مجله دانشکده پزشکی تهران

شماره نهم و دهم ــ خرداد ، تیر ــ ۲۵۳۶ ــ صفحه ۲۶۶

# مطالعات الکتروفورتیک و ایمونوالکتروفورتیک 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 تعدادی‌از بیماریهای کلیه قاقد 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 ازت 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 ۲/۵ ــ ۵ میلی‌گرم درصد یافت میشود متعاقب آن Post در سال ۱۹۶۶ (۵) با روش ایمونوفلورسانس نشان داد که پروتئین اوری فیزیولژیک شامل البومین و گاماگلوبولین در لوله‌های پروکسی مال‌انسان و موش هردو دیده میشود بعلاوه Jorgensen (۴) مقدار پروتئین را در مایع صاف شده گلومرولی ۹ میلی‌گرم درصد تعیین نمود و Harrisson با همکاران (۳) البومین مایع صاف شده گلومرولی در حدود ۱ ــ ۲ میلی‌گرم درصد تعیین نموده است. بنابراین بین ۵ ــ ۳۰ میلی‌گرم پروتئین روزانه در فیلترای گلومرولی دیده میشود .

اساسا" 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 ادراری هنوز بدرستی شناخته نشده است و تئوریهای چندی ارائه شده است ولی پروتئین‌های خون از آندوتلیوم و مامبرال بازال گلومرولی با شکافهائی که بین ۷۰۰ ــ 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 ــ وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت یک درناژ ( drainage ) غیرطبیعی لنفاتیک‌ها یا توسط سلولهای خود کلیه یا مجاری تحتانی ادراری باشد .

۲ ــ وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت اشباع کلیه از نظر حمل و نقل ( transport ) پروتئین‌ها باشد یعنی Tm بعضی از پروتئین‌ها افزایش داشته باشد مثل هموگلوبین .

۳ ــ وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت ازدیاد غلظت پروتئین‌های پلاسما باشد مثل انفوزیون البومین یادر بعضی از مبتلایان بسرطان برونش (درخون غلظت پروتئین‌های ملکول سبک زیاد شده است) .

۴ ــ وجود پروتئین در ادرار ممکن است بعلت کاهش جذب مجدد پروتئین از لوله‌های ادراری باشد ((عیب لوله‌های ادراری))

۵ ــ بالاخره پروتئین اوری ممکن است بعلت نقض در

* دانشیار دانشکده پزشکی پهلوی ــ دانشگاه تهران

** کارشناس آزمایشگاه دانشکده پزشکی پهلوی ــ دانشگاه تهران

[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19 ]

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 لوله‌ای:

الف ــ 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 ــ نوع لوله‌ای: که بعلت کاهش جذب مجدد پروتئین‌ها از لوله‌های ادراری دیده میشود معمولاً" از نوع ملکولهای سبک است مانند سندرم Fanconi ، بیماری ویلسون Cystinosiz ، Sarcoidosis ، فقر پطاسیم ، مسمومیت با کادمیوم و اسیدوز کلیوی لوله‌های ادراری ( Renal Tubular Acidosis ) . باروشهای الکترو ایمونولاکتروفورز پروتئین‌های ادرای همانطور که Manuel ، Trager ، Revillard (۹) نیز در فرانسه معمول و متداول کردند فراکسیون پروتئین ادراری را جدا نموده و تراسه‌های بدست آمده راهنمای خوبی جهت دسترسی به تشخیصهای بالینی میباشد.

باید یادآور شد که تمامی پروتئین‌های ادراری از نوع پروتئین‌های خون نمیباشند 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 آنتی‌ژن، آنتی کور در ادرار مواد حاصل از تجزیه فیبرینوژن هم یافت‌میگردد. باید متذکر شد که بین ضایعات هیستولژیک کلیه با مقدار پروتئین‌های ادرار رابطه‌ای مستقیم وجود ندارد (۷) مثلاً" در نفروز لیپوئیدی که پروتئین اوری پاسبو دیده میشود از نظر هیستولژی ضایعات بسیار کم میباشد ولی در کلیه‌های پلی کیستیک که ضایعات هیستولژیک بسیار است در ادرار پروتئین ناچیز میباشد.

## Material and Methods

الف ــ Material : ما ۳۰ مورد تراسه‌های مربوط به بیماران را مطالعه نمودیم که از آنها در حدود ۱۸ مورد توام با بیوپسی کلیه بوده است. کلیه این موارد مربوط به بخشهای داخلی و نفرولژی بوده است. ادرار این بیماران صرفنظر از نوع بیماریشان مورد مطالعه قرار گرفته است.

ب ــ Methods : روش ما مربوط به‌آزمایشهای پروتئین اوری در چهار مرحله زیر خلاصه میگردد،

۱ ــ جمع‌آوری ادرار: برای جلوگیری از تجزیه پروتئین‌های ادراری از یک ماده ضد عفونی (( Merseptyl )) استفاده شده است.

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

۳ ــ تغلیظ ادرار: از آنجائیکه در بیشتر موارد غلظت پروتئین‌های ادراری کم و برای الکترو و ایمونوالکتروفورز مناسب نمیباشد، 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 میلی‌پور انجام شد. ( 50 P.S.I. )

۴ ــ الکتروفورز و ایمونوالکتروفورز: روی این ادرار تغلیظ یافته ابتدا الکتروفورز بر روی استات سلولز بروش میلی‌پور با تامپون و رونال PH = ۸/۶ و ولتاژ ۱۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه بعمل آمد. ایمونوالکتروفورز در PH = ۸/۶ روی ورقه‌های ژلوز پیش ساخته ((کارخانه میلی‌پور)) بنام ایمونو-آگار و اسلاید ( Immuno-Agaroslide ) بعمل آمد و پس از رنگ‌آمیزی با آمیدوبلاک مورد مطالعه قرار گرفت و از سرم آنتی گلوبولین پلی ولانت نیز استفاده شد. (شکل ۲۰۱)

## تقسیم‌بندی تراسه‌ها:

تراسه‌های بدست آمده پس از تطبیق با بیوپسی کلیه بسه دسته تقسیم گردید:

۱ ــ پروتئین اوری گلومرولی:

الکتروفورز ــ البومین بیشتر از ۷۰ درصد

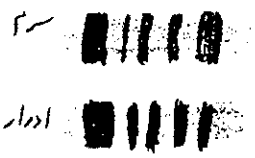
گلوبولین $\alpha_2$ < گلوبولین $\alpha_1$

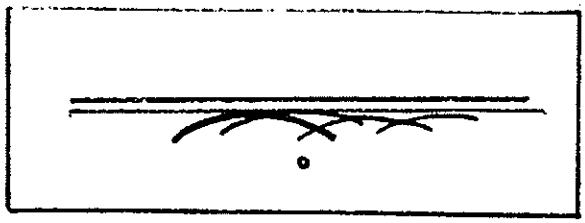
گلوبولین منفی یا کمتر از ۵ درصد

ایمونو الکتروفورز: البومین بمقدار زیاد

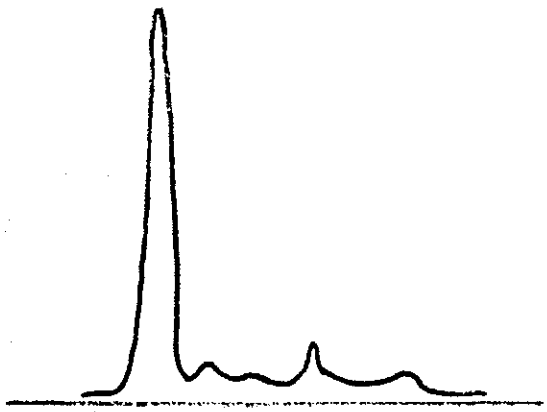
۲ ــ پروتئین اوری لوله‌ای:

[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19 ]



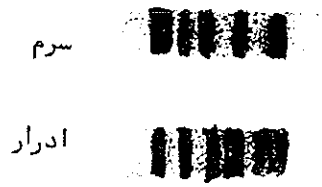



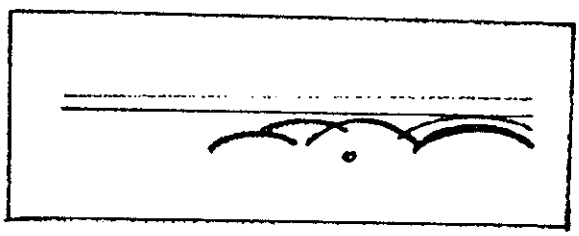
ایمونوالکتروفورز

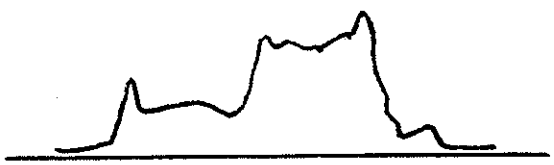


الکتروفورز

شکل . ۱ . تراسه پروتئین اوری گلومرولی





شکل . ۲ . تراسه پروتئین اوری لوله‌ای

[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19 ]

الکتروفورز ــ البومین کمتر از ۳۰ درصد
البومین / گلوبولین کمتر از ۰/۵

ایمونوالکتروفورز: البومین بمقدار کم
۳ ــ پروتئین اوری مخلوط:
مخلوطی از هر دو تراسه

در نوع گلومرولی: با الکتروفورز روی استات سلولز و ایمونو الکتروفورز روی آگاروژل میتوان این نوع پروتئین ــ اوری‌ها که توفق ( Predominance ) آلبومین دارند بدو دسته تقسیم نمودنوع اختصاصی ( Selective )ونوع غیر اختصاصی ( Non-selective )

در نوع اختصاصی ( Selective ): مقدارالبومین بیشتر از ۷۰ درصد و بقیه را گلوبولین‌ها تشکیل داده‌اند.

در نوع غیر اختصاصی ( Non-slective ): تراسه بدست آمده عینا" شبیه به سرم خون میباشد.

درجات بینابین (( Intermediaire )) بین اختصاصی، خالص ( Tres Selective ) و غیر اختصاصی ( Non-Selective ) نیز دیده میشود که به ترتیب عبارتند از اختصاص نسبی ( Relativement Selective ) اختصاصی 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 دونوع تراسه بالا با برتری یکی بر دیگری.

## نتایج آماری

پروتئین‌اوری گلومرولی: ازاین‌نوع تعداد ۱۷ تراسه بدست آمد که مربوط به ۱۷ نفر بیمار بود از این عده ۱۱ نفر بیوبسی 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 بیوبسی کلیه داشتند.

پروتئین اوری مخلوط = از این نوع تعداد ۵ تراسه بدست آمد که مربوط به ۵ نفر بیمار بود از این عده ۲ نفر بیوبسی کلیه داشتند.

## بحث:

از آنجائیکه تعداد تراسه‌ها محدود بوده است نمیتوان نتیجه قاطعی را بیان نمود ولی رویهمرفته از نظرآماری 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 میدهیم.

بطورکلی پروتئین اوری‌ها را بسه دسته تقسیم‌بندی نموده و در باره هرکدام بحث مینمائیم.

الف ــ پروتئین‌اوری نفروپاتی با ابتلاء گلومرولی یا ( Pre-dominance glomerulaire )

ب ــ پروتئین اوری نفروپاتی یا ابتلاء لوله‌های ادراری

ج ــ پروتئین اوری‌های علامتی

الف ــ پروتئین اوری نفروپاتی با ابتلاء گلومرولی:

۱ ــ سندرم نفروتیک: در این سندرم اختصاص بودن پروتئین ادراری هیچگونه نسبتی با مقدار پروتئین ادراری ۲۴ ساعت ندارد. پروتئین اوری اختصاصی ( Proteinurie Selective )معمولا" در مواردیکه ضایعات آسیب شناسی گلومرولی 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.

پروتئین‌اوری غیر اختصاصی ( Proteiurie non-selective ) = معمولا" همراه ضایعات گلومرولی 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 بیوبسی 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:

[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19 ]

تصفیه اختصاصی ( Selective de Filtration ) = میتواند انواع ضایعات بافت شناسی کلیه را نشان دهد مانند گلومرولونفریت اکستراماميرانوز ، گلومرو ــ لونفریت برولیفراتیو Proliferative

در گلورمرونونفریت پرولیفراتیو که دارای انواع آندو ــ کاپیلر ، اکستراکاپیلر انتراکاپیلر که گاه همراه ضایعات مامبران میباشد و بآن مامبرانو پرولیفراتیو ( Intercapillaira ) نیز اطلاق میگردد نمیتوان از راه الکتروفورز تیپهای مختلف هیستولژیک 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 ا زمان سیر میکند .

**۲ ــ گلومرولونفریتها :**

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

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

ج ــ 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 ــ نفروپاتی گلومرولی ثانوی بر بیماریهای سیستمیک**

الف ــ نفروپاتی لوپوس ارتیماتو ــ دراین نوع تراسه پروتئین اوری غیر اختصاصی یا نسبتا" اختصاصی ( Peu ou non-selective ) میباشد . (۹ و ۱۰)

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

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

**ب ــ نفروپاتی‌های همراه ضایعات لوله‌ای ( Tubulaire )**

الف ــ نوع ضایعات لوله‌ای مادزادی ( Tubulo ــ 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 نیمتوان تشخیص داد .

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

**نتیجه و خلاصه ( Resume ) :**

مطالعات الکترو ایمونولاکتروفورتیک پروتئین اوری آسان و فقط احتیاج به ادرار بیمار دارد "بهمین دلیل میتوان چندین بار تکرار نمود و برعکس بیوپسی کلیه که تکنیک آن 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 .

[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19 ]

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 macromolecules 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 pathalogical urin. Vol. Kargerd, 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.


[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-19 ]