بررسی پروتئین‌های ادراری در بیماری دیابت به روش ژل‌الکتروفورز

دکتر ملیحه عباسعلی‌پورکبیره* دکتر فریده جلیلیان**

خلاصه :

پروتئین‌ها که از ترکیبات مهم بدن می‌باشند همیشه مورد توجه دانشمندان و محققین قرار داشته است. بررسی آنها ابتدا در خون انجام گرفته اما با توجه به اینکه کلیه‌ها از ارگانهای تصفیه کننده بدن می‌باشند بنابراین می‌توان گفت که این ترکیبات به نحوی در ادرار راه پیدا می‌کنند.

تکنیک‌های مختلفی برای جداسازی پروتئین‌ها در ادرار که به مقدار ناچیز در حالت طبیعی وجود دارد ارائه شده است و در تمام این تکنیک تعداد پروتئین‌های جدا شده متفاوت بوده است. تکنیک بکار گرفته شده در این تحقیق روش الکتروفورز با ژل اکریلامید می‌باشد که بسیار حساس است. دو نوع الکتروفورز مورد مطالعه بوده است:

۱) روش تغییر یافته لاملی (Lammlie) با مدل قالب لوله‌ای

۲) روش ژل‌گرادیان غلظت با متداوفارل (O'farrel) مدل قالب صفحه‌ای.

طبق تجربیات حاصله استفاده از قالب صفحه با ژل گرادیان غلظت نتایج بهتری در این مورد داشته است. در مطالعات انجام یافته مهمترین پروتئین موجود در ادرار آلبومین و یوروموکوئید Uromucoid ذکر شده است که میزان یوروموکوئید را بیشتر از آلبومین ذکر کرده‌اند. این پروتئین در رابطه با تشکیل سنگها و کست‌های کلیوی Cast مورد توجه قرار گرفته شده است.

در تحقیق انجام یافته در مورد بیماران دیابتیک میزان آلبومین بیش از سایر پروتئین‌ها بوده است و براساس آن بیماران دیابتیک به سه گروه تقسیم شده‌اند.

۱ - گروه اول بیماران کم سن که مدت بیماری کوتاهتری داشته‌اند و میزان آلبومین آنها در حد طبیعی بوده است.

۲ - گروه دوم میزان دفع آلبومین کمتر از حد طبیعی داشته‌اند اما به علت افزایش دفع پروتئین‌های با وزن ملکولی کمتر از آلبومین Low molecular, weight protein و یا به اختصار LMW احتمالاً پروتئین اوری توبولار داشته‌اند.

۳ - گروه سوم میزان دفع آلبومین را بیش از حد طبیعی نشان داده‌اند این بیماران سن بالائی داشته و طول مدت بیماریشان بین ۲۰-۴ سال بوده است. طول زیاد مدت بیماری در این بیماران نارسائی کلیوی ایجاد کرده است.

مقدمه :

ادرار مایعی است که توسط کلیه‌ها از خون جدا می‌گردد. در شخص بالغ میزان ادرار در مدت ۲۴ ساعت ۱۶۰۰ - ۶۰۰ میلی‌لیتر است. بطور طبیعی همراه با ادرار املاح و ترکیبات ازت‌داری که در مراحل نهائی متابولیسم حاصل شده‌اند به خارج از بدن انتقال پیدا می‌کنند. اما ترکیبات غیرطبیعی در ادرار شامل گلوسیدها، پروتئین‌ها، خون و ترکیبات کتونی می‌باشند که برای جستجو و تعیین

* - گروه آموزشی علوم‌پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
** - گروه آموزشی بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی‌تهران، تهران - ایران.

مقدار این مواد روش‌های مختلف شیمیائی در آزمایشگاه وجود دارد. البته این نکته قابل ذکر است که در حالت طبیعی پروتئین به میزان ۰/۲-۰ گرم در ادرار ۲۴ ساعته وجود دارد که قسمت اعظم آن را آلبومین و بقیه را پروتئینی به نام یوروموکوئید Uromucoid یا تام‌هورس‌فال Tommhors & fall تشکیل می‌دهد (۱۵) افزایش بیش از حد طبیعی پروتئین در ادرار ایجاد پروتئین اوری Protein Uria می‌کند.

در یک مطالعه که روی ۱۰۰۱ بیمار دیابتیک انجام گرفت بیماران به دو گروه مبتلا به پروتئین اوری و غیر مبتلا به پروتئین اوری تقسیم شدند. علل متعددی برای مرگ و میر این دسته از بیماران وجود داشت. در مبتلایان به پروتئین اوری شدید اورمی Uremia علت اصلی مرگ بود (۱۱ و ۱۲).

علت مرگ بیمارانی که پروتئین اوری نداشتند ناراحتی‌های قلبی و عروقی ذکر شده است (۸). مرگ و میر در بین خانمهای جوان دیابتیک مبتلا به پروتئین اوری بیشتر بوده و کتواسیدوز فاکتور مخصوص این گروه بوده است و با افزایش سن، میزان مرگ و میر کاهش یافته است. مقدار متوسط زمان زنده بودن پس از شروع پروتئین اوری ۸-۷ سال ذکر گردیده است (۵).

دکتر J.J.Bending و همکاران بیماری کلیه را در ۱۲ بیمار دیابتیک که حداقل ۱۰ سال مبتلا به دیابت بودند مورد بررسی قرار دادند. بدلیل فرسوده شدن گلومرول‌ها این بیماران پروتئین اوری کلینیکال متناوب داشتند که به سه گروه تقسیم شدند (۶).

در گروه اول میزان دفع آلبومین طبیعی بود (12ug/min)

در گروه دوم میکروآلبومینوری دیده شد (12-100 ug/min)

در گروه سوم دفع آلبومین به میزان بیش از ۲۰۰ میکروگرم در دقیقه 200 ug/min بوده است (۶).

به خوبی ثابت شده است که کنترل متابولیکی، افزایش غیر طبیعی فیلتراسیون گلومرولی را در افرادی که دیابت وابسته به انسولین IDDM همراه با آلبومینوری دارند کاهش می‌یابند (۱۶ و ۲۰).

براساس این مطالعه افزایش اسیدهای چرب اشباع نشده (Poly unsaturated fatty acid) (PUSFA) در غذای این بیماران فاکتور پائین آورنده فشار خون است و بیماران دیابتیکی که از افزایش فشار خون و ناراحتی کلیه رنج می‌برند جایگزینی اسیدهای چرب مذکور و رژیم غذائی مناسب بوده و نقش مؤثری در پائین آوردن فشار خون داشته است.

علت اصلی مرگ در دو نوع دیابت وابسته به انسولین و غیر وابسته به انسولین نفروپاتی دیابتیک است. نفروپاتی زمانی مهم است که میزان دفع پروتئین اوری بیش از 500 mg در روز باشد (ادرار ۲۴ ساعته) (۱۰). در ۲۶۱ نفر از بیماران دیابتیک مبتلا به نفروپاتی کلینکال، پروتئین اوری مطالعه شد و مشخص شد که اندازه‌گیری غلظت آلبومین و یا نسبت $\frac{\text{آلبومین}}{\text{کراتینین}}$ در اولین نمونه ادرار صبح می‌تواند آلبومینوری جزئی را پیشگوئی کند. دفع آلبومین به میزان ۳۰ میکروگرم در دقیقه (30 ug/min) مقدار بحرانی است که می‌تواند در افراد دیابتیک ابتلای آنها را به نفروپاتی آینده پیش‌بینی نماید (۱۹).

برای تشخیص سریع ناراحتی گلومرول در دیابت، اندازه‌گیری میکروترانسقرین نسبت به میکروآلبومینوری شاخص حساس‌تری است (۷).

به طور کلی بررسی پروتئین اوری در بیماران به دو روش کیفی و کمی انجام می‌گیرد. در روش کیفی از

نوارهای کاغذی مخصوصی به نام دیپ‌استیک Dip stick و همچنین از متد فولین‌سیوکالتو Folin cio calteu می‌توان استفاده کرد (۳). در روش Dip stick با تغییر رنگ نوار می‌توان بوجود پروتئین پی برد.

روش فولین‌سیوکالتو (۳) بدین ترتیب است که : محلول‌هایی که دارای حلقه فنولی هستند در مجاورت محلول‌های اکسیدکننده نظیر اسید فسفوتنگستومولیبدیک Phosphotungstomolybdic acid در محیط قلیائی اکسید شده ایجاد کمپلکس رنگی می‌نماید که شدت رنگ بستگی به تعداد حلقه‌های فنلی و در حقیقت غلظت آن دارد. در واقع کلیه پروتئین‌های دارای آمینواسیدتیروزین دارای حلقه فنلی هستند و به همین جهت می‌توان واکنش بالا را برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین نیز بکار برد.

گروه‌های اندول و اایمیدازول که در تریپتوفان Tryptophane و هیستیدین Histidine وجود دارند در این واکنش شرکت می‌کنند. تعداد تیروزین، ترتیپتوفان و هیستیدین در پروتئین‌های مختلف متفاوت است مثل کلاژنها در ژلاتین که تعداد تریپتوفان و تیروزین آنها کم بوده و برعکس در آلبومین و گاماگلوبولین‌ها تعداد این آمینواسیدها بیشتر است بنابراین دقت این روش در اندازه‌گیری کمی از بیوره کمتر است.

روش‌های کمی دیگری نیز وجود دارد که می‌توان مقدار پروتئین را در ادرار اندازه‌گیری نمود. برای این منظور از روش لوری (O.H. Lawry) (۱۴) و اسباخ (۱) با دستگاه اسباخ نیز می‌توان استفاده نمود.

در بعضی از بیماریها پروتئین‌های مخصوصی در ادرار وجود دارد که تشخیص آنها مشکل است در نتیجه باید از روش‌های حساسی که بتوان کمترین مقدار پروتئین را با آن مشخص نمود استفاده کرد. یکی از این روش‌ها استفاده از روش الکتروفورز با ژل پلی‌اکریلامید همراه با سدیم دودسیل‌سولفات (Sodum dodecyl sulfate-polycarylamid gell electrophordsis) و یا باختصار SDS-PAGE (۹) است.

در این تحقیق میزان پروتئین‌های دفع شده در بیماران دیابتی با استفاده از روش فوق بصورت ژل صفحه‌ای و گرادیان غلظت مورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج حاصله نشان می‌دهد که بیماری دیابت استفاده از الکتروفورز برای ادرار می‌تواند در تشخیص بیماری و عوارض ناشی از آن مؤثر و مفید باشد.

۱ - مواد شیمیائی لازم : سولفات مس دارای ۵ ملکول آب، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم - کربنات سدیم، سود، سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin) معرف فولین‌سیوکالتو،فسفوتنگستات و فسفومرلیبدیک، تریس‌هیدروکلراید از شرکت سیگما Sigma اسیدکلریدریک، اکریلامید، متیلن‌بیس‌اکریلامید، آمونیم پر فسفات، سدیم‌دودسیل‌سولفات یا SDS، تمد .N.N.N.N تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین و یا باختصار TMED پودر اوره، سوکروز، مرکاپتواتانول، برموفنل‌بلو، اسیداستیک، اتانول و گلسین از شرکت مرک Merk، آبی‌کوماس R250، R50 از شرکت گریفین Griffin

۲ - دستگاه‌هایی که مورد استفاده قرار گرفته‌اند :

- دستگاه الکتروفورزژل لوله‌ای - دستگاه الکتروفورزژل صفحه‌ای - دستگاه تشکیل‌دهنده ژل گرادیان (Gradient gell former) ساخت کارخانه .L.K.B آلمان. دستگاه تخلیه برای تغلیظ نمونه‌ها که در آزمایشگاه ساخته شد. کیسه دیالیزازسیگما (Produce Sigma 2272) = number دستگاه دانسیتومتری واسکن ژلها، سرنگ هامیلتون، دستگاه pH متر الکتریکی.

مواد و روش کار :

۱ - آماده کردن نمونه (۲) : بدلیل ناچیز بودن پروتئین در ادرار، قبل از انجام عمل الکتروفورز باید نمونه‌های ادراری تغلیظ شوند. ما برای انجام عمل تغلیظ از روش کیسه دیالیز و دستگاه تخلیه استفاده کردیم. با این روش نمونه‌ها را صد مرتبه تغلیظ نمودیم (۲ و ۴).

۲ - تعیین مقدار پروتئین مجهول به روش لوری Lowry (۱) و (۱۴) حساسیت این روش تا ۲۰۰ میکروگرم پروتئین در مایعات بیولوژیک است و بنابراین بهترین روش جهت اندازه گیری پروتئین در مایعات مذکور مانند مایع مغزی نخاعی و ادرار طبیعی است.

برای رسم منحنی استاندارد میزان چگالی نوری Optical Dencity و یا به اختصار OD_{λ} را در محلول‌های استاندارد دارای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکروگرم پروتئین در ادرار را مقابل محلول شاهد در طول موج ۷۵۰ فوتومتر قرائت کرده و از محل برخورد نقاط مربوط به چگالی نوری و غلظت محلول‌های استاندارد، منحنی استاندارد را به دست آوریم. پس از رسم منحنی استاندارد غلظت پروتئین محلول‌های مجهول را در ۱۰ میکرولیتر بدست آوردیم.

الکتروفورز :

الکتروفورز عبارت است از حرکت یک جسم باردار در میدان الکتریکی در pH معین، حرکت در این میدان به عوامل زیر بستگی دارد. بار جسم، اندازه و شکل جسم، شدت جریان، pH محیط و ساختمان Supporting medium.

در روش الکتروفورز نوع ژل پلی‌اکریلامید Poly acrylamid gel electrop horesis پروتئین‌ها نه تنها براساس بارشان بلکه براساس اندازه ملکول‌هایشان اندازه‌گیری شده و به شکل دیسک‌هائی روی ژل ظاهر می‌شوند. ما در این تحقیق روش SDS-PAGE را به دو صورت لوله‌ای و همچنین صفحه‌ای با گرادیان غلظت انجام دادیم.

الکتروفورز به روش لوله‌ای :

در روش الکتروفورز لوله‌ای از متد Lammlie (۱۳) استفاده شد این روش که برای جدا کردن پروتئین‌های ادرار بسیار حساس است به منظور جداسازی بهتر تغییراتی روی آن انجام شد.

بدین‌ترتیب که در تهیه با فرژل جدا کننده Resolving gel و ژل متراکم کننده Stacking gel از اوره ۴ مولار و برای باقی نمونه از اوره ۸ مولار استفاده شد. ژل اکریلامیدی که در تحقیق فوق بکار رفت اکریلامید ۱۵٪ بوده (۲). مدت زمان الکتروفورز ۷ ساعت با جریان ثابت Constant current و ۳ میلی آمپر به ازای هر لوله ژل بود.

الکتروفورز صفحه‌ای به صورت ژل گرادیان غلظت (۱۶) : الکتروفورز گرادیان غلظت باعث تفکیک زیاد زیر واحدهای پروتئین با دامنه وسیع وزن ملکولی می‌شود. به علت دامنه وسیع سوراخهای موجود در ژل نمونه‌ای که دارای اجزاء با وزن ملکولی مختلف می‌باشد به خوبی تفکیک می‌شود. انجام الکتروفورز براساس متد O'farrell و غلظت ۲۲/۵-۱۰ درصد اکریلامیدوژل مدل قالب صفحه‌ای بوده زمان الکتروفورز ۵ ساعت با درجه حرارت ۱۰ درجه سانتیگراد و جریان ثابت ۶۰ میلی‌آمپر و ضخامت ژل ۱/۵ میلی‌متر بود.

رنگ آمیزی ژلها : برای رنگ‌آمیزی (۱۳) و تثبیت پروتئین‌ها بر روی ژلها ازروش آندرسن (A.R. Anderson) (۵). همراه با کوماسی‌بلو استفاده شد. در مرحله شستشوی ژلها (رنگ‌بری) از محلول اتانول و

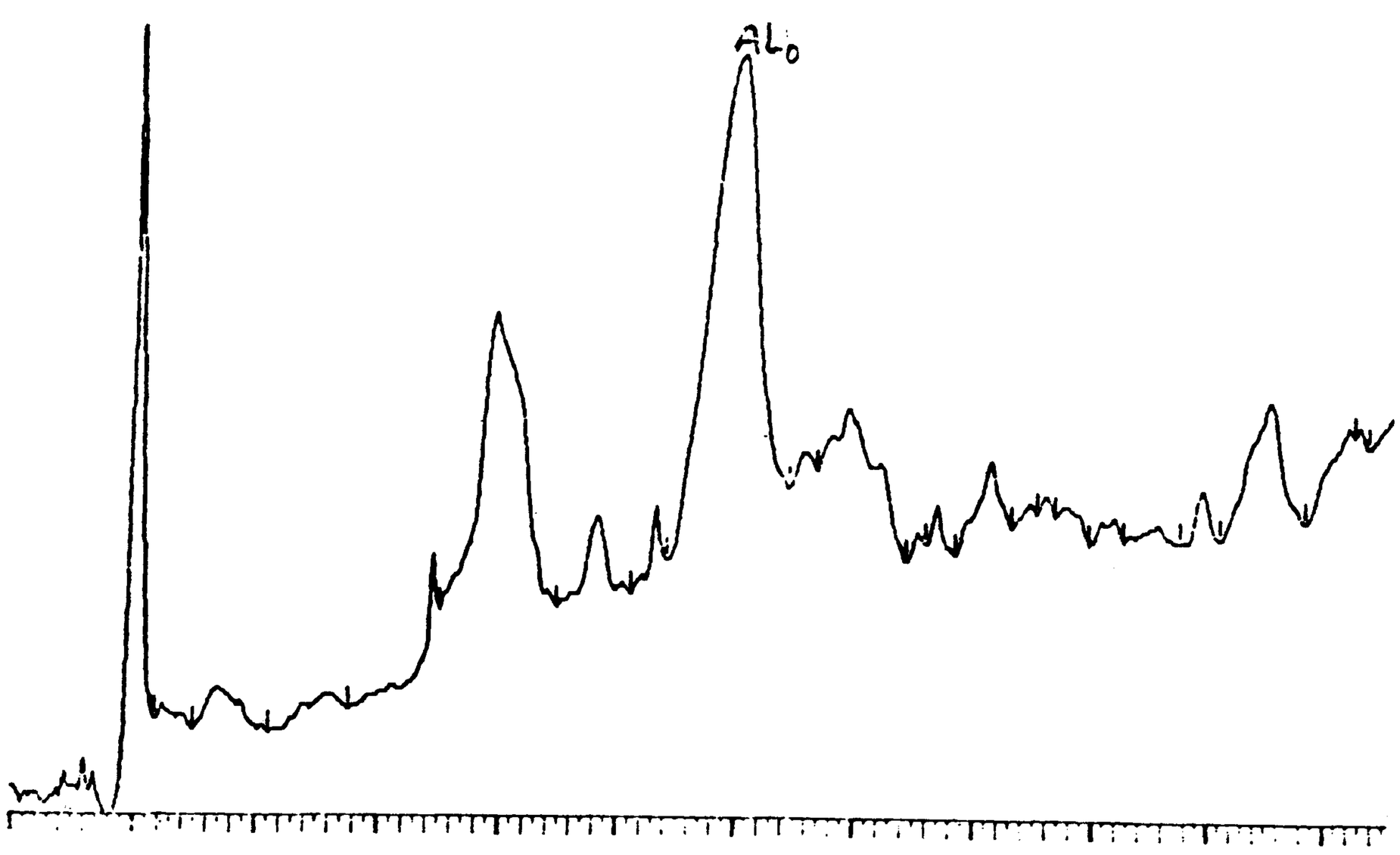
اسیداستیک استفاده نمودیم.

مرحله اسکن نمونه‌ها : به منظور مشخص کردن تعداد باندهای موجود در روی ژل‌ها آن‌ها را به دستگاه دانسیتومتر ویژه قرائت چگالی نوری بر روی ژل منتقل نموده و باندها را در طول موج ۵۹۵ نانومتر اسکن نمودیم. در منحنی‌های حاصله هر یک از قله‌ها Peack مربوطه یک باند پروتئینی بر روی ژل است.

نتایج :

در این مطالعه تعداد ۳۵ بیمار دیابتی بین سنین ۸۰-۱۵ ساله که در بخش اندوکرینولوژی بیمارستان امام خمینی بستری شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. هدف از این تحقیق بررسی پروتئین اوری Proleinouria در این دسته از بیماران بوده است. به این منظور از تمامی این افراد ادرار ۲۴ ساعته جمع‌آوری گردید و پس از دیالیز و تغلیظ در فریزر نگهداری شدند. همانطور که قبلاً شرح داده شد الکتروفورز (SDS-PAGE) نمونه‌ها به دو روش لوله‌ای و گرادیان غلظت به شکل صفحه‌ای انجام شد.

در روش اول که از ژل همگن (Hemogenous) استفاده شد تعداد باندهای بدست آمده کمتر از روش دوم بوده بهمین دلیل تفسیر آزمایشات ما بیشتر بر مبنای نتایج حاصله از روش دوم می‌باشد زیرا استفاده از گرادیان غلظت باعث تفکیک بیشتر زیر واحدهای پروتئینی با دامنه وسیع وزن مولکولی می‌شود.



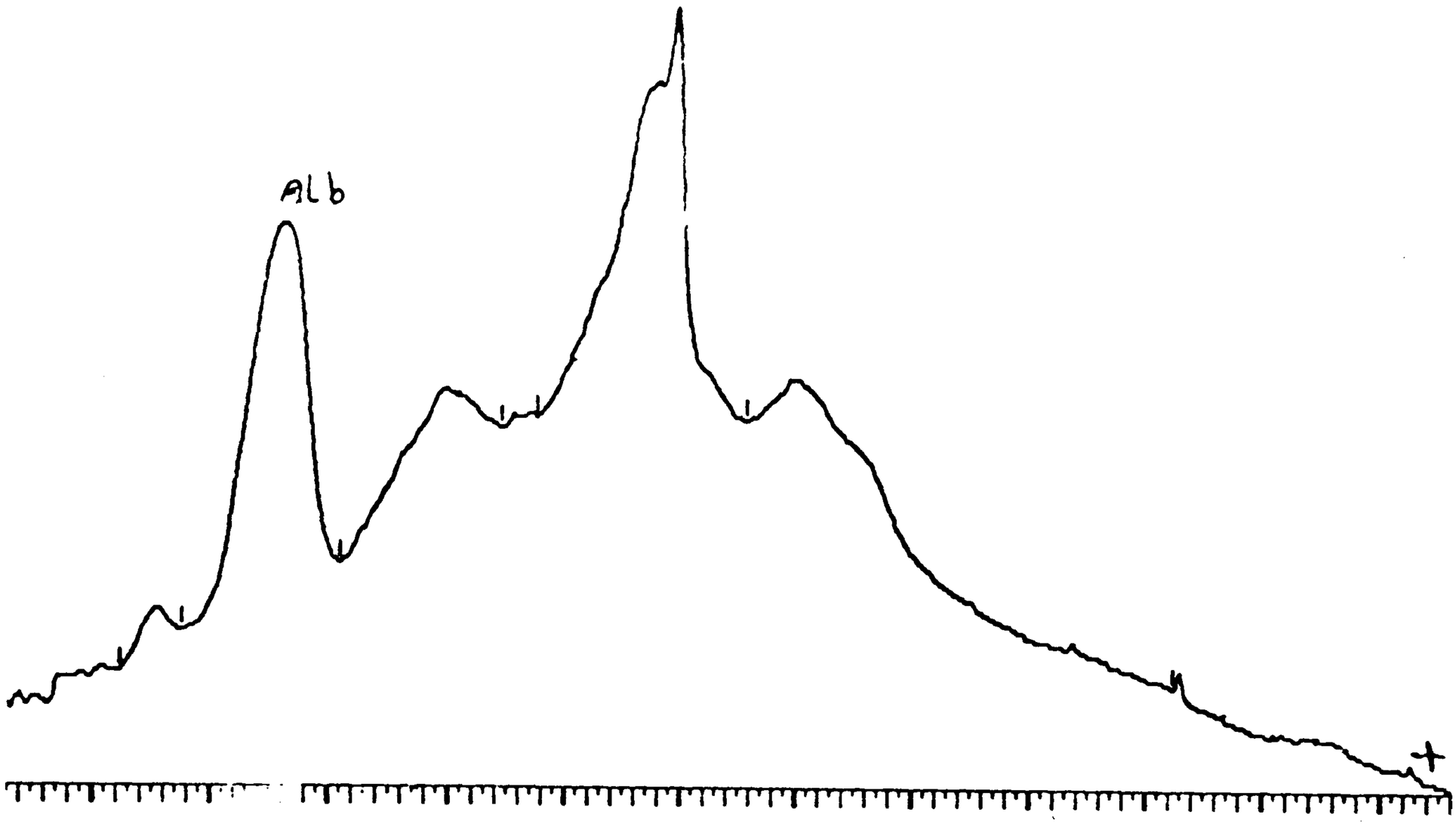
شکل ۱ ـ اسکن نمونه نرمال و نمایش باند آلبومین (Alb)
تعداد باندها ۲۴ عدد می‌باشد. - میزان دفع آلبومین ۱۶/۵ درصد است.
باندهای پروتئینی قبل از آلبومین، پروتئین‌های با وزن ملکولی بالا می‌باشند.
باندهای پروتئینی بعد از آلبومین، پروتئین‌های با وزن ملکولی کم می‌باشند.

در هر دو روش برای مشخص کردن باند آلبومین (MW= ۶۷۰۰۰) در نمونه‌ها از نمونه سرم آلبومین انسانی H.S.A و نیز ادرار نرمال استفاده شد. میزان آلبومین در منحنی حاصله از ادرار نرمال ۱۶/۵٪ بدست آمد (شکل شماره ۱) باندهای پروتئینی که قبل از آلبومین دیده می‌شوند پروتئین‌های با وزن ملکولی بالا (H.M.W)هستند و روی ژل دیرتر حرکت می‌کنند. میزان این پروتئین‌ها در پروتئین اوری گلومرولی افزایش می‌یابد.

باندهای پروتئینی که پس از آلبومین قرار دارند پروتئین‌های با وزن ملکولی کم (L.M.W) هستند در نتیجه روی ژل سریعتر حرکت می‌کنند. میزان این پروتئین‌ها در پروتئین اوری توبولی افزایش می‌یابد. طبق نتایج حاصله از این تحقیق بیماران دیابتی را براساس میزان درصد آلبومین در ادرارشان به سه گروه تقسیم نمودیم (تابلوی شماره۱).

تابلو ۱ - نتایج آزمایشات انجام شده

شماره بیمار	میزان پروتئین در ۱۰۸ ادرار تغلیظ شده (طبق روش Lowry)	تعداد باندها به روش tube electrophoresis	تعداد باندها به روش Slab electrophoresis	میزان درصد دفع آلبومین	میزان درصد دفع H.M.W Proteins	میزان درصد دفع L.M.W Proteins
۱	۷۵	۱۳	۲۴	۱۴/۶	۲۷/۲۰	۵۸
۲	۶۰	۶	۸	۱۴/۷	۶/۵ .	۷۸/۹
۳	۶۳	۸	۲۳	۱۳/۸	۳۳/۲	۵۳
۴	۲۷	۱۰	۲۴	۱۶/۹	۳/۶	۷۹/۵
۵	۶۰	۱۲	۱۹	۱۳/۴	۲/۲	۸۴/۴
۶	۳۳	۸	۲۶	۱۴/۸	۱۰/۴	۷۴/۸
۷	۸۰	۱۷	۲۸	۱۱/۸	۶/۸	۸۱/۴
۸	۵۱	۱۱	۱۲	۶/۵	۲/۸	۹۰/۶
۹	۳۵	۷	۱۲	۱۰/۵	۷/۴	۸۲/۱
۱۰	۱۰	۱۴	۱۶	۵/۳	/۵	۸۴/۲
۱۱	۳	۹	۳۲	۴/۲	۲۱	۷۴/۸
۱۲	۶۵	۱۵	۱۸	۱۰/۳	۹/۱	۸۰/۶
۱۳	۹۳	۱۴	۲۸	۱۱/۸	۵/۸	۸۲/۴
۱۴	۶۰	۹	۱۱	۲۹	۳/۴	۶۷/۶
۱۵	۱۴۸	۷	۱۴	۳۴/۲	۱۴/۸	۵۱۲
۱۶	۳۷	۱۰	۲۰	۲۸/۶	۱۶/۷	۵۴/۷
۱۷	۸۶	۶	۲۸	۲۶/۱	۷	۶۶/۹
۱۸	۵۳	۶	۲۸	۲۵/۶	۱۰/۹	۶۳/۵
۱۹	۴۴	۱۸	۲۷	۴۹/۸	۲/۹	۴۷/۳
۲۰	۶۷	۶	۱۲	۶۱/۲	۱۲/۸	۲۶
۲۱	۳۴۶	۹	۱۲	۳۴/۴	۶/۲	۵۹/۴
۲۲	۱۱۱	۱۴	۱۸	۳۱/۳	۸/۲	۶۱/۵
۲۳	۶۰	۱۵	۱۹	۲۹/۱	۱۰/۲	۶۰/۷
۲۴	۱۴۰	۸	۱۴	۴۰/۳	۱۱	۳۹/۷
۲۵	۱۵۰	۱۷	۱۸	۵۰/۱	۴/۷	۴۵/۲

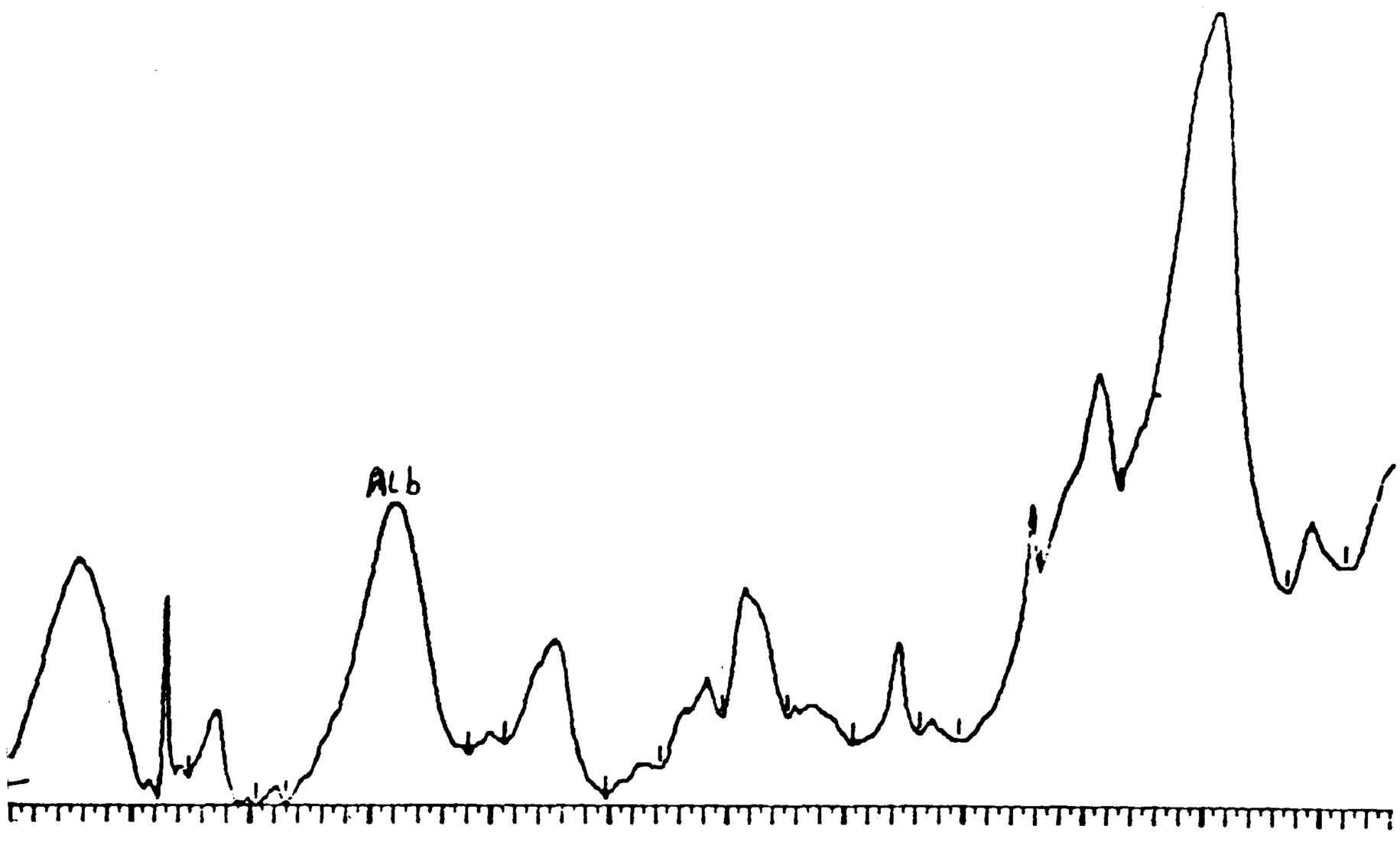


شکل ۲ ـ دو نمونه از اسکن گروه اول بیماران دیابتی مشخصات بیماران و نتایج آزمایشات حاصله در تابلو ۱

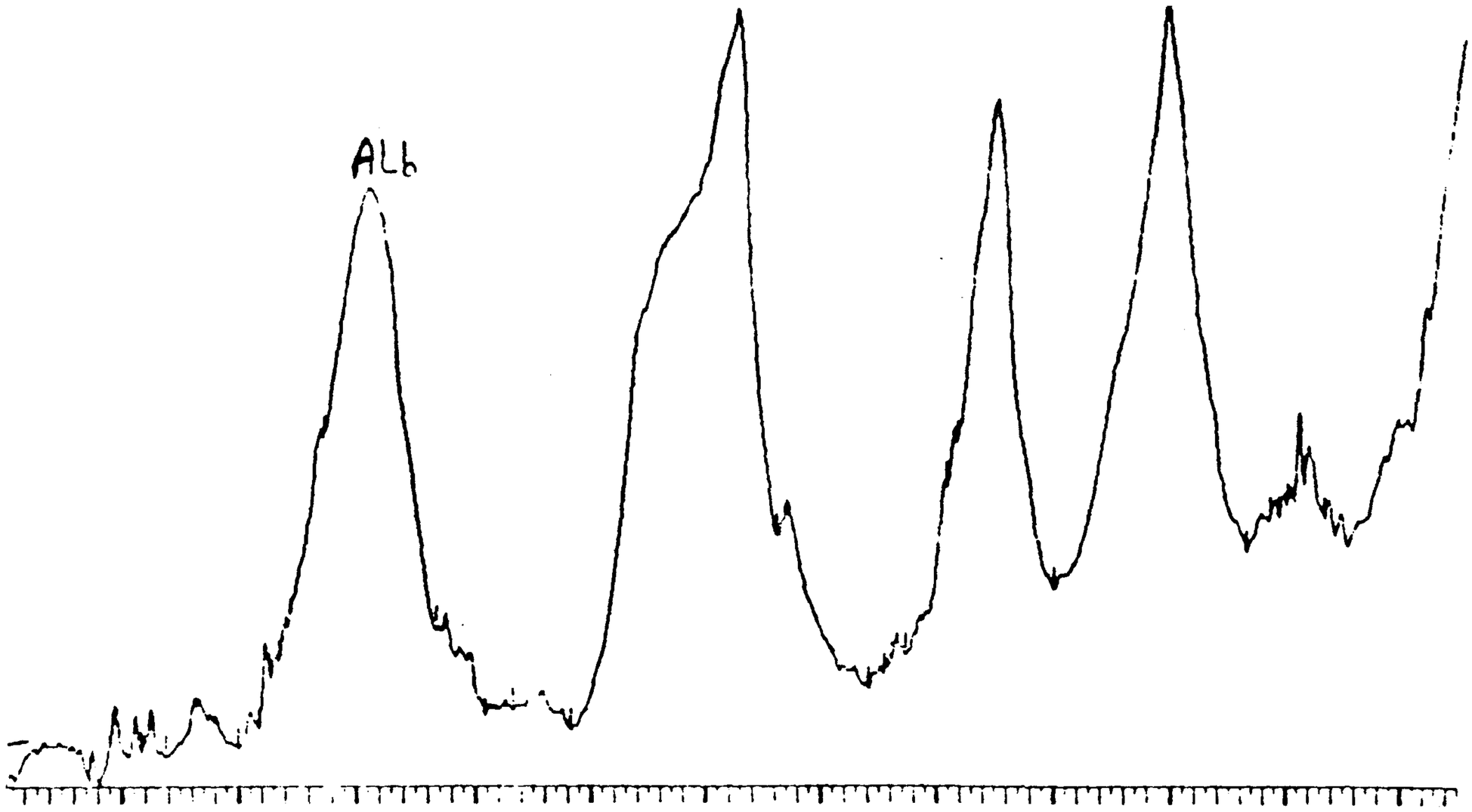
۱ - گروه اول که دفع آلبومین آنها در محدوده طبیعی می‌باشد (۲۰-۱۴ درصد) که شامل بیماران شماره ۶-۱ است. همانطور که ملاحظه می‌گردد میزان درصد دفع L.M.W نیز در این افراد تقریباً با حالت نرمال یکسان می‌باشد. سن افراد این گروه اغلب پائین و نیز مدت بیماری در آنها کوتاه بوده است (کمتر از یکسال) (شکل شماره ۲).

۲ - گروه دوم که درصد دفع آلبومین در آنها از حد طبیعی کمتر بوده است (کمتر از ۱۴ درصد) این گروه شامل بیماران شماره ۱۴-۷ می‌باشد. در اغلب این بیماران میزان L.M.W از حد طبیعی بیشتر بوده است که این امر احتمالاً ناشی از پروتئین اوری توبولار در آنها می‌باشد در نمونه شماره ۷ پس از اسکن کردن منحنی‌های حاصله طرح پروتئین اوری توبولار را که شامل چند باند مشخص می‌باشد نشان داده شده است (شکل شماره ۳) در افراد این گروه نیز مدت زمان بیماری کوتاه بوده است.

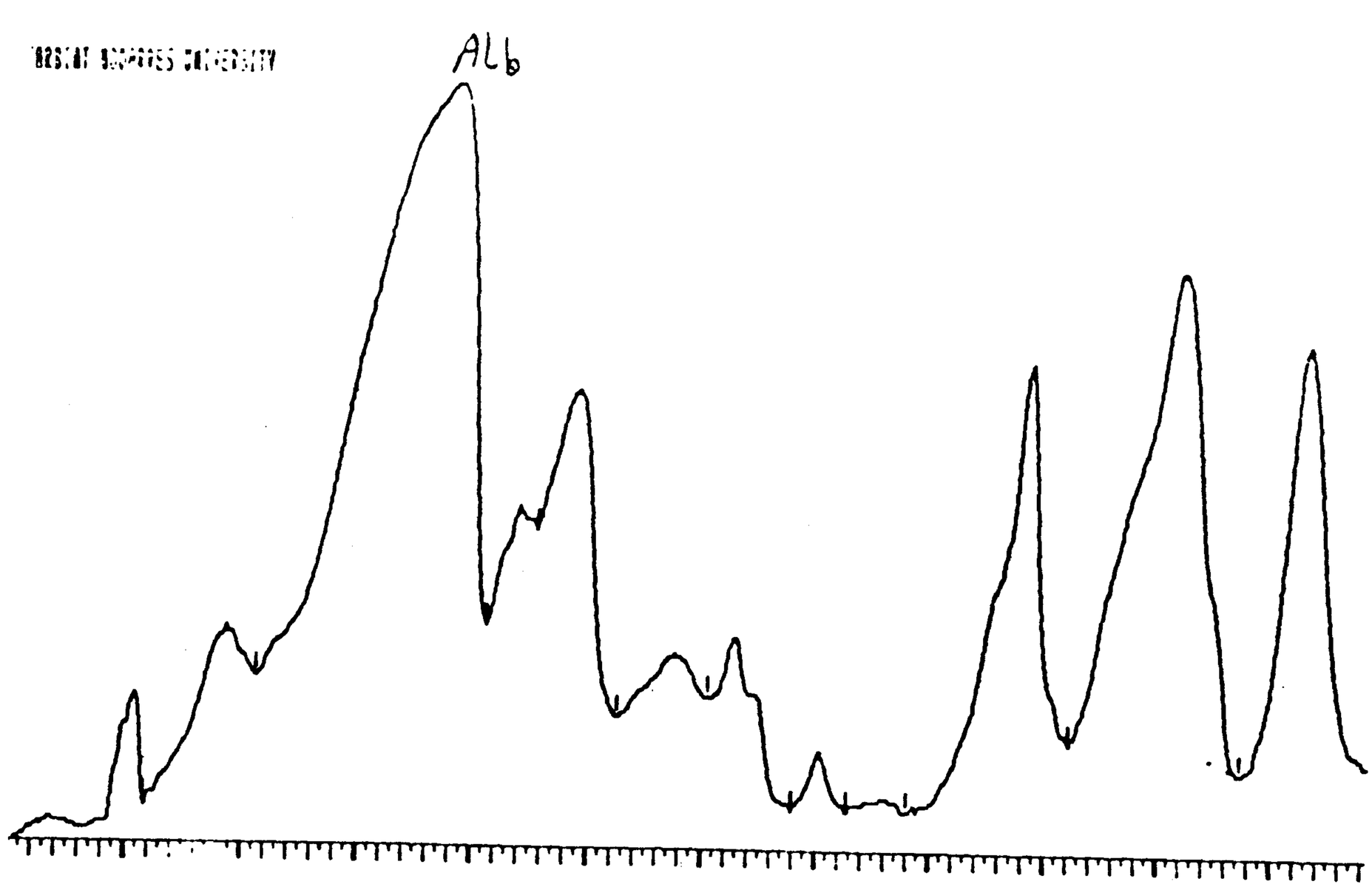
۳ - گروه سوم که درصد دفع آلبومین آنها بیش از حد طبیعی بوده است (بیش از ۲۰ درصد) که شامل بیماران شماره ۲۵-۱۴ می‌باشد. بیماران این گروه دارای سنین بالا بودند و طول مدت بیماری آنها در بین ۲۰-۴ سال بوده است. در این بیماران به علت افزایش سن و طولانی بودن مدت بیماری، احتمالاً کلیه‌ها دچار نارسائی ناشی از بیماری دیابت گردیده است (شکل شماره ۳) و افزایش دفع آلبومین در ادرار این گروه مبین این نارسائی می‌باشد (۶).



شکل ۳(۱) - یک نمونه از اسکن گروه دوم بیماران دیابتی

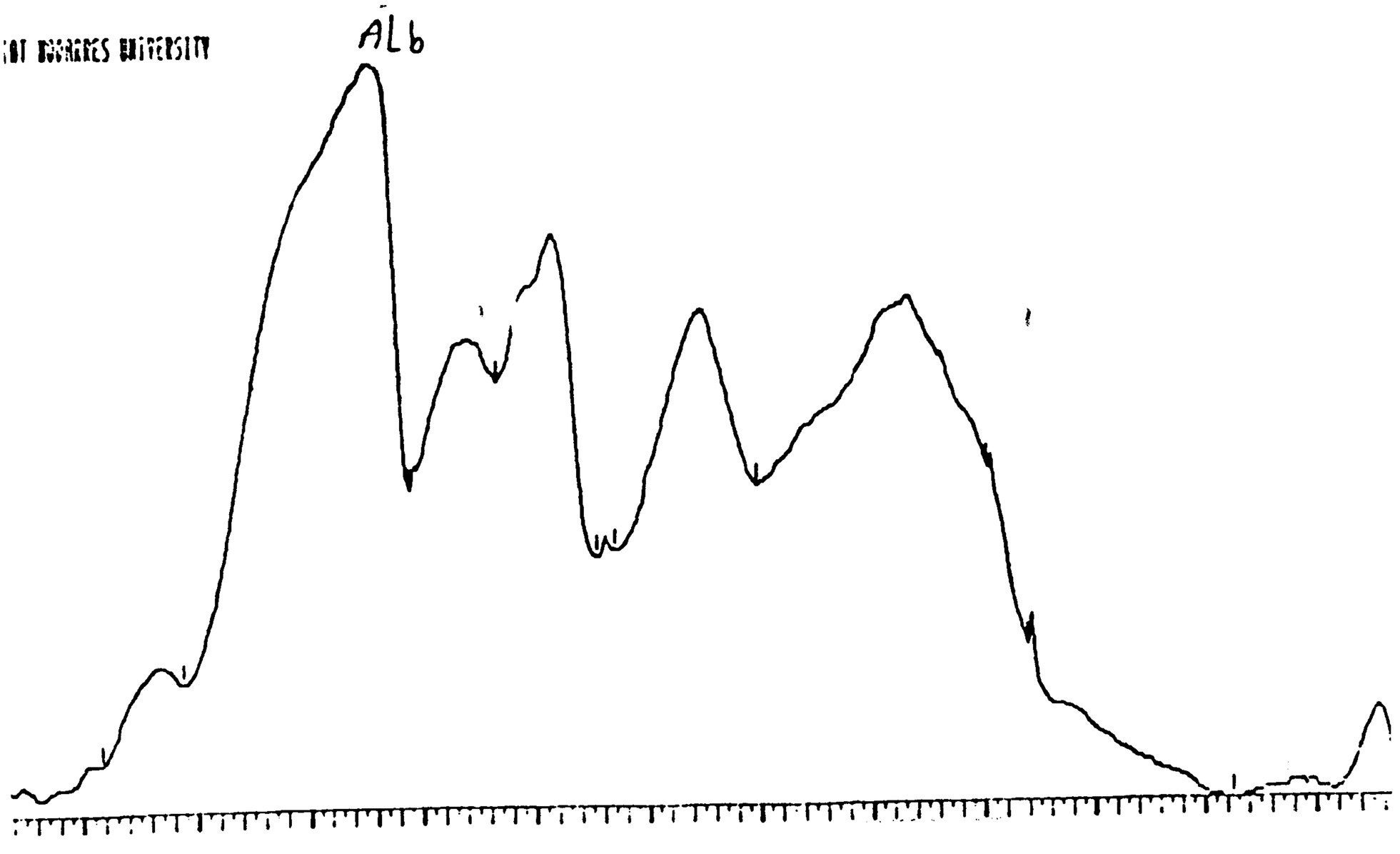


شکل ۳(۲) ـ یک نمونه از اسکن گروه دوم بیماران دیابتی



شکل ۴(۱) ـ یک نمونه از اسکن گروه سوم بیماران دیابتی

IOT DOGRES UNIVERSITY



شکل ۴(۲) ـ یک نمونه از اسکن گروه سوم بیماران دیابتی

بحث :

پروتئین‌ها ترکیباتی هستند که در واکنش‌های بیولوژیکی نقش اساسی دارند به همین دلیل مطالعه آنها از اهمیت خاصی برخوردار است.

با توجه به اینکه کلیه از ارگان‌های تصفیه کننده بدن می‌باشند اکثر موادی که در پلاسما وجود دارد به نحوی در ادرار راه پیدا می‌کند بنابراین پروتئین‌های سرم همگی با مقادیر مختلف در ادرار وارد می‌شوند. مقدار کل آنها در حالت طبیعی کم (۰/۲-۰ گرم در ادرار ۲۴ ساعته) و حتی می‌توان گفت ناچیز است (۹).

در بیماریهایی مانند دیابت و نیز بیماریهایی که سبب آسیب توبولها یا گلومرولهای کلیوی می‌شوند، مقادیر پروتئین‌های دفع شده توسط ادرار تغییر نموده بطوریکه بررسی آنها در تشخیص این بیماریها می‌تواند بسیار مؤثر باشد. در آسیب‌های گلومرولار پروتئین‌های پلاسمائی که همراه ادرار دفع می‌شوند شامل مقادیر زیادی آلبومین و پروتئین‌هایی است که وزن ملکولی آنها بیشتر از آلبومین می‌باشد و در آسیب‌های توبولار پروتئین‌های دفع شده ادراری شامل میزان معینی آلبومین و مقادیر زیادی پروتئین‌هایی با وزن ملکولی کمتر از آلبومین می‌باشد (۱۸).

مطالعات انجام شده روی یک گروه از بیماران

دیابتیک نشان می‌دهد که آنها به دو گروه مبتلا به پروتئین اوری و غیر مبتلا به پروتئین اوری تقسیم شده‌اند که علت‌های متعددی برای مرگ و میر وجود داشته است ولی در مبتلایان به پروتئین اوری شدید اورمی Uremia علت اصلی مرگ بوده است (۸).

در زنان جوان دیابتیک مبتلا به پروتئین اوری مرگ و میر بیشتر بوده و فاکتور اصلی در اینجاکتواسید بوده است (۱۰). مطالعه دیگری که روی بیماران دیابتیک مبتلا به بیماری کلیه انجام شد پروتئین اوری کلینیکال را به دلیل فرسوده شدن گلومرولها در آنها یافتند که پروتئین اوری کلینیکال در آنان به صورت متناوب بوده و در تقسیماتی که روی آنها انجام شد متوجه شدند که بعضی از آنها میزان دفع آلبومین طبیعی دارند و بعضی میکروآلبومینوری و گروهی دیگر آلبومینوری شدید دارند (۶) و ثابت شده است که کنترل متابولیکی در افرادی که دیابت وابسته به انسولین IDDM همراه با آلبومینوری دارند کاهش می‌یابد (۱۷ و ۲۰).

براساس این مطالعات افزایش اسیدهای چرب اشباع نشده (PUSFA) فاکتور پائین آورنده فشار خون بوده و بیماران دیابتیکی که از افزایش فشار خون و ناراحتی کلیه رنج می‌برند با جایگزین نمودن اسیدهای چرب مذکور در رژیم غذائی نقش مؤثری در پائین آوردن فشار خون داشته است. نقروپاتی دیابتیک نیز در همه افراد مبتلا به دیابت اعم از نوع وابسته به انسولین و غیر وابسته به انسولین علت اصلی مرگ بوده است (۱۰).

جداسازی پروتئین‌های ادرار بوسیله الکتروفورز اطلاعات مهمی درباره بیماریهای مختلف می‌دهد به همین دلیل ما از روش الکتروفورز بر پایه ژل پلی‌اکریلامید برای بررسی پروتئین اوری در افراد مبتلا به بیماری دیابت استفاده نمودیم.

در روش فوق SDS به تمامی پروتئین‌ها متصل شده و آنها را دارای بار منفی می‌کند در نتیجه جداسازی پروتئین‌ها فقط براساس وزن ملکولی آنها صورت می‌گیرد. به این ترتیب می‌توان پروتئین اوری گلومرولار را از نوع توبولار تفکیک کرد.

در روش اول (الکتروفورز لوله‌ای) که از ژل یکنواخت استفاده گردیده تعداد باندهای جدا شده کمتر از روش دوم (الکتروفورز گرادیان غلظت) بود مزیت روش اول این است که به دلیل قرار دادن نمونه‌ها در لوله‌های جداگانه در هنگام الکتروفورز، نمونه‌ها با یکدیگر در تماس نیستند ولی در روش دوم قرار گرفتن نمونه‌ها در کنار یکدیگر روی ژل صفحه‌ای سبب می‌شود که وجود احتمالی املاح و با غلظت بالای پروتئین در یک نمونه به نمونه‌های اطراف نفوذ نموده و در نتیجه باندهای الکتروفورزی نمونه‌ها در یکدیگر ادغام شوند و در این صورت اسکن این نمونه‌ها ارزش خاصی ندارد در طی تجربیات خود، از روش گرادیان غلظت به صورت صفحه‌ای نتایج بهتری برای جدا کردن باندهای پروتئینی گرفتیم در این روش به علت وسعت تعداد سوراخ‌های موجود بر روی ژل (گرادیان غلظت ۲۲/۵-۱۰ درصد) نمونه‌ای که دارای اجزایی با وزن ملکولی مختلف است می‌تواند بخوبی تفکیک شده و در نتیجه تعداد باندهای پروتئینی بیشتری روی ژل ظاهر شود و نیز تفکیک باندهای پروتئینی بهتر صورت می‌گیرد (۱۶).

permeability to small and large molecules in short term juvenile diabetics. Diabetologia 12: 161-6.

18) Tietz Norbert, W. 1986: Textbook of clinical chemistry. W.B. Sauders. Compary, chapter. 4. P:602-7.

19) Viberti, G.C., Wil, R.D., Jarrett, R.J., Argyro Ulos, A. Mahmud, U. and Keen, H. 1982: Microalbumininuria as apredictor of clinical nephropathy in insulin dependent diabetes mellitus. Lancet, I: 1430-2.

20) Wiseman, M.J., Saunders, A.J. and Keen, H. 1985: Effect of blood glucose control on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin dependent diabetes. Nengl J Med. 312: 207-210.

منابع:

۱) جلیلیان، فریده. ۱۳۶۹: پایان‌نامه (بررسی پروتئین اوری در بیماری دیابت به روش ژل الکتروفورز. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، صفحه: ۵۳-۵۱.

۲) عباسعلی‌پورکبیره، ملیحه. ۱۳۶۷: پایان‌نامه (بررسی پروتئین‌های نرمال در ادرار انسان به روش ژل‌الکتروفوروز) دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی صفحات: ۴۳-۲۳.

۳) ملک‌پور، اکبر. ۱۳۶۲: اصول بیوشیمی بالینی، مرکز نشر دانشگاهی دانشگاه تهران صفحه ۲۲۰-۲۱۹.

References :

4) Alex, C. sonnenwirth, 1980: Gradewohl's clinical laboratory methods and diagnosis eight edition. The C.V. Mosby company chapter 13. PP: 265.

5) Anderson, A.R., Christiansen, J.S., Anderson, J.K. and Kreiners Deckert, T. 1983: Diabetic nephropathy in type 1(insulin dependent) diabetes; an epidemiological study. Diabetologia 25: 496-501.

6) Bending, J.J., Vibertig, C., Watkins, P.J. and Keen, H. 1986: Intermittent clinical proteinuria and renal function in diabetes evaluation and the effect of glycaemic control. Br Med J (clin. Res) 292: 83-86.

7) Bernard, A.M., Uled amor, A.A., Goemare Vanneste, J., Antoine, J.L., Lauwreys, R.R., Lambert, A. and Vandeleene, B. 1988: Microtransferrinuria is a more senseitive indicator of early glomerular damage in diabetes than microalbuminuria clin chem, 1920-21.

8) Borch Johnson, K., Andersen, P.K. and Deckert, T. 1985: The effect of proteinuria on relative mortality in type 1(insulin dependent diabetes mellitus) 28(8): 590-600.

9) De Moreno Miriam, R. and Smith Jedn, F. 1985: Silver staining of proteins in poly acrylamid gels: Increased sensitivity through a combined coomasi blue-silverstain procedure, analytical Biochemistry 151: 460-470.

10) Hutchison, A.S., O'Rerlly, D.St.J. and Maccusih, A. 1988: Albumin excretion rate, Albumin concentration and albumin, creatinine ratio compared for screning for slight albuminuria. Clin chem. 3410: 2012-2021.

11) Keutel, H.J., King, J.S. and Böyge, W.H. 1964: Further studies of uromocoid in normal and ston urine, urol Int, 17: 324-341.

12) Kiyoko Sanoshiba, Kiyoko Kanamori, and Hiroko cho. 1987: Re - evaluating of normal human urinary proteins fractionated by one diamentione sodium dedecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis, clinical chemica Acta 172: 77-87.

13) Laemmlie, U.K. 1970: Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophaget. Nature, 277: 680-685.

14) Lawry, O.H., Rosebvough, N.H., Farr, A.L. and Rondall, R.J. 1951: Protein measurment with the folin phenol reagent, J. Biol chem, 193: 265-275.

15) Marshall, T. and William, K.M. 1986: Electrophoresis indicates protein losson centrifugation of urin. Clinical chemistry 32, 11: 2105-2106.

16) O'Farrell, P.H. 1975: High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biochem. 250: 4007-4021.

17) Parving, H.H., Noer, I. and Deckert, T. 1976: The effect of matabolic regulation of microvascular

proteinuria in these patients, was result from tubular proternuria. Third group the amount of Albiumin excreted in these patients was more than normal in this group of patients due to prologed illness and an increased in age. The kidney in sufficiency might be occured.

Evaluation of proteinuria in diabetic patients by one dimensional sodium dodecyl sulfate - polyacrylamid gel electrophoresis

Abbasali Pourkabireh, M.* Jalilian, F.**

Summary:

The study of proteins which are most important constituents of human body have been always interested by the scientists and investigators.

The investigations on proteins have been primarily done on blood, but with regard to the fact that the kidneys are involving in clearance of the plasma, therefore those components in some way are released into the Urine.

In spite of trace amount of proteins present in the urine, varies techniques has been used to isolate and seperate these proteins. The proteins isolated by these techniques have been differed from each other. The technique which has been used in the present dissertation is an electrophoresis technique and the technique is very sensetive and can measure proteins precisely.

Two kind of electrophoresis technique used in this study were as follow:

1 - Modified Laemmlie technique with tubular cast model

2 - Gradient gel concentration with O'farrell cast slab methos.

According to our finding using tubular cast with gradient gel consentration have had another results.

The studies conducted in our laboratory, the amount of uromucoid is less than the amount of albiumin. Therefore in our studies the albiumin has been regarded as the main protein which can be excreted in the urine.

According to our finding diabetic patients has been divided in to three groups:

1 - In the first group the amount of albiumin excreting was in the range of normal, in such patients, they were yound and the course of the illness was short.

2 - Second group the amount of Albiuminexcretion was less than normal, but due to L.M.W. proteins excretion, is increased it is likely that due to the

* - Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

** - Department of Biochmistry Medical School, Medical University of Tehran, Tehran - Iran.