

## ظهور فراوان رنگدانه‌های لیپوفوژین در سلولهای جدار لوله‌های کلیه

### موشهای صحرا ای مبتلا به دیابت بوسیله آلوکسان

دکتر محسن پورقاسم<sup>۱</sup>، دکتر مهدی جلالی<sup>۲</sup>، دکتر محمد رضا نیکروش<sup>۲</sup>،

دکتر مرتضی بپنام رسوی<sup>۲</sup>، دکتر ناهید امینیان<sup>۴</sup>

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار علوم تشریح دانشکده پزشکی مشهد

۳- استادیار فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد ۴- دانشیار پاتولوژی دانشکده پزشکی مشهد

**سابقه و هدف:** در گیری 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- انوزین (H-E) و پاس هماتوکسیلین (PAS-H) و متادشمورل (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 پروکریمال رنگدانه‌های لیپوفوژین که تجمع فراوان آنها در سلول می‌تواند نشانه آسیب سلولی باشد بصورت غیر طبیعی افزایش یافته است. همچنین وجود سلولهایی که بزرگتر و انوزینوفیل‌تر از سلولهای طبیعی بوده و گاما دارای دو هسته می‌باشد 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 علام در گیری کلیه در بیماری دیابت مطرح گردد.

**واژه‌های کلیدی:** دیابت شیرین، لیپوفوژین، آلوکسان، کلیه.

#### مقدمه

کربوهیدراتها می‌کند بلکه در متابولیسم چربی‌ها و پروتئین‌ها نیز اختلال ایجاد می‌کند (۲). دیابت به دو گروه 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)

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیکی است که شامل اختلال در متابولیسم کربوهیدراتها و کاهش مصرف گلوكز 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

قرارداده شد. یک گروه با تزریق آلوکسان بصورت زیرجلدی با دوز  $120\text{ mg/kg}$  ۱۲۰ دیابتی شدند(۸). اثر استرس تزریق، با تزریق سرم فیزیولوژیک در گروه شاهد برسی شد. هر دو گروه در شرایط یکسان و استاندارد از نظر رطوبت و درجه حرارت ( $22 \pm 1$ ) 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 گلوكومتر از نوع Refeluxs tgpli-72115، اندازه گرفته شد. قندخون بالای  $200\text{ mg/dl}$  دیابت در نظر گرفته شد(۷). رت هایی که قند پایین تر از  $200\text{ mg/dl}$  داشتند از گروه حذف شدند. ۸ هفته بعد از تزریق، بار دیگر قند خون آنها را اندازه گرفته و رت هایی که قند پایین تر از  $200\text{ mg/dl}$  داشتند از گروه حذف شدند. چند سرت از دیابتی نیز در این مدت مردند که در نهایت ۱۵ سرت از گروه دیابتی باقی ماندند که با توجه به این مسئله از گروه شاهد نیز به طور تصادفی ۱۵ نمونه انتخاب شدند. ابتدا رت ها با کلروفرم بیهوده و سپس با عمل پر فیوژن در داخل قلب، عروق بزرگ و عروق کلیه فیکساتور فرمالین  $10\%$  وارد شد. آنگاه کلیه ها را در آورده و در فرمالین  $10\%$  به مدت ۴۸ ساعت جهت انجام فیکاسیون بهتر قرار داده شد. بعد از آن کلیه ها به روش معمول بافت شناسی پاساز داده و بلوك تهیه گردید. سپس از بلوكها لام تهیه شده و لام ها به سه روش رنگ آمیزی H-E، PAS-H و Schmorl رنگ آمیزی گردید(۸).

### یافته ها

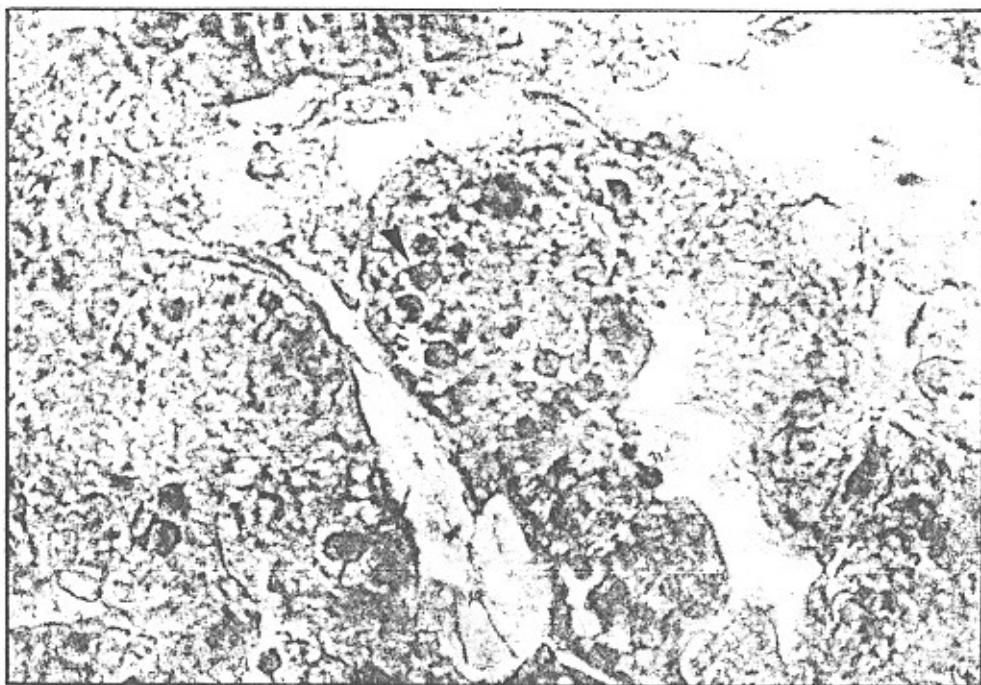
در هر سه رنگ آمیزی بکار برده شده ظهور فراوان رنگدانه های لیپوفوژین در سلولهای جداری لوله های در هم پیچیده پروگزیمال (PCT) و دیستال (DCT) کلیه دیده شده است (تصاویر ۱ و ۲). با توجه به اینکه رنگ آمیزی schmorl's method برای رنگدانه های لیپوفوژین اختصاصی است (۸). وجود این رنگدانه ها تأیید شده است.

(NIDDM) تقسیم می شود و در هر دو گروه آسیب کلیوی را می توان دید. که در نهایت باعث نفروپاتی دیابتی می شود و این یکی از مهمترین علل بیماری نهایی کلیه است که احتیاج به عمل دیالیز را بدنبال دارد (۲). علت اصلی آسیب، گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئین های پلاسمما و غشاء پایه لوله ها و کلائف های گلومرولی است (۴-۶). زیرا در یک محیط با قند بالا، گلوكز با پیوند کرووالان با گروه آمین پروتئین ها عکس العمل نشان می دهد که در ابتدا این گلیکوزیلاسیون قابل برگشت می باشد (۵).

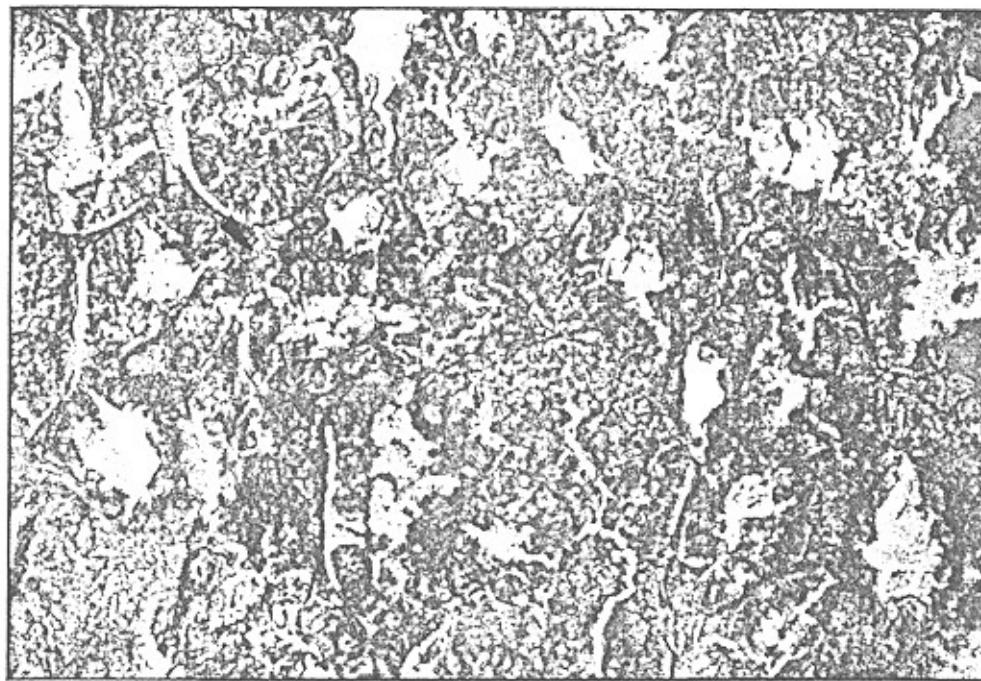
عوارض اصلی دیابت بر روی کلیه شامل گلومرولواسکلروزیس، افزایش ضخامت غشاء پایه کلائف های گلومرولی و لوله های کلیه، نکروز پاپیلاری، کلاهک فیبرینی و قطره کپسولی است که مهمترین آن گلومرولواسکلروزیس می باشد و بصورت متشر باندولار خود را نشان می دهد که در آن افزایش ماتریکس مزانزیال پیش می آید. علایم اولیه کلینیکی بصورت پرادراری، آلبومینوری و پروتئینوری خود را نشان می دهد و سرانجام نفروپاتی آنقدر پیشرفت می کند که کلیه را از کار می اندازد. نکته اینجاست که گلیکوزیلاسیون در ابتدا قابل برگشت است ولی در مدت طولانی مولکولهایی مثل کلازن پیوند غیر قابل برگشتی را با گلوكز تشکیل می دهد (۵). لذا تشخیص زودتر درگیری کلیه در دیابت می تواند نتایج درمانی بهتری را در پی داشته باشد. از آنجا که پارامترهای تشخیصی در آسیب شناسی کلیه در دیابت معمولاً چند سال بعد از شروع دیابت بوجود می آید، لذا بر آن شدیدم که علایم اولیه زودرس عکس العمل سلولهای جداری لوله های کلیه را نسبت به دیابت بررسی کنیم. این تحقیق بر روی ظهور رنگدانه های لیپوفوژین متمرکز شده است.

### مواد و روشها

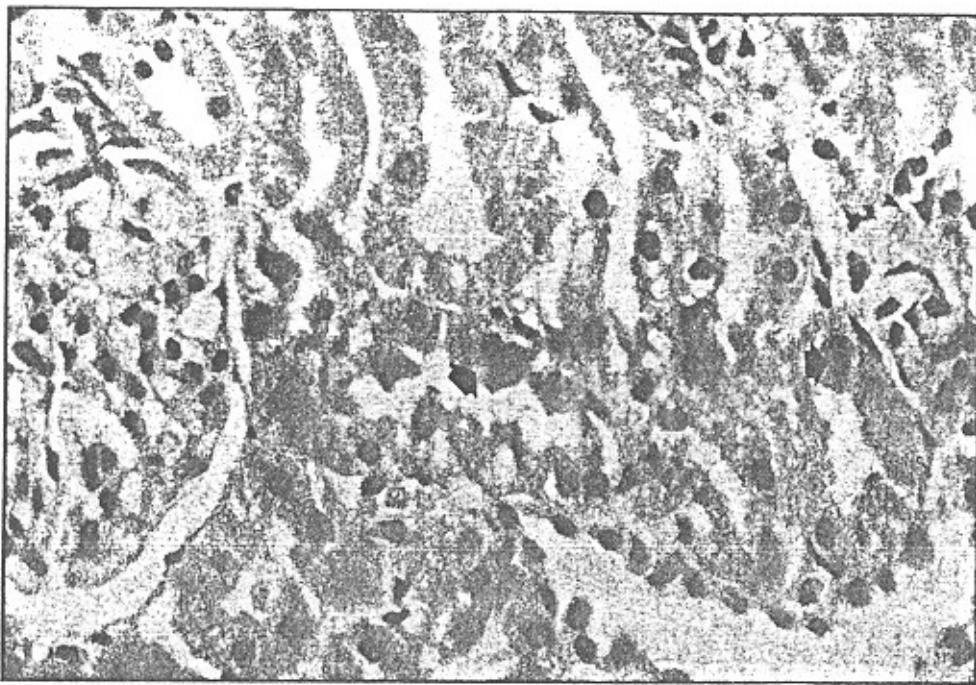
۶۰ سرت نر از تر زاد Whistar با وزن حدود  $200$  تا  $250$  گرم از مؤسسه تحقیقاتی و سرم سازی رازی مشهد تهیه گردید. رت ها بطور تصادفی در دو گروه  $30$  تایی



تصویر ۱. فراوانی رنگدانه‌های لیپوفوشن (پیکان)، در لوله پروکربیوال کلیه دیابتی.  
(رنگآمیزی schmorl's method با بزرگنمایی ۱۰۰×)



تصویر ۲. فقدان رنگدانه‌های لیپوفوشن در لوله‌های کلیه شاهد، واکنشپای رنگی که مشاهده می‌شود (پیکان)، حموکلوپین است که بدلیل داشتن آهن واکنش نشان داده‌اند، چون در این متد رنگآمیزی فری سیانید به فرو سیانید تبدیل می‌شود (schmorl's method با بزرگنمایی ۴۰×).



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

فراوانی در این سلولها بخصوص در سلولهای جدار لوله‌های پروگریمال وجود دارد(۷). پروتئین‌ها و مواد مفید دیگر پلاسمما 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 پلاسمما در بیماری دیابت دچار گلیکوزیلاسیون می‌شوند (۱۰ و ۵ و ۴). 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 آنزیم‌های موجود در لیزوزوم این سلولها نیستند. این پروتئین‌ها و مواد گلیکوزیله شده دیگر بصورت اجسام باقیمانده Residual bodies سلولها تجمع می‌یابند، مشابه آن چیزی که در بیماریهای

ظهور رنگدانه‌ها در تمام نمونه‌های دیابتی بطور محسوس و چشم‌گیری قابل شناسایی بوده است. علاوه بر این بعضی از سلولهای جداری لوله‌های کلیه تمام نمونه‌ها، بزرگتر و اسیدوفیل‌تر از معمول بوده‌اند. تخریب لوله‌ها وجود داشت و همچنین جابجا‌یابی هسته‌ها (nuclear displacement) که نشانه آسیب سلولی است، نیز در تمام 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 در هم پیچیده نفرونها بخصوص در لوله‌های پروگریمال افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان میدهد. سلولهای جدار این لوله‌ها از یک سیستم لیزوزومی قویی برخوردار بوده، بطوریکه لیزوزومهای

همکارانش در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که رنگدانه‌های لیپوفوژین در اریتروسیت‌های افراد دیابتی افزایش می‌یابند<sup>(۹)</sup>. او علت اصلی این مسئله را کاهش ویتامین E در افراد دیابتی می‌داند. ویتامین E یک آنتی‌اکسیدانت فیزیولوژیک است<sup>(۱۶)</sup>، بنابراین کاهش آن در دیابت عمل اکسیداسیون را در بافتها تشدید می‌کند. اکسیداسیون لیپیدها خود عامل اصلی ظهور رنگدانه‌های لیپوفوژین به عنوان رنگدانه‌های سن پیری Aging pigment است<sup>(۸)</sup>. مطالعات *in vitro* نشان داده است که محیط هایپرگلیمیک باعث کاهش مولکول O<sub>2</sub> و افزایش رادیکالهای آزاد O<sub>2</sub> می‌شود که این باعث افزایش اکسیداسیون چربی غشاء سلول می‌شود<sup>(۹)</sup>. تجویز مواد آنتی‌اکسیدانت در رت‌های دیابتی نشان داده است که ظهور رنگدانه‌های لیپوفوژین کاهش می‌یابد<sup>(۹)</sup>. دیابت خود باعث کاهش قدرت Detoxification رادیکالهای آزاد توسط آنزیم‌ها می‌شود که خود ناشی از کاهش ویتامین E است<sup>(۱۷)</sup>. 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<sup>(۱۶)</sup>. بطور مثال در دیابت هموگلوبین گلیکوزیله شده HbA1C خود به عنوان ملاکی برای تعیین میزان شدت گلیکوزیلاسیون در دیابت استفاده می‌شود<sup>(۱۸)</sup>. 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 باز هم باعث نشت بیشتر پلاسمما به داخل فضای بومن می‌شود.

ذخیره‌ای storage disease پیش می‌آید و این اجسام باقیمانده در لیزوزوم‌های ثانویه می‌توانند بصورت رنگدانه‌های لیپوفوژین ردیابی و شناسایی شوند. از طرف دیگر مطالعات نشان داده است که در دیابت شارژ منفی غشاء پایه گلومرولی به علت کاهش گلیکوپروتئین‌های این غشاء کاهش می‌یابد<sup>(۱۱) و (۱۲)</sup>. از آنجاکه وجود این گلیکوپروتئین‌ها در این سد فیلتراسیون به صورت یک سد الکتریکی عمل می‌کنند و مانع از عبور آنیونهایی مثل پروتئین‌های پلاسمما می‌شوند، کاهش قدرت این سد باعث نشت بیشتر پروتئین‌های پلاسمما به مایع فیلتره شده فضای بومن می‌شود. شاید نشت این پروتئین‌ها آنقدر زیاد است که لیزوزومهای سلول‌های جدار لوله‌های نفرون فرصت آن را ندارند که همه این پروتئین‌ها را شکته و اسید آمیة آنها را وارد گردش خون کنند. بنابراین این پروتئین‌ها و مواد باز جذب شده دیگر بصورت رنگدانه‌های لیپوفوژین در داخل سلول تجمع می‌یابند. پروتئین‌های غشاء پایه نیز از عمل گلیکوزیلاسیون که ناشی از محیط هایپرگلیمیک است مصون نمی‌مانند. بنابراین باز هم قدرت سد فیلتراسیون کاهش می‌یابد و مجدد نشت بیشتر مواد داخل پلاسمما 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 نتیجه آن فیلتراسیون گلومرولی افزایش می‌یابد<sup>(۱۳) و (۱۴)</sup>. همکارانش در سال ۱۹۷۸ نشان دادند که با نفرکتومی یکطرفه چون جریان خون بیشتر به کلیه باقیمانده می‌رود، عوارض دیابت بر روی کلیه تشدید می‌شود<sup>(۱۵)</sup>. Jain و



## 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 proliferation 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. Strivastava Y, Venkala KH. Effects of momordica charanita linn. pomous aqueous extract on cataractogenesis in murrian alloxan diabetes. *Pharmacol Res Commun* 1988; 20: 201-204.
  8. Bradbury P, Keith 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 hemoglobin A1C in Diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitative microdensitometry. *Diabetes* 1992; 27: 384-388.