● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال دوم ـ شمارهٔ ۱ پی‌درپی (۵)، صفحه ۱۵ الی ۲۰ ، زمستان ۱۳۷۸

ظهور فراوان رنگدانه‌های لیپوفوشین در سلولهای جدار لوله‌های کلیه موشهای صحرایی مبتلا به دیابت بوسیلهٔ آلوکسان

دکترمحسن پورقاسم [۱]، دکترمهدی جلالی [۲]، دکترمحمدرضا نیکروش [۳]،
دکترمرتضی بهنام‌رسولی [۳]، دکترناهید امینیان [۴]

۱ ـ عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲ ـ استادیار علوم تشریح دانشکده پزشکی مشهد
۳ ـ استادیار فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد ۴ ـ دانشیار پاتولوژی دانشکده پزشکی مشهد

سابقه و هدف: درگیری کلیه یکی از عوارض مهم دیابت است که در عرض چند سال پس از شروع دیابت خود را نشان می‌دهد و یکی از عوامل مهم نارسایی کلیه و دیالیز محسوب می‌شود. تشخیص تغییرات زودرس کلیه در بیماری دیابت می‌تواند باعث جلوگیری از پیشرفت آن و مرحله نهایی بیماری کلیه گردد.

مواد و روشها: برای پیدا کردن تغییرات زودرس سلولی در لوله‌های کلیه، ابتدا رت‌ها توسط آلوکسان دیابتی شدند. سپس بعد از ۸ هفته دیابتی بودن، کلیه آنها را در آورده و با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین - ائوزین (H-E) و پاس هماتوکسیلین (PAS-H) و متد اشمورل (Schmorl's method) تغییرات سلولی در لوله‌های کلیه مورد بررسی قرار گرفتند.

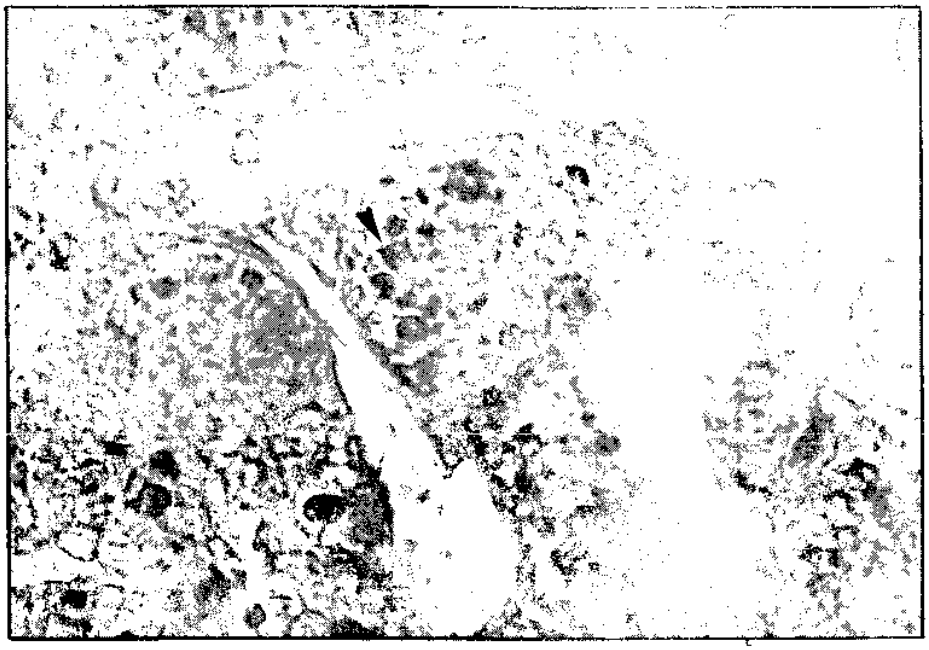
یافته‌ها: بررسیهای میکروسکوپی لوله‌ها نشان داده است که در سلولهای لوله‌ها بخصوص در لوله‌های پروگزیمال رنگدانه‌های لیپوفوشین که تجمع فراوان آنها در سلول می‌تواند نشانه آسیب سلولی باشد بصورت غیر طبیعی افزایش یافته است. همچنین وجود سلولهایی که بزرگتر و ائوزینوفیل‌تر از سلولهای طبیعی بوده و گاهاً دارای دو هسته می‌باشند با رأسی گنبدی شکل و هسته بزرگتر از معمول قابل تشخیص بوده‌اند.

نتیجه گیری: بنابراین تغییرات اولیه در سلولهای لوله‌های کلیوی می‌تواند به عنوان اولین علایم درگیری کلیه در بیماری دیابت مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی: دیابت شیرین، لیپوفوشین، آلوکسان، کلیه.

مقدمه

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیکی است که شامل اختلال در متابولیسم کربوهیدراتها و کاهش مصرف گلوکز می‌باشد که منجر به افزایش قندخون می‌شود که ناشی از فقدان یا کاهش ترشح انسولین و یا عمل غیر مؤثر آن می‌باشد (۱)، و نه تنها ایجاد اختلال در متابولیسم کربوهیدراتها می‌کند بلکه در متابولیسم چربی‌ها و پروتئین‌ها نیز اختلال ایجاد می‌کند(۲). دیابت به دوگروه بزرگ وابسته به انسولین یا تیپ ۱ (Insulin- dependent diabetes mellitus. IDDM) و غیر وابسته به انسولین یا تیپ ۲ یا (non-Insulin -dependent diabetes mellitus)



تصویر ۱ فراوانی رنگدانه‌های لیپوفوشین (پیکان) در لولهٔ پروگزیمال کلیهٔ دیابتی.
به‌رنگ‌آمیزی Schmorl's method و بزرگنمایی ۴۰۰

تصویر ۲ فقدان رنگدانه‌های لیپوفوشین در لوله‌های کلیهٔ ... که مشاهده میشود (پیکان). هموگلوبین است که بدنبال ... آهن واکنش نشان داده‌اند، چون در این متد رنگ آمیزی قرمز میباید به قرمز سیاه تبدیل میشود. Schmorl's method و بزرگنمایی ۴۰۰

(NIDDM) تقسیم می‌شود و در هر دو گروه آسیب کلیوی را می‌توان دید که در نهایت باعث نفروپاتی دیابتی می‌شود و این یکی از مهمترین علل بیماری نهایی کلیه است که احتیاج به عمل دیالیز را بدنبال دارد (۳). علت اصلی آسیب، گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئین‌های پلاسما و غشاء پایه لوله‌ها و کلافه‌های گلومرولی است (۶-۴). زیرا در یک محیط با قند بالا، گلوکز با پیوند کووالان با گروه آمین پروتئین‌ها عکس العمل نشان می‌دهد که در ابتدا این گلیکوزیلاسیون قابل برگشت می‌باشد(۵).

عوارض اصلی دیابت بر روی کلیه شامل گلومرولواسکلروزیس، افزایش ضخامت غشاء پایه کلافه‌های گلومرولی و لوله‌های کلیه، نکروز پاپیلاری، کلاهک فیبرینی و قطره کپسولی است که مهمترین آن گلومرولواسکلروزیس می‌باشد و بصورت منتشر یا ندولار خود را نشان می‌دهد که در آن افزایش ماتریکس مزانژیال پیش می‌آید. علایم اولیه کلینیکی بصورت پرادراری، آلبومینوری و پروتئینوری خود را نشان می‌دهد و سرانجام نفروپاتی آنقدر پیشرفت می‌کند که کلیه را از کار می‌اندازد. نکته اینجاست که گلیکوزیلاسیون در ابتدا قابل برگشت است ولی در مدت طولانی مولکولهایی مثل کلاژن پیوند غیر قابل برگشتی را با گلوکز تشکیل می‌دهند (۵). لذا تشخیص زودتر درگیری کلیه در دیابت می‌تواند نتایج درمانی بهتری را در پی داشته باشد. از آنجا که پارامترهای تشخیصی در آسیب‌شناسی کلیه در دیابت معمولاً چند سال بعد از شروع دیابت بوجود می‌آید، لذا بر آن شدیم که علایم اولیه زودرس عکس‌العمل سلولهای جداری لوله‌های کلیه را نسبت به دیابت بررسی کنیم. این تحقیق بر روی ظهور رنگدانه‌های لیپوفوشین متمرکز شده است.

مواد و روشها

۶۰ سر رت نر از نژاد Whistar با وزن حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از مؤسسه تحقیقاتی و سرم سازی رازی مشهد تهیه گردید. رت‌ها بطور تصادفی در دو گروه ۳۰ تایی قرار داده شد. یک گروه با تزریق آلوکسان بصورت زیرجلدی با دوز ۱۲۰mg/kg دیابتی شدند(۸). اثر استرس تزریق، با تزریق سرم فیزیولوژیک در گروه شاهد بررسی شد. هر دو گروه در شرایط یکسان و استاندارد از نظر رطوبت و درجه حرارت (۱±۲۳) و نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی از ساعت ۴ تا ساعت ۱۶ بوده است) و دسترسی به مواد غذایی و آب، نگهداری شدند. یک هفته بعد از تزریق قند خون آنها، با دستگاه گلوکومتر از نوع tgpll-72115, Refeluxs اندازه گرفته شد. قندخون بالای ۲۰۰mg/dl ملاک دیابت درنظر گرفته شد(۷). رت هایی که قند پایین‌تر از ۲۰۰mg/dl داشتند از گروه حذف شدند. ۸ هفته بعد از تزریق، بار دیگر قند خون آنها را اندازه گرفته و رت‌هایی که قند پایین‌تر از ۲۰۰mg/dl داشتند از گروه حذف شدند. چند سر رت دیابتی نیز در این مدت مردند که در نهایت ۱۵ سر رت از گروه دیابتی باقی ماندند که با توجه به این مسئله از گروه شاهد نیز به طور تصادفی ۱۵ نمونه انتخاب شدند. ابتدا رت‌ها با کلروفرم بیهوش شده و سپس با عمل پرفیوژن در داخل قلب ، عروق بزرگ و عروق کلیه فیکساتور فرمالین ۱۰٪ وارد شد. آنگاه کلیه‌ها را درآورده و در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۴۸ ساعت جهت انجام فیکساسیون بهتر قرار داده شد. بعد از آن کلیه‌ها به روش معمول بافت‌شناسی پاساژ داده و بلوک تهیه گردید. سپس از بلوکها لام تهیه شده و لام‌ها به سه روش رنگ‌آمیزی H-E، PAS-H و Schmorl رنگ‌آمیزی گردید(۸).

یافته ها

در هر سه رنگ‌آمیزی بکار برده شده ظهور فراوان رنگدانه‌های لیپوفوشین در سلولهای جداری لوله‌های در هم پیچیده پروگزیمال (PCT) و دیستال (DCT) کلیه دیده شده است(تصاویر ۲و۱). با توجه به اینکه رنگ‌آمیزی schmorl's method برای رنگدانه‌های لیپوفوشین اختصاصی است (۸). وجود این رنگدانه‌ها تأیید شده،

تصویر ۳ وجود سلولهای غیر طبیعی در جدار لوله‌های کلیهٔ دیابتی، سلولهای دو هسته‌ای و تک هسته‌ای با هسته‌ای بزرگتر و سیتوپلاسم اسیدوفیل‌تر از معمول (رنگ‌آمیزی H-E با بزرگنمایی ۴۰۰).

ظهور رنگدانه‌ها در تمام نمونه‌های دیابتی بطور محسوس و چشمگیری قابل شناسایی بوده‌است. علاوه بر این بعضی از سلولهای جداری لوله‌های کلیه تمام نمونه‌ها، بزرگتر و اسیدوفیل‌تر از معمول بوده‌اند. تخریب لوله‌ها، وجود دشت و همچنین جابجایی هسته‌ها (nuclear displacement) که نشانه آسیب سلولی است، نیز در همه نمونه‌ها مشاهده شده است (تصویر ۳).

بحث

افزایش رنگدانه‌های لیپوفوشین در سلولها می‌تواند نشانه آسیب سلولی باشد(۹). در این تحقیق رنگدانه‌های لیپوفوشین در لوله‌های درهم پیچیده بخصوص در لوله‌های پروگزیمال افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان میدهد. سلولهای جدار این لوله‌ها از یک سیستم لیزوزومی قوی برخوردار بوده، بطوریکه لیزوزومهای فراوانی در این سلولها بخصوص در سلولهای جدار لوله‌های پروگزیمال وجود دارد(۷).

پروتئین‌ها و مواد مفید دیگر پلاسما توسط لوله‌های کلیه باز جذب می‌شوند و این مواد توسط لیزوزومها شکسته شده و دوباره مورد استفاده بدن قرار می‌گیرند. تاکنون چندین تحقیق نشان داده است که پروتئین‌ها و مواد دیگر مثل لیپوپروتئین‌های پلاسما در بیماری دیابت دچار گلیکوزیلاسیون می‌شوند(۱۰و۲و۵). گلیکوزیلاسیون غیر آنزیماتیک اولیه پروتئین‌ها احتمالاً باعث تغییر ماهیت پروتئین‌ها می‌شوند و زمانیکه سلولهای جداری لوله‌های نفرون‌ها آنها را از مایع فیلتره شده بازجذب کنند این پروتئین‌ها قابل هضم توسط لیزوزومهای موجود در لیزوزوم سلولها نیستند و این پروتئین‌ها و مواد گلیکوزیله شده دیگر بصورت اجسام باقیمانده Residual bodies در سلول جمع می‌شوند، مشابه آن چیزی که در بیماریهای

ذخیره‌ای storage disease پیش می‌آید و این اجسام باقیمانده در لیزوزومهای نائویه می‌توانند بصورت رنگدانه‌های لیپوفوشین رؤیایی و شناسایی شوند. از طرف دیگر مطالعات نشان داده است که در دیابت سازمنفی غشاء پایه گلومرولی به علت کاهش گلیکوپروتئین‌های این غشاء کاهش می‌یابد (۱۲و۱۱). از آنجا که وجود این گلیکوپروتئین‌ها در این سد فیلتراسیون به صورت یک سد الکتریکی عمل می‌کنند و مانع از عبور آنیونهایی مثل پروتئین‌های پلاسما می‌شوند، کاهش قدرت این سد باعث نشت بیشتر پروتئین‌های پلاسما به مایع فیلتره شده فضای بومن می‌شود. شدید نشت این پروتئین‌ها آنقدر زیاد است که لیزوزومهای سلولهای جدار لوله‌های نفرون فرصت آن را ندارند که همه این پروتئین‌ها را شکسته و اسید آمینهٔ آنها را وارد گردش خون کنند. بنابراین این پروتئین‌ها و مواد بازجذب شده دیگر بصورت رنگدانه‌های لیپوفوشین در داخل سلول تجمع می‌یابند. پروتئین‌های غشاء پایه نیز از عمل گلیکوزیلاسیون که ناشی از محیط هایپرگلیسمیک است مصون نمی‌مانند. بنابراین باز هم قدرت سد فیلتراسیون کاهش می‌یابد و مجدداً نشت بیشتر مواد داخل پلاسما از سد فیلتراسیون پیش می‌آید، اگرچه غشاء پایه به عنوان واکنش جبرانی ضخیم‌تر می‌شود. دلیل دیگر افزایش بار لیزوزومهای سلول می‌تواند ناشی از افزایش جریان خون کلیه باشد که بنام اصل همودینامیک نامیده می‌شود که در نتیجهٔ آن فیلتراسیون گلومرولی افزایش می‌یابد (۱۴و۱۳). Steffes و همکارانش در سال ۱۹۷۸ نشان دادند که با نفرکتومی یکطرفه چون جریان خون بیشتر به کلیه باقیمانده می‌رود، عوارض دیابت بر روی کلیه تشدیدمی‌شود(۱۵). Jain و همکارانش در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که رنگدانه‌های لیپوفوشین در اریتروسیت‌های افراد دیابتی افزایش می‌یابند(۹). از علت اصلی این مسئله را کاهش ویتامین E در فرد دیابتی می‌دانند. ویتامین E یک آنتی اکسیدانت فیزیولوژیک است (۱۶)، بنابراین کاهش آن در دیابت عمل اکسیداسیون را در بافتها تشدید می‌کند. اکسیداسیون لیپیدها خود عامل اصلی ظهور رنگدانه‌های لیپوفوشین به عنوان رنگدانه‌های سن پیری Aging pigment است (۸). مطالعات in vitro نشان داده است که محیط هایپرگلیسمیک باعث کاهش مونکول O2 و افزایش رادیکالهای آزاد O2 می‌شود که این باعث افزایش اکسیداسیون چربی غشاء سلول می‌شود (۹). تجویز مواد آنتی اکسیدانت در رت‌های دیابتی نشان داده است که ظهور رنگدانه‌های لیپوفوشین کاهش می‌یابد(۹). دیابت خود باعث کاهش قدرت Detoxification رادیکالهای آزاد توسط آنزیم‌ها می‌شود که خود ناشی از کاهش ویتامین E است (۱۷). کاهش ویتامین E باعث کوتاهتر شدن عمر اریتروسیت‌ها و کاهش توانایی تغییر شکل آنها می‌شود و علاوه بر این کاهش ویتامین E عمل گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئین‌ها و ترکیبات مشابه آنها را افزایش می‌دهد(۱۶). بطور مثال در دیابت هموگلوبین گلیکوزیله شده HbA1C خود به عنوان ملاکی برای تعیین میزان شدت گلیکوزیلاسیون در دیابت استفاده می‌شود(۱۸). بنابراین گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و کاهش مانور و عمر اریتروسیت خود باعث هیپوکسی بافتها از جمله کلیه‌ها می‌شود که بصورت یک واکنش جبرانی میزان جریان خون کلیه‌ها افزایش می‌یابد که بازهم باعث نشت بیشتر پلاسما به داخل فضای بومن می‌شود.

****

References

1. Sacks DB. Carbohydrates in: Burtis CA. and Ashwood ER. Tietz's fundamentals of clinical chemistry. 4th ed,

1996; 355-357.

2. Rodger W. Non-insulin dependent (type II) diabetes mellitus. Can Med Assoc J 1991; 145: 1571-1581.

3. Elisa TL, Viviens LM et al. Incidence of renal failure in NIDDM: the Oklahoma-Indian diabetes study. Diabetes 1994; 43:572-578.

4. Crowley ST, Brownley M, Diane ES et al. Effects of nonenzymatic glycosylation of mesangial on prolifration of mesangial cell. Diabetes 1991; 40: 540-547.

5. Cefalu W, Wang ZQ, Farrow AB et al. Liver and kidney tissue membranes as tissue markers for nonenzymatic glycosylation. Diabetes 1991; 40: 902-907.

6. Berg TJ, Bongstad HJ. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin - dependent diabetes mellitus. Metabolism 1997; 46: 661-665.

7. Srivastava Y, Venkala KH. Effects of momordica charanita linn. pomous aqueous extract on cataraciogenesis in murrian alloxan diabetes. Pharmacol Res Commun 1988; 20: 201-204.

8. Bradbury P, Keithe G. Theory and practice of histological techniques. edited by Bancroft JD, Sterens A, Turner DR. 3rd ed. Churchill livingstone. 1990; 119-112.

9. Jain SK, Levine SN, Dueit J. Reduced Vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. Diabetes 1991; 40:1241-1244.

10. Kim JA, Berliner JA, Rama D et al. Evidence that Glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. Diabetes 1994; 42:1103-1106.

11. Moran A, Brown DM, Kim Y et al. Effects of IGF-L and Glucose on protein and proteoglycan synthesis by human fetal - mesangial cells in culture. Diabetes 1991; 40:1346-1354.

12. Kofoed-Enevoldsen A, Eriksson UJ. Inhibition of N-acetyl heparosan deacetylase in diabetic rats. Diabetes 1991; 40: 1449-1452.

13. Remuzzi A, Fassi A, sengalli F et al. Prevention of renal injury in diabetic MWF rats by angiotensin II antagonism. Exp Nephrol 1998; 60: 28-38.

14. Shore AC, Jaap AJ, Tooke J. Capillary pressure in patients with NIDDM. Diabetes 1994; 43:1198-1201.

15. Steffes MW, Brown DM, Mauor SM. Diabetic glomerulopathy following unilateral nephrectomy in the rat. Diabetes 1978; 41: 35-41.

16. Aoki Y, Awa Y, Yazaki K et al. Protective effect of vitamin E supplementation on increased thermal stability of collagen in diabetic rats. Diabetologia 1992; 35: 913-916.

17. Woff SP, Demm RT. Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. Biochem J 1987; 245: 243-250.

18. Spicer KM, Allen RC, Buse MC. A simplified assay of hemoglubin A1C in Diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitive microdensitometry. Diabetes 1992; 27: 384-388.