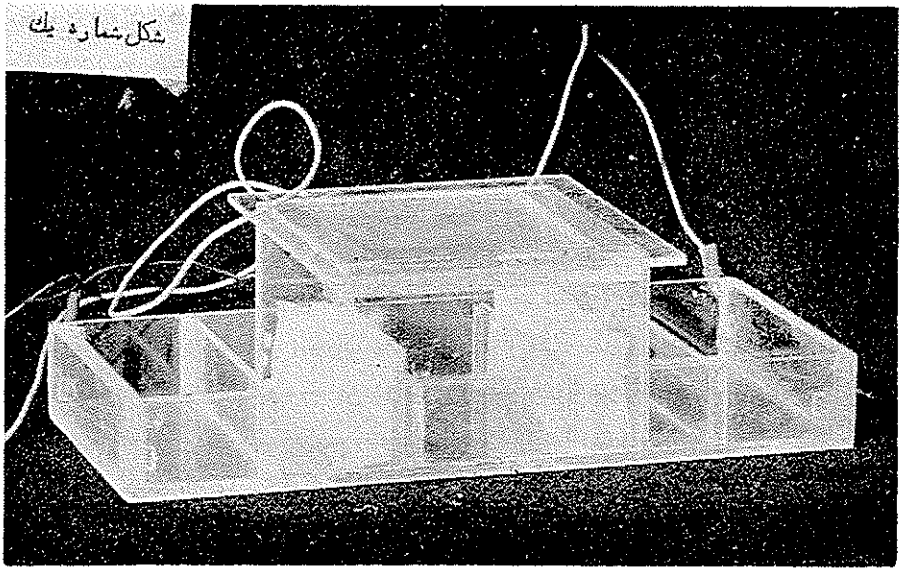
۱- دکتررهبر ایمونوالکتروفورز شماره٦ مجله دانشکده پزشکی اسفند۱۳٤۳

2- Peetom : The Agas Précipitationand its application Oliver and Boyd 1963

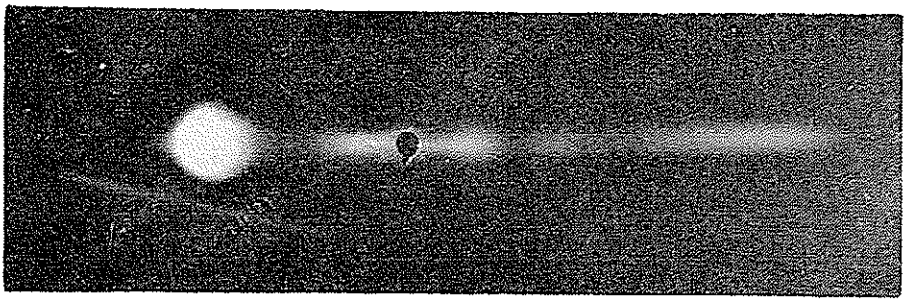
3- Wieme : Clinica Chimica Acta 4-317 1959

4- Crowle : Immunodiffusion A. P. 1961

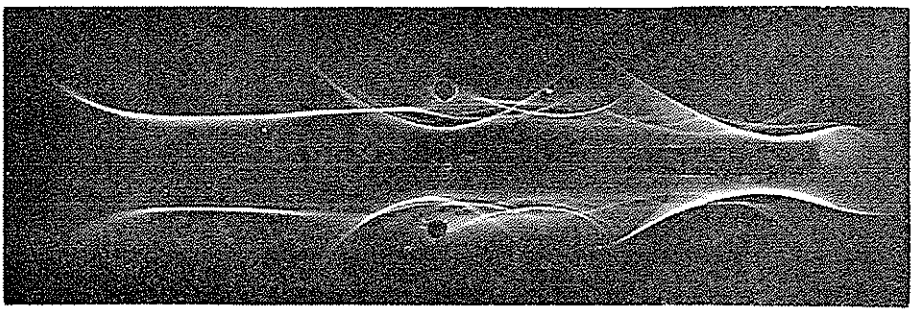
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19]



شکل ۱ ـ دستگاه الکترو فورز

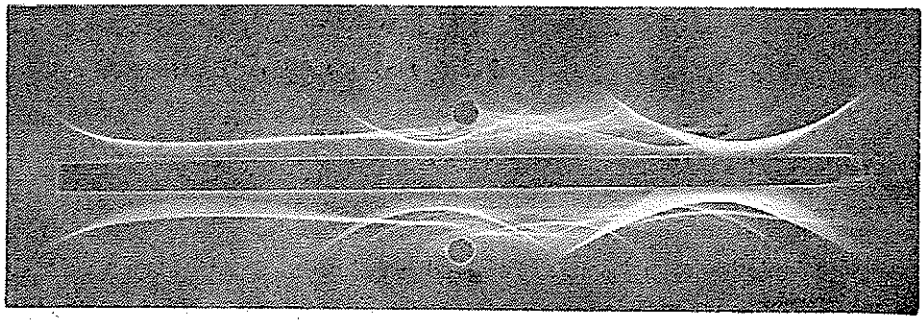


شکل ۲ ـ الکتروفورز ساده پروتئین های سرم درآگارژل از چپ براست :
آلبومین آلفایک، آلفا دو وبتا و گاما گلوبولین

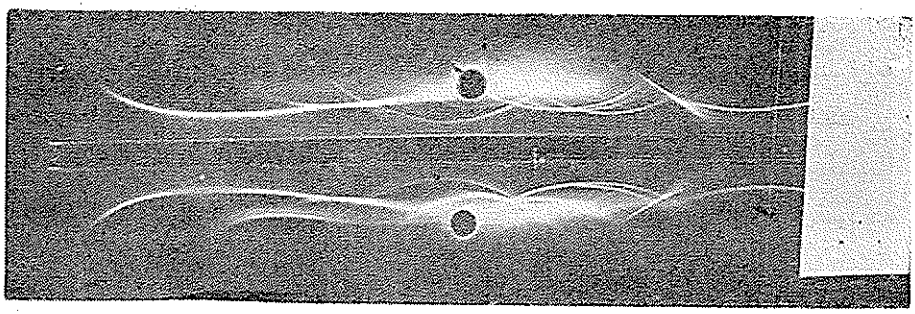


شکل ۳ ـ باند گاما گلوبولین در پائین با مقایسه با شاهد طبیعی دربالا کوتاه‌تر و کم حجم‌تر است بیمار مبتلا به آگاما گلوبولینمی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19]

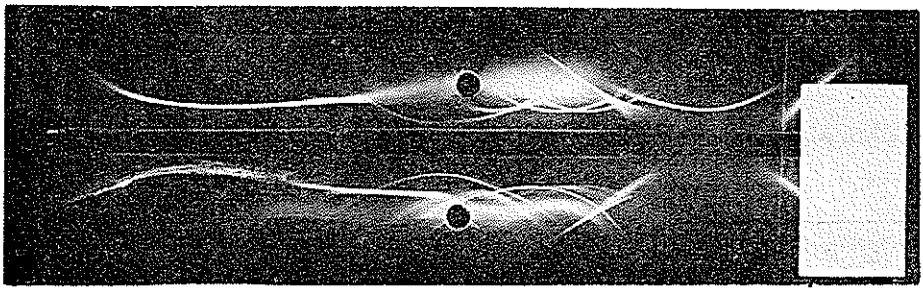


شکل ٤- منحنی دربالا طبیعی ودرقسمت پائین مربوط به‌بیمار مبتلا به‌میلوم مولتی‌پل میباشد- باندگاما درپائین حجیم‌تر وضخیم ترازشاهد طبیعی است



β_{2M}↗

شکل ٥- بیماری‌ماکروگلوبولینمی‌والدشتروم باند β_{2M} نمایان‌وحجیم‌ترازطبیعی‌است



β_{2M}↗

شکل٦- مربوط به بیمار مبتلا به‌ماکروگلوبولینی والداشتروم که باند β_{2M} واضح وحجیم شده است

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19]