مقاله پژوهشی

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

دکتر مهدی جلالی* ، دکتر محمدرضا نیکروش*

دریافت : ۸۴/۲/۱۳ ، پذیرش : ۸۴/۱۲/۴

چکیده:

مقدمه و هدف: مادهٔ 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 کننـده ای در تشـکیل غشـای پایـه و بافـت مزانشـیال گلومرولهـای کلیـوی ایفـا 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 گلومرولی را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق بر سـاختمان بـافتی و عملکـرد کلیـه هـا تاثیر بگذارد. لذا در پژوهش حاضر سعی گردیده است تا تغییرات ناشی از دیابت در میزان کلاژن غشای پایهٔ کلافه های گلومرولی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد.

روش کار: برای این مطالعه تجربی از ۲٤ موش نر دو ماههٔ نژاد balb/c استفاده شد که بطور تصادفی به دو گروه تجربـی و دو گروه کنترل ۱ و ۲ تقسیم شدند. در مرحلهٔ بعد سلولهای بتای جزایر لانگرهانس پانکراس نمونه های مربوط به گروههای تجربی با استفاده از تزریق mg/kg ۱۶۰ آلوکسان تخریب گردید و گروههای کنترل بدون دریافت آلوکسان بصـورت دسـت نخـورده باقی ماندند. سپس به منظور بررسی تفاوت تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت تاثیر دیابت بـر کلیـه و مقایسـهٔ آن بـا گروههـای کنترل با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال که بر علیه کلاژن نوع IV به کار گرفته شد، تغییرات غشای پایهٔ گلومرولهای کلیوی در گروه تجربی۱ و کنترل ۱ پس از ۸ هفته و گروه تجربی۲ و کنترل ۲ پس از ۱۶ هفته از شروع دیابت مورد مطالعه قرار گرفـت. علاوه بر این، حجم کلافه های گلومرولی نیز با استفاده از تکنیک های استریولوژیکی، در گروههای تجربی وکنترل مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج : یافته های این پژوهش نشان داد که هرچند تفاوت قابل ملاحظه ای بین گروههای تجربی و کنتـرل ۱ وجـود نـدارد امـا در مقایسهٔ بین گروههای تجربی و کنترل ۲ این اختلاف معنی دار است. بر این اساس واکنش غشای پایهٔ کلافه های گلـومرولی نمونـه های دیابتیک نسبت به آنتی بادی کلاژن نوع IV مثبت و ضخامت غشای پایهٔ کلافه های گلومرولی نیز در گروه دیابتیک ۱۶ هفتـه ای نسبت به سایر گروهها به شکل معنی داری نسبت به گروه کنترل و تجربی ۱ نیز افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$) در حالیکـه ایـن تفاوت بین گروه کنترل و گروه دیابتیک ۸ هفته ای معنی دار به نظر نمی رسـد. عـلاوه بـر ایـن در انـدازه گیـری کلافـه هـای گلومرولی افزایش حجم مشخصی در بافت مزانژیال گروه ۱۶ هفته ای دیده می شود ($٤/٦٣٥ \pm ۰/۲۸۹ \times ۱۰^{٦} \mu m^{۳}$) که این تغییـر حجم در گروه ۸ هفته ای ($۳/٥۰٤ \pm ۰/۱۸۹ \times ۱۰^{٦} \mu m^{۳}$) و کنترل ($۳/٤۲۲ \pm ۰/۱٤۰ \times ۱۰^{٦} \mu m^{۳}$) معنی دار به نظر نمی رسد.

نتیجه نهائی : ابتلا به دیابت در دراز مدت می تواند از طریق واکنش بافت مزانژیال و غشای پایهٔ گلومرول 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 گلومرولی کمک می نماید.

کلید واژه ها : دیابت شیرین / غشای پایهٔ گلومرولی / 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 متاسفانه 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 گلومرولی 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 گلومرولی شامل سلول های مزانژیال، سلولهای آندوتلیال مویینه گلومرولی و سلولهای اپیتلیال لایهٔ احشایی کپسول بومن را که همگی در سنتز کلاژن نقش دارند در گیر می نماید (۶). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که ضخیم شدن غشای پایه در کلافه های گلومرولی می تواند موجبات انسداد کاپیلرها را فراهم آورد و در نهایت به اختلال در عملکرد گلومرولها 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 دهندهٔ غشای پایه تا چه حد بر ساختمان کلافه های گلومرولی موشهای دیابتی تاثیر می گذارد.

روش کار:

این مطالعه از نوع تجربی ـ آزمایشگاهی می باشد.

۱- روش ایجاد دیابت تجربی : در این پژوهش که مراحل ایجاد دیابت تجربی و تهیهٔ برشهای بافتی کلیه در آزمایشگاه هیستوتکنیک گروه علوم تشریحی دانشکدهٔ پزشکی مشهد و مطالعات ایمونوهیستو شیمیایی آن در دانشگاه Dalhousie کانادا صورت گرفت، از ۲۴ سر موش نر دو ماههٔ balb/c که نژاد مناسبی برای مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی محسوب می شود استفاده گردید. نمونه های مورد نظر از خانهٔ 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 Dioxy uracil 6-5) که از شرکت سیگما خریداری شده بود، دیابتی گردیدند. برای این هدف، مقدار mg/kg ۱۲۰ 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 mg/dl ۸۰ تجاوز نمی کند)، قند بالای mg/dl۱۶۰ 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 فاصلهٔ ۸ هفته پس از شروع دیابت بروز می نماید و این تغییرات به فاصلهٔ 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 کلروفرم بیهوش شدند. سپس برای نمونه برداری و فیکس

اولیه با استفاده از پرفیوژن بطنی که با بهره گیـــــری از فرمالین ۱۰٪ انجام گرفت کلیه های آنان بر داشته شـد و پس از حذف کپسول کلیوی به منظور دستیابی به فـیکس بهتر در هر یک از کلیه ها یک برش طولی ایجاد گردیده و به شیشه های کد گذاری شدهٔ محتوی فیکساتور (فرمالین ۱۰٪) انتقال یافت. در مرحلهٔ بعد هـر یـک از نمونـه هـای کلیوی مطابق روشهای معمول بافت شناسـی مـورد آمـاده سازی قرار گرفت و سرانجام از بلوکهای بافتی بدست آمده برشهای سریال در جهت افقی و به ضـخامت ۱۰ میکـرون تهیـه گردیـد. از مجمـوع بـرش هـای سـریال بـه دسـت آمدهٔ مربوط به هر نمونه از هر۳ برش یک بـرش انتخـاب گردیده و به لام های دارای شمارهٔ سـریال متـوالی انتقـال داده شد تا در مرحلـهٔ بعـدی بـا اسـتفاده از آنتـی بـادی اختصاصی علیه کلاژن نـوعIV مـورد رنـگ آمیـزی قـرار گیرد.

۳- مطالعـهٔ ایمونوهیستوشـیمیایی : بـر اسـاس اسـتفاده از تکنیکهای مورد نظر (۱۲)، پس از پارافین زدایی و آبدهی مجدد هر یک از برشها دو بار و هر بار به مـدت ۵ دقیقـه در بافر تـریس (حـاوی ۱/۵٪ کلـرور سـدیم در pH =۷/۴) مورد شستشو قرار گرفت. جهت بلوک کردن آنتـی ژنهـای غیـر اختصاصـی، ابتـدا بـرای مـدت ۳ سـاعت، برشـها در مجاورت تریتون ۰/۳٪ X100 در بافر تریس و goat serum و پس از آن برای مدت ۲۴ ساعت در مجاورت آنتی بـادی کلاژن IV (تهیه شده از شرکت سیگما) که به میزان ۱ به ۲۵۰ در محلول تریس بافر حاوی تریتـون ۳٪ و سـرم ۲٪ رقیق شده بود قرار گرفتند. سپس نمونه ها ۳ بار و هر بـار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر تـریس شستشـو داده شـدند و آنگاه به مدت ۲ سـاعت بـا biotinylated goat anti-rabit IgG مجاور گردیدند. در مرحلهٔ بعـد نمونـه هـای مـورد نظر۳ بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شدند و پس از آن جهت مهار فعالیت آنـدوژناز پراکسـیداز بـه مـدت ۱ ساعت در محلول ۳٪ آب اکسیژنه در متانول قرار گرفتنـد. در ادامهٔ ایـن مرحلـه بـرای مـدت ۲ سـاعت در مجـاورت آویدین بیوتین که بـا هـورس رادیـش پراکسـیداز (HRP) کانژوگه شده بود مجاور شدند. سپس ۳ بار دیگر و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه این نمونه هـا در بـافر تـریس شستشـو گردیـده و بعـد بـرای مـدت ۱۵ دقیقـه در معـرض دی آمینوبنزیدین حاوی ۰/۰۳ درصد آب اکسیژنه قـــرار داده شدند. در آخرین مرحله پس از شستشوی نمونه هـــــا بـــرای ایجـاد رنـگ زمینـه از هماتوکسـیلین اسـتفاده گردیـد و هـر بـرش بـا اسـتفاده از ژل گلیسـرول مونتـه گردید.

۴- تعیین حجم کلافه های گلومرولی : برشهای انتخابـــی بـا استفاده از میکروسـکوپ نـوری و بـا بهـره گیـری از روش استریولوژیکی مورد مطالعهٔ مورفومتریک قرار گرفت (۱۳). برای این منظـور از ابتـدا از میـدان دیـد میکروسـکوپیک مربوط به یک ناحیه از هر برش کلیه که بـا یـک شـاخص حاشیه ای (یک تار موی قـرار گرفتـه در قالـب پـارافینی) مشخص شده بـود سـطح مقطـع گلومرولهـای موجـود در میدان با بهـره گیـری از یـک تـرانس پرانسـی مـوزاییکی (صفحهٔ نقطه چینـی کـه فاصـلهٔ همـهٔ نقـاط سـطح آن از همدیگر به یک اندازه باشد) تعیین گردید که در هر میدان بسته به موقعیت برش هر یک از گلومرولها تعـداد مقـاطع گلومرولی شمارش شده بین ۱۴ تا ۲۰ عدد بود. روش کـار بدین ترتیب بود که با شمارش نقطه های منطبق بر سطح برش هر کلافه، ضمن در نظر گرفتن فاصلهٔ هـر نقطـه بـا نقاط مجاور آن، سطح مقطع هر یک از کلافه های موردنظر در هر برش محاسبه گردید. سپس سطح مقطـع برشـهای سریال به دست آمده(با احتساب دو برش حذف شده از هر سـه بـرش سـریال) در ضـخامت برشـها ضـرب گردیـده و براساس اصـل کاوالیـه(۱۴) حجـم هـر یـک از گلومرولهـا تعیین گردید.

۵- بررسی تغییرات کلاژن غشای پایهٔ گلومرولهـا : بـه اعتبـار اینکه واکنش به رنگ پذیری کلاژن نوعIV که بـا اسـتفاده از آنتـی بـادی مونوکلونـال شـاخص مناسـبی در افـزایش تراکم این نوع کلاژن محسوب می شود، درجهٔ رنگ پذیری کـلاژن موجـود در غشـای پایـه بـر اسـاس درجـه بنـدی اسـتفان Stefan (۱۵) بـه عنـوان معیـار تـراکم کـلاژن مد نظر قرار گرفت. در این حالت درجهٔ رنگ ناپذیری صفر و رنگ پذیری غشای پایه از ۱ تا ۴ در نظـر گرفتـه شـد و نمونه های مربوط به کنترل، تجربی ۱ و تجربـی ۲ کـه در معـرض آنتـی بـادی قـرار گرفتـه بودنـد بـا اسـتفاده از میکروسکوپ چند نفره مورد ارزیـابی قـرار گرفـت و بـه شـدت رنـگ پـذیری غشـای پایـهٔ گلومرولهـا امتیـاز داده شد.

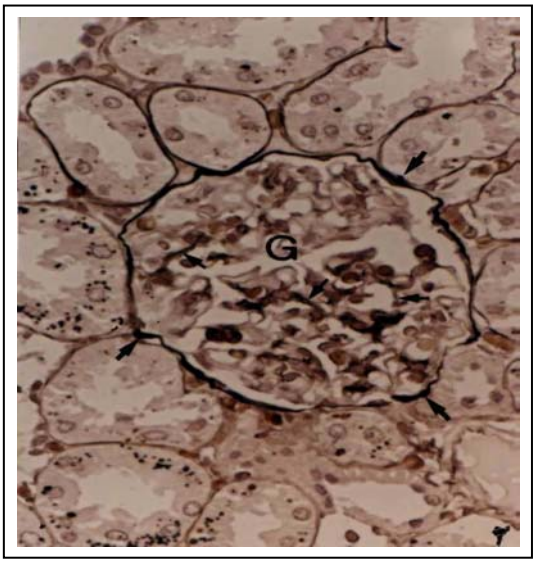
۶- آنالیز آماری : پس از ثبت نتایج بدست آمـده از بـر آورد حجـم بافـت مزانژیـال کلافـه هـای گلـومرولی و تعیـین میانگین برای نمونه های هرگروه به کمک نرم افزار آماری

instat و با استفاده از تست توکی مبادرت به محاسبهٔ آنالیز واریانس گردید. جهت مقایسهٔ تغییرات میزان کلاژن در غشای پایه که بر اساس شدت رنگ پذیری در گروههای مختلف انجام گرفت، از آزمون غیر پارامتری من ـ 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 مطالعهٔ 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 محاسبهٔ آماری، میزان تغییرات کلاژن مشخص گردید.

نتایج :

از عمده ترین یافته های این پژوهش افزایش سنتز کلاژن نوع IV در غشای پایهٔ کلافه های گلومرولی مربوط به گروه دیابتیک ۱۶ هفته ای بود که به شکل معنی داری نسبت به گروه کنترل و تجربی ۱ افزایش یافته بود ($p<۰/۰۵$) 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 همهٔ 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 گلومرول ها و سلول های آندو تلیال موبینه گلومرولی 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 اندازهٔ غشای پایهٔ گلومرولها نبود. محاسبات حجمی گلومرولها نیز بازگو کنندهٔ این واقعیت است که در گروه دیابتیک ۱۶هفته ای افزایش حجم معنی داری نسبت به سایر گروهها دیده می شود (جدول ۱).



شکل ۱: نمای میکروسکوپیک کلافهٔ گلومرولی (G) یک نمونهٔ 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 گلومرول ها و سلول های آندو تلیال موبینه گلومرولی 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 گلومرولی ($\times 10^6\ \mu m^3$) در گروههای تجربی و کنترل (SEM ±)

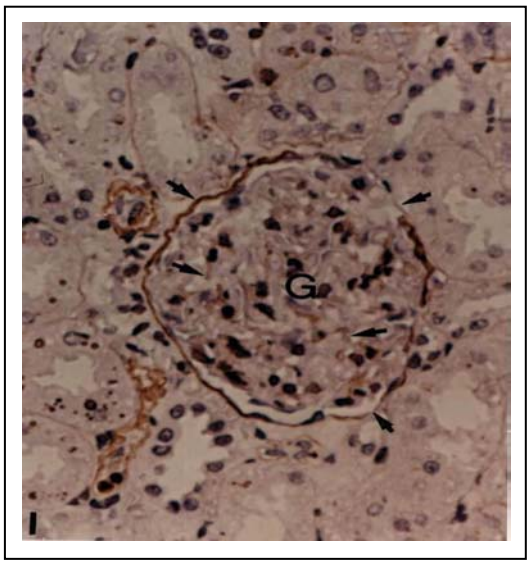
ردیف(*)	کنترل	تجربی ۱ (**)	تجربی ۲(***)
۱	۳/۹۸۰ ±۱/۳۹۱	۴/۱۰۸ ±۱/۵۸۰	۴/۶۳۱±۱/۲۱۸
۲	۳/۲۹۴ ±۰/۹۲۸	۳/۲۶۷ ±۰/۳۱۲	۴/۸۰۷±۱/۷۱۶
۳	۴/۰۱۱ ±۱/۷۱۷	۴/۱۰۷±۲/۶۵۵	۴/۹۰۲±۱/۱۱۶
۴	۳/۵۹۵ ±۰/۱۵۲	۳/۳۰۲ ±۰/۸۶۶	۳/۲۶۶±۰/۹۰۸
۵	۳/۴۸۵ ±۱/۸۵۰	۳/۱۶۸ ±۱/۳۴۵	۵/۳۲۱±۲/۲۲۷
۶	۳/۱۶۸ ±۱/۶۹۶	۴/۰۵۴ ±۱/۰۱۷	۴/۸۸۷±۱/۲۴۳
میانگین کل	۳/۴۲۲ ±۰/۱۴۰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

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

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

***در این مقایسه، میانگین حجم گلومرولی گروه تجربی ۲ نسبت به کنترل و تجربی ۱ کاملاً معنی دار است ($p<۰/۰۰۵$).

در مقایسهٔ غشای پایهٔ گلومرولهای 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.



شکل ۲: نمای میکروسکوپیک کلافهٔ گلومرولی (G) یک نمونـهٔ کنترل که با آنتی بادی مونوکلونال علیه کلاژن نوع IV مجـاور شده است. در این نما غشای پایهٔ مربوط به سلولهای اندوتلیال کپسول بومن، ماتریکس مزانژیال گلومرول هـا و سـلول هـای آندو تلیال مویینه گلومرولی (پیکانهای نشانه) عکـس العمـل ضـعیفی نسـبت بـه ایـن آنتـی بـادی نشـان داده اسـت (درشتنمایی۴۰۰).

بحث:

ساختارکلیه ها به اعتبار نقش تعیین کننده ای که در امر فیلتراسیون دارند، در محیط هیپرگلیسمیک سریعتر و بیشتر از بقیهٔ بافتها آسیب پذیری از خود نشان می دهند. مطالعات متعدد در این زمینه مشخص نموده است کـه غشـای پایـه (Basment membrane) در گلومرولهـا و بـه دنبال آن در توبول های کلیوی از اولین منـاطقی هسـتند که در رابطـه بـا تـاثیر گـذاری دیابـت دسـتخوش تغییـر می شوند(۱۸-۱۶). غشای پایه نواحی تخصص یافتـه ای از مادهٔ خارج سلولی(Extra cellular matrix) است که حاوی ترکیبات مختلفی از قبیل پروتئین ها و قندها می باشـند. این ماده معمـولاً از ترکیبـاتی از قبیـل انـواع رشـته هـای کلاژن شامل کلاژن نوع IV و V، لامینـین، فیبـرونکتین و گلیکوز آمینوگلیکانهای سـولفاته و غیـر سـولفاته تشـکیل میشود(۱۹). در بین ترکیبات غشـای پایـه، کـلاژن جـزو فراوان ترین ترکیبات موجود است و از ایـن میـان کـلاژن نوع IV ساختار اصلی ایـن بخـش را ایجـاد مـی نمایـد. از سوی دیگر الیاف کلاژن موجود در غشای پایهٔ کلافه های گلومرولی نقش مهمی در تبادل مـواد بـازی مـی کننـد و حضور آنها در بخش میانی غشای پایـــه که تحت عنوان Lamina densa نامیـده مـی شـود سـبب مـی شـود کـه مولکولهای کوچکتر از منافذ این شبکه عبور نمایند (۲۰).

مطالعات انجام گرفته در این زمینه نشـان داده اسـت که در محیط های هایپرگلوکز سـنتز اجـزای غشـای پایـه افزایش می یابد. افزایش ضخامت غشای پایـه مـی توانـد ناشـی از رسـوب ایمنوگلوبـولین هـا شـامل IgG و IgM و اجزای کمپلمان باشد (۲۱). نشت این مواد از کلافـه هـای گلومرولی از طرفی باعـث رسـوب آنهـا در بافـت مزانژیـال گلومرولها شده و از طرف دیگر مـی توانـد افـزایش سـنتز اجزای غشای پایه از قبیل لامینین، فیبرونکتین و کلاژن را به دنبال داشته باشد(۵،۲۲). تغییرات ایجاد شده در بافـت کلیوی نمونه های دیابت تجربی گویای این واقعیـت اسـت که ابتلای به دیابت میتواند لطمه های جبران ناپذیری بـر کلیه ها وارد نموده و سلامت و عملکرد آنها را به مخـاطره اندازد. با توجه به اینکه یکی از مهمترین عوارض دیابت در انسان بروز نفروپاتی دیابتی است، اینگونه بیمـاران معمـولا به سمت گلومرولواسکلروزیس پیش می روند(۲۳) و زمینهٔ پیـدایش بیمـاران دیـالیزی را فـراهم میکننـد (۲۴،۲۵). بنابراین با توجه بـه نقـش کلیـه هـا در ثابـت نگهداشـتن محیط داخلی بدن، گرفتاری کلیه بـه سـهم خـود موجـب شروع گرفتاریهای وسـیعتری مـی شـود کـه از آن جملـه میتوان به نوروپاتی دیـابتی، رتینوپـاتی(۲۶) و بیماریهـای قلبی عروقـی اشـاره کـرد (۲۷). گرفتـاری سیسـتم قلبـی عروقی اگرچه در بدو ابتلای به دیابت ممکن اسـت تظـاهر ننماید اما بتدریج با افزایش فشار خون و آنژیوپاتی دیـابتی همراه است که بـه عـوارض دیگـری از جملـه انفـارکتوس میوکارد منجر میشود (۲۷). اهمیت موضوع از آنجا ناشـی می شود که بـا شـروع دیابـت، غشـای پایـهٔ گلومرولهـای کلیـــوی بـــه عنـــوان اولـــین منـــاطق متـــاثر از محـــیط هایپرگلیسمیک شروع به تغییر ماهیت می نمایند و زمینهٔ بـروز تغییـرات پاتولوژیـک بعـدی را در مـاتریکس خـارج سلولی فراهم می کنند (۱۸-۱۶).

تغییر در ساختار ماتریکس خارج سلولی به سهم خود به میانکنش هایی می انجامد کـه در وهلـهٔ اول بـه سـنتز پروتئوگلیکانهایی منجر می شـود کـه زمینـهٔ تولیـد انـواع کلاژن را فراهم می آورد (۲۸). بر اسـاس مطالعـات انجـام شده، هر چند که انواع کلاژن در نقاط مختلف بـدن دارای پراکندگی وسیعی می باشند امـا کـلاژن نـوع IV را فقـط می توان در نواحی خاصی از قبیل غشای پایهٔ مربوط بـــه

جدار عروق، لولهٔ 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 بقیهٔ اجزای غشای پایه در مطالعات معمول بافت شناسی وجود ندارد اما با استفاده از تکنیک های ایمونو هیستوشیمیایی 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 العادهٔ 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 پایهٔ 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 هیپرگلیسمی 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 مادهٔ 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 نوبهٔ خود می تواند به افزایش حجم کلافه های گلومرولی و بافت های بینابینی کمک نماید (۳۰،۳۱).

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 درجهٔ رنگ پذیری آن گویای این واقعیت است که تفاوت معنی داری در ضخامت غشای پایهٔ نمونه های دیابتیک۱۶ هفته ای نسبت به گروه ۸ هفته ای و کنترل وجود دارد. بر اساس این یافته ها می توان چنین اذعان کرد که اگرچه در طول ۸ هفتهٔ اول زمینهٔ 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 کنندهٔ 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 colagen 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 diabeties. Pharmaco Res Commun 1998; 20: 201-204 .
10. Anthony SP, Susan NS. Gloucose and

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 Cytochemisry 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, laturnus 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, Stwart LR, Cheek DE, Hurray D, Self SE. IgA antiglomerular 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. I Am Sot 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 nonenzymetic glycosylation of mesengial matrix on proliferation of meangial 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 postglomerular microvesseles in pathophisiology of diabetic nephropathy. Diabetes 1991; 40: 791-795.