

مطالعات الکتروفوریتیک و ایمونوالکتروفوریتیک پروتئین‌های اداری

مطالعه درسی (۳۰) مورد بیماران کلیوی

*** دکتر حبیب‌اله خرسندی * الویرا ریاحی

مقدمه:

پروتئین اوری یکی از علائم اولیه در بیماریهای کلیوی است گرچه این موضوع صحیح بنظر میرسد ولی تعدادی از بیماریهای کلیه قافد پروتئین در ادرار میباشند و یا همراه مقادیر کم از پروتئین در ادرار میباشند. وجود پروتئین در ادرار از زمان بقراط و برایت (Ricard Bright) شناخته شده است و برایت (Bright) گزارشی درباره ماده قابل انعقاد در ادرار توام با آسیت و افزایش رازت خون و نبض سفت و سخت در مبتلایان به بیماریهای کلیه منتشر نموده است پس از آن این مطالعات بدست فراموشی سپرده شد تا اینکه در ۱۹۶۴ Dirks و همکاران (۱) توسط پونکسیون گلومرولی در سگها نشان دادند که در مایع صاف شده گلومرولی البومین بمقدار $2/5 - 5$ میلی گرم درصد یافت میشود متعاقب آن Post در سال ۱۹۶۶ (۵) با روش ایمونوفلورسانس نشان داد که پروتئین اوری فیزیولوژیک شامل البومین و گاماگلوبولین در لوله‌های پروکسی مال انسان و موش هردو دیده میشود بعلاوه Jorgensen (۴) مقدار پروتئین را در مایع صاف شده گلومرولی ۹ میلی گرم درصد تعیین نمود و Harrison با همکاران (۳) البومین مایع صاف شده گلومرولی در حدود ۱ - ۲ میلی گرم درصد تعیین نموده است. بنابراین بین ۵ - ۳۰ میلی گرم پروتئین روزانه در فیلترای گلومرولی دیده میشود. اساساً دو تئوری برای عبور پروتئین‌های خون از راه گلومرولها وجود دارد. یکی تئوری غربالی (Free theory

(و دیگری تئوری نفوذی) Diffusion theory) بطورکلی مکانیسم غربال کردن پروتئین‌ها در گلومرول و جذب مجدد آن از لوله‌های اداری هنوز بدرستی شناخته نشده است و تئوریهای چندی ارائه شده است ولی پروتئین‌های خون از آندوتلیوم و مامبرال بازال گلومرولی یا شکافهائی که بین ۷۰۰ - ۳۰۰۰ آنگستروم در بین سلولهای آن وجود دارد بسهولت فیلتره میشوند. بطور خلاصه هنوز یک اصل شناخته شده واضحی برای دو تئوری یاد شده در بالا وجود ندارد و پروتئین اوری توسط یک یا چند مکانیسم زیر خلاصه میشود:

- ۱- وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت یک درناز (drainage) غیرطبیعی لنفاتیک‌ها یا توسط سلولهای خود کلیه یا مجاری تحتانی اداری باشد.
- ۲- وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت اشباع کلیه از نظر حمل و نقل (transport) پروتئین‌ها باشد یعنی T_m بعضی از پروتئین‌ها افزایش داشته باشد مثل هموگلوبین.
- ۳- وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت ازدیاد غلظت پروتئین‌های پلاسما باشد مثل انفوزیون البومین یا در بعضی از مبتلایان بسرطان برونش (در خون غلظت پروتئین‌های ملکول سبک زیاد شده است).
- ۴- وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت کاهش جذب مجدد پروتئین از لوله‌های اداری باشد ((عیب لوله‌های اداری))
- ۵- بالاخره پروتئین اوری ممکن است بعلت نقض در

* دانشیار دانشکده پزشکی پهلوی - دانشگاه تهران

** کارشناس آزمایشگاه دانشکده پزشکی پهلوی - دانشگاه تهران

توام با بیوسی کلیه بوده است. کلیه این موارد مربوط به بخشهای داخلی و نفرولوژی بوده است. ادرار این بیماران صرفنظر از نوع بیماریشان مورد مطالعه قرار گرفته است. ب- Methods: روش ما مربوط به آزمایشهای پروتئین

اوری در چهار مرحله زیر خلاصه میگردد،

۱- جمع آوری ادرار: برای جلوگیری از تجزیه پروتئینهای ادراری از یک ماده ضد عفونی (Merseptyl) تا تمهول استفاده شده است.

۲- تعیین و تشخیص پروتئین اوری: از روش اسباخ به کمک اسید سبتروپیکریک بعمل آمده است.

۳- تغلیظ ادرار: از آنجائیکه در بیشتر موارد غلظت پروتئینهای ادراری کم و برای الکترو و ایمونوالکتروفورز مناسب نمیشد، لذا اقدام به تغلیظ ادرار بین ده تا پنجاه برابر نمودیم تا غلظت پروتئینهای ادراری در حدود ۶۰ گرم در لیتر باشد. برای این کار از اولترافیلتراسیون روی ممبران Pellicon و تحت فشار ازت در سلولهای میلی پورا انجام شد. (50 P.S.I.)

۴- الکتروفورز و ایمونوالکتروفورز: روی این ادرار تغلیظ یافته ابتدا الکتروفورز بر روی اسات سلولز بروش میلی پور با تامپون و رونا $PH = 8/6$ و ولتاژ ۱۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه بعمل آمد. ایمونوالکتروفورز در $PH = 8/6$ روی ورقه های ژلوز پیش ساخته ((کارخانه میلی پور)) بنام ایمونو-آگار و اسلاید (Immuno-Agaroslide) بعمل آمد و پس از رنگ آمیزی با آمیدوبلاک مورد مطالعه قرار گرفت و از سرم آنتی گلوبولین پلی ولانت نیز استفاده شد. (شکل ۲۰۱)

تقسیم بندی تراسه ها:

تراسه های بدست آمده پس از تطبیق با بیوسی کلیه بسه دسته تقسیم گردید:

۱- پروتئین اوری گلومرولی:

الکتروفورز - البومین بیشتر از ۷۰ درصد

۲ گلوبولین < گلوبولین

گلوبولین منفی یا کمتر از ۵ درصد

ایمونو الکتروفورز: البومین بمقدار زیاد

۲- پروتئین اوری لوله ای:

غشاء مویرگهای گلومرولی باشد که اجازه میدهد تا پروتئینها از آن بمقدار زیاد عبور نمایند.

از تمام علل یاد شده علل شماره ۴ و ۵ از همه بیشتر اتفاق میافتد.

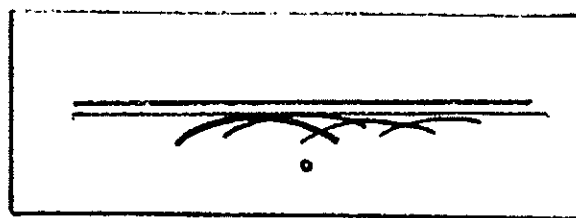
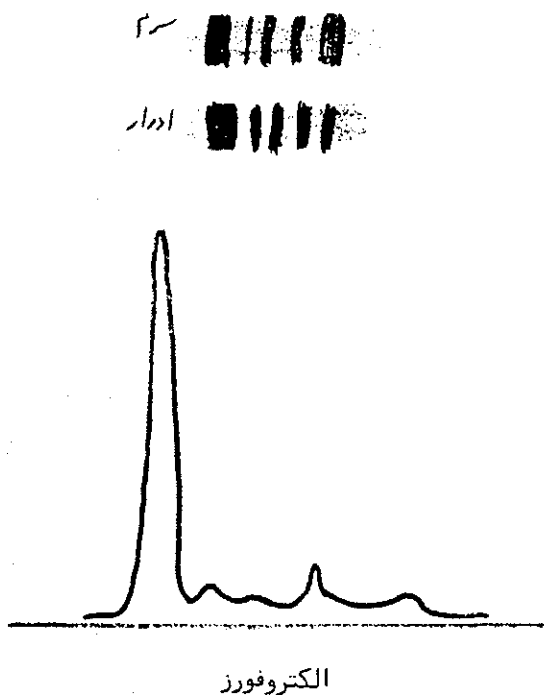
از نظر آسیب شناسی پروتئین اوری را باید بدو دسته بزرگ تقسیم کرد یکی نوع گلومرولی و دیگری نوع لوله ای: الف - نوع گلومرولی: در نتیجه بیماریهای اولیه کلیه و یا بعلت ابتلاء کلیه در بیماریهای سیستمیک اتفاق میافتد که همراه با پروتئینهای سنگین وزن در ادرار میباشد.

ب - نوع لوله ای: که بعلت کاهش جذب مجسدد پروتئینها از لوله های ادراری دیده میشود معمولاً از نوع ملکولهای سبک است مانند سندرم Fanconi، بیماری ویلسون Sarcoidosis، Cystinosiz، فقر پتاسیم، مسمومیت با کادمیوم و اسیدوز کلیوی لوله های ادراری (Renal Tubular Acidosis)، باروشهای الکترو ایمونوالکتروفورز پروتئینهای ادراری همانطور که Revillard، Trager، Manuel (۹) نیز در فرانسه معمول و متداول کردند فراکسیون پروتئین ادراری را جدا نموده و تراسه های بدست آمده راهنمای خوبی جهت دسترسی به تشخیصهای بالینی میباشد.

باید یادآور شد که تمامی پروتئینهای ادراری از نوع پروتئینهای خون نمیشدند بلکه ممکن است از نوع Taum Horsfall باشند که از پروتئینهای مجاری ادراری است و قسمت عمده سیلندرهای ادراری را تشکیل میدهد و بعلاوه در موارد پیوندهای کلیه یا در جریان فیبرینولیزهای داخل عروقی یا ترومبوزها و بالاخره در واکنشهای آنتی ژن، آنتی کور در ادرار مواد حاصل از تجزیه فیبرینوژن هم یافت میگردد. باید متذکر شد که بین ضایعات هیستولژیک کلیه با مقدار پروتئینهای ادرار رابطه ای مستقیم وجود ندارد (۷) مثلاً در نفروز لیپوئیدی که پروتئین اوری پاسو دیده میشود از نظر هیستولژی ضایعات بسیار کم میباشد ولی در کلیه های پلی کبستیک که ضایعات هیستولژیک بسیار است در ادرار پروتئین ناچیز میباشد.

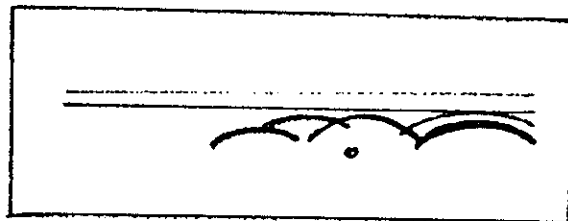
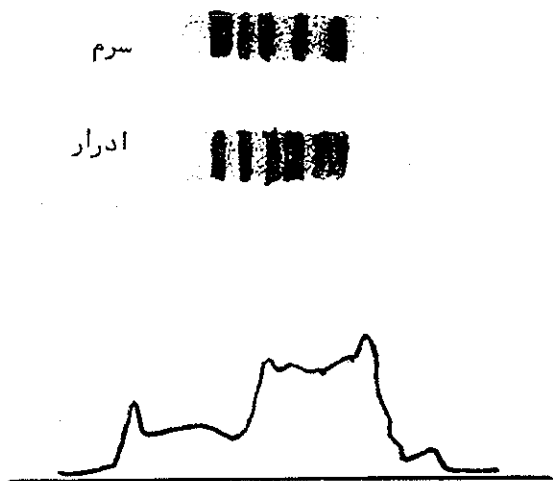
Material and Methods

الف - Material: ما ۳۰ مورد تراسه های مربوط به بیماران را مطالعه نمودیم که از آنها در حدود ۱۸ مورد



ایمونوالکتروفورز

شکل ۱ . تراسه پروتئین اوری گلوبولینی



شکل ۲ . تراسه پروتئین اوری لوله‌ای

الکتروفورز - البومین کمتر از ۳۰ درصد
 $\frac{\text{البومین}}{\text{گلوبولین}}$ کمتر از ۰/۵

ایمونوالکتروفورز: البومین بمقدار کم
 ۳ - پروتئین اوری مخلوط:

مخلوطی از هر دو تراسه

بحث:

از آنجائیکه تعداد تراسه‌ها محدود بوده است نمیتوان نتیجه قاطعی را بیان نمود ولی رویهمرفته از نظر آماری ارزش زیادی از لحاظ نوع نفروپاتی‌ها دارد. نتایج حاصله شباهت زیادی به نتایجی که Revillard (۱۰) با تعداد بیشتری از تراسه‌ها گرفت، دارد. ما انواع پروتئین اوری را در جریان نفروپاتی‌های مختلف شرح میدهم.

بطور کلی پروتئین اوری‌ها را به دسته تقسیم‌بندی نموده و در باره هر کدام بحث مینمائیم.

الف - پروتئین اوری نفروپاتی با ابتلاء گلوبولینی یا (Pre-dominance glomerulaire)

ب - پروتئین اوری نفروپاتی با ابتلاء لوله‌های ادراری

ج - پروتئین اوری‌های علامتی

الف - پروتئین اوری نفروپاتی با ابتلاء گلوبولینی:

۱ - سندرم نفروتیک: در این سندرم اختصاص بودن پروتئین ادراری هیچگونه نسبتی با مقدار پروتئین ادراری ۲۴ ساعت ندارد. پروتئین اوری اختصاصی (Proteinurie Selective) معمولاً در مواردیکه ضایعات آسیب شناسی گلوبولینی ناچیز باشد دیده میشود پیش‌آگهی عارضه با شیمیوتراپی و کورتیکوتراپی بسیار خوب است و بهبودی (Remission) کامل چه از نظر شیمیائی و چه از نظر بیولژیائی دارد.

پروتئین اوری غیر اختصاصی (Proteinurie non-selective) معمولاً همراه ضایعات گلوبولینی وسیع از نوع پرولیفراتیو (Proliferative) است، درمان در این عارضه زیاد موثر نیست و بطرف نارسائی مزمن کلیه پیشرفت می‌نماید.

گرچه با الکتروفورز پروتئین‌های ادرار مانند بیوسی کلیه بصراحت نمیتوان ضایعات آسیب شناسی را تشخیص داد ولی از نتایج حاصله نکات زیر که با آسیب شناسی هماهنگی داشته است میتوان یادآور شد:

در نوع گلوبولینی: با الکتروفورز روی استات سلولز و ایمونوالکتروفورز روی آگاروز ژل میتوان این نوع پروتئین - اوری‌ها که توفق (Predominance) آلبومین دارند بدو دسته تقسیم نمود نوع اختصاصی (Selective) و نوع غیر اختصاصی (Non-selective). در نوع اختصاصی (Selective): مقدار البومین بیشتر از ۷۰ درصد و بقیه را گلوبولین‌ها تشکیل داده‌اند. در نوع غیر اختصاصی (Non-selective): تراسه بدست آمده عیناً شبیه به سرم خون میباشد.

درجات بنیابین ((Intermediaire)) بین اختصاصی، خالص (Tres Selective) و غیر اختصاصی (Non-Selective) نیز دیده میشود که به ترتیب عبارتند از اختصاص نسبی (Relativement Selective) اختصاص متوسط (Moyenno-ment Selective) و اختصاص جزئی (Peu Selective):

در نوع لوله‌ای = مقدار آلبومین کمتر از سی درصد و بقیه از نوع گلوبولین‌ها میباشد.

در نوع مختلط (Mixte) = اجتماعی از هر دو نوع تراسه بالا با برتری یکی بر دیگری.

نتایج آماری

پروتئین اوری گلوبولینی: از این نوع تعداد ۱۷ تراسه بدست آمد که مربوط به ۱۷ نفر بیمار بود از این عده ۱۱ نفر بیوسی کلیه داشتند.

پروتئین اوری لوله‌ای = از این نوع تعداد ۸ تراسه بدست آمد که مربوط به ۸ نفر بیمار بود که از این عده چهار نفر بیوسی کلیه داشتند.

ب - نفروپاتی دیابتی یا سندرم Kimmel Stiel-Wilson
در این نوع تراسه نسبتاً اختصاصی - peu selective میباشد.

ج - نفروپاتی‌های آبستنی و آمیلوز چه در این نوع تراسه از تیپ نسبتاً اختصاصی peu-selective میباشد.

ب - نفروپاتی‌های همراه ضایعات لوله‌ای (Tubulaire)

الف - نوع ضایعات لوله‌ای مادرادی (Tubulo - pathie Congenital) : در این دسته از نفروپاتی‌ها که شامل اسیدوز لوله‌ای (Tubulaire) سندرم لو (Lowe) و سندرم دربره فانکونی (Debre-Fanceni) (میشود تراسه پروتئین اوری از نوع لوله‌ای (Tub- Tubulaire) میباشد ولی از تراسه بدست آمده نوع ضایعات ابتدائی (Proximal) و یا انتهائی (Distal) را نمیتوان تشخیص داد.

ب - نوع اکتسابی: در مرحله اول بیماری تراسه غیر- اختصاصی (Non-selective) ولی هنگامی که دی‌اورز برقرار شد از تیپ لوله‌ای (Tubulaire) میباشد.

نتیجه و خلاصه (Resume) :

مطالعات الکتروایمونولکتروفوریتیک پروتئین اوری آسان و فقط احتیاج به ادرار بیمار دارد "بهمن دلیل میتوان چندین بار تکرار نمود و برعکس بیوسنی کلیه که تکنیک آن سخت و مشکل بوده و تکرار آن مصیبت بار است. گرچه اطلاعاتی که از این راه بدست می‌آید مانند آسیب‌شناسی دقیق نیست ولی راهنمای خوبی برای تشخیص پیش‌آگهی (Pronostic) و درمان بیمار میباشد. الکتروفورز پروتئین‌های ادراری چنانچه با سایر وسائل تشخیص همراه باشد کمک ذیقیمتی برای شناخت بهتر و بیشتر نفروپاتی‌ها است.

تصفیه اختصاصی (Selective de Filtration) = میتواند انواع ضایعات بافت شناسی کلیه را نشان دهد مانند گلومرولونفریت اکسترامامیرانوز، گلومرو- لونفریت برولیفراتیو Proliferative در گلومرونونفریت پرولیفراتیو که دارای انواع آندو- کاپیلر، اکستراکاپیلر انتراکاپیلر که گاه همراه ضایعات مامبران میباشد و بآن مامبرانو پرولیفراتیو (Intercapillaira) نیز اطلاق میگردد نمیتوان از راه الکتروفورز تیپهای مختلف هیستولوژیک را تعیین نمود. اما هنگامی که اختصاصی بودن (Selectivite) پروتئین‌ها خوب باشد از نظر پیش‌آگهی خوب و هنگامی که اختصاصی بودن پروتئین (Selective) خوب نباشد از نظر پیشرفت بطرف از زمان سیر میکند.

۲ - گلومرولونفریتها:

الف - نوع حاد: در مرحله حاد تراسه پروتئین اوری غیر- اختصاصی (non-selective) میباشد و چنانچه رو به بهبود گذارد تراسه پروتئین اوری اختصاصی (selective) میشود و تکرار این آزمایش امکان پیش‌بینی برای عود بیماری با بهبود کامل را میسر میسازد.

ب - نوع نیمه حاد: در این شکل که معمولاً "بطرف نارسائی کلیه پیش میرود از همان ابتدای ابتلاء تراسه پروتئین اوری غیر اختصاصی (non-selective) میباشد.

ج - نوع مزمن: که همراه نارسائی کلیه و گاه فشارخون میباشد نمیتوان تراسه خاصی را از نظر اختصاصی بودن (selectivite) پروتئین اوری ارائه کرد و بیشتر از تیپ مخلوط (Mixte) میباشد.

۳ - نفروپاتی گلومرولی ثانوی بر بیماریهای سیستمیک

الف - نفروپاتی لوپوس ارتیماتو - در این نوع تراسه پروتئین اوری غیر اختصاصی یا نسبتاً اختصاصی (Peu ou non-selective) میباشد. (۹ و ۱۰)

References

1. Dirks, J.H., Clapp, J.R., and Berliner, R.W.: The protein cocentration in the proximal tubules of the dog. *J. Cl. Invest.* 43: 916 (1964)
2. Hardwicke, J., Hulme, B., Jones, J.H., and Rickets, C.R.: Measurement of glomerular permeability to polydisperse radioactivity labelled macro-molecules in normal rabbits. *Clin. Sci.*, 34: 505-514 (1968).
3. Harrison, J.F., Blainy, J.D., Hardwicke, J., Rowe, D.S. and Soothill, J.F.: Proteinuria in multiple myeloma. *Clin. Se.* 31: 95-110 (1966).
4. Jorgensen, M.B.: A gel filtration method for the determination of portein in normal urin. *Acta Med. Scand.* 181: 153-162 (1967).
5. Post, R.S.: The distribution of nomral serum proteins within rat and human renal tubule cytoplasm as demonstrated by immuno-florescence *J. Lab. Clin. Med.* 67: 189 (1966).
6. Stterman, R.L. and Becker, E.L.: Alpha-2 macroglobulin and slectivity of protein in excretion. *Nephron* 8: 255 (1971).
7. Robinson R.R. Clinical significance of proteinuria in asymptomatic patints. *Proct. 5th. Int. Congr. Nephrol, Mexico, Icee, Vol. 3, pp. 27-33.*
8. Gaillard L., Salle B., Manuel Y., Delphin D. 1969. Interet de l'association systematique ponction biopsie renal electrophorese urinaire (proteines dans l'tude des nephrites et proteinurie de l'enfant. *Ann. Ped.* 16, 10, 615-623.
9. Manuel, Y., Revillard, J.P. Retyek H., 1970-Proteins in normal and pathological urin. Vol. Karger, Basel.
10. Revillard J.P. 1964- Les proteinurie aux cour des maladies renale, etude de 750 cas par electrophorese en gel d'amidon et immuno-electrophorese These, Med. Lyon. Catheron Imp.