

EKSPRESI RESEPTOR RETINOID X (α dan β) DALAM DIABETES AUTOIMUN

oleh

ZULKARNAIN MUSTAPHA

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

Februari 2005

DEDIKASI

Ditujukan khas buat,

Isteri tercinta, Haslinda,

Ibu dan ayahku,

Anak-anakku,

Terima kasih di atas segala pengorbanan dan sokongan kalian...

PENGHARGAAN

Dengan Nama Allah Yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang

Alhamdulillah setinggi-tinggi kesyukuran dipanjatkan kehadiran Allah s.w.t. kerana dengan izinNya penyelidikan dan tesis ini dapat disiapkan.

Setinggi-tinggi penghargaan dan jutaan terima kasih kepada penyelia-penyelia saya, Prof. Madya Dr. Nik Soriani Yaacob, Profesor Norazmi Mohd. Nor dan Profesor Datuk Mafauzy Mohammad di atas segala tunjuk ajar, nasihat, teguran, cadangan serta panduan dalam menjalankan penyelidikan dan penulisan tesis ini. Penghargaan juga kepada pihak MOSTI kerana menyediakan geran penyelidikan sebagai sumber kewangan projek. Juga kepada skim pensyarah pelatih serta tajaan oleh pihak USM adalah amat dihargai.

Saya juga ingin merakamkan ucapan terima kasih kepada Dekan Pusat Pengajian Sains Perubatan, Profesor Zabidi Azhar; Dekan Pusat Pengajian Sains Kesihatan, Profesor Zainul Fazirudin Zainuddin; Pengarah Informm (Institute for Molecular Medicine), Profesor Asma Ismail dan juga kepada Jabatan Pendaftar, Puan Hasnah Ishak di atas segala nasihat dan sokongan yang diberikan di sepanjang penyelidikan ini.

Terima kasih juga kepada Ketua Jabatan Patologi Kimia, Ketua Jabatan Patologi serta kakitangan kedua-dua jabatan berkenaan yang sentiasa sudi memberi tunjuk ajar terutamanya dari segi teknikal. Tidak lupa juga kepada kesemua rakan-rakan seperjuangan dari kumpulan penyelidikan Prof. Norazmi Mohd NOR (NMN), Prof. Zainul Fazirudin Zainuddin (ZFZ), Dr. Rape'ah Suppian, En. Jamaruddin Mat Asan, En. Arrifin Kaderi dan En. Arnizan yang sentiasa memberi inspirasi dan berkongsi segala kegembiraan jua kedukaan.

SENARAI KANDUNGAN

Kandungan

| | Muka surat |
|-------------------|-------------------|
| TAJUK | I |
| DEDIKASI | li |
| PENGHARGAAN | lii |
| SENARAI KANDUNGAN | lv |
| SENARAI JADUAL | xi |
| SENARAI RAJAH | xii |
| SENARAI PLAT | xv |
| ABSTRAK | xvi |
| ABSTRACT | xviii |

BAB 1 PENGENALAN

| | | |
|---------|---|----|
| 1.1 | Diabetes mellitus jenis 1 (T1DM) | 1 |
| 1.1.1 | Latar belakang T1DM | 1 |
| 1.1.2 | Unsur imunologi dalam patogenesis T1DM | 4 |
| 1.1.3 | Peringkat perkembangan T1DM | 7 |
| 1.1.4 | Mencit diabetes tidak obes (NOD): Model haiwan untuk T1DM | 9 |
| 1.1.4.1 | Latar belakang | 9 |
| 1.1.4.2 | Sejarah mencit NOD | 10 |
| 1.1.4.3 | Ciri-ciri mencit NOD | 11 |
| 1.1.4.4 | Strain kawalan untuk mencit NOD | 13 |
| 1.1.5 | Perubahan organ pankreas dalam T1DM | 15 |
| 1.1.6 | Strategi pengesanan awal dan pencegahan T1DM | 19 |
| 1.2 | Reseptor Retinoid X (RXR) | 25 |
| 1.2.1 | Latar belakang | 25 |
| 1.2.2 | Struktur dan organisasi gen | 26 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.2.3 | Ligand untuk RXR | 29 |
| 1.2.4 | Corak ekspresi gen RXR | 29 |
| 1.3 | Interaksi RXR dengan pelbagai reseptor nukleus lain | 30 |
| 1.3.1 | Latar belakang | 30 |
| 1.3.2 | Aspek molekul | 30 |
| 1.3.2.1 | Elemen gerak balas hormon | 30 |
| 1.3.2.2 | Monomer, homodimer dan heterodimer | 31 |
| 1.3.2.3 | Mekanisme pengaktifan RXR dan kawalatur ekspresi gen sasaran | 33 |
| 1.3.3 | Aspek fisiologi | 34 |
| 1.3.3.1 | Fungsi biologi RXR | 34 |
| 1.4 | Ekspresi dan kuantifikasi gen | 38 |
| 1.5 | Tindak balas rantaian polimerase masa nyata (<i>real-time PCR</i>) | 39 |
| 1.6 | Rasional, matlamat dan perancangan kajian | 42 |

BAB 2 BAHAN DAN KAEDAH PENYELIDIKAN

| | | |
|-------|---|----|
| 2.1 | Bahan-bahan | 45 |
| 2.2 | Strain mencit | 45 |
| 2.3 | Bakteria | 45 |
| 2.4 | Air | 45 |
| 2.5 | Plasmid | 46 |
| 2.6 | Penyediaan media, larutan dan penampunan | 48 |
| 2.6.1 | Kaldu Luria-Bertani (LB) | 48 |
| 2.6.2 | Agar Luria-Bertani (LA) | 48 |
| 2.6.3 | Media RPMI | 48 |
| 2.6.4 | Stok antibiotik ampicilin | 49 |
| 2.6.5 | Larutan 5 M natrium klorida (NaCl) | 49 |
| 2.6.6 | Larutan 3 M natrium hidroksida (NaOH) | 49 |
| 2.6.7 | Larutan 1 M asid hidroklorida (HCl) | 49 |
| 2.6.8 | Larutan 100 mM magnesium klorida (MgCl ₂) | 50 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.6.9 | Larutan 100 mM kalsium klorida (CaCl ₂) | 50 |
| 2.6.10 | Larutan 0.5 M EDTA | 50 |
| 2.6.11 | Larutan penampakan Tris (TBS) | 51 |
| 2.6.12 | Larutan penampakan fosfat (PBS) | 51 |
| 2.6.13 | Larutan penampakan Tris-EDTA (TE) | 51 |
| 2.6.14 | Larutan penampakan Tris-asetat-EDTA (TAE) | 52 |
| 2.6.15 | Larutan penampakan sitrat | 52 |
| 2.6.16 | Larutan penampakan lisis amonium klorida/kalium (ACK) | 52 |
| 2.6.17 | Larutan penampakan muatan | 53 |
| 2.6.18 | Larutan etidium bromida (EtBr) | 53 |
| 2.6.19 | Larutan sodium dodesil sulfat (SDS) 10% | 53 |
| 2.6.20 | Larutan gliserol 80% | 53 |
| 2.6.21 | Larutan stok hematoksilin | 53 |
| 2.6.22 | Larutan formalin 10% | 54 |
| 2.6.23 | Larutan eosin 1% | 54 |
| 2.6.24 | Larutan asid alkohol 1% | 54 |
| 2.6.25 | Larutan amonia lemah | 54 |
| 2.6.26 | Larutan H ₂ O ₂ 3% dalam metanol | 55 |
| 2.6.27 | Larutan pelarut Tris (TBS) | 55 |
| 2.6.28 | Larutan substrat DAB | 55 |
| 2.6.29 | Larutan etanol 95% | 55 |
| 2.6.30 | Larutan etanol 80% | 55 |
| 2.6.31 | Larutan etanol 70% | 56 |
| 2.6.32 | Larutan etanol 50% | 56 |
| 2.6.33 | Penanda DNA | 56 |
| 2.7 | Penyelenggaraan haiwan kajian | 56 |
| 2.7.1 | Penjagaan mencit | 56 |
| 2.7.2 | Pengukuran kandungan glukosa darah | 57 |
| 2.7.3 | Pengambilan organ kajian | 57 |
| 2.7.4 | Pemencilan limfosit daripada limpa | 58 |
| 2.8 | Pengasingan limfosit T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ secara pemisahan | 59 |

imunomagnetik

| | | |
|--------|--|----|
| 2.8.1 | Penyediaan bahan untuk pengasingan limfosit T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ daripada limpa | 59 |
| 2.8.2 | Kaedah pengasingan limfosit T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ secara pemisahan imunomagnetik | 59 |
| 2.9 | Analisis flow sitometri | 60 |
| 2.10 | Pengekstrakan RNA total | 61 |
| 2.11 | Penentuan kepekatan dan ketulenan RNA | 62 |
| 2.12 | Sintesis bebenang tunggal cDNA | 62 |
| 2.13 | Penyediaan reagen untuk tindak balas rantaian polimerase (PCR) dan PCR himpunan | 63 |
| 2.13.1 | Pemilihan primer kajian | 63 |
| 2.13.2 | Penyediaan larutan stok kerja primer | 63 |
| 2.13.3 | Penyediaan larutan stok kerja oligonukleotida untuk PCR himpunan | 63 |
| 2.13.4 | Penyediaan <i>master mix</i> reagen-reagen PCR dan PCR himpunan | 64 |
| 2.13.5 | Analisis elektroforesis gel agarosa | 65 |
| 2.14 | Pengklonan produk PCR ke dalam vektor pengklonan | 66 |
| 2.14.1 | Penyediaan sel bakteria kompeten untuk pengklonan DNA | 66 |
| 2.14.2 | Proses ligasi produk PCR ke dalam vektor pCR2.1 TOPO | 66 |
| 2.14.3 | Proses transformasi | 67 |
| 2.14.4 | Penyaringan koloni bakteria | 67 |
| 2.15 | Ekstraksi plasmid DNA | 68 |
| 2.16 | Tindak balas rantaian polymerase masa nyata (<i>real-time PCR</i>) | 69 |
| 2.16.1 | Penyediaan reagen dan <i>master mix</i> untuk <i>real-</i> | 69 |

| | | |
|--------------|---|----|
| | <i>time PCR</i> | |
| | 2.16.2 Proses amplifikasi <i>real-time PCR</i> | 69 |
| 2.17 | Penyediaan slaid histologi | 70 |
| | 2.17.1 Penyediaan tisu blok paraffin | 70 |
| | 2.17.1.1 Fiksasi tisu | 70 |
| | 2.17.1.2 Pemrosesan tisu | 70 |
| | 2.17.1.3 Hirisan tisu | 70 |
| 2.18 | Teknik pewarnaan hematoksilin dan eosin | 71 |
| 2.19 | Teknik pewarnaan imunohistokimia | 71 |
| 2.20 | Analisis statistik | 73 |
| | | |
| BAB 3 | KUANTIFIKASI GEN RXRα DAN RXRβ DI DALAM LIMFOSIT T CD4$^+$ DAN CD8$^+$ MENCIT NOD DAN NOR | |
| | | |
| 3.1 | Pembangunan standard internal homologus untuk gen RXR α dan RXR β | 74 |
| | 3.1.1 Pengenalan | 74 |
| | 3.1.2 Aliran kerja | 74 |
| | 3.1.3 Pemilihan primer dan prob kajian | 75 |
| | 3.1.4 Amplifikasi gen RXR β daripada templat cDNA | 79 |
| | 3.1.4.1 Templat untuk ujian PCR | 79 |
| | 3.1.4.2 Ujian optimisasi parameter PCR | 81 |
| | 3.1.5 Amplifikasi gen RXR α menggunakan teknik PCR himpunan | 81 |
| | 3.1.5.1 Pemilihan oligonukleotida | 81 |
| | 3.1.5.2 Tindak balas himpunan gen | 83 |
| | 3.1.5.3 Tindak balas amplifikasi gen | 83 |
| | 3.1.6 Pembentukan plasmid rekombinan pNSY-RXRA dan NSY-RXRB | 85 |
| | 3.1.7 Pengesahan kehadiran fragmen gen RXR α dan RXR β di dalam plasmid rekombinan | 86 |
| | 3.1.8 Percubaan ujian <i>real-time PCR</i> menggunakan | 88 |

plasmid rekombinan sebagai standard internal

| | | |
|--------------|---|-----|
| 3.2 | Kuantifikasi gen RXR α dan RXR β di dalam limfosit T CD4 $^+$ dan CD8 $^+$ dengan menggunakan <i>real-time PCR</i> | 91 |
| 3.2.1 | Aliran kerja | 91 |
| 3.2.2 | Parameter berat mencit, berat limpa, bilangan sel limpa dan kandungan glukosa darah | 91 |
| 3.2.3 | Pengasingan limfosit T CD4 $^+$ dan CD8 $^+$ | 94 |
| 3.2.4 | Kepekatan, ketulen dan integriti RNA total yang terhasil | 98 |
| 3.2.5 | Ujian integriti bebenang tunggal cDNA | 98 |
| 3.2.6 | Analisis <i>real-time PCR</i> ekspresi gen RXR α dan RXR β | 101 |
| 3.2.6.1 | Plot amplifikasi dan analisis data | 101 |
| 3.2.6.2 | Pengiraan ekspresi salinan mRNA RXR α dan RXR β | 101 |
| 3.2.6.3 | Ekspresi gen RXR α di dalam limfosit T CD4 $^+$ dan CD8 $^+$ mencit NOD dan NOR | 103 |
| 3.2.6.4 | Ekspresi gen RXR β di dalam limfosit T CD4 $^+$ dan CD8 $^+$ mencit NOD dan NOR | 104 |
| 3.3 | Perbincangan | 109 |
| BAB 4 | KAJIAN EKSPRESI RXRα DAN RXRβ DI DALAM TISU PANKREAS | |
| 4.1 | Pengenalan | 112 |
| 4.2 | Aliran kerja | 113 |
| 4.3 | Analisis histologi pankreas melalui pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E) | 113 |
| 4.4 | Analisis imunohistokimia RXR α dan RXR β ke atas tisu pankreas | 117 |
| 4.4.1 | Ujian optimisasi analisis imunohistokimia | 117 |

| | | |
|----------------------------------|---|-----|
| 4.4.2 | Skor imunohistokimia | 119 |
| 4.4.3 | Corak ekspresi RXR α dan RXR β | 121 |
| 4.5 | Perbincangan | 126 |
| BAB 5 PERBINCANGAN UMUM | | |
| 5.1 | Perbincangan keseluruhan | 130 |
| 5.2 | Kesimpulan | 141 |
| 5.3 | Kajian masa hadapan | 142 |
| RUJUKAN | | 144 |
| PEMBENTANGAN KERTAS KERJA | | 158 |

SENARAI JADUAL

| | Jadual | Muka surat |
|------------|--|------------|
| Jadual 1.1 | Pengkelasan diabetes mellitus berdasarkan kepada etiologi (Adaptasi daripada <i>WHO Expert Committee Report</i> , 2000) | 3 |
| Jadual 1.2 | Perbandingan daripada segi gambaran klinikal (A), morfologi (B) dan imunologi (C) di antara mencit NOD dan manusia (Adaptasi daripada <i>Lampeter et al.</i> , 1989) | 12 |
| Jadual 1.3 | Gen diabetogenik di dalam mencit NOD (Adaptasi daripada <i>Karasit et al.</i> , 1994) | 14 |
| Jadual 2.1 | Senarai bahan-bahan kimia dan senarai pembekal | 46 |
| Jadual 3.1 | Ringkasan maklumat a) primer serta saiz produk amplifikasi yang dijangkakan dan b) prob kajian | 80 |
| Jadual 3.2 | Senarai oligonukleotida yang digunakan untuk PCR himpunan bagi RXR α . | 84 |
| Jadual 3.3 | Parameter berat badan, berat limpa, kandungan glukosa darah dan bilangan sel limpa. | 95 |
| Jadual 4.1 | Peratusan insulitis mengikut gred yang terdapat di dalam pankreas mencit NOD dan NOR pra diabetes (5, 9 minggu) dan peringkat diabetes (dNOD, dcNOR; > 10 minggu) | 118 |
| Jadual 4.2 | Senarai antibodi yang digunakan bersama pencairan dan tempoh eraman optimum | 120 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Jadual 4.3 | Keputusan ujian imunohistokimia RXR α dan RXR β ke atas pankreas mencit NOD dan NOR | 124 |
|------------|--|-----|

SENARAI RAJAH

| | Rajah | Muka surat |
|-----------|---|------------|
| Rajah 1.1 | Mekanisme pemusnahan sel β dalam diabetes mellitus jenis 1 (Adaptasi daripada Kawasaki <i>et al.</i> , 2004) | 6 |
| Rajah 1.2 | Perkembangan T1DM mengikut peringkat digambarkan secara skematik (Adaptasi daripada Skyler <i>et al.</i> , 2001) | 8 |
| Rajah 1.3 | Struktur organ pankreas manusia (Adaptasi daripada Van De Graaff <i>et al.</i> , 1997) | 16 |
| Rajah 1.4 | Strategi pencegahan T1DM bermula dari sejarah awal penyakit hingga kepada kemunculan manifestasi klinikal (Adaptasi daripada Skyler <i>et al.</i> , 2001) | 21 |
| Rajah 1.5 | Formula perkembangan dan patogenesis T1DM | 23 |
| Rajah 1.6 | Struktur utama reseptor nukleus (Adaptasi daripada Rastinejad, 2001) | 27 |
| Rajah 1.7 | Corak elemen gerak balas reseptor nukleus (Adaptasi daripada Rasjinejad, 2001) | 32 |
| Rajah 1.8 | Mekanisme pengaktifan RXR-PPAR dan kawalatur transkripsi gen sasaran bersama pasangan heterodimer PPAR (Adaptasi daripada Balasubramanyan <i>et al.</i> , 2000) | 35 |
| Rajah 1.9 | Lakaran skematik menunjukkan prinsip <i>real-time PCR</i> | 41 |

yang menggunakan prob berpendaflour (Adaptasi daripada Overbergh *et al.*, 2003)

| | | |
|-----------|---|----|
| Rajah 3.1 | Langkah-langkah aliran kerja pembangunan standard internal homologus untuk RXR α and RXR β | 76 |
| Rajah 3.2 | Jujukan gen mRNA RXR α bersama kedudukan primer (diwarnakan merah) dan kedudukan prob (diwarnakan hijau) | 77 |
| Rajah 3.3 | Jujukan gen mRNA RXR β bersama kedudukan primer (diwarnakan merah) dan kedudukan prob (diwarnakan hijau) | 78 |
| Rajah 3.4 | Analisis elektroforesis gel agarosa ke atas a) RXR α hasil daripada tindak balas PCR himpunan dan b) RXR β yang disasarkan daripada cDNA limfosit T | 82 |
| Rajah 3.5 | Analisis elektroforesis gel agarosa RXR α dan RXR β yang diamplifikasi daripada plasmid rekombinan yang dibangunkan | 87 |
| Rajah 3.6 | Contoh plot amplifikasi <i>real-time PCR</i> hasil daripada pengukuran gen RXR α di dalam plasmid rekombinan pNSY-RXRA yang dibangunkan. Plot menunjukkan kedudukan larutan standard berkepekatan daripada 10^{-3} kepada 10^{-8} (pmol) | 89 |
| Rajah 3.7 | Keluk standard untuk gen RXR α merupakan plot garis lurus yang menghubungkan antara pencairan standard dengan <i>cycle threshold</i> (Ct). $R^2 = 0.997304$ | 90 |
| Rajah 3.8 | Langkah-langkah aliran kerja penyediaan kerja penyediaan limfosit limpa bagi tujuan ekstraksi RNA dan pembentukan cDNA | 92 |
| Rajah 3.9 | Kandungan glukosa darah mencit daripada kumpulan diabetes | 93 |

(dNOD)

| | | |
|------------|---|-----|
| Rajah 3.10 | Analisis keputusan flow sitometri. Contoh dot plot a) sebelum dan b) selepas pengasingan limfosit T CD4 ⁺ c) Pengiraan efisiensi pengasingan limfosit T CD4 ⁺ | 96 |
| Rajah 3.11 | Analisis keputusan flow sitometri. Contoh dot plot a) sebelum dan b) selepas pengasingan limfosit T CD8 ⁺ c) Pengiraan efisiensi pengasingan limfosit T CD8 ⁺ | 97 |
| Rajah 3.12 | Contoh analisis elektroforesis gel agarosa RNA total bagi limfosit T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ | 99 |
| Rajah 3.13 | Contoh analisis elektroforesis gel agarosa ekspresi gen GAPDH sebagai petunjuk integriti sintesis cDNA. | 100 |
| Rajah 3.14 | Contoh plot amplifikasi <i>real-time PCR</i> hasil daripada pengukuran gen RXR α di dalam limfosit T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ mencit dNOD | 102 |
| Rajah 3.15 | Ekspresi gen RXR α di dalam limfosit T CD4 ⁺ mencit NOD dan NOR. | 105 |
| Rajah 3.16 | Ekspresi gen RXR α di dalam limfosit T CD8 ⁺ mencit NOD dan NOR. | 106 |
| Rajah 3.17 | Ekspresi gen RXR β di dalam limfosit CD4 ⁺ mencit NOD dan NOR. | 107 |
| Rajah 3.18 | Ekspresi gen RXR β di dalam limfosit CD4 ⁺ mencit NOD dan NOR | 108 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Rajah 4.1 | Langkah-langkah aliran kerja pewarnaan hematoksilin dan eosin serta ujian imunohistokimia ke atas pankreas mencit | 114 |
|-----------|---|-----|

SENARAI PLAT

| | Plat | Muka Surat |
|----------|---|------------|
| Plat 4.1 | Pewarnaan H&E ke atas pankreas menunjukkan perbezaan antara mencit a) NOD5 dan b) dNOD | 115 |
| Plat 4.2 | Pewarnaan H&E ke atas pankreas mencit NOD menunjukkan beberapa gred insulitis | 116 |
| Plat 4.3 | Contoh fotomikrograf analisis imunohistokimia ke atas tisu kontrol positif dan negatif bagi antibodi poliklon anti-RXR α dan anti-RXR β | 122 |
| Plat 4.4 | Contoh fotomikrograf analisis imunohistokimia daripada blok parafin pankreas mencit dcNOR (Pembesaran 20 X) | 123 |
| Plat 4.5 | Contoh fotomikrograf analisis imunohistokimia ke atas tisu pankreas daripada blok parafin mencit NOD dan NOR dengan menggunakan antibodi poliklon anti-RXR α (Pembesaran 40 X). Kesemua tisu menunjukkan tindak balas positif terhadap antibodi anti-RXR α | 126 |
| Plat 4.6 | Contoh fotomikrograf analisis imunohistokimia ke atas tisu pankreas daripada blok parafin mencit NOD dan NOR dengan menggunakan antibodi poliklon anti-RXR β (Pembesaran 40 X). Kesemua tisu tidak menunjukkan sebarang tindak balas terhadap antibodi anti-RXR β | 127 |

ABSTRAK

Mencit diabetes tanpa obes (NOD) adalah satu daripada model haiwan untuk penyakit diabetes autoimun, diabetes melitus jenis 1 (T1DM). Kira-kira 80% daripada mencit betina NOD akan menjadi diabetes secara spontan apabila mencecah usia antara 9 – 30 minggu. Kejadian patologi utama di dalam mencit ini dikenali sebagai insulinitis, iaitu penyusupan masuk sel-sel mononukleus terutamanya makrofaj, limfosit T dan limfosit B ke dalam pulau Langerhans. Reseptor retinoid X (RXR) adalah sejenis reseptor daripada superfamili reseptor nukleus hormon yang memainkan peranan penting dalam mengawal morfogenesis, perkembangan, tumbesaran dan differensiasi sel dan juga mungkin terlibat di dalam kawalatur sistem imun. Ia juga bertindak sebagai pasangan heterodimer utama reseptor nukleus lain seperti PPAR, RAR dan VDR. Kajian ini dilakukan bertujuan untuk menganalisis ekspresi mRNA RXR α dan RXR β di dalam limfosit splenik CD4⁺ dan CD8⁺ mencit NOD menggunakan tindak balas polimerase masa nyata (*real-time PCR*). Limfosit T splenik CD4⁺ dan CD8⁺ dipencilkan daripada 3 kumpulan mencit NOD iaitu mencit berusia 5 minggu (NOD5), 9 minggu (NOD9) dan mencit diabetes (dNOD). RNA total dipencilkan daripada setiap jenis sel imun tersebut dan cDNA disintesis. Kajian yang sama juga dilakukan ke atas kumpulan mencit tidak obes rintang diabetes (NOR) yang bertindak sebagai kawalan tersuai usia kepada kumpulan mencit NOD, iaitu NOR5, NOR9 dan dcNOR (kawalan diabetes NOR). Tahap ekspresi isoform-isoform RXR di dalam setiap subset limfosit T bagi setiap mencit diukur dengan kaedah *real-time PCR* menggunakan standard internal homologus untuk setiap

isoform RXR yang dibangunkan secara spesifik. Di samping itu, corak ekspresi protein RXR di dalam pankreas kedua-dua kumpulan mencit NOD dan NOR juga diselidiki menggunakan kaedah imunohistokimia. Hasil daripada kajian ini menunjukkan kesemua RXR α dan RXR β yang dikaji diekspres secara berbeza oleh limfosit splenik CD4⁺ dan CD8⁺ di dalam setiap kumpulan mencit. Ekspresi RXR α adalah lebih rendah di dalam kedua-dua limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺ mencit NOD berbanding dengan mencit NOR pada kesemua peringkat umur. Sebaliknya, ekspresi RXR β adalah lebih tinggi pada peringkat pra diabetes tetapi menurun pada peringkat diabetes. Penemuan ini mencadangkan bahawa perubahan dalam ekspresi mRNA kedua-dua isoform RXR mungkin penting dalam perkembangan penyakit T1DM. Sementara itu, hanya protein RXR α dapat dilihat di dalam pankreas kedua-dua mencit NOD dan NOR pada kesemua peringkat umur, sedangkan protein RXR β tidak dapat dikesan. Ekspresi protein RXR α hanya dapat dikesan di dalam pulau Langerhans tetapi tiada di dalam sel asinus, mencadangkan hanya reseptor ini memainkan peranan yang signifikan dalam fisiologi pankreas.

EXPRESSION OF RETINOID X RECEPTORS (α AND β) IN AUTOIMMUNE DIABETES

ABSTRACT

The non-obese diabetic (NOD) mouse is an animal model of autoimmune diabetes, type 1 diabetes mellitus (T1DM) that spontaneously develops autoimmune diabetes between the ages of 9 to 30 weeks of life. The major pathological event in these mice is mononuclear cell infiltration into the islets of Langerhans, known as insulinitis, mainly by macrophages, T lymphocytes and B lymphocytes. Retinoid X receptor (RXR) plays an important role in regulating the morphogenesis, development, growth and differentiation of cell and may be involved in the regulation of immune response. It also acts as a major heterodimer partner with other nuclear receptors such as PPARs, RAR and VDR. The aim of this study was to analyze the mRNA expression of two RXR isoforms in splenic T lymphocyte CD4⁺ and CD8⁺ of NOD mice using quantitative real time polymerase chain reaction. Splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated from three groups of NOD mice, specifically five week old (NOD5), nine week old (NOD9) and diabetic group (dNOD). Total RNA was isolated and cDNA was synthesized from each cell subset. The same procedures were also carried out on groups of the non-obese resistance (NOR) mice, namely NOR5, NOR9 and dcNOR (diabetic-control NOR) which served as age-matched controls to the NOD mice. The expression levels of the RXR isoforms in each subset of T lymphocytes were quantified by real time PCR using specifically developed homologous internal standards for each RXR isoform. In addition, the levels of RXR proteins in the

pancreas of both NOD and NOR mice were also studied using immunohistochemistry. This research demonstrated that RXR α and RXR β were differentially expressed in the splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells. RXR α mRNA expression was found to be significantly decreased in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells of NOD mice compared to NOR mice in all age groups. In contrast, RXR β mRNA expression was significantly higher in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells of NOD mice compared to NOR mice at pre diabetic stage but decreased at diabetic stage. These findings suggest that alterations of mRNA expression of both RXR subtypes may be important in the development and progression of T1DM. Meanwhile, only RXR α protein was observed in both NOD and NOR mice at pre diabetic and diabetic stages, whereas RXR β was not detected. The expression of RXR α protein was observed only in the islets of Langerhan and not in the acinus cells in the pancreas, suggesting that only this type of RXR receptor isoform plays a significant role in the physiology of the pancreas.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Diabetes mellitus jenis 1 (T1DM)

1.1.1 Latar belakang T1DM

Diabetes mellitus dapat didefinisikan sebagai sejenis penyakit yang disebabkan oleh gangguan metabolisme karbohidrat. Manifestasi klinikal diabetes mellitus ditunjukkan oleh gejala hiperglisemia samada dalam keadaan akut ataupun kronik. Hiperglisemia akut boleh membawa kepada keadaan yang boleh membawa maut iaitu ketoasidosis, sementara hiperglisemia kronik boleh membawa kepada keadaan komplikasi diabetes seperti retinopati, nefropati, neuropati serta komplikasi jantung (Wetterhall *et al.*, 1992).

Persatuan Diabetes Amerika (American Diabetes Association, ADA) bersama Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) secara berasingan telah mengubah kriteria pengelasan dan diagnosis T1DM. Walau bagaimanapun, kedua-dua kumpulan itu secara umumnya telah membuat kesimpulan yang sama tentang pengelasan penyakit ini. ADA telah menerbitkan cadangannya pada tahun 1997 (*Report of the expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus*, 1997) sementara kumpulan WHO telah menerbitkan kesimpulannya pada tahun 1999 (*Report of a WHO Consultation*, 1999). Sebelum ini, diabetes mellitus dikelaskan berdasarkan kepada jenis rawatan iaitu *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) dan *non-insulin dependent diabetes mellitus* (NIDDM). Ia kemudian diubah kepada berdasarkan etiologi.

Dalam pengkelasan berdasarkan kepada etiologi ini, istilah IDDM dan NIDDM telah digugurkan. Diabetes mellitus yang disebabkan oleh kekurangan hormon insulin dikelaskan sebagai diabetes mellitus jenis 1 (*Type 1 diabetes mellitus*, T1DM). Diabetes jenis ini biasanya bermula pada peringkat kanak-kanak secara akut dan pesakit T1DM memerlukan bekalan hormon insulin untuk hidup. Sementara diabetes mellitus yang disebabkan oleh rintangan terhadap hormon insulin pula dikelaskan sebagai diabetes mellitus jenis 2 (*Type 2 diabetes mellitus*, T2DM). T2DM biasanya berlaku pada usia yang lebih lewat, bermula lebih perlahan dan keperluan rawatan insulin adalah bergantung kepada manifestasi klinikal. Pengkelasan diabetes mellitus secara menyeluruh ditunjukkan dalam Jadual 1.1.

Walaupun kefahaman sebenar tentang etiologi T1DM ini masih jauh, penentuan genetik dan faktor persekitaran dianggap sebagai faktor penting pada kebanyakan penghidap diabetes. Antara kawasan gen yang berkait dengan T1DM ialah kompleks *human leukocyte antigen* (HLA) pada lengan pendek kromosom 6. Gen kelas II HLA, terutamanya yang mengkod molekul HLA-DQ, mempunyai kaitan paling kuat dengan risiko diabetes (Caillat-Zucman *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1994).

Oleh itu, penyakit ini mempunyai kecenderungan keluarga yang kuat. Walau bagaimanapun, kajian ke atas kembar monozigot menunjukkan kadar keselarasan (*concordance*) yang rendah (21 - 70%) dan juga peningkatan insiden penyakit ini menggambarkan patogenesis penyakit ini juga boleh dipengaruhi oleh faktor persekitaran (Petersen *et al.*, 1997; Redondo *et al.*, 1999). Jangkitan enterovirus dan diet merupakan antara komponen utama faktor persekitaran yang paling banyak dikaji walaupun bukti konklusif masih belum ditemui (Dahlquist *et al.*, 1995; Hyoty *et al.*, 1995).

Jadual 1.1 Pengkelasan diabetes mellitus berdasarkan kepada etiologi

(Adaptasi daripada *Report of a WHO Consultation, 1999*)

Jenis 1 (Pemusnahan sel beta yang menyebabkan kekurangan hormon insulin secara mutlak)

- A. Autoimun
- B. Idiopati

Jenis 2 (Kebanyakan disebabkan oleh rintangan insulin dengan kekurangan insulin secara relatif ataupun kekurangan rembesan insulin dengan atau tanpa rintangan insulin)

Jenis spesifik yang lain

- A. Kecacatan genetik terhadap fungsi sel beta
- B. Kecacatan genetik terhadap tindak balas insulin
- C. Penyakit pankreas eksokrin
- D. Rangsangan dadah ataupun bahan kimia
- E. Infeksi
- F. Diabetes perantara-imun yang luar biasa
- G. Sindrom genetik yang berkait dengan diabetes

Diabetes mellitus kehamilan (*Gestational diabetes mellitus*)

Kajian terbaru bidang epidemiologi menunjukkan terdapat variasi yang tinggi tentang insiden T1DM di seluruh dunia. Insiden tahunan bagi kanak-kanak yang berumur 14 tahun dan ke bawah di negara China ialah 0.1/100 000 berbanding dengan 37/100 000 di negara Finland (EURODIAB ACE Study Group, 2000; Karvonen *et al.*, 2000). Ini menunjukkan kedua-dua faktor genetik dan persekitaran memainkan peranan penting dalam patogenesis penyakit T1DM.

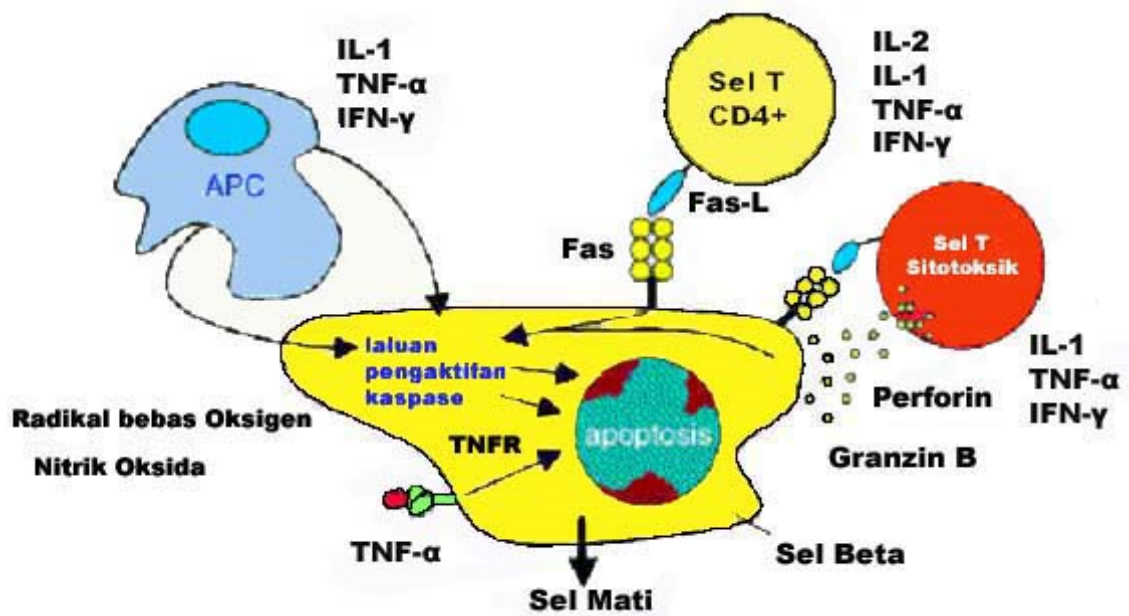
Pesakit diabetes di seluruh dunia menjelang tahun 2010 diramalkan seramai 221 juta orang berbanding 124 juta pada tahun 1997 (Bjork *et al.*, 2001). Walaupun jumlah pesakit T1DM hanya merangkumi kira-kira 5 - 10% berbanding pesakit T2DM, penyakit T1DM mempunyai kadar morbiditi dan mortaliti yang lebih tinggi. Ini memandangkan penyakit ini bermula pada peringkat umur yang lebih awal, di samping ia mempunyai risiko yang tinggi untuk mendapat ketoasidosis diabetes. Oleh itu, fokus utama kajian kebanyakan penyelidik masa kini ke atas penyakit T1DM adalah lebih tertumpu kepada mencari sesuatu yang dapat menyekat dan menghalang proses penyakit ini.

1.1.2 Unsur imunologi dalam patogenesis T1DM

Proses penyakit T1DM melibatkan pemusnahan sel-sel β pankreas secara selektif. Secara umumnya, faktor pemusnahan sel-sel β ini disebabkan oleh fenomena autoimun (Bach, 1988; Rossini *et al.*, 1991; Honeyman *et al.*, 1993). Faktor sebenar yang mencetus fenomena autoimun ini masih samar, namun sebagaimana yang telah dinyatakan, besar kemungkinan ia disebabkan oleh interaksi di antara pengaruh genetik dan faktor persekitaran. Antara bukti-bukti yang menyokong konsep autoimun dalam T1DM termasuklah penyusupan masuk sel-sel limfosit di sekeliling pulau Langerhans (insulitis) yang terdiri daripada sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$ (Foulis *et al.*, 1991; Esensten, 2001);

penemuan autoantibodi spesifik untuk insulin dan sel pulau seperti *islet cytoplasmic antibodies* (ICA), *insulin autoantibodies* (IAA), *glutamic acid decarboxylase antibodies* (GADA) dan *islet tyrosine phosphatases* (IA2 dan IA2 β) (Genovese *et al.*, 1992; Gianani *et al.*, 1992; Atkinson *et al.*, 1993); hubungkait dengan kompleks histokompatibiliti utama (*major histocompatibility complex*, MHC) I dan II (Campbell *et al.*, 1988; Rossini *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 2000); pemusnahan sel-sel β pankreas hasil tindak balas sitokin pemusnah (*interleukin-1* [IL-1], *tumor necrosis factor* [TNF- α]) dan *interferon γ* [IFN- γ]) (Campbell *et al.*, 1991; Amrani *et al.*, 2000); ketahanan sel-sel β daripada pemusnahan apabila dirawat dengan menggunakan agen perencat imun (Feutren *et al.*, 1986); dan pengulangan insulinitis limfosit di dalam organ pankreas yang dipindahkan (Sibley *et al.*, 1987).

Di dalam mencit diabetes tidak obes (*non obese diabetic*, NOD), berlaku penyusupan masuk sel mononukleus ke dalam pulau Langerhans, diikuti oleh pemusnahan sel-sel β pankreas, kekurangan hormon insulin dan akhirnya mendorong ke arah hiperglisemia (Jansen *et al.*, 1994). Sel-sel yang mempersembahkan antigen, seperti makrofaj dan sel dendritik muncul lebih awal, diikuti oleh sel T CD4⁺, CD8⁺ dan sel B (O'Reilly *et al.*, 1991). Proses insulinitis ini bermula di sekeliling pulau Langerhans dan seterusnya memasuki ke dalam pulau dan memusnahkan sel-sel β . Mekanisme pemusnahan sel-sel β dalam T1DM ditunjukkan di dalam Rajah 1.1. Sel T menjadi perantara pemusnah sel melalui pembebasan molekul sitotoksik, termasuk sitokin, granzin B atau perforin, ataupun melalui penghantaran isyarat kematian sel melalui laluan Fas. Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ teraktif bertindak secara bersama bagi mengaktifkan kematian sel β melalui proses yang dikenali sebagai apoptosis. Apoptosis diaktifkan melalui laluan kaspase, yang mana laluan ini pula diaktifkan oleh beberapa mekanisme alternatif termasuk, interaksi antara



Rajah 1.1 Mekanisme pemusnahan sel β dalam diabetes mellitus jenis 1
(Adaptasi daripada Kawasaki *et al.*, 2004)

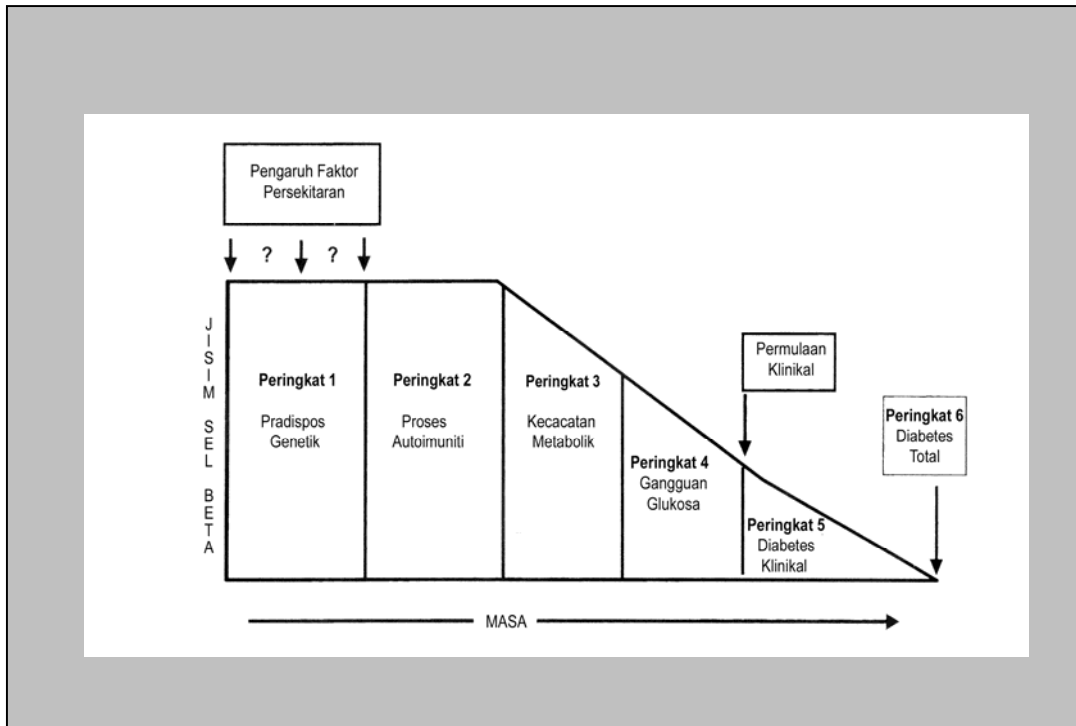
Fas dengan ligand Fas (FasL), tindakan nitrik oksida (NO) dengan radikal bebas dan pemecahan membran oleh perforin dan granzin B yang dihasilkan oleh sel T sitotoksik (Mandrup-Poulsen, 2003; Myung-Shik *et al.*, 2004). Sel T sitotoksik mempercepat kematian sel-sel β dengan cara meningkatkan kawalatur Fas dan FasL, dan juga merangsang penghasilan NO dan radikal bebas (Amrani *et al.*, 2000).

1.1.3 Peringkat perkembangan T1DM

Perkembangan T1DM boleh dibahagikan kepada 6 peringkat (Eisenbarth *et al.*, 1986). Pembahagian ini adalah bertujuan bagi memudahkan strategi pencegahan penyakit ini. Ini kerana setiap peringkat mempunyai etiologi dan kaedah pencegahan yang berbeza yang boleh menghalang daripada menular ke peringkat yang seterusnya. Rajah 1.2 menunjukkan patogenesis penyakit T1DM bermula dari faktor etiologi hinggalah kepada peringkat diabetes klinikal yang dibahagikan kepada 6 peringkat.

Peringkat 1. Pengaruh genetik dalam individu tertentu boleh mempengaruhi kerentanan kepada penyakit ini. Apabila faktor genetik ini digabungkan dengan faktor persekitaran ia bertindak sebagai pencetus kepada proses autoimun.

Peringkat 2. Rangsangan imun melawan sel-sel β menyebabkan insulinitis. Kejadian ini menyebabkan kerosakan, kekurangan fungsi dan kehilangan jisim sel-sel β di dalam pankreas. Kecederaan sel-sel β ini akan membentuk rangsangan imun humoral sekunder yang merangsang penghasilan autoantibodi (IAA, ICA, GADA, IA-2A).



Rajah 1.2 Peringkat perkembangan T1DM mengikut peringkat digambarkan secara skematik (Adaptasi daripada Skyler *et al.*, 2001)

Peringkat 3. Kekurangan jisim sel β menjejaskan penghasilan hormon insulin. Ini ditunjukkan oleh kehilangan fasa pertama tindak balas insulin (*first phase insulin response*) semasa ujian toleransi glukosa intravena (*intravenous glucose tolerance test*) pada peringkat ini.

Peringkat 4. Pada peringkat ini, terdapat gangguan toleransi glukosa (*impaired glucose tolerance*) dan juga gangguan glukosa puasa (*impaired fasting glucose*). Aras glukosa darah adalah melebihi had paras normal, tetapi masih belum mencapai tahap diagnosa diabetes.

Peringkat 5. Peringkat ini ditentukan oleh manifestasi klinikal diabetes. Pada permulaan peringkat ini, dijangka kira-kira 80% daripada fungsi sel β telah hilang, tetapi masih ada sel residual yang kekal berfungsi bagi homeostasis metabolik (dibuktikan dengan kehadiran peptida-C).

Peringkat 6. Pada peringkat ke 6 ini, kesemua sel β pankreas telah hilang. Ini ditunjukkan dengan ketiadaan peptida-C meskipun selepas ujian provokasi. Diabetes pada peringkat ini dikenali sebagai diabetes total, di mana ia dikenal pasti melalui ketidak seimbangan aras glukosa darah dan ketiadaan peptida-C di dalam darah.

1.1.4 Mencit diabetes tidak obes (NOD): Model haiwan untuk T1DM

1.1.4.1 Latar belakang

Kefahaman tentang patogenesis penyakit T1DM yang begitu kompleks telah berkembang dengan pesat melalui penggunaan model haiwan untuk kajian penyakit ini. Pelbagai aspek

dalam diabetes seperti genetik, etiologi, fisiologi, biokimia, kajian komplikasi dan intervensi boleh dikaji dengan menggunakan model haiwan. Umpamanya bagi kajian genetik, proses pembiakan boleh diatur, geneologi boleh dikekalkan dan pemerhatian pada pelbagai generasi boleh dilakukan dalam masa yang singkat. Begitu juga untuk kajian etiologi, kajian boleh dilakukan secara homogenus di mana kesan pelbagai faktor etiologi boleh dikaji secara berasingan pada masa yang sama (Ikegami & Makino, 2001).

Walau bagaimanapun, masalah yang timbul mengenai kajian menggunakan haiwan ialah kekurangan korelasi yang sempurna antara haiwan dengan manusia. Oleh itu, sebelum sesuatu kajian menggunakan model haiwan dilakukan, perlu ada pemilihan yang teliti dan interpretasi data yang diperolehi daripada haiwan adalah dianggap kritikal jika ia mahu diaplikasi kepada manusia. Setakat ini terdapat dua spesis utama mencit dan tikus yang digunakan sebagai model haiwan untuk T1DM. Antaranya ialah mencit NOD dan tikus *bio-breeding* (BB) (Rossini *et al.*, 1995).

1.1.4.2 Sejarah mencit NOD

Mencit NOD adalah strain mencit yang terhasil dari program pembiakbakaan dalam (*inbreeding*) bagi menghasilkan *cataract-prone subline* (CTS) daripada strain mencit Institut Penyelidikan Kanser, Tokyo (ICR) yang dilakukan oleh Makino dalam tahun 1980 (Makino *et al.*, 1980). Pada generasi ke 6, mencit CTS akan diasingkan bergantung kepada kandungan glukosa darah. Baka yang euglisemia (aras glukosa darah ~ 100 mg/dL) akan menjadi strain NOD, sementara baka yang mengalami hiperglisemia (aras glukosa darah ~ 150 mg/dL) akan menjadi strain tidak obes tanpa diabetes (*non-obese non diabetic*, NON). Kes pertama diabetes dikesan dalam mencit betina NOD pada generasi ke 20 dalam pembiakbakaan. Penamaan mencit NOD diberi mengikut pusat di

mana mencit itu dibiakkan. Umpamanya NOD/Ltj (Makmal Jackson, USA), NOD/ShiJic (Clea Japan Inc., Jepun), NOD/Bom (Bomholtgard, Denmark), NOD/RijHsd (Harlen UK Ltd., UK), NOD/Orlco (IFFA CREDO, France) dan NOD/LtSanlbm (RCC Biotechnology, Switzerland).

1.1.4.3 Ciri-ciri mencit NOD

Mencit NOD mempunyai beberapa ciri klinikal dan sifat patologi yang menyamai T1DM pada manusia. Diabetes berkembang secara spontan pada usia 12 – 30 minggu, yang dikenal pasti melalui manifestasi klinikal seperti polidipsia, glukosuria, pengurangan berat badan secara tiba-tiba, hiperglisemia dan ketoasidosis (Ohneda *et al.*, 1984; Kolb *et al.*, 1987). Perbandingan antara mencit NOD dengan manusia daripada aspek manifestasi klinikal, sifat morfologi dan imunologi, ditunjukkan di dalam Jadual 1.2.

Insulitis adalah proses penyusupan masuk sel-sel mononukleus ke dalam pulau Langerhans. Penyusupan ini boleh didapati di dalam kedua-dua jantina mencit dan terdiri daripada sel makrofaj, sel limfosit T dan limfosit B. Insulitis bermula di dalam pankreas mencit NOD seawal 3 – 4 minggu, di mana sel-sel ini berasal daripada kapilari eferen dan salur limfatik pada periferi pulau, dan seterusnya menyusup masuk ke dalam pulau. Keadaan inflamasi ini menyebabkan kemusnahan sel-sel β dalam pulau Langerhans (Gepts *et al.*, 1987; Signore *et al.*, 1989).

Sifat poligenik yang mempengaruhi perkembangan diabetes dalam mencit NOD diasaskan melalui kacukan luar dengan strain NON, yang diasingkan daripada kumpulan NOD pada generasi ke 6 (Makino *et al.*, 1980).

Jadual 1.2 Perbandingan daripada segi gambaran klinikal (A), morfologi (B) dan imunologi (C) di antara mencit NOD dengan manusia
(Adaptasi daripada Lampeter, 1989)

| A. Perbandingan gambaran klinikal | | |
|---|--------------------|-------------------|
| | Manusia | Mencit NOD |
| Kehilangan berat badan | Ada | Ada |
| Polidipsia | Ada | Ada |
| Poliuria | Ada | Ada |
| Hiperglisemia | > 15 mmol/l | 20-30 mmol/l |
| Ketoasidosis | Biasa | Kurang |
| Insulin dalam darah | Sangat rendah | Sangat rendah |
| Jantina | Lelaki ≥ Perempuan | Betina > Jantan |
| B. Perbandingan morfologi | | |
| | Manusia | Mencit NOD |
| Peri insulitis/insulitis | Ada | Ada |
| Insulitis di dalam subjek bukan diabetes | ? | Ada |
| Pepulau Langerhans yang kekurangan sel β | Ada | Ada |
| Penyusupan limfosit dalam organ lain | Jarang-jarang | Ada |
| C. Perbandingan sifat imunologi | | |
| | Manusia | Mencit NOD |
| Autoantibodi insulin | Ada | Ada |
| Antibodi sel pulau | Ada | Ada |
| Antibodi permukaan sel pulau | Ada | Ada |
| Nisbah sel T CD4 ⁺ / CD8 ⁺ abnormal | Ada | Ada |
| Subpopulasi sel T di dalam insulitis | CD8 ⁺ | CD4 ⁺ |

Terdapat sekurang-kurangnya 3 gen resesif yang menyumbang ke arah perkembangan diabetes dalam mencit NOD (Hattori *et al.*, 1986; Prochazka *et al.*, 1989) di mana dua daripadanya tidak berkaitan dengan MHC. Jadual 1.3 menunjukkan beberapa gen diabetogenik yang terdapat dalam mencit NOD.

Insiden diabetes dalam mencit NOD betina adalah 80% pada usia 30 minggu berbanding kurang daripada 20% dalam mencit jantan. Secara kumulatif di seluruh dunia perbandingan antara 21 pusat pembiakan menunjukkan purata usia onset diabetes dalam mencit betina ialah 11.5 minggu (julat 4 - 25 minggu) dan jantan pada 14.0 minggu (julat 6 - 25 minggu). Perbandingan ini juga menunjukkan insiden yang berbeza dalam setiap koloni. Ini disebabkan oleh beberapa faktor yang berlainan seperti pemakanan dan persekitaran (Pozzilli *et al.*, 1993).

Mencit NOD juga mempunyai kelebihan berbanding dengan model haiwan lain dalam mengkaji patogenesis penyakit T1DM. Ini kerana mencit ini mempunyai asas genetik yang menyamai manusia seperti lokus diabetogenik resesif yang berkait dengan MHC tanpa menunjukkan sebarang tanda limfopenia T sebagaimana yang terdapat dalam tikus BB.

Kajian ke atas mencit NOD bukan sahaja dapat menjelaskan patogenesis T1DM dalam manusia, tetapi juga boleh digunakan untuk menguji sebarang bentuk terapi yang efektif bagi mencegah penyakit ini (Leiter *et al.*, 1987).

1.1.4.4 Strain kawalan untuk mencit NOD

Terdapat 2 baka strain mencit yang dikenal pasti sebagai kontrol untuk mencit NOD. Kedua-dua strain ini dikenali sebagai mencit NON dan mencit tidak obes rintang diabetes

Jadual 1.3 Gen diabetogenik di dalam mencit NOD

(Adaptasi daripada Karasit *et al.*, 1994)

Gen berkaitan MHC

idd-1 : gen berkaitan dengan MHC pada kromosom 17

Gen tidak berkaitan MHC

idd-2 : gen berkaitan dengan Th1 pada kromosom 9

idd-3 : pada kromosom 3, membabitkan perkembangan insulitis

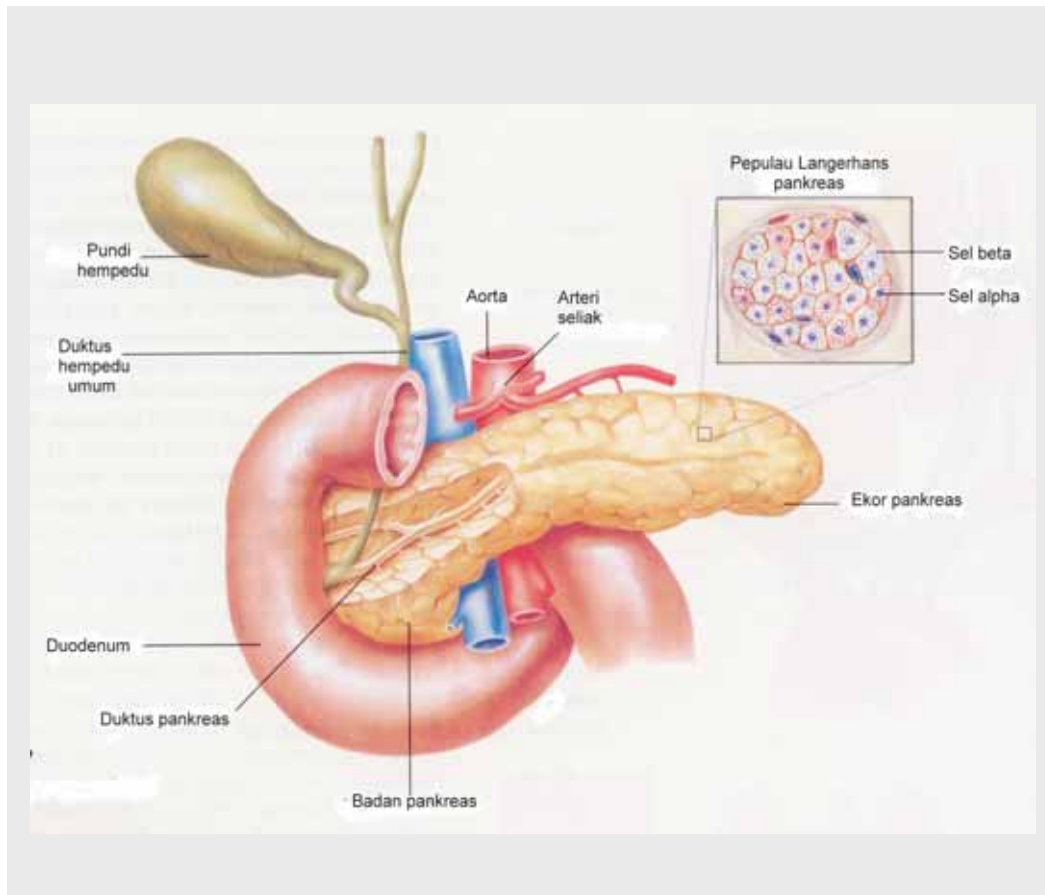
idd-4 : pada kromosom 11 membabitkan faktor umur bagi
perkembangan diabetes

idd-5 : pada kromosom 1 membabitkan perkembangan
peri insulitis, insulitis dan diabetes

(NOR). Mencit NON diasaskan di dalam makmal yang sama dengan strain mencit NOD (Ikegami & Makino, 2001). Sementara mencit NOR terbentuk hasil daripada kontaminasi genetik baka NOD di dalam makmal Jackson di Maine, USA (Prochazka *et al.*, 1992). Sebagaimana mencit NOD, mencit NOR tidak akan menjadi obes ataupun mengalami sel T limfopenia. Mencit NOR juga berkongsi gen diabetogenik yang sama sebagaimana mencit NOD iaitu *H2g7* di atas kromosom 17 (Prochazka *et al.*, 1992). Kajian histologi ke atas tisu pankreas mencit NOR juga menunjukkan proses insulitis berlaku, tetapi ia tidak akan berkembang ke tahap pemusnahan sel β secara menyeluruh. Daripada fakta-fakta ini, mencit NOR adalah strain kawalan yang paling sesuai untuk kajian yang menggunakan mencit NOD.

1.1.5 Perubahan organ pankreas dalam T1DM

Pankreas adalah satu organ yang terletak di dalam ruang retroperitoneum di bahagian atas abdomen. Pankreas manusia mempunyai ukuran panjang kira-kira 23 cm, bermula dari duodenum hingga ke limpa, dan terdiri daripada 3 bahagian. Bahagian-bahagian ini terdiri daripada kepala pankreas, badan pankreas dan ekor pankreas (Rajah 1.3). Tisu pankreas terdiri daripada lobulus sel rembesan yang tersusun di sekitar duktus halus yang bermula dari persambungan duktus kecil lobulus yang terletak dalam ekor pankreas dan turun melalui badannya dari kiri ke kanan yang menerima duktus dari lobulus lain dan kemudian bersatu untuk membentuk duktus utama, iaitu duktus Wirsung (Van De Graaff *et al.*, 1997). Struktur pankreas manusia mempunyai bentuk yang lebih jelas berbanding dengan struktur pankreas mencit. Ini disebabkan struktur pankreas mencit dikelilingi oleh lapisan tisu lemak yang tebal dan menyebabkan ianya sukar untuk dibezakan dengan struktur pankreas. Pankreas mencit juga didapati melekat dengan kuat pada lapisan lemak dan juga organ di sekelilingnya.



Rajah 1.3 Struktur organ pankreas manusia
(Adaptasi daripada Van De Graaff *et al.*, 1997)

Pankreas dikatakan sebagai dwiorgan yang mempunyai kedua-dua tisu berfungsi sebagai kelenjar endokrin dan eksokrin. Fungsi eksokrin dilaksanakan oleh sel rembesan lobulusnya yang membentuk jus pankreas dan mengandung enzim dan elektrolit. Tisu endokrin pankreas membentuk satu kelompok kecil sel epithelium, yang jelas terpisah dan nyata, tetapi berselerak dan dikelilingi oleh tisu eksokrin pankreas yang dinamakan pulau Langerhans. Pankreas manusia mengandung antara 10^5 – 10^6 pulau Langerhans yang berselerak ke seluruh parenkima eksokrin pankreas. Struktur ini buat pertama kalinya digambarkan oleh Paul Langerhans di dalam tesisnya dalam tahun 1869.

Daripada aspek histologi, pulau Langerhans terdiri daripada kelompok sel yang merembeskan hormon-hormon yang mempunyai fungsi yang berbeza. Antaranya ialah sel A (glukagon), sel B (insulin), sel D (somatostatin), sel D_1 (polipeptida intestin vasoaktif), sel PP (polipeptida pankreatik) dan sel G (gastrin). Kira-kira 60 – 80% daripada kelompok sel di dalam pulau Langerhans terdiri daripada sel B, 20% sel A dan 10% sel D. Sel-sel ini hanya dapat dibezakan melalui teknik pewarnaan khusus.

Dalam T1DM, terdapat perubahan pada morfologi dan juga pada persekitaran mikro pankreas. Sebagai organ sasaran dalam patogenesis penyakit T1DM, perubahan ini boleh dilihat sebagai faktor yang boleh mencetus ke arah penyakit ini, ataupun sebagai kesan daripada mekanisme kompensasi dalam proses perkembangan penyakit ini.

Kajian perubahan morfologi pada pankreas banyak dilakukan ke atas pankreas manusia melalui ujian autopsi. Antara perubahan yang dilaporkan adalah seperti pengurangan saiz dan juga berat; penemuan pulau yang hiperaktif yang ditunjukkan oleh hipertropi sel, degranulasi sitoplasmik, dan peningkatan kandungan sitoplasma RNA; pulau yang dalam keadaan hiperplasia secara fokal; dan perubahan pada kumpulan sel di mana sel-

sel A dan D kelihatan terkeluar daripada kelompok sel lalu membentuk sel-sel individu di dalam parenkima (Gepts *et al.*, 1987).

Daripada kesemua perubahan yang dinyatakan di atas, belum terdapat sebarang laporan yang menunjukkan pankreas mencit juga mengalami perubahan yang sama. Walau bagaimanapun, perubahan ketara yang ditemui di dalam kedua-dua pankreas manusia dan mencit ialah penyusupan masuk sel-sel mononukleas ke dalam pankreas dan memusnahkan sel-sel β . Keadaan ini dinamakan insulitis, merupakan perubahan yang paling penting dalam T1DM.

Selain daripada perubahan pada morfologi pankreas, perubahan pada persekitaran mikro juga memainkan peranan penting dalam patogenesis penyakit T1DM. Pengaruh genetik dan persekitaran terhadap diabetes telah dikaji dengan mendalam. Beberapa kelainan yang terdapat dalam sel yang mempersembahkan antigen (*antigen presenting cell*, APC) dan limfosit telahpun dilaporkan. Walau bagaimanapun, penerangan ini tidak dapat menjelaskan tentang spesifikasi organ pankreas dalam proses autoimun. Oleh itu beberapa kajian telah dilakukan untuk menunjukkan kelainan yang terdapat di dalam organ ini yang boleh menyumbang ke arah pencetusan proses autoimuniti (Rosmalen *et al.*, 2002).

Kajian menunjukkan tahap ekspresi MHC kelas I dan II yang tinggi ke atas sel β pankreas membuatkan ia menjadi lebih mudah dipengaruhi oleh aktiviti sel T autoreaktif (Batazzo *et al.*, 1985; Foulis *et al.*, 1987), begitu juga dengan bahan-bahan perantara kemusnahan sel β pankreas seperti IL-1 β dan IFN- γ , perforin, radikal bebas dan FasL (Thomas *et al.*, 2000; Eizirik *et al.*, 2001). Seterusnya, analisis mikroarai menunjukkan sitokin seperti IL-1 β dan IFN- γ bila terdedah kepada sel β tikus akan meningkatkan ekspresi mRNA untuk kimokin

interferon inducible protein-10 (IP-10), *macrophage inflammatory protein-3 α* (MIP-3 α), *fractalkine* dan sitokin interleukin 15 (IL-15)(Cardozo *et al.*, 2003). Bahan-bahan ini merupakan bahan perantara utama dalam proses inflamatori secara akut dan juga kronik dalam manusia (Luster *et al.*, 1998; Arimilli *et al.*, 2000).

Dalam mencit NOD yang berusia 4 minggu, ekspresi mRNA gen kaspase-3 dan NF- κ B secara spesifik meningkat di dalam mencit NOD betina (Aspord *et al.*, 2004). Kaspase-3 merupakan efektor biokimia pada peringkat akhir apoptosis. Begitu juga dengan sitokin yang terhasil daripada pengaktifan laluan NF- κ B mempunyai sifat pro-apoptosis (Trudeau *et al.*, 2000). Perubahan spesifik ekspresi gen apoptosis di dalam pankreas mencit NOD ini menggambarkan kepentingan mekanisme ini dalam proses patogenesis penyakit T1DM yang nyata berbeza dengan proses pembentukan semula jisim sel β sebagaimana yang terdapat dalam spesis mencit lain (Trudeau *et al.*, 2000).

Ekspresi secara spesifik beberapa faktor angiogenik di dalam pulau mencit NOD menunjukkan perubahan ini berlaku bukannya hasil daripada proses inflamasi pulau secara sekunder. Beberapa gen faktor angiogenik seperti *Eph A2*, *A4*, *A8* dan *Ephrin B1* didapati meningkat secara dramatik di dalam pulau mencit NOD seawal 4 minggu. Perubahan ini memberi spekulasi bahawa pertumbuhan vaskular dan ekspresi *Eph/Ephrin* kompleks pada peringkat awal boleh mempermudah penyusupan masuk sel-sel mononukleus ke dalam pulau mencit NOD (Aspord *et al.*, 2004).

1.1.6 Strategi pengesanan awal dan pencegahan T1DM

Tempoh praklinikal yang panjang sebelum bermulanya diabetes klinikal dalam T1DM memberi keupayaan untuk meramal penyakit ini dan seterusnya merancang bentuk

pencegahannya (Devendra *et al.*, 2004). Kajian lalu menunjukkan kehadiran beberapa autoantibodi di dalam serum boleh digunakan untuk mengenal pasti subjek-subjek berisiko tinggi yang boleh mendapat diabetes. Di antara autoantibodi itu ialah ICA, IAA, IA2 dan GAD65. Pengesanan 2 atau lebih autoantibodi (GAD65, IA-2, ataupun IAA) dalam keluarga pesakit T1DM mempunyai nilai ramalan positif melebihi 90% (Verge *et al.*, 1996). Kaedah penyaringan berdasarkan autoantibodi ini telahpun digunakan bukan sahaja untuk menyaring keluarga pesakit T1DM, tetapi juga dalam populasi umum yang mana ia telah berjaya mengurangkan kes diabetes ketoasidosis, nilai *glycated hemoglobin* (HbA_{1c}) yang lebih baik dan mengurangkan kadar kemasukan ke hospital (Barker *et al.*, 2003). Keputusan kajian oleh *United Kingdom prospective diabetes study* (UKPDS) dengan menggunakan kaedah penyaringan ini juga menunjukkan kira-kira 30% daripada pesakit T2DM yang muda mengalami proses autoimun dan kumpulan pesakit ini biasanya memerlukan insulin dalam tempoh 3 tahun (Turner *et al.*, 1997).

Setakat ini, belum terdapat sebarang rawatan yang boleh mencegah penyakit T1DM dalam manusia. Walau bagaimanapun, kefahaman tentang patogenesis penyakit T1DM ini menyumbang kepada beberapa strategi untuk mencegah penyakit ini. Secara praktikalnya, setiap peringkat penyakit ini mempunyai strategi pencegahannya masing-masing. Penyakit T1DM berlaku apabila elemen-elemen penyebab penyakit melampaui elemen-elemen perlindungan. Sebarang usaha untuk meningkatkan lagi keupayaan elemen-elemen perlindungan boleh menyumbang ke arah pencegahan penyakit ini. Elemen-elemen yang terdapat dalam patogenesis penyakit T1DM bersama strategi pencegahan ditunjukkan dalam Rajah 1. 4.

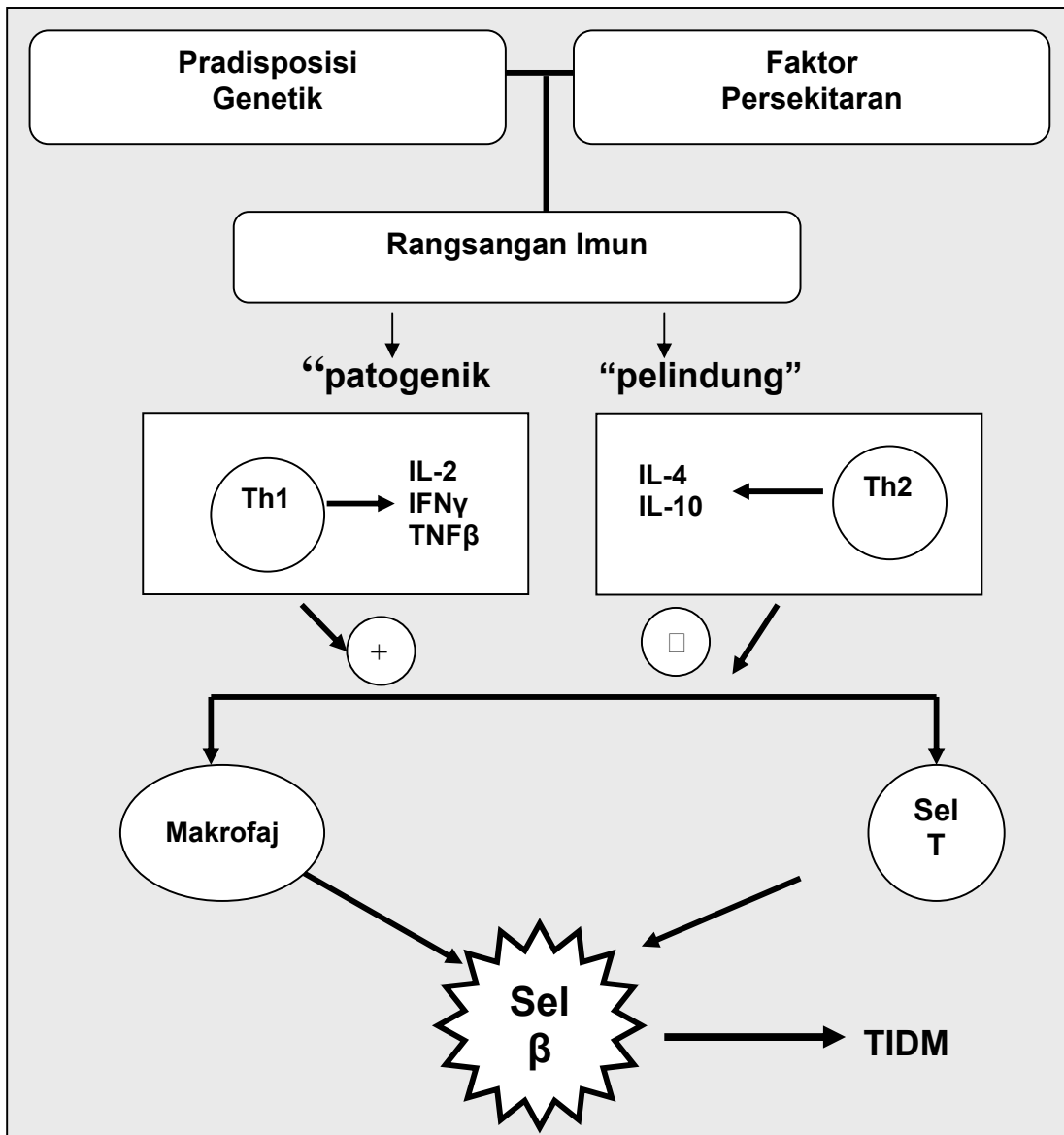
Strategi pencegahan T1DM boleh dibahagikan kepada 3 peringkat iaitu pencegahan primer (pra autoimuniti), pencegahan sekunder (selepas autoimuniti, pra diabetes) dan



Rajah 1.4 Strategi pencegahan T1DM bermula dari sejarah awal penyakit hingga kepada kemunculan manifestasi klinikal (Adaptasi daripada Skyler *et al.*, 2001)

pengecahan tertier (selepas diabetes). Dalam pengecahan primer, gen-gen yang berisiko tinggi untuk mendapat penyakit ini telah dikenal pasti. Melalui program penyaringan seperti data yang diperolehi dari *Diabetes Autoimmunity Study in the Young* (DAISY) di Denver, Colorado (Rewers *et al.*, 1996); BABYDIAB di German, dan *Type 1 Diabetes Prevention and Protection Project* (DIPP) di Finland, didapati kanak-kanak yang mempunyai HLA jenis DR3/4, DQB1 0302 dan keluarga daripada generasi pertama penghidap diabetes mempunyai risiko 40% untuk membentuk autoantibodi pada usia 4 tahun. Daripada kumpulan yang telah dikenal pasti ini, langkah seterusnya ialah untuk cuba mengelakkan pendedahan kepada faktor-faktor lain yang menjadi penyumbang kepada T1DM. Antaranya ialah mengelakkan daripada memberi susu lembu yang dipercayai mengandungi protein serum albumin bovin (*bovine serum albumine*) yang boleh mencetuskan autoimuniti ke atas sel β sebagaimana yang telah dilakukan di Finland (Gerstein *et al.*, 1995).

Pencegahan sekunder adalah pengecahan selepas tercetusnya proses autoimuniti sebelum mendapat diabetes sepenuhnya (pra diabetes). Pencegahan peringkat ini, adalah percubaan untuk mengubah kawalatur sistem imun. Sebagaimana yang telah dibincangkan di atas, pemusnahan sel-sel β hanya akan terjadi apabila berlaku ketidakseimbangan antara sel-sel patogenik dengan sel-sel pelindung. Rajah 1.5 menunjukkan bagaimana faktor genetik dan persekitaran mempengaruhi haluan rangsangan imun. Rangsangan imun patogenik boleh menjurus ke arah pemusnahan sel β pankreas. Mekanisme ini diperantarakan oleh subpopulasi sel T pembantu 1 (*T cell helper 1*, Th1) melalui tindakan sitokin, IL-2, IFN- γ dan TNF- β . Sementara itu, subpopulasi sel T pembantu 2 (*T cell helper 2*, Th2) pula bertindak sebagai pelindung melalui sitokin IL-4 dan IL-10 (Rabinovitch, 1994). Mengikut konsep ini, sel Th1 bersama produk



Rajah 1.5 Formula perkembangan dan patogenesis T1DM
(Adaptasi daripada Rabinovitch, 1998)

Kedua-dua faktor genetik dan persekitaran boleh mempengaruhi arah tuju rangsangan imun samada kemusnahan (patogenik) ataupun ke arah perlindungan (pelindung) sel β

sitokinnya akan mengaktifkan makrofaj dan sel T sitotoksik, sementara sel Th2 dan sitokinnya akan menekan sel Th1 dan sitokin dan seterusnya menghalang T1DM.

Berdasarkan daripada fakta di atas, pendekatan yang dilakukan untuk tujuan rawatan dan pencegahan T1DM perlu tertumpu ke arah peningkatan keupayaan fungsi sel Th2 dan penghasilan sitokinnya ataupun pengurangan fungsi sel Th1 dan penghasilan sitokinnya. Terdapat banyak intervensi yang terbukti mampu untuk menghalang perkembangan T1DM ini, namun kebanyakan kajian telah dilakukan terhadap mencit NOD. Setakat ini terdapat 3 kajian pilot ke atas manusia yang melibatkan 3 agen: siklosporin, insulin dan nikotinamida. Siklosporin (siklosporin A) adalah drug imunotindasan yang bertindak ke atas kedua-dua sel T pembantu dan sel T sitotoksik (Feutren *et al.*, 1986; Masteller & Bluestone, 2002). Kajian menunjukkan drug ini berkeupayaan untuk mengekalkan fungsi sel β pankreas di samping mengurangkan keperluan insulin.

Nikotinamida bertindak dengan mengurangkan kandungan radikal bebas dan NO; meningkatkan jumlah nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) dengan menghalang aktiviti poli-adenosin difosfat (ADP)-ribosa polimerase. Kajian ke atas model haiwan menunjukkan ia dapat memperbaiki pertumbuhan semula sel β meningkatkan penghasilan insulin, dan boleh menghalang daripada perkembangan ke arah diabetes klinikal dalam haiwan (Mandrup-Poulsen *et al.*, 1993; Pozzilli *et al.*, 1996).