دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال ششم، شماره ۲، صفحه ۱۲۶-۱۲۲ (اسفند۱۳۸۲)

بررسی استریولوژیکی تعداد گلومرول ها در نارسائی حاد کلیه ناشی از تجویز گلیسرول در موش صحرائی نر

دکتر فرزانه دهقانی[۱]*، دکتر عبدالرحمن دزفولیان[۲] *، دکتر محمدرضا پنجه شاهین[۳]، دکتر حیات ممبینی[۴]، دکتر سید ضیاء الدین تابعی[۵]، دکتر شهلا ظهیری[۶]

[۱]استادیار بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۲]استادیار بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
[۳]استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۴]دانشیار نفرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۵]استاد پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۶]استادیار بافت شناسی، دانشکده علوم پزشکی جهرم

چکیده :

شمارش تعداد گلومرول ها معیار مناسبی برای تشخیص و درمان بیماری های کلیه به حساب می آید. به منظور بررسی این تغییرات در نارسایی حاد کلیه القاء شده توسط گلیسرول در موش صحرایی, از روش های استریولوژی به عنوان شاخص اندازه گیری استفاده شد. در این تحقیق تعداد ۲۴ قطعه موش صحرایی از نژاد اسپراگو-داولی به صورت تصادفی انتخاب و به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم گردیدند. به گروه آزمایش به میزان ده سی سی در کیلو گرم از محلول ۵۰ در صد گلیسرول و به گروه کنترل به همین میزان حلال (نرمال سایلین) به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. بعد از ۴۸ ساعت حیوان ها تحت بیهوشی عمیق با اتر تشریح و پس از فیکس شدن به روش پرفوزیون عروقی با محلول فرمالین ده در صد, کلیه راست آنها برداشته شد. از هر کلیه قطعاتی به ضخامت یک میلی متر تهیه و از هر قطعه پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی یک جفت برش به ضخامت ۵ میکرون و با ارتفاع مشخص تهیه و با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی گردید. جفت برش های تهیه شده توسط اصل دیسکتورفیزیکی, مطالعه شدند. نتایج نشان داد که بین تعداد گلومرول های کلیه در گروههای کنترل و آزمایش هیچ ارتباط معنی داری وجود نداشت. بنابراین بنظر می رسد که در نارسایی حاد کلیه ناشی از تزریق گلیسرول, تعداد گلومرول ها تغییر نمی کند. اما تصمیم گیری قطعی در مورد این نتایج نیاز به مطالعات گسترده تری بر روی بیماری فوق در مدل های تجربی دیگر دارد.

واژگان کلیدی : استریولوژی , نارسایی حاد کلیه , گلومرول , دیسکتور

* شیراز – دانشگاه علوم پزشکی – دانشکده پزشکی – بخش علوم تشریحی Telfax:2304372
Email:dehghanf@sums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-05]

مقدمه :

از آنجا که دامنه تغییرات در زمینه های مختلف علوم زیستی و انتقال این تحقیقات از سطح ماکروسکوپی به سطح میکروسکوپی همواره در حال گسترش است؛ لذا نیاز به روش هائی که بتواند محقق را به ساختمان درونی و سه بعدی بافت ها و اجزاء آنها رهنمون سازد، ضروری بنظر می رسد. استفاده از روش های استریولوژی به منظور بررسی میزان تغییرات در اعضاء حیاتی بدن دارای اهمیت ویژه ای است. استریولوژی عملی است که با استفاده از قوانین ساده ریاضی به محاسبه کمی و سه بعدی ساختمانهای میکروسکوپی و ماکروسکوپی بدن می پردازد(۱). این علم در بافت شناسی و آسیب شناسی تجربی و بالینی جایگاه ویژه ای دارد و دریچه تازه ای را در امر تشخیص و درمان بیماریها گشوده است. تعیین تعداد اجزاء در ساختمانهای سه بعدی از مهمترین مسائل مطرح شده در علم استریولوژی است. یکی از روش هائی که به منظور برآورد تعداد اجزاء مورد استفاده قرار می گیرد بر پایه اصل دیسکتور فیزیکی استوار است که به عنوان روشی فاقد سویه گیری و تورش برای تعیین شمارش اجزاء در ساختمانهای مورد نظر بکار گرفته شده است (۲). این اصل امکان شمارش اجزاء را در ساختمانهای سه بعدی و با استفاده از مقاطع زوج فراهم می آورد (۳). پیشرفت های اخیر در زمینه های قانون شمارش بر اساس مقاطع زوج منحصر به فرد نبوده بلکه از سال ۱۸۹۵ تا کنون چندین بار عنوان گردیده است. اما تا قبل از سال ۱۹۸۴ تمام روش هائی که مطرح می شده بر اساس یک پیش فرض در مورد شکل، اندازه و جهت اجسام بوده است (۴).

اصل دیسکتور اولین بار توسط استریو در سال ۱۹۸۴ مطرح شد، اما گاندرسن در سال ۱۹۸۶ این تکنیک را گسترده تر نمود (۵). بر اساس این اصل، از اجزاء جدا از هم نمونه گیری با احتمال مساوی به دست می آید, بدون اینکه هیچ پیش فرض در مورد شکل و ساختمان جسم مورد مطالعه وجود داشته باشد. بدین ترتیب مقاطع سریال را می توان با هم مقایسه نمود، این مقاطع به صورت جفت انتخاب می شوند ولی شمارش تنها در یک مقطع انجام می گیرد (۶).از آنجا که نقش کلیه ها به عنوان یک ارگان حیاتی در سلامتی عمومی هر فرد واضح و روشن است بنابراین مطالعه در مورد بیماریهای این عضو کمک مؤثری به درک ساختمان طبیعی و غیر طبیعی آن می کند. یکی از بیماریهای شایع این عضو، نارسائی حا د کلیه است که با وجود تلاش وسیع در امر درمان این بیماری هنوز درصد زیادی از مبتلایان در معرض خطر مرگ قرار دارند (۷). برای بررسی نارسائی حاد کلیه در حیوانات آزمایشگاهی, مدل های تجربی مختلفی پیشنهاد گردیده است. مدل تجربی انتخاب شده در این تحقیق، مدل گلیسرول است که شبیه ایجاد نارسائی حاد کلیه در اثر ضربه یا آسیب های عضلانی در انسان می باشد (۸ و ۹). تزریق این ماده به صورت داخل عضلانی یا زیر پوستی در حیوانات آزمایشگاهی منجر به تجزیه سلولهای عضلانی و رها سازی پروتئین های آهن دار می گردد (۱۰). رسوب این پروتئین در لوله های کلیه به همراه تنگی عروق ناشی از افزایش آدنوزین موجب آسیب به لوله های پیچیده نزدیک و دور در قشر کلیه شده و میزان پالایش کلیوی کاهش می یابد (۱۱و ۱۲). مطالعات نشان می دهد که میزان پالایش کلیه ارتباط مستقیمی با تعداد و اندازه گلومرولها دارد (۱۱)؛ لذا بنظر می رسد که کاهش میزان پالایش در کلیه موجب تغییر در تعداد گلومرولها شود. بنابراین در این تحقیق تغییرات احتمالی در تعداد گلومرولها ناشی از تجویز گلیسرول در نارسائی حاد کلیه با استفاده از روش استریولوژی دیسکتور فیزیکی در بیماری فوق مورد بررسی قرار می گیرد.

روش کار:

تعداد ۲۴ قطعه موش صحرائی از نژاد اسپراگو-داولی با وزن حدود ۲۵۰-۲۳۰ گرم انتخاب و به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم گردید. به گروه آزمایش محلول گلیسرول ۵۰ درصد در نرمال سایلین به میزان 10ml/kg و به گروه کنترل به همین میزان محلول نرمال سایلین به عضلات پشتی ران حیوان تزریق شد. بعد از ۲ روز حیوانات تحت بیهوشی عمیق تشریح و کلیه راست آنها توسط روش پرفوزیون عروقی با محلول فرمالین

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-05]

۱۰ درصد فیکس و در محلول مزبور غوطه ور گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت کلیه ها در قالب آگاری قرار داده شد و توسط ماکروتوم ابداعی هیستولوژی از هر کلیه حدود ۱۲ مقطع به ضخامت ۱ میلی متر تهیه و پس از انجام آماده سازی بافتی از هر مقطع، یک جفت برش موازی به ضخامت ۵ میکرون با ارتفاع مشخص به دست آمد. ارتفاع دیسکتور یا فاصله بین دو برش موازی تقریباً مساوی یک سوم یا ۳۰ درصد اندازه کوچکترین گلومرولها تعیین گردید. برای شمارش کل گلومولهای کلیه به روش فوق ابتدا دانسیته عددی گلومرولها محاسبه شد. بدین منظور برش های زوج، همزمان با هم بر روی دو میکروسکوپ پروجکتینگ مورد مطالعه قرار گرفت. بدین ترتیب که یک برش به عنوان شاهد و برش دیگر به عنوان مرجع در نظر گرفته شد. گلومرولها در محل کورتکس کلیه مورد بررسی قرار گرفتند. برای شمارش تعداد آنها از شبکه هائی متشکل از تعدادی فریم استفاده شد و برای هر زوج برش حداکثر چهار فریم به صورت تصادفی منظم انتخاب گردید. روش کار به این ترتیب بود که در صورت مشاهده گلومرولها در مقطع مرجع و عدم آن در مقطع شاهد آن گلومرول شمارش می گردید، مشروط بر آنکه در خارج از فریم های مزبور شمارش واقع نشده باشد. این عمل در صورتی بود که فریم ها به صورت تصادفی منظم بر روی تصاویر پرتاب شوند. برای تعیین دانسیته عددی گلومرولها و تعداد کل گلومرولها از فرمولهای زیر استفاده شد.

$$NV = \frac{\Sigma Q}{a(F).\ h.\ \Sigma P}$$ تعداد گلومولها در واحد حجم

$Ntotal = NV.Vcortex$ تعداد کل گلومرولها

$Vcortex = \Sigma P.t.a(P)$ حجم قشر کلیه

حجم قشر کلیه با استفاده از اصل کاوالیه و روش شمارش نقطه ای بدست آمد. برای اندازه گیری ضریب خطای استریولوژی برای شمارش گلومرولها از فرمول زیر استفاده شد.

$$CE=\left[\frac{k}{k-1}\left(\frac{(\sum P_{cor})^2}{\sum P_{cor}\times\sum P_{cor}}+\frac{(\sum Q_{glom})^2}{\sum Q_{glom}\times\sum Q_{glom}}-2\frac{\sum P_{cor}\times Q_{glom}}{\sum P_{cor}\times\sum Q_{glom}}\right)\right]^{\frac{1}{2}}$$

تعداد فریم هائی که با فضای مرجع برخورد داشته اند = $\sum P$ مجموعه گلومرولها = $\sum Q$ تعداد نمونه ها = K

به منظور مقایسه تعداد گلومرولها در گروه کنترل و آزمایش از روش Mann-Withney-u test استفاده شد، نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار و ۹۵ درصد فاصله اطمینان مورد قبول و در سطح$P< ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج :

نتایج بافتی :

از دیدگاه میکروسکوپ نوری، تغییرات خاصی در ساختمان گلومرولها و عروق کلیه مشاهده نگردید ولی اغلب گلومرولها دچار بر هم افتادگی شده بطوریکه فضای کپسول بومن ظاهراً وسیع بنظر می رسید. خیز و ادم در ناحیه بافت پارانشیمی به صورت آشکار مشاهده گردید. آسیب در لوله های کلیه به ویژه لوله های پیچیده نزدیک بیشتر دیده شد. فضای لوله ها در اکثر موارد وسیع و توسط مواد هیالینی و صورتی رنگی بنام Cast مسدود شده بود. در بعضی لوله ها پیوستگی اپی تلیوم از بین رفته و به صورت منقطع مشاهده گردید. سطح حاشیه مسواکی اپی تلیوم لوله پیچیده نزدیک در بعضی لوله ها تخریب شده بود. اپی تلیوم لوله ها در بسیاری موارد نکروز شده ولی میزان و پراکندگی آن کاملاً متغیر بود بطوریکه در بعضی لوله ها بیشتر و در بعضی کمتر مشاهده گردید.

نتایج حاصل از مطالعات سه بعدی :

نتایج حاصل از این بررسی نشان دادکه تعداد گلومرولها بر روی واحدهای Frame روی کلیه (Q) و تعداد گلومرولها در واحد حجم کلیه (NV) در گروه آزمایش اختلاف معنی داری را با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ نشان می دهد. اما تعداد کل گلومرولهای کلیه (Ntotal) بین گروههای کنترل و آزمایش اختلاف معنی داری دیده نشد.

حجم کورتکس کلیه در بین دو گروه گروه کنترل و آزمایش اختلاف معنی داری در سطح $P<0.05$ وجود داشت. در این آزمایش تعداد کل گلومرولهای کلیه بین دو گروه کنترل

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-05]

و آزمایش مشابه یکدیگر بود. ولی افزایش تعداد گلومرولها بر روی واحدهای Frame (Q) و در واحد حجم کلیه (NV) در گروه آزمایش به علت افزایش حجم قسمت کورتکس کلیه در این گروه بود. اندازه گیری ضریب خطای آزمایش درهر دو گروه پائین بود که این امر نشان دهنده دقت اندازه گیری در روش استریولوژی فوق محسوب گردید.

جدول شماره-۱: تعداد گلومرولها در واحدهای Frame واحد حجم وتعداد کل آن و محاسبه حجم قسمت قشری کلیه و ضریب خطای آن

	تعداد گلومرولهای شمارش شده در Frame کلیه (Q)	تعداد گلومرولها در واحد حجم کلیه (NV)	ضریب خطا CE	تعداد کل گلومرولهای کلیه (N)	حجم قسمت قشری کلیه (Vcor./mm3)	ضریب خطا CE
کنترل (نرمال سایلین)	*۲۷/۰۸ ±۲/۹۱	۱۴۱/۱۰±۱۵/۱۴	۰/۰۵	۳۰۹۶۹/۷۷±۱۹۷۹/۰۳	۲۲۰/۵۲±۱۲/۱	۰/۰۴
آزمایش (گلیسرول)	۱۶/۵۸±۲/۰۲	۸۶/۴۰±۱۰/۵۳	۰/۰۴	۳۰۶۶۲/۲۴±۲۰۷۲/۳۹	۳۵۷/۸۴±۳۱/۴۷	۰/۰۳

*اعداد بصورت میانگین و انحراف معیار می باشند.

بحث :

یکی از روش های تشخیص نارسائی حاد کلیه، اندازه گیری میزان پالایش گلومرولی است. این اندازه گیری به میزان فاکتورهای مختلفی مانند حجم گلومرولها، تعداد گلومرول ها و ساختمان لوله های کلیه وابسته است، به نظر می رسد با کاهش تعداد گلومرولها میزان پالایش گلومرولی نیز کاهش یابد (۳). دربسیاری از بیماریها، تعداد گلومرولهای کلیه کاهش می یابد، تحقیقات نشان می دهد که در بیماری دیابت وابسته به انسولین، تعداد گلومرولها بتدریج کم می شود (۱۳). افزایش فشار خون نیز می تواند موجب کاهش تعداد این اجزاء شود؛ پری یرا در سال۲۰۰۱ در یک مدل تجربی برروی موش صحرائی نشان داد که افزایش فشار خون موجب کاهش تعداد گلومرول ها به میزان ۳۳ درصد می شود (۱۴). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که درطی نارسائی حاد کلیه ناشی از تزریق گلیسرول تعداد گلومرولهای کلیه نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری را آشکار نمی سازد. در این تحقیق میانگین تعداد کل گلومرولهای کلیه در یک موش صحرائی ۱۹۷۹ ± ۳۰۹۶۹/۷۷ تخمین زده شد. تعداد گلومرولهای کلیه در موش صحرائی بالغ و سالم توسط محققین مختلف و بوسیله روش های متفاوت بین ۴۴۰۰۰-۲۴۰۰۰ عدد محاسبه گردید (۱۵).

برت رام (۱۹۹۲) با مطالعه ای که بر روی موش صحرائی انجام داد تعداد کل گلومرولهای کلیه در این حیوان را حدود ۳۶۶۷± ۳۱۷۶۴ تخمین زد (۱۶). از مطالعات فوق می توان چنین استنباط نمود که گلیسرول تأثیری بر روی تعداد کل گلومرولهای کلیه در حین نارسائی حاد کلیه ندارد، هر چند تحقیقات پی یرا در سال ۲۰۰۱ نشان داد که در نارسائی حاد کلیه میزان اکسیدنیتریک کاهش می کند و کاهش این فاکتور موجب کم شدن تعداد گلومرولها می شود (۱۳) ولی لازاروس در سال۱۹۹۳ معتقد بود که علیرغم تأثیر اکسیدنیتریک در گشادی عروق و افزایش جریان خون در کلیه، نقش این ماده در ایجاد نارسائی حاد کلیه گمراه کننده است (۱۷). بنابراین تغییر در میزان تراوش این ماده بطور قطع نمی تواند سبب بروز بیماری مزبور گردد.

تحقیقات دیگر نشان می دهد که در طی روند بیماریهای

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-05]

مزمن کلیه تعداد گلومرولها کاهش می یابـد(۱۶), امـا بنظـر می رسد که در نارسائی حاد کلیه در مدل گلیسـرول, تعـداد گلومرول ها تغییر نمی کند و فاکتورهای دیگری می توانند سبب کاهش میزان پالایش گلومرولی و ایجاد بیماری شوند. با وجوداین نتایج فوق, نیاز بـه مطالعـات گسـترده تـری بـر روی این بیماری در مدلهای تجربی دیگر دارد.

References :

1. Jensen EB, Gundersen HJG. The Stereological estimatic of moments of particle volume. J Apl prob 1985; 22: 82-98.
2. Miller PB, Charleston JS, Battaglia DE. An accurate simple method for unbiased determination of primordial follicule number in the primate ovary. Biol Repod 1997; 56: 909-15.
3. Bendsten TF, Nyengaard JR. Unbiased estimation of particle number using section historical perspective with special reference to the stereology of glomeuli. J Micros 1989; 153: 93-102.
4. Weibel ER. Stereological method. practical method for biological morphometry, Toronto: Academic Press, 1979.
5. Gundersen HJG, Osterby R. Sampleng efficiency and biological variation in stereology. Mikroskopie 1986; 37: 1414.
6. Kogland TS, Kascher R, Berthold CH. Aspects of the quantitative analysis of neurons in the cerebral cortex. J Neurotics Methods 1996; 70: 201-10.
7. Kumar V, Cotran Rs, Stanley Rl. Basic Pathology. 6th ed. Chicago: WB Saunders Company, 1997, 459-461.
8. Smith JA, Whitaker EM, Bowmer CJ, et al. Differential expression of renal adenosine A(1) receptors induced by acute renal failure. Biochem Pharmacol 2000; 59: 723-32.
9. Ward MM. Factors predictive of acute renal failur in rhabdomyolycic. Arch Intern Med 1988; 148: 1553-7.
10. Zager RA. Mitochondrial free radical production induced lipid peroxidation during myoglohemoglobinur. Kidney Int 1996; 49: 741-51.
11. Kellet R, Bowmer CJ, Collis MG, et al. Amelioration of glycerol induced acute renal failure in the rat with 8-cyclopentyl-1,3 dipropyl xanthine. Br J Pharmacol 1989; 98: 1066-74.
12. Welch WJ. Adenosine A(1) receptor antagonists in the kidney. Effects in fluid retaining disorders. Curr Opin Pharmacol 2002; 2: 165-70.
13. Bilous Rw, Mauer SM, Sutherland DER, et al. Mean glomerular volume and volume and rate of development of biabetic nephropathy. Diabetes 1989; 38: 1142-7.
14. Pereira LMM, Manbarim-de-Lacerda CA. Glomerular profile numerical density per area and mean glomerular volume in rats submitted to nitric oxide synthase blockade. Histol Histophatol 2001; 16: 15-20.
15. Nyengaard JR, Bendtsen TF, Christensen S, et al. The number and size of glomerular in long-term lithium-induced nephropathy in rats. APMIS 1994; 102: 59-66.
16. Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, et al. Total number of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. Cell Tissue Res 1992; 270: 37-45.
17. Lazarus JM, Brenner BM. Acute renal failure. 3rd ed. New York: Churchill Livigstone, 1993, 33-37, 45 61, 379-380.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-07-05]