

تخمین معدل حجمی گلومرول ها در نارسایی حاد کلیه القاء شده توسط گلیسرول در موش صحرائی نر

دکتر فرزانه دهقان^{1*}، دکتر عبد الرحمان دزفولیان²، دکتر محمد رضا پنجه شاهین³، دکتر شهلا ظهیری⁴

چکیده

مقدمه: استفاده از روش های اندازه گیری سه بعدی ساختمان ها برای بررسی میزان تغییرات در اعضای حیاتی بدن مثل کلیه از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تحقیقات نشان می دهد که تعیین حجم گلومرولها روش مناسبی برای شناخت بیماری های کلیه است. در این تحقیق حجم گلومرولها در نارسایی حاد کلیه در یک مدل تجربی بر روی موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: تعداد 48 قطعه موش صحرائی نر از نژاد اسپراگو- داوولی به صورت تصادفی انتخاب و به 2 گروه کنترل و آزمایش تقسیم گردید، به گروه آزمایش محلول 50 درصد گلیسرول به میزان 10 میلی گرم بر کیلوگرم و به گروه کنترل به همین میزان محلول نرمال سالین به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. بعد از 48 ساعت حیوانات تحت بیهوشی عمیق تشریح و پس از فیکس شدن به روش پرفیوژن عروقی با محلول فرمالین 10 درصد کلیه راست آنها برداشته شد و پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی، اسلایدها توسط هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی گردید. حجم گلومرولها توسط میکروسکوپ پروجکتینگ و با استفاده از روش شمارش نقطه ای و اصل کاوالیه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: ایجاد نارسایی حاد کلیه توسط گلیسرول تأثیری بر روی حجم و اندازه گلومرول ها ندارد ولی باعث افزایش حجم کلیه می شود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که تخمین حجم گلومرول ها نمی تواند معیار مناسبی برای تشخیص نارسایی حاد کلیه در مدل گلیسرول باشد اما تصمیم گیری قطعی در باره آن نیاز به تحقیقات گسترده تری در مدل های آزمایشگاهی دیگر دارد.

واژه های کلیدی: کلیه، استریولوژی، معدل حجمی

مقدمه

نارسایی حاد کلیه یک سندرم بالینی است که سبب کاهش عملکرد کلیه و کم شدن میزان فیلتراسیون گلومرولی

در مدت زمان کوتاهی میگرد (1). علیرغم پیشرفت تکنیک های جدید در امر درمان این بیماری، هنوز تلفات ناشی از آن زیاد است. به طوری که در دهه های اخیر بیش از 50 درصد از مبتلایان از بین رفته اند (2). برای ایجاد نارسایی حاد کلیه در حیوانات مدل های تجربی مختلفی پیشنهاد شده است. یکی از این مدلها، مدل گلیسرول است که تزریق داخل عضلانی یا زیر پوستی این ماده منجر به تجزیه سلول های عضلانی و ایجاد بیماری کلیه از نوع رابدومیولیز می گردد (3). تأثیرات گلیسرول از طریق تحریک ترشح موضعی ماده ای بنام آدنوزین از کلیه می باشد (4).

*1- استادیار بافت شناسی - گروه علوم تشریحی

تلفن همراه: 0917 71 0758 Telfax: 0711 2304372

Email: dehghanf@sums.ac.ir

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شیراز

2و4- استادیار گروه بافت شناسی

3- استاد گروه فارماکولوژی

2- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اهواز

3- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شیراز

4- دانشکده علوم پزشکی جهرم

تاریخ دریافت: 83/2/19 تاریخ پذیرش: 84/7/7

وزن حدود 230-250 انتخاب و در شرایط استاندارد از نظر رطوبت، درجه حرارت، نور و دسترسی کافی به مواد غذایی و آب در قفس مخصوص نگهداری شدند. سپس حیوانات به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند.

در این مطالعه از مدل تجربی گلیسرول برای ایجاد نارسایی حاد کلیه استفاده شد به همین منظور به گروه آزمایش به میزان 10 میلی لیتر در برابر هر کیلوگرم وزن بدن، گلیسرول 50 درصد در نرمال سالین و به گروه شاهد به همین میزان نرمال سالین تزریق گردید. پس از گذشت 48 ساعت حیوانات تحت بیهوشی عمیق با اتر تشریح و کلیه راست آنها با محلول فرمالین 10 درصد فیکس گردید. کلیه ها در قالب آگاری قرار داده شد و با ماکروتوم قطعاتی به ضخامت 1 میلی متر (به اندازه 1/10 طول کلیه) فراهم گردید و از هر یک پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی در پارافین برش هایی با دستگاه میکروتوم و به ضخامت 5 میکرون فراهم و با رنگ معمولی (هماتوکسیلین-اؤزین) رنگ گردید.

لام های میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ پروجکتینگ و به روش شمارش نقطه ای، بر پایه اصل کاوالیه بررسی شد و حجم کلیه به دست آمد. سپس از هر کلیه 17 گلومرول به صورت تصادفی انتخاب و محاسبه حجم آن ها توسط روش کاوالیه (11) انجام گرفت.

معدل حجمی گلومرول ها و حجم کلیه توسط روش کاوالیه و به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید:

$$VG: \sum PG.a(p).t$$

$$m^2$$

$p(G) =$ مجموعه تعداد نقاط روی هر گلومرول

$a(p) =$ دامنه اطراف هر نقطه

$t =$ ضخامت هر برش

$m =$ بزرگنمایی میکروسکوپ

آنالیز آماری با استفاده از آزمون غیر پارامتری Mann-withney و نرم افزار SPSS انجام شد. اختلافات آماری به میزان $P < 0.05$ معنی داری در نظر گرفته شد.

تأثیرات آدنوزین، از طریق اثر برگیرنده های A1 موجود در عروق آوران کلیه، اعمال می شود به دنبال این عمل افزایش مقاومت عروقی در این رگها و در نهایت ایسکمی در کلیه پدیدار می گردد (4,5). مطالعات هیستوپاتولوژی نشان می دهد که بیشترین تأثیر گلیسرول بر روی لوله های پیچیده نزدیک است (6). اما از آنجا که بین تخریب لوله ها و آتروفی گلومرول ها ارتباط مستقیم وجود دارد (7). بنابراین تخمین حجم گلومرول های کلیه شاخص بسیار مناسبی جهت اندازه گیری میزان تصفیه گلومرولی و عملکرد کلیه ها به حساب می آید (8). تغییر در اندازه گلومرول ها در طی بیماری ها و آسیب های کلیوی بوجود می آید اما بسته به نوع آسیب واکنش گلومرول ها در قبال آن متفاوت می باشد. این واکنش می تواند به صورت کاهش و یا افزایش حجم گلومرول باشد. انقباض و کم شدن قطر مویرگ ها سبب کاهش حجم گلومرول و در نهایت کاهش میزان فیلتراسیون کلیوی می شود (9). افزایش حجم گلومرول ها سبب زیاد شدن میزان فیلتراسیون گلومرولی و عملکرد بیشتر کلیه ها می شود (10). برای اندازه گیری میزان این شاخص نیاز به تکنیک های پیشرفته اندازه گیری است. امروزه استفاده از تکنیک های استریولوژی برای اندازه گیری متغیرهایی مثل حجم گلومرول ها رایج شده است (8). یکی از این روش ها استفاده از اصل کاوالیه است که به عنوان یک روش استاندارد برای مطالعه حجم گلومرول ها پیشنهاد شده است. اصل کاوالیه براساس شمارش تعداد نقاط استوار می باشد بدین ترتیب که اگر نقاط در فضا به صورت تصادفی انتشار یافته باشند در این صورت تعداد نقاطی که بر روی یک جسم سه بعدی قرار می گیرند با حجم آن جسم رابطه مستقیم دارد (11). کاربرد این روش مستلزم اندازه گیری حجم گلومرول ها بر روی برش های سریالی از یک نمونه است و فاقد هرگونه پیش فرض در مورد شکل و اندازه گلومرول ها می باشد (12). بنابراین هدف از این بررسی تخمین معدل حجمی گلومرول ها در نارسایی حاد کلیه القاء شده بر روی موش صحرایی نر می باشد. در این تحقیق حجم کلیه نیز به عنوان یک بافت زمینه ای مورد بررسی قرار گرفت.

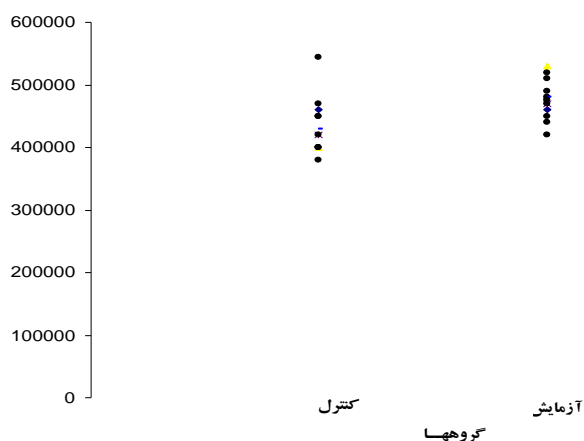
روش بررسی

تعداد 24 سر موش صحرایی از نژاد اسپراگو-داولی با

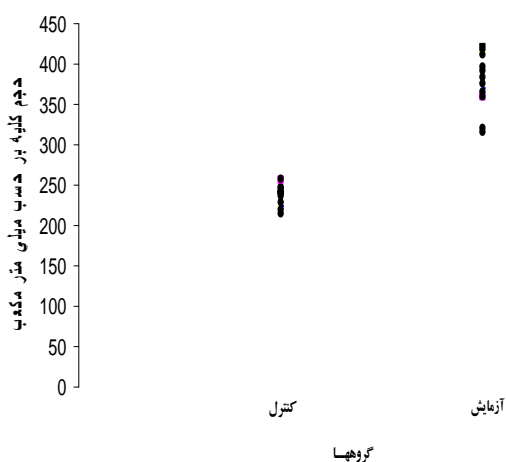
نتایج

یافته های بافتی: بررسی اسلاید های میکروسکوپی در الگوی نارسایی حاد کلیه ناشی از تزریق گلیسرول نشان داد که فضای لوله های کلیوی به علت تجمع کاست و پروتئین های آهن دار وسعت یافته است. اتصالات بین سلولی در اپی تلیوم بیشتر لوله ها از بین رفته و رسوب مواد فیبرینی بر روی سطح اپی تلیوم مشاهده گردید. در بسیاری از سلولهای این اپی تلیوم میزان هایی از نکروز دیده شد. این تغییرات در لوله های پیچیده نزدیک بیشتر از سایر قسمت ها وجود داشت. خیز و ادم در ناحیه بافت بینابینی قشر کلیه و تجمع کاست در لوله های کلیوی مشاهده گردید. ولی هیچگونه تغییری در ساختار گلومرول ها دیده نشد.

یافته های استریولوژی: نتایج داده های دو گروه آزمایش و شاهد در جدول (1) نشان داده شده است. یافته ها نشان می دهد که میزان معدل حجمی گلومرول ها بین دو گروه مورد بررسی تفاوت فاحشی را در سطح $p < 0.05$ نشان نمی دهد (نمودار 1). اما حجم کلیه در گروه آزمایش اختلاف معنی داری را در سطح $p < 0.05$ با گروه کنترل نشان می دهد (نمودار 2).



نمودار 1: ارتباط معدل حجمی گلومرولها در گروههای کنترل و آزمایش



نمودار 2: ارتباط بین حجم کلیه در گروه کنترل و آزمایش

جدول 1: میانگین معدل حجمی گلومرول ها μm^3 و حجم کلیه mm^3 در گروه کنترل و آزمایش

متغیر	معدل حجمی	ضریب خطای حجم کلیه	ضریب خطای	مؤثر حجم (میلیمتر مکعب)	مؤثر حجم (میلیمتر مکعب)
گروه	گلومرول \pm انحراف	مؤثر حجم	مؤثر حجم	مؤثر حجم	مؤثر حجم
	معیار (میکرومتر مکعب)	گلومرول ها	کلیه	کلیه	کلیه
کنترل	453921 \pm 28850	0/01	237 \pm 14	0/01	0/01
آزمایش	475637 \pm 32912	0/03	376 \pm 34	0/01	0/01

این امر بیانگر این مطلب است که نارسایی حاد کلیه ناشی از تجویز گلیسرول هیچ تأثیری بر روی اندازه و حجم گلومرول ها ندارد. اما می تواند سبب افزایش حجم کلیه شود. این اختلافات وابسته به تعداد نقاط موجود بر روی هر گلومرول است. اندازه گیری ضریب خطای استریولوژی در تمام گروههای مورد بررسی بین 0.03-0.01 متغیر بود که نشان دهنده پایداری بودن میزان خطا در روش فوق دارد.

بحث

اندازه گیری حجم گلومرول ها روش مناسبی برای شناخت بیماری های کلیه است (13). مشاهدات بالینی نشان می دهد که در بسیاری از بیماری ها و آسیب های وارده به کلیه حجم گلومرول ها تغییر می کند. تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که در بیماری دیابت نوع اول (14) سندرم نفروتیک (15) و نارسایی مزمن کلیه (16) حجم گلومرول ها زیاد می شود. نتایج حاصل از بررسی فوق نشان می دهد که گلیسرول تأثیری بر روی میزان معدل حجمی گلومرول ها ندارد. مطالعات آورا موویک (1999) نیز نشان داد که در نارسایی حاد کلیه ناشی از تجویز گلیسرول تغییری در اندازه و حجم گلومرول ها بین گروههای کنترل و آزمایش دیده نشد (17). تحقیقات دیگر نشان داد که در

تغییری پیدا نمی کند. اما در همین گروه حجم کلیه به طور معنی داری افزایش یافت. زیاد شدن حجم کلیه می تواند مربوط به تغییرات در اندازه ساختمان های موجود در کلیه مانند گلومرول ها، لوله های کلیه و ماده میان بافتی باشد. مطالعات بافتی در گروه آزمایش نیز حاکی از وجود خیز میان بافتی و تجمع کاست در لوله های کلیه بود که این تغییرات می تواند افزایش حجم در کلیه را توجیه نماید. پس افزایش حجم در کل کلیه بر اثر تجویز گلیسرول مربوط به افزایش اندازه گلومرول ها نیست و فاکتورهای دیگری نظیر ادم بینابینی و افزایش اندازه لوله های کلیوی می تواند بر این افزایش تأثیر بگذارد.

نتیجه گیری: براساس نتایج فوق می توان این گونه استنتاج نمود که در مدل تجربی نارسایی حاد کلیه القاء شده توسط گلیسرول هیچ تغییری در اندازه و حجم گلومرول های کلیه مشاهده نشد اما حجم کلیه زیاد شد. بنابراین تخمین معدل حجمی گلومرول ها در این مدل تجربی نمی تواند شاخص مناسبی برای ارزیابی میزان این بیماری باشد.

نارسایی حاد کلیه از نوع ایسکمی رگ ها به صورت موضعی وسیع و پر خون می شوند و این تغییر به دلیل کاهش جریان خون روی می دهد⁽¹⁸⁾ بنابراین، این احتمال بوجود می آید که در مدل تجربی گلیسرول که نوعی حالت ایسکمی است، وسیع شدن موضعی مویرگ های گلومرولی سبب افزایش حجم این ساختمان ها شود. اما طبق گزارش گاتون⁽¹⁹⁸⁶⁾ در مدل تجربی گلیسرول گلومرول ها منقبض شده و اندازه آنها کاهش می یابد⁽¹⁹⁾. بر همین اساس انتظار می رود که گلیسرول سبب کاهش حجم گلومرول ها شود. از آنجا که در این بررسی گلیسرول سبب تغییر در اندازه معدل حجمی گلومرول ها نشده است ولی براساس گزارشات فوق می توان این گونه استنباط نمود که گلیسرول می تواند موجب وسیع شدن مویرگ ها در بعضی از گلومرول ها شود و همین عامل سبب افزایش حجم این ساختمان ها گردد، از طرف دیگر می تواند باعث انقباض عده ای دیگر از گلومرول ها شود و حجم آنها را کاهش دهد بدین ترتیب معدل حجمی گلومرول ها تحت تأثیر گلیسرول

References

1. Smith JA, Whitaker EM, Bowmer CY, Yates MS. *Differential expression of renal adenosine A1 receptors induced by acute renal failure*. Biochem Pharmacol. 2000; 15; 59(6): 727-32.
2. Liebethal W, Nigam SK. *Acute renal failure. II Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable*. Am J Physiol Renal Physiol. 2000; 287(1): F1-F12.
3. Better OS, Stein JH. *Early management of shock and prophylaxis of acute renal in traumatic rhabdomyolysis*. N Engl J Med. 1990; 322:825.
4. Gould J, Bowmer CJ, Yates MS. *Renal hemodynamic responses to adenosine in acute renal failure*. Nephron. 1995; 71(2): 184-9.
5. Welch WJ. *Adenosine A1 receptor antagonists in the kidney: Effects in fluid retaining disorders*. Curr Opin Pharmacol. 2002; 2(2): 165-70.
6. Mlitoris BA, Sandoval R, Sutton TA. *Endothelial injury and dysfunction in ischemic acute renal failure*. Crit Care Med. 2002; 30(5): S235-40.
7. Kumar V, Cotran RS, Standy RL. *Basic pathology*. 6th ed. Saunders Company. 1997; 459-61.
8. Osterby Hans R, Gundersen HJG, Nyberg G, Aurell M. *Advanced diabetic glomerulopathy: Quantitative structural characterization of nonoccluded glomeruli*. Diabetes. 1987; 36:612-19.
9. Haley DP, Sarrafian M, Bulger RE, Dobyan DE, Fknoyan G. *Structural and functional correlates of effects of angiotensin-induced changes in rat glomerulus*. American Physiological Society. 1987; F111-119.
10. Basgen JM, Steffes MW, Stillman AE, Mauer M. *Estimating glomerular number in situ using*

- magnetic resonance imaging and biopsy*. *Kidney Int.* 1994; 45:1663-72.
11. Howard CV, Reed MG. *Unbiased stereology*. 1st ed. London: Bios Scientific Publisher, 1998: 39-54.
 12. Gundersen HJG, Jensen EB. *The efficiency of systemic sampling in stereology and its prediction*. *J Microsc.* 1987;147:229-63
 13. Fogo A, Hawkins EP, Berry PL, Glick AD, Chiang ML, Macdonell RC, Ishikawa I. *Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis*. *Kidney Int.* 1990; 38:115-23.
 14. Bilous RW, Mauer SM, Suther Land DER, Steffes MW. *Mean glomerular volume and rate of development of diabetic nephropathy*. *Diabetes*. 1989; 38:1142-47.
 15. Remuzzi A, Pergolizzi R, Mauer MS, Betani T. *Three-dimensional morphometric analysis of segmental glomerulosclerosis in the rat*. *Kidney Int.* 1990;38:851-6.
 16. Cahill MM, Ryan GB, Brtram F. *Biphasic glomerular hypertrophy in rats administered puromycin aminonucleoside*. *Kidney Int.* 1996; 50:568-775.
 17. Avramovic V, Vlahovic P, Mihailovic D, Stefanovic V. *Protective effect of a bioflavonoid proanthocyanidin-BP1 in glycerol- induced acute renal failure in the rat: renal stereological study*. *Ren Fail.* 1999; 21(6): 627-34.
 18. Mason J, Joeris B, Welsch J, Kriz W. *Vascular congestion in ischemic renal failure: the role of cell swelling*. *Minor Electrolyte Metab.* 1989; 15(3): 114-24.
 19. Gattone VH, Evan AP. *Quantitative renal vascular casting nephrology researches*. *Scan Electron Microsc.* 1986; 175(2): 442-8.