

مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی تغییرات کلاژن نوع IV در غشای پایه کلافه های گلمرولی در موشهای دیابتی نژاد Balb/c

دکتر مهدی جلالی*، دکتر محمدرضا نیکروش*

دریافت: ۸۴/۲/۱۳، پذیرش: ۸۴/۱۲/۴

چکیده:

مقدمه و هدف: ماده خارج سلولی دارای ماکرومولکولهای متعددی است که از آن جمله می توان به ترکیباتی از قبیل انواع کلاژن اشاره نمود. از آنجا که کلاژن نوع IV نقش تعیین کننده ای در تشکیل غشای پایه و بافت مزانشیال گلمرولهای کلیوی ایفا می نماید، استرس های اکسیداتیو ناشی از محیط های هیپر گلیسمیک یکی از عواملی است که می تواند با تاثیر گذاری بر افزایش سنتز این نوع کلاژن روند فیلتراسیون گلمرولی را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق بر ساختمان بافتی و عملکرد کلیه ها تاثیر بگذارد. لذا در پژوهش حاضر سعی گردیده است تا تغییرات ناشی از دیابت در میزان کلاژن غشای پایه کلافه های گلمرولی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد.

روش کار: برای این مطالعه تجربی از ۲۴ موش نر دو ماهه نژاد Balb/c استفاده شد که بطور تصادفی به دو گروه تجربی و دو گروه کنترل ۱ و ۲ تقسیم شدند. در مرحله بعد سلولهای بتای جزایر لانگرهانس پانکراس نمونه های مربوط به گروههای تجربی با استفاده از تزریق ۱۶۰ mg/kg آلوکسان تخریب گردید و گروههای کنترل بدون دریافت آلوکسان بصورت دست نخورده باقی ماندند. سپس به منظور بررسی تفاوت تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت تاثیر دیابت بر کلیه و مقایسه آن با گروههای کنترل با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال که بر علیه کلاژن نوع IV به کار گرفته شد، تغییرات غشای پایه گلمرولهای کلیوی در گروه تجربی ۱ و کنترل ۱ پس از ۸ هفته و گروه تجربی ۲ و کنترل ۲ پس از ۱۶ هفته از شروع دیابت مورد مطالعه قرار گرفت. علاوه بر این، حجم کلافه های گلمرولی نیز با استفاده از تکنیک های استریولوژیکی، در گروههای تجربی و کنترل مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج: یافته های این پژوهش نشان داد که هرچند تفاوت قابل ملاحظه ای بین گروههای تجربی و کنترل ۱ وجود ندارد اما در مقایسه بین گروههای تجربی و کنترل ۲ این اختلاف معنی دار است. بر این اساس واکنش غشای پایه کلافه های گلمرولی نمونه های دیابتیک نسبت به آنتی بادی کلاژن نوع IV مثبت و ضخامت غشای پایه کلافه های گلمرولی نیز در گروه دیابتیک ۱۶ هفته ای نسبت به سایر گروهها به شکل معنی داری نسبت به گروه کنترل و تجربی ۱ نیز افزایش یافته است ($p < 0.05$) در حالیکه این تفاوت بین گروه کنترل و گروه دیابتیک ۸ هفته ای معنی دار به نظر نمی رسد. علاوه بر این در اندازه گیری کلافه های گلمرولی افزایش حجم مشخصی در بافت مزانشیال گروه ۱۶ هفته ای دیده می شود ($3/422 \pm 0/14 \times 10^6 \mu m^3$) که این تغییر حجم در گروه ۸ هفته ای ($3/504 \pm 0/189 \times 10^6 \mu m^3$) و کنترل ($3/422 \pm 0/14 \times 10^6 \mu m^3$) معنی دار به نظر نمی رسد.

نتیجه نهایی: ابتلا به دیابت در دراز مدت می تواند از طریق واکنش بافت مزانشیال و غشای پایه گلمرول ها و توبول های کلیوی در مقابله با غلظت بالای گلوکز به ترشح بیش از حد کلاژن نوع IV منجر شود که این موضوع به سهم خود به افزایش حجم کلافه ای و کاهش فیلتراسیون گلمرولی کمک می نماید.

کلید واژه ها: دیابت شیرین / غشای پایه گلمرولی / کلاژن نوع IV / موش

* دانشیار گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (Mejalaly@yahoo.co.in)

مقدمه :

از جمله بیماریهای غیر واگیر که سلامت بسیاری از جوامع را تهدید می کنند دیابت قندی (Diabetes mellitus) است که به اختلال در متابولیسم کربوهیدراتها و کاهش مصرف گلوکز و افزایش قند خون منجر می شود. آمار انتشار یافته از سوی بهداشت جهانی نشانگر این واقعیت است که امروزه حدود ۴ تا ۵ درصد مردم جهان از این بیماری رنج می برند و گمان می رود که تعداد مبتلایان به این بیماری تا سال ۲۰۱۰ میلادی بالغ بر سیصد میلیون نفر باشد (۱) که قریب به ۶۰٪ آنها را جمعیت آسیا تشکیل خواهد داد (۲). بدین ترتیب برای اغلب کشورهای آسیایی یک روند رو به رشد برای ابتلای به این بیماری پیش بینی شده است (۳) که جمعیت ایران نیز از این قاعده مستثنی نیست. مشکل عمده این است که متأسفانه نیمی از بیماران دیابتی در بدو امر از ابتلای خود به دیابت بی اطلاع هستند و زمانی به موضوع پی می برند که بسیاری از بافتها و دستگاههای بدن تا حد زیادی تحت تاثیر این بیماری صدمات جبران ناپذیری یافته است (۴).

بروز تغییرات بافتی در کلافه های گلمورولی بیانگر بروز تغییرات پاتولوژیک است که می تواند به عنوان اولین علائم آسیب کلیوی در بیماری دیابت محسوب شود (۵). آسیب هایی که از طریق دیابت دامنگیر کلیه ها می شود هر سه نوع سلول کلافه های گلمورولی شامل سلول های مزانژیال، سلولهای آندوتلیال موینه گلمورولی و سلولهای اپیتلیال لایه احشایی کپسول بومن را که همگی در سنتز کلاژن نقش دارند درگیر می نماید (۶). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که ضخیم شدن غشای پایه در کلافه های گلمورولی می تواند موجبات انسداد کاپیلرها را فراهم آورد و در نهایت به اختلال در عملکرد گلمورولها منجر شود (۷).

مطالعات مشابه در این زمینه نشان داده است که سلول های اندوتلیال چنانچه در محیط هایپرگلوکز قرار گیرند شروع به سنتز کلاژن، فیبرونکتین و لامینین می نمایند (۸). لذا در این پژوهش سعی گردیده است تا مشخص شود که سنتز کلاژن نوع IV به عنوان رکن اساسی تشکیل دهنده غشای پایه تا چه حد بر ساختمان کلافه های گلمورولی موشهای دیابتی تاثیر می گذارد.

روش کار:

این مطالعه از نوع تجربی - آزمایشگاهی می باشد. ۱- روش ایجاد دیابت تجربی و تهیه برشهای بافتی کلیه در آزمایشگاه هیستوتکنیک گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی مشهد و مطالعات ایمنو هیستوشیمیایی آن در دانشگاه Dalhousie کانادا صورت گرفت، از ۲۴ سر موش نر دو ماهه balb/c که نژاد مناسبی برای مطالعات ایمنو هیستوشیمیایی محسوب می شود استفاده گردید. نمونه های مورد نظر از خانه حیوانات بیمارستان قائم (عج) مشهد تهیه گردیده و ۱۲ مورد از آنان به طور تصادفی با بهره گیری از آلوکسان مونو هیدرات (با نام شیمیایی 5-6 Dioxy uracil) که از شرکت سیگما خریداری شده بود، دیابتی گردیدند. برای این هدف، مقدار ۱۲۰ mg/kg آلوکسان محلول در سرم فیزیولوژی به هر یک از نمونه ها بصورت زیر جلدی تزریق گردید (۹). ۱۲ مورد باقی مانده به عنوان گروههای کنترل ۱ و ۲ محسوب شده و از هیچ دارویی استفاده نکردند. برای نتیجه گیری بهتر در ایجاد دیابت و مقابله با اثر رقابتی گلوکز با آلوکسان که ممکن بود مانع از اثر قطعی دارو بر روی سلولهای بتای پانکراس شود تزریق مورد نظر در هریک از نمونه ها در ساعت ۸ صبح و در حالت ناشتا انجام گرفت (۱۰). پس از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق، در حالت ناشتا از ورید دمی حیوانات مبادرت به خون گیری شد و با استفاده از گلوکومتر Reflux ساخت آلمان قند خون آنان اندازه گیری شد. در این پژوهش (با توجه به اینکه قند خون این حیوان در حالت معمولی از حدود ۸۰ mg/dl تجاوز نمی کند)، قند بالای ۱۶۰ mg/dl ملاک دیابتی بودن قرار گرفت (۱۱) و ثبت گردید.

۲- نمونه برداری و آماده سازی بافتی: به اعتبار اینکه در پژوهش های قبلی مشخص شده است که اولین اثرات مربوط به تاثیر دیابت بر کلیه در حیوانات آزمایشگاهی به فاصله ۸ هفته پس از شروع دیابت بروز می نماید و این تغییرات به فاصله ۱۶ هفته بعد از آن به شکل حاد تری قابل پیگیری است. بر این اساس گروههای کنترل ۱ و ۲ مطابق زمانهای فوق نیز انتخاب گردیدند. نمونه های مربوط به گروههای تجربی و کنترل ۱ و ۲ به ترتیب در پایان دوره های یاد شده با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند. سپس برای نمونه برداری و فیکس

برای ایجاد رنگ زمینه از همتوکسیلین استفاده گردید و هر برش با استفاده از ژل گلیسرول مونته گردید.

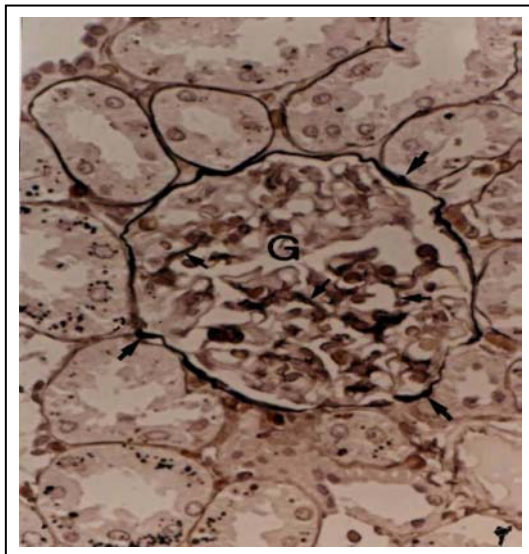
۴- تعیین حجم کلافه های گلومرولی: برشهای انتخابی با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بهره گیری از روش استریولوژیکی مورد مطالعه مورفومتریک قرار گرفت (۱۳). برای این منظور از ابتدا از میدان دید میکروسکوپیکی مربوط به یک ناحیه از هر برش کلیه که با یک شاخص حاشیه ای (یک تار موی قرار گرفته در قالب پارافینی) مشخص شده بود سطح مقطع گلومرولهای موجود در میدان با بهره گیری از یک ترانس پرناسی موزاییکی (صفحه نقطه چینی که فاصله همه نقاط سطح آن از همدیگر به یک اندازه باشد) تعیین گردید که در هر میدان بسته به موقعیت برش هر یک از گلومرولها تعداد مقاطع گلومرولی شمارش شده بین ۱۴ تا ۲۰ عدد بود. روش کار بدین ترتیب بود که با شمارش نقطه های منطبق بر سطح برش هر کلافه، ضمن در نظر گرفتن فاصله هر نقطه با نقاط مجاور آن، سطح مقطع هر یک از کلافه های موردنظر در هر برش محاسبه گردید. سپس سطح مقطع برشهای سریال به دست آمده (با احتساب دو برش حذف شده از هر سه برش سریال) در ضخامت برشها ضرب گردیده و براساس اصل کاوالیه (۱۴) حجم هر یک از گلومرولها تعیین گردید.

۵- بررسی تغییرات کلاژن غشای پایه گلومرولها: به اعتبار اینکه واکنش به رنگ پذیری کلاژن نوع IV که با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال شاخص مناسبی در افزایش تراکم این نوع کلاژن محسوب می شود، درجه رنگ پذیری کلاژن موجود در غشای پایه بر اساس درجه بندی استفان Stefan (۱۵) به عنوان معیار تراکم کلاژن مد نظر قرار گرفت. در این حالت درجه رنگ ناپذیری صفر و رنگ پذیری غشای پایه از ۱ تا ۴ در نظر گرفته شد و نمونه های مربوط به کنترل، تجربی ۱ و تجربی ۲ که در معرض آنتی بادی قرار گرفته بودند با استفاده از میکروسکوپ چند نفره مورد ارزیابی قرار گرفت و به شدت رنگ پذیری غشای پایه گلومرولها امتیاز داده شد.

۶- آنالیز آماری: پس از ثبت نتایج بدست آمده از بر آورد حجم بافت مزانژیال کلافه های گلومرولی و تعیین میانگین برای نمونه های هر گروه به کمک نرم افزار آماری

اولیه با استفاده از پرفیوژن بطنی که با بهره گیری از فرمالین ۱۰٪ انجام گرفت کلیه های آنان بر داشته شد و پس از حذف کپسول کلیوی به منظور دستیابی به فیکس بهتر در هر یک از کلیه ها یک برش طولی ایجاد گردیده و به شیشه های کد گذاری شده محتوی فیکساتور (فرمالین ۱۰٪) انتقال یافت. در مرحله بعد هر یک از نمونه های کلیوی مطابق روشهای معمول بافت شناسی مورد آماده سازی قرار گرفت و سرانجام از بلوکهای بافتی بدست آمده برشهای سریال در جهت افقی و به ضخامت ۱۰ میکرون تهیه گردید. از مجموع برش های سریال به دست آمده مربوط به هر نمونه از هر ۳ برش یک برش انتخاب گردیده و به لام های دارای شماره سریال متوالی انتقال داده شد تا در مرحله بعدی با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه کلاژن نوع IV مورد رنگ آمیزی قرار گیرد.

۳- مطالعه ایمنو هیستوشیمیایی: بر اساس استفاده از تکنیکهای مورد نظر (۱۲)، پس از پارافین زدایی و آبدهی مجدد هر یک از برشها دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر تریس (حاوی ۱/۵٪ کلرور سدیم در pH=۷/۴) مورد شستشو قرار گرفت. جهت بلوک کردن آنتی ژنهای غیر اختصاصی، ابتدا برای مدت ۳ ساعت، برشها در مجاورت تریتون ۰/۳٪ X100 در بافر تریس و goat serum و پس از آن برای مدت ۲۴ ساعت در مجاورت آنتی بادی کلاژن IV (تهیه شده از شرکت سیگما) که به میزان ۱ به ۲۵۰ در محلول تریس بافر حاوی تریتون ۰/۳٪ و سرم ۰/۲٪ رقیق شده بود قرار گرفتند. سپس نمونه ها ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس شستشو داده شدند و آنگاه به مدت ۲ ساعت با biotinylated goat anti-rabbit IgG مجاور گردیدند. در مرحله بعد نمونه های مورد نظر ۳ بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شدند و پس از آن جهت مهار فعالیت آندوژناز پراکسیداز به مدت ۱ ساعت در محلول ۰/۳٪ آب اکسیژنه در متانول قرار گرفتند. در ادامه این مرحله برای مدت ۲ ساعت در مجاورت آویدین بیوتین که با هورس رادیش پراکسیداز (HRP) کانژوگه شده بود مجاور شدند. سپس ۳ بار دیگر و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه این نمونه ها در بافر تریس شستشو گردیدند و بعد برای مدت ۱۵ دقیقه در معرض دی آمینوبنزیدین حاوی ۰/۰۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شدند. در آخرین مرحله پس از شستشوی نمونه ها



شکل ۱: نمای میکروسکوپی کلافه گلوبولوی (G) یک نمونه تجربی ۱۶ هفته ای که با آنتی کلاژن نوع IV مجاورت یافته است. در این نما کلاژن نوع IV موجود در غشای پایه (پیکانهای نشانه) و کپسول بومن با ایجاد رنگ قهوه ای تیره عکس العمل شدیدی نسبت به این آنتی بادی نشان داده است. چنین عکس العملی در ماتریکس مزانژیال گلوبولول ها و سلول های آندو تلیال موینه گلوبولوی نیز قابل تشخیص است. همانگونه که در تصویر دیده می شود ضخیم شدن غشای پایه و نامتجانس بودن این ضخامت در بخش های مختلف کپسول قابل توجه است (درشتنمایی ۴۰۰).

جدول ۱: میانگین حجم کلافه های گلوبولوی ($\times 10^6 \mu m^3$) در گروههای تجربی و کنترل (SEM \pm)

ردیف(*)	کنترل	تجربی ۱ (**)	تجربی ۲ (***)
۱	۳/۹۸۰ \pm ۱/۳۹۱	۴/۱۰۸ \pm ۱/۵۸۰	۴/۶۳۱ \pm ۱/۲۱۸
۲	۳/۲۹۴ \pm ۰/۹۲۸	۳/۲۶۷ \pm ۰/۳۱۲	۴/۸۰۷ \pm ۱/۷۱۶
۳	۴/۰۱۱ \pm ۱/۷۱۷	۴/۱۰۷ \pm ۲/۶۵۵	۴/۹۰۲ \pm ۱/۱۱۶
۴	۳/۵۹۵ \pm ۰/۱۵۲	۳/۳۰۲ \pm ۰/۸۶۶	۳/۲۶۶ \pm ۰/۹۰۸
۵	۳/۴۸۵ \pm ۱/۸۵۰	۳/۱۶۸ \pm ۱/۳۴۵	۵/۳۲۱ \pm ۲/۲۲۷
۶	۳/۱۶۸ \pm ۱/۶۹۶	۴/۰۵۴ \pm ۱/۰۱۷	۴/۸۸۷ \pm ۱/۲۴۳
میانگین کل	۳/۴۲۲ \pm ۰/۱۴۰	۳/۵۰۴ \pm ۰/۱۸۹	۴/۶۳۵ \pm ۰/۲۸۹

* میانگین حجم گلوبولولهای شمارش شده در کلیه های مربوط به هر موش در هر یک از گروهها

** در مقایسه آماری، میانگین حجم گلوبولولی گروه تجربی ۱ نسبت به کنترل معنی دار نیست.

*** در این مقایسه، میانگین حجم گلوبولولی گروه تجربی ۲ نسبت به کنترل و تجربی ۱ کاملاً معنی دار است ($p < 0.05$).

در مقایسه غشای پایه گلوبولولهای گروه دیابتیک ۸ هفته ای با گروه کنترل از نظر واکنش به رنگ پذیری تغییر محسوسی مشاهده نگردید (شکل ۲). همچنین تفاوت حجمی معنی داری بین این گروه با گروه کنترل مشاهده نگردید.

instat و با استفاده از تست توکی مبادرت به محاسبه آنالیز واریانس گردید. جهت مقایسه تغییرات میزان کلاژن در غشای پایه که بر اساس شدت رنگ پذیری در گروههای مختلف انجام گرفت، از آزمون غیر پارامتری من - ویتنی استفاده شد. در این روش بسته به سنتز کلاژن رنگ بافت غشای پایه از قهوه ای روشن به قهوه ای تیره تغییر می کند که با استفاده از مطالعه سه نفره به کمک میکروسکوپ نوری چند نفره، انجام گرفت. برای این منظور شدت رنگ پذیری از خفیف (+) متوسط (++) تا شدید (+++) در جه بندی گردید و هر نفر جدا از دیگران تغییرات کلاژن میدان دید مشخصی را درجه بندی نموده و از این طریق تغییرات کیفی به کمی مبدل گردید. سپس بر مبنای اعداد به دست آمده با استفاده از محاسبه آماری، میزان تغییرات کلاژن مشخص گردید.

نتایج:

از عمده ترین یافته های این پژوهش افزایش سنتز کلاژن نوع IV در غشای پایه کلافه های گلوبولوی مربوط به گروه دیابتیک ۱۶ هفته ای بود که به شکل معنی داری نسبت به گروه کنترل و تجربی ۱ افزایش یافته بود ($p < 0.05$) در حالیکه این تفاوت بین گروه کنترل و گروه دیابتیک ۸ هفته ای معنی دار نبود. موضوع دیگر اینکه این تراکم کلاژن که بصورت ضخیم شدن غشای پایه در گروه ۱۶ هفته ای به شکل چشمگیری بروز یافته بود در همه نقاط دارای توزیع یکنواختی نبوده و در بخش هایی از آن بصورت موضعی افزایش قابل ملاحظه ای را نشان داد که به اعتبار واکنش به رنگ پذیری شدید، این نقاط به رنگ قهوه ای متمایل به تیره قابل رؤیت بود (شکل ۱).

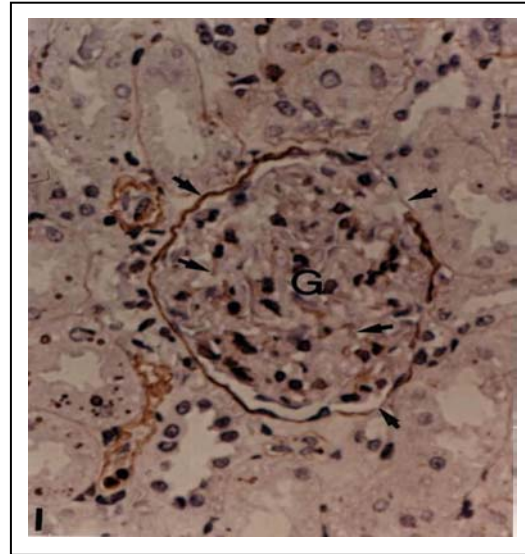
چنین تغییراتی در ماتریکس مزانژیال گلوبولول ها و سلول های آندو تلیال موینه گلوبولوی نیز با شدت کمتری در این گروه مشاهده گردید که حکایت از افزایش نسبی کلاژن نوع IV در این مناطق دارد اما شدت رنگ پذیری آن به اندازه غشای پایه گلوبولولها نبود. محاسبات حجمی گلوبولولها نیز بازگو کننده این واقعیت است که در گروه دیابتیک ۱۶ هفته ای افزایش حجم معنی داری نسبت به سایر گروهها دیده می شود (جدول ۱).

Lamina densa نامیده می شود سبب می شود که مولکولهای کوچکتر از منافذ این شبکه عبور نمایند (۲۰).

مطالعات انجام گرفته در این زمینه نشان داده است که در محیط های هایپرگلوکز سنتر اجزای غشای پایه افزایش می یابد. افزایش ضخامت غشای پایه می تواند ناشی از رسوب ایمنوگلوبولین ها شامل IgG و IgM و اجزای کمپلمان باشد (۲۱). نشت این مواد از کلافه های گومرولی از طرفی باعث رسوب آنها در بافت مزانژیال گومرولها شده و از طرف دیگر می تواند افزایش سنتر اجزای غشای پایه از قبیل لامینین، فیبرونکتین و کلاژن را به دنبال داشته باشد (۲۲، ۵). تغییرات ایجاد شده در بافت کلیوی نمونه های دیابت تجربی گویای این واقعیت است که ابتلای به دیابت میتواند لطمه های جبران ناپذیری بر کلیه ها وارد نموده و سلامت و عملکرد آنها را به مخاطره اندازد. با توجه به اینکه یکی از مهمترین عوارض دیابت در انسان بروز نفروپاتی دیابتی است، اینگونه بیماران معمولاً به سمت گومرولواسکلروزیس پیش می روند (۲۳) و زمینه پیدایش بیماران دیالیزی را فراهم میکنند (۲۴، ۲۵).

بنابراین با توجه به نقش کلیه ها در ثابت نگهداشتن محیط داخلی بدن، گرفتاری کلیه به سهم خود موجب شروع گرفتاریهای وسیعتری می شود که از آن جمله میتوان به نوروپاتی دیابتی، رتینوپاتی (۲۶) و بیماریهای قلبی عروقی اشاره کرد (۲۷). گرفتاری سیستم قلبی عروقی اگرچه در بدو ابتلای به دیابت ممکن است تظاهر ننماید اما بتدریج با افزایش فشار خون و آنژیوپاتی دیابتی همراه است که به عوارض دیگری از جمله انفارکتوس میوکاردا منجر میشود (۲۷). اهمیت موضوع از آنجا ناشی می شود که با شروع دیابت، غشای پایه گومرولهای کلیوی به عنوان اولین مناطق متاثر از محیط هایپرگلیسمیک شروع به تغییر ماهیت می نمایند و زمینه بروز تغییرات پاتولوژیک بعدی را در ماتریکس خارج سلولی فراهم می کنند (۱۸-۱۶).

تغییر در ساختار ماتریکس خارج سلولی به سهم خود به میانکنش هایی می انجامد که در وهله اول به سنتر پروتئوگلیکانهایی منجر می شود که زمینه تولید انواع کلاژن را فراهم می آورد (۲۸). بر اساس مطالعات انجام شده، هر چند که انواع کلاژن در نقاط مختلف بدن دارای پراکندگی وسیعی می باشند اما کلاژن نوع IV را فقط می توان در نواحی خاصی از قبیل غشای پایه مربوط به



شکل ۲: نمای میکروسکوپی کلافه گومرولی (G) یک نمونه کنترل که با آنتی بادی مونوکلونال علیه کلاژن نوع IV مجاور شده است. در این نما غشای پایه مربوط به سلولهای اندوتلیال کپسول بومن، ماتریکس مزانژیال گومرولها و سلولهای آندوتلیال مویینه گومرولی (پیکانهای نشانه) عکس العمل ضعیفی نسبت به این آنتی بادی نشان داده است (درشتنمایی ۴۰۰).

بحث:

ساختار کلیه ها به اعتبار نقش تعیین کننده ای که در امر فیلتراسیون دارند، در محیط هایپرگلیسمیک سریعتر و بیشتر از بقیه بافتها آسیب پذیری از خود نشان می دهند. مطالعات متعدد در این زمینه مشخص نموده است که غشای پایه (Basement membrane) در گومرولها و به دنبال آن در توبول های کلیوی از اولین مناطقی هستند که در رابطه با تاثیر گذاری دیابت دستخوش تغییر می شوند (۱۸-۱۶). غشای پایه نواحی تخصص یافته ای از ماده خارج سلولی (Extra cellular matrix) است که حاوی ترکیبات مختلفی از قبیل پروتئین ها و قندها می باشند. این ماده معمولاً از ترکیباتی از قبیل انواع رشته های کلاژن شامل کلاژن نوع IV و V، لامینین، فیبرونکتین و گلیکوز آمینوگلیکانهای سولفاته و غیر سولفاته تشکیل میشود (۱۹). در بین ترکیبات غشای پایه، کلاژن جزو فراوان ترین ترکیبات موجود است و از این میان کلاژن نوع IV ساختار اصلی این بخش را ایجاد می نماید. از سوی دیگر الیاف کلاژن موجود در غشای پایه کلافه های گومرولی نقش مهمی در تبادل مواد بازی می کنند و حضور آنها در بخش میانی غشای پایه که تحت عنوان

واقعیت است که تفاوت معنی داری در ضخامت غشای پایه نمونه های دیابتیک ۱۶ هفته ای نسبت به گروه ۸ هفته ای و کنترل وجود دارد. بر اساس این یافته ها می توان چنین ادعان کرد که اگرچه در طول ۸ هفته اول زمینه بروز تغییرات پاتولوژیک مشخصی در گلومرولهای کلیوی بروز نکرده است اما با گذشت ۱۶ هفته از ابتلای به دیابت، ضخیم شدن غشای پایه و افزایش حجم مزانژیال گلومرولها به عنوان اولین علائم هشدار دهنده، بازگو کننده پیشرفت سیر بیماری در کلیه ها محسوب می شوند.

منابع:

1. World Health Organization (WHO). Prevention of Diabetes Mellitus, Geneva, Technical Report Series 1994; No. 844.
2. Heine RJ. Diabetes in the next century: challenges and opportunities. Netherlands J Med 1999;55: 265-270.
3. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025 prevalence, numerical estimates and projections, Diabetes Care 1998; 21: 1414-1431.
4. American Diabetes Association, Implications of the diabetes control and complications trial, Diabetes Care 1998; 21(1): 88-90.
5. Cogliero E, Roth T, Roy S. Characteristic and mechanisms of high-glucose-induced human endothelial cells, Diabetes 1991; 40: 100-109.
6. Masanori WK, Spiro MJ. Synthesis of type IV collagen by cultured glomerular and comparison of its regulation by glucose and other factors with that of type IV collagen. Diabetes 1994; 43: 95-103.
7. Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. J Pathol. 2003; 200(4):537-546.
8. Fuh GM, Bensch K, Karasek MA, Kramer RH. Synthesis of basement membrane-specific macromolecules by cultured human microvascular endothelial cells isolated from skin of diabetic and nondiabetic subjects. Microvasc Res 1986; 32(3):359-370.
9. Strivastava Y, Ven kala krisna H. Effects of momrdica charanita aqueous extract on cataractogenesis in murrian alloxan diabetics. Pharmaco Res Commun 1998; 20: 201-204 .
10. Anthony SP, Susan NS. Glouucose and

جدار عروق، لوله گوارش، توبول های کلیوی و بافت مزانژیال کلافه های گلومرولی جستجو کرد (۳،۲۹). از سوی دیگر اگرچه تفکیک و تمایز کلاژن نوع IV از بقیه اجزای غشای پایه در مطالعات معمول بافت شناسی وجود ندارد اما با استفاده از تکنیک های ایمونوهیستوشیمیایی که در این پژوهش با استفاده از آنتی بادی یاد شده صورت گرفت، واکنش شدید نسبت به رنگ پذیری در غشای پایه گلومرولهای گروه دیابتی ۱۶ هفته ای، افزایش فوق العاده این نوع کلاژن را تایید می نماید. بنا بر این چنین به نظر می رسد که چنانچه کلاژن نوع IV به عنوان یکی از مهمترین عناصر ساختاری غشای پایه دستخوش تغییر گردد علاوه بر آنکه آسیب های بافتی را در کلیه به دنبال خواهد داشت به لحاظ تغییر در ماهیت می تواند عملکرد کلیه را نیز تحت تاثیر قرار دهد و به بالا بردن محیط هایپرگلیسمیک کمک نماید. این تصور از آنجا ناشی می شود که بپذیریم که ساختمان غشای پایه گلومرولها و توبولها و بافت مزانژیال گلومرولها که اساس فیلتراسیون کلیوی را تشکیل می دهند در گرو سلامت ماتریکس خارج سلولی و از همه مهمتر الیاف کلاژن مربوط به آن است (۲۰).

در ارتباط با افزایش حجم گلومرولها نیز عوامل متعددی ممکن است دخالت داشته باشند. هر چند که یافته های این پژوهش نشان داد که تغییرات غشای پایه یکی از اولین علائمی است که به دنبال هایپرگلیسمی ایجاد می شود اما با توجه به اینکه این افزایش نمی تواند نقش تعیین کننده ای در افزایش حجم گلومرولها داشته باشد به نظر می رسد که افزایش بافت مزانژیال و احتباس پروتئین ها در ماده خارج سلولی، عامل اصلی این تغییر حجم باشد. مطالعات قبلی نیز چنین فرضیه ای را تایید می نماید به این معنی که به دنبال ضایعات عروقی post glumerolar (از قبیل عروق پری توبولار) با افزایش نشت پلاسما و پروتئین های یاد شده امکان بازگشت کامل آن از طریق عروق لنفاوی امکان پذیر نبوده و این مسئله به نوبه خود می تواند به افزایش حجم کلافه های گلومرولی و بافت های بینابینی کمک نماید (۳۱، ۳۰).

نتیجه نهائی:

بنابراین بر اساس نتایج به دست آمد چنین مشخص می شود که واکنش غشای پایه به آنتی بادی کلاژن نوع IV و در نظر گرفتن درجه رنگ پذیری آن گویای این

- 3-0 Methyl glucose protection against aloxan poisoning of pancreatic alpha and beta cells. *Diabetes* 1977;20: 972-977.
11. Rasch R, Drup J. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment *Diabetologia* 1997, 40: 802-809.
 12. Guedson JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1979; 27: 1131-1139.
 13. Weibel ER. In: *Elementary Introduction to Stereological Principles. Stereological Methods Vol 1 Practical Methods for Biological Morphometry*, Academic Press London, New York 1979; pp. 9-62
 14. Osterby R, Nyberg G, Andersson C, Frisk B. Glomerular structural quantification in baseline biopsies from cadaveric donor kidney pairs. *APMIS Supplementum* 1988; 4: 134-140
 15. Stefan GH. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. *J Hepatol*, 1998; 29: 1015-1022.
 16. Carlson EC, Audette JL, Veitenheimer NJ, Risan JA, Iaturnus DI, Epstein PN. Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Anat Rec* 2003; 271A(2):332-341.
 17. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(5):1358-1373.
 18. Share AJ, Stewart LR, Cheek DE, Hurray D, Self SE. IgA antglomerular basement membrane nephritis associated with Crohn's disease: a case report and review of glomerulonephritis in inflammatory bowel disease. *Am J Kidney Dis*. 2003; 41(5):1097-1109.
 19. Adler S. Structure-function relationships associated with extraglomerular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1165-1172,
 20. Kitsou PV, Tzinia AK, Stetler Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B, et al. Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 284(4):671-679.
 21. Steffes MW, Brown DM, Mauor M. Diabetic glomerulopathy following unilateral nephropathy in the rat, *Diabetes* 1978; 1: 35-40.
 22. Crowley ST, Brownley M, Sten D. Effects of nonenzymatic glycosylation of mesangial matrix on proliferation of mesangial cells. *Diabetes* 1991;40: 540-547.
 23. Grond J, Koudstaal J, Elema JD. Mesangial function and glomerular sclerosis in rats with aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1985;27:405-410.
 24. Marinides GN, Groggel GC, Cohen AH, Border WA. Enalapril and low protein reverse chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Kidney Int* 1990; 37: 749-757.
 25. Najafian B, Kim Y, Crosson JT, Mauer M. Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(4):908-917.
 26. Stitt A, Gardiner TA, Anderson NL. The AGE Inhibitor Pyridoxamine Inhibits Development of Retinopathy in Experimental Diabetes. *Diabetes* 2002, 51(9): 2826 - 2832.
 27. Tang D, YU T, Khraibi AA. Cardiovascular and renal characteristics, and responses to acute volume expansion of a rat model of diabetic pregnancy. *Life Sci*. 2004; 74(23):2909-2918.
 28. Melrose J, Ghosh P, Taylor TK. Proteoglycan heterogeneity in the normal adult ovine intervertebral disc. *Matrix Biol* 1994; 14: 61-75.
 29. Kapa E, Han X, Holm S, Peltonen J, Takala T, Vanharanta H. Collagen synthesis and types I, III, IV, and VI in an animal model of disc degeneration. *Spine* 1995; 20: 59-67.
 30. Jean MM, Kathryn EW, Helen T, Rudolf WB. Measurement of glomerular volume in needle biopsy specimens. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 239-243.
 31. Pinter GG, Atkins JK. Role of post-glomerular microvessels in pathophysiology of diabetic nephropathy. *Diabetes* 1991; 40: 791-795.