



بررسی استریولوژیک حجم کلیه در نارسایی حاد کلیه ی القا شده به وسیله ی گلیسرول در موش صحرایی نر

چکیده

مقدمه: بررسی کمی دگرگونی های ساختمانی، نقش مهمی در تشخیص بیماری و بررسی روند بهبود دارد. در این پژوهش، برای بررسی این دگرگونی در نارسایی حاد کلیه ی القا شده به وسیله ی گلیسرول در موش صحرایی از معیارهای استریولوژی (حجم کل کلیه، حجم کورتکس و حجم مدولا)، به عنوان معیار اندازه گیری استفاده شد. **روش کار:** شمار ۲۴ سرموش صحرایی نر از نژاد اسپراگو-داولی (Sprague-Dawley) برگزیده و به صورت تصادفی به دو گروه آزمایش و شاهد بخش گردید. به گروه آزمایش، میزان ۱۰ میلی گرم در برابر هر کیلوگرم وزن از محلول ۵۰ درصد گلیسرول و به گروه شاهد، به همین میزان حلال (نرمال سیلین)، به صورت درون ماهیچه ای تزریق گردید. پس از ۴۸ ساعت، موش ها، در بیهوشی عمیق، تشریح و پس از فیکس کردن به روش پرفوزیون عروقی با محلول فرمالین ۱۰ درصد، کلیه ی راست آنها برداشته شد. از هر کلیه، پس از انجام مراحل قالب گیری به وسیله ی آگار، برش هایی به ضخامت یک میلی متر تهیه گردید، سپس، از هر برش، پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی، در قالب های پارافینی برش هایی به ضخامت پنج میکرون فراهم و با همتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی گردید. لام های میکروسکوپی آماده شده، با استفاده از روش شمارش نقطه ای و اصل کاوالیه، بررسی و حجم کل و حجم بخش قشری و مرکزی کلیه به دست آورده شد. **یافته ها:** حجم کل کلیه در گروه آزمایش بیشتر از گروه شاهد بود و این افزایش، ارتباطی معنی دار را با افزایش حجم کورتکس نشان داد. به نظر می رسد که این تغییر حجم، به تغییرات آسیب شناختی در کلیه مربوط باشد. **نتیجه:** در این بررسی تلاش گردیده است، که تغییر حجم در کلیه و نواحی گوناگون آن در این الگوی تجربی از نارسایی حاد کلیه بررسی گردد زیرا، روش بالا به علت داشتن خطای کمتر، می تواند روشی مناسب برای

فرزانه دهقانی*،
دکتر عبدالرحمان دزفولیان**،
دکتر محمد رضا پنجه شاهین***،
دکتر سید ضیاء الدین تابعی،
دکتر حیات ممبئینی،
شهلا ظهیری*
*دانشجوی دکترای بافت شناسی،
**استاد یار گروه بافت شناسی،
استاد گروه داخلی،
دانشگاه علوم پزشکی اهواز
***دانشیار گروه فارماکولوژی،
استاد گروه پاتولوژی،
دانشگاه علوم پزشکی شیراز

نویسنده مسوول:
فرزانه دهقانی
اهواز، دانشکده ی پزشکی،
بخش بافت شناسی
تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۴۳۷۲
E-mail:
Dehghanf@sums.ac.ir

اندازه گیری تغییرحجم در بافت ها و اندام های کالبد باشد. اما تصمیم گیری برای کاربرد آن در درمانگاه، به بررسی های گسترده تر نیاز دارد.

کلید واژه ها: استریولوژی، حجم، نارسایی حاد کلیه، گلیسرول

مقدمه

بدن جنین، با استفاده از روش کاوالیه انجام گرفته است [۶،۷]. از آنجا که بیماری های کلیوی یکی از مشکلات بزرگ در جوامع امروز است، بنابراین، توجه دقیق به ساختار و کارکرد آن، می تواند نقشی مهم در سلامت فردی بر عهده داشته باشد. یکی از بیماری های شایع این اندام، نارسایی حاد کلیه است، که با وجود تلاش گسترده در امر درمان این بیماری، هنوز بیشتر از ۵۰ درصد از مبتلایان، در برابر خطر مرگ قرار دارند [۸]. بنابراین، بررسی این بیماری در ابعاد گوناگون دانش زیستی، دارای اهمیتی به سزا است. برای بررسی نارسایی حاد کلیه در حیوانات آزمایشگاهی، روش های تجربی گوناگونی پیشنهاد گردیده و بررسی های زیاد درباره ی هر یک از آنها انجام شده است. الگوی تجربی برگزیده شده در این پژوهش، الگوی گلیسرول است، که مانند ایجاد نارسایی حاد کلیه در اثر ضربه یا آسیب های ماهیچه ای در انسان است [۹]. تزریق این ماده، به صورت درون ماهیچه ای یا زیر پوستی در حیوانات آزمایشگاهی، موجب بروز نارسایی حاد کلیه بدلیل رابدومیولیز می شود [۱۰]. گلیسرول موجب تجزیه ی سلول های ماهیچه ای و گلبول های قرمز و رها سازی پروتئین های آهن دار می گردد [۱۱]. رسوب این پروتئین در لوله های کلیوی، به همراه تنگی رگ های خونی کلیوی، ناشی از افزایش آدنوزین [۱۲]، موجب آسیب به لوله های پیچیده ی نزدیک و دور در قشر کلیه می شود. به دنبال این تغییرات، کارکرد کلیه دچار اختلال می شود [۱۳]. به نظر می رسد، که دگرگونی های ساختاری

استریولوژی، دانشی است، که با استفاده از قوانین ساده ی ریاضی به محاسبه ی کمی و سه بعدی ساختارهای میکروسکوپی و ماکروسکوپی می پردازد. به این ترتیب که، با استفاده از کمیت های قابل مشاهده در تصویرهای دو بعدی، می تواند کمیت هایی مانند طول، سطح و حجم را اندازه گیری کند [۱]. این دانش، در بافت شناسی و آسیب شناسی تجربی و بالینی جایگاهی ویژه دارد و دریچه ای تازه را در امر تشخیص و درمان بیماری ها گشوده است. تعیین حجم، یکی از معیارهای مهم در شناخت ساختار اندام ها به شمار می آید و بررسی این معیار، در بسیاری از بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است. تعیین حجم اندام ها با روش هایی گوناگون انجام گرفته است. یک روش سنتی، که بر پایه ی اصل ارشمیدس پایه گذاری شده، غوطه ور سازی در آب و جابه جایی آن است، که به دلیل نفوذ آب به درون اندام ها، از اهمیت آن کاسته شده است [۲]. امروزه، روش های استریولوژیکی گوناگون برای تعیین حجم ساختار های اندام های مورد نظر معرفی گردیده، که عبارت هستند از روش کاوالیه، روش دیسکتور، روش وایبل-گومز و روش MPA [۳،۴]. از میان آنها، روش کاوالیه، به عنوان روش استاندارد طلایی معرفی گردیده است زیرا، در این روش، خطای استریولوژیکی کمتر بوده و هیچگونه پیش فرضی در باره ی شکل، اندازه و موقعیت ساختار مورد بررسی وجود ندارد [۵]. در سال های اخیر، پژوهش هایی زیاد برای اندازه گیری حجم بافت های بدن مانند قلب، مغز، شش و

$$CE = \frac{\sqrt{3a+c-4b}}{\sum p}$$

$$a = P_i \cdot P_i$$

$$b = P_i \cdot P_i + 1$$

$$c = P_i \cdot P_i + 2$$

استفاده شد.

در ضمن، وزن همه ی کلیه ها پس از فیکس شدن، با استفاده از ترازوی رایانه ای اندازه گیری شد. آنالیز آماری، با استفاده از آزمون غیر پارامتری من-ویتنی (Mann-Whitney) و نرم افزار SPSS انجام شد. اختلافات آماری به میزان $p < 0/05$ ، معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته ها

واکاوای داده ها ی دو گروه شاهد و آزمایش، در جدول شماره ی یک نشان داده شده است. یافته های آزمایش های یاد شده نشان می دهد که، در بین حجم کلیه و حجم بخش قشری آن، در دو گروه یاد شده، اختلاف معنی دار به میزان $p < 0/05$ وجود دارد. بنابراین، گلیسرول موجب افزایش حجم کلیه و بخش قشری آن می شود. این در حالی بود، که حجم مدولا در گروه آزمایش اختلافی معنی دار با گروه شاهد نشان نداد. این اختلافات، به شمار نقاط موجود بر روی هر یک از بخش های کلیه مربوط بود. همچنین، وزن کلیه در گروه آزمایش افزایش یافته، به گونه ای که، اختلاف معنی دار به میزان $p < 0/05$ ، نسبت به گروه شاهد نشان داد. اندازه گیری خطای آزمایش در همه ی معیارهای یاد شده پایین بود و این امر، نشان دهنده ی دقت اندازه گیری در روش استریولوژی بالا میباشد. بررسی لام های میکروسکوپی در الگوی تجربی، نارسایی حاد کلیه، ناشی از تزریق گلیسرول نشان داد، که فضای لوله های کلیوی، به علت افزایش تجمع کاست و پروتئین های

مواد و روش

بالا موجب دگرگونی در حجم کلیه می گردد، این دگرگونیهای احتمالی را می توان در حجم کل و در بخش های قشری و مرکزی کلیه بررسی کرد.

شمار ۲۴ سر موش صحرایی نر از نژاد اسپراگو-داولی، با وزن حدود ۲۳۰ تا ۲۵۰ گرم انتخاب و به صورت تصادفی، به دو گروه آزمایش و شاهد بخش گردید. به گروه آزمایش، به میزان ۱۰ میلی لیتر در برابر هر کیلوگرم وزن، گلیسرول ۵۰ درصد در نرمال سیلین و به گروه شاهد، به همین میزان محلول نرمال سیلین تزریق گردید. پس از ۴۸ ساعت، حیوانات تحت بیهوشی عمیق تشریح و کلیه ی راست آنها با روش پرفوزیون عروقی با محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید. پس از یک هفته، کلیه ها در قالب آگاری گذارده شدند و با ماکروتوم هیستولوژی، برش هایی به ضخامت یک میلی متر فراهم گردید. از هر کلیه، در حدود ۱۲ برش به دست آمد و از هر یک، پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی، برش هایی به ضخامت پنج میکرون به وسیله ی دستگاه میکروتوم فراهم و با رنگ معمولی (هماتوکسیلین ائوزین) رنگ گردید. لام های میکروسکوپی، با استفاده از میکروسکوپ پروجکتینگ و به روش شمارش نقطه ای، بر پایه ی اصل کاوالیه بررسی شد و حجم کل، حجم قشر و حجم مدولا با استفاده از فرمول زیر بدست آمد [۳،۲].

$$V = \sum P \cdot a(p) \cdot t$$

$\sum P$ = شمار نقاط

$A(P)$ = مساحت هر نقطه

T = ضخامت برش

CE = خطای اندازه گیری

برای اندازه گیری خطای آزمایش در استریولوژی از فرمول:

جدول ۱: میانگین وزن و حجم کلیه، همراه با محاسبه ی شمار نقاط بر روی هر یک از بخش های بالا و محاسبه ی میزان خطای اندازه گیری

گروه ها	حجم کل (میلی متر مکعب)	شمار نقاط کل	خطای اندازه گیری	حجم قشر (میلی متر مکعب)	شمار نقاط قشر	خطای اندازه گیری	حجم مدولا (میلی متر مکعب)	شمار نقاط مدولا	خطای اندازه گیری	وزن کلیه (گرم)
شاهد	۲۳۷/۶	۱۴۸۵	۰/۰۲	۲۲۰/۵۲	۱۰۶/۷۵	۰/۰۳	۱۷/۰۸	۱۰۶/۷۵	۰/۰۲	۰/۸۶
	۴/۰۸	۲۵/۴۹		۳/۴۹	۴/۳		۰/۶۹	۴/۳		۰/۰۰۱
آزمایش	۳۷۶/۹۷	۲۳۵۶/۰۸	۰/۰۲	۳۵۷/۸۴	۱۱۹/۵۸	۰/۰۲	۱۹/۱۳	۱۱۹/۵۸	۰/۰۲	۱/۲۳
	۱۰/۰۳	۶۲/۶۹		۹/۱	۶/۱		۰/۹۸	۶/۱		۰/۰۰۲
P-value	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		۰/۱۰۶	۰/۱۲۸		۰/۰۰۰

کلیه در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد، به گونه ای معنی دار افزایش یافته است و این افزایش، به دلیل زیادتر شدن حجم در ناحیه ی قشر است. بنابراین، ارتباطی معنی دار میان حجم کل کلیه و حجم قشر مشاهده گردید و این، در صورتی بود، که هیچ رابطه ای معنی دار میان حجم کل کلیه و حجم مدولا دیده نشد. خطای اندازه گیری در این آزمایش اندک بود و این عامل، نشان دهنده ی دقت در این روش به شمار می آید. از سویی، وجود خیز میان بافتی و تجمع کاست در لوله های کلیوی ناحیه ی قشر، می تواند افزایش حجم در این ناحیه را توجیه کند. در ضمن، وزن کلیه در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایشی معنی دار را نشان داد، که می تواند بیانگر افزایش حجم کلیه باشد. پژوهش بومر، نیز نشان داد که در الگوی نارسایی حاد کلیه، ناشی از تجویز گلیسرول، وزن کلیه در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد بیشتر بود و این عامل، نشان دهنده ی درستی آزمایش بالاست [۱۵]. در الگوی تجربی دیگر از نارسایی حاد کلیه، ناشی از تجویز لیتیم، آشکار گردید، که حجم کلیه نسبت به گروه شاهد، افزایش چشمگیر داشته است [۱۶]. هین کلیف، نشان داد، که وزن کلیه، معیاری برای اندازه گیری میزان تکامل در کلیه جنین انسان به شمار می آید و تغییرات حجم در کلیه جنین، به هنگام تکامل، به وسیله ی تصویرهای ام . آر . آی، که جایگزین برش های بافتی شده است، قابل بررسی است و

آهن دار، وسعت یافته است. اتصالات میان سلولی در اپی تلیوم بیشتر لوله ها از میان رفته و رسوب مواد فیبروزی بر روی سطح اپیتلیوم مشاهده گردید. در بسیاری از سلول های اپی تلیوم لوله ها، میزان هایی از نکروز دیده شد. این دگرگونی ها در لوله های پیچیده ی نزدیک، بیشتر از دیگر بخشها وجود داشت. خیز در ناحیه ی بافت بینابینی قشر کلیه دیده شد ولی هیچگونه تغییری در ساختار گلومرول ها مشاهده نگردید.

بحث

برای تشخیص نارسایی حاد کلیه، روش هایی گوناگون پیشنهاد گردیده است. یکی از این روش ها که به طور رایج در درمانگاه استفاده می شود، اندازه گیری اوره و کراتینین سرم و میزان فیلتراسیون گلومرولی است [۱۴]. در کنار این معیارها، اندازه گیری حجم کلیه نیز می تواند به عنوان شاخصی مهم مطرح گردد، هر چند حجم کلیه با روش غوطه ورسازی و جایگزینی در آب قابل اندازه گیری است، اما به دلیل وجود خطای زیاد (به میزان ۵۰ درصد)، روشی مناسب نیست [۲]. امروزه، روش کاوالیه برای محاسبه ی حجم بافت ها، به عنوان روشی کار آمد و با خطای بسیار ناچیز معرفی گردیده است [۴]. یافته های آزمایش های بالا برای تعیین حجم کلیه به روش کاوالیه، نشان داد، که حجم

بافت های کالبد، می تواند بیانگر میزان آسیب باشد و این تغییرات، به دلیل کمتر بودن خطای اندازه گیری می تواند کاربردی زیاد در امر درمان داشته باشد. اما برای رسیدن به نتیجه ی قطعی، بررسی های بیشتر و گسترده تر نیاز است.

از این روش، می توان برای اندازه گیری میزان رشد کلیه به هنگام تکامل جنین بهره جست [۱۷]. الیوتی نیز روش مورفومتری و استریولوژی را، به عنوان یک معیار اندازه گیری برای بررسی میزان رشد در کلیه ها معرفی کرد [۱۸]. بررسی ها نشان می دهد، که تغییر حجم در

A Stereological Study of Kidney Volume in Glycerol-Induced Acute Renal Failure in Male Rats

Background: Quantitative changes of histopathological structures are important in the process of improvement or regression of diseases. The aim of this study was to stereologically assess kidney volume (cortex and medulla) in glycerol-induced acute renal failure (ARF).

Materials and Methods: Twenty-four Sprague Dawley rats were selected and randomly divided into two groups. In the case group, ARF was induced by intramuscular injection of 50% glycerol (10 ml/kg). The control group received the same amount of saline solution. After 48 hours, anesthetized rats were sacrificed and the right kidneys were fixed by formalin perfusion. Kidneys were embedded in agar block and 1 mm thick slices were prepared by microtome. Each slice was processed and stained by hematoxylin eosin. Microscopic slides were used to measure the kidney volume using the point counting method and Cavalieri principle. **Results:** Kidney volume in the experimental group was more than that in the control group and there was a significant relationship between the cortex and whole kidney volumes. **Conclusion:** It seems that pathological changes coincided with volume changes. Although this procedure is unbiased, the results should be supported by further studies.

Keywords: Stereology, Renal failure, Glycerol

منابع

- [1]Vesterby A: Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using vertical section. *Anat Rec* 1993;235:325-34.
- [2]Weibel ER: *Stereological methods: Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press, Vol .I 1979.
- [3]Lane PH, Steffs MW, Mauer SM: Estimation of glomerular volume: A comparison of four methods. *Kidney Int* 1992;41:1085-9.

F. Dehghani*,
A. Dezfulian**, Ph.D.,
M.R. Panjehshahin***,
Ph.D., S.Z. Tabei, M.D.,
H. Mombeini, M.D.,
Sh. Zahiri*,
*Ph.D. Candidate,
**Assistant Professor of
Histology, Associate
Professor of Internal
Medicine,
Ahwaz University of
Medical Sciences
*** Associate Professor
of Pharmacology,
Professor of Pathology,
Shiraz University of
Medical Sciences

Correspondence:
F. Dehghani
Ahwaz School of Medicine,
Department of Histology,
Ahwaz, Iran
Tel: +98-711-2304372
E-mail:
dehghanf@sums.ac.ir

- [4] Lane H: Methods in laboratory investigation. *Lab Invest* 1995;72(6):765-70.
- [5] Gundersen HJG, Jensen EB: Stereological estimation of the volume weighted mean volume of arbitrary particle observed on random sections. *J Microsc* 1985;138:127-42.
- [6] Gundersen HJG, Jensen EB: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147:229-36.
- [7] Howard CV, Reed MG: *Unbiased stereology*. 1st ed. London: Bios Scientific Publisher, 1998:39-54.
- [8] Molitoris BA, Sandoval R, Sutton TA: Endothelial injury and dysfunction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 2002;30(5):235-40.
- [9] Ishikawa I, Shikura N, Takada K et al.: Changes of adenosine level in the carotid artery, renal vein and inferior vena cava after glycerol or mercury injection in the rat. *Nephron* 1993;64(4):605-8.
- [10] Stefanovic V, Savic V, Vlahovic P et al.: Reversal of experimental myoglobinuric acute renal failure with bioflavonoids from deeds of groups. *Ren Fail* 2000;22(3):225-66.
- [11] Baliga R, Zhang Z, Baliga M et al.: Evidence for cytochrome p-450 as a source of catalytic iron in myoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int* 1996;49(2):362-9.
- [12] Osswald H, Gleiter C, Muhlbauer B: Therapeutic use of theophylline to antagonize renal effects of adenosine. *Clin Nephrol* 1995;43(1):533-7.
- [13] Bohle A, Christensen J, Kokot F et al.: Acute renal failure in man: New aspects concerning pathogenesis. A morphometric study. *Am J Nephrol* 1990;10(5):374-88.
- [14] Neuser D, Hirth- Diertrich C, Stasch JP et al.: Influence of calcium antagonists on renal function and secondary hyperparathyroidism in acute renal failure in rats. *Ren Fail* 1990;12(4):221-5.
- [15] Bowmer CJ, Collis MG, Yates MS: Effect of the adenosine antagonist 8-phenyltheophylline on glycerol-induced acute renal failure in the rat. *Br J Pharmacol* 1986; 88(1):205-12.
- [16] Marcussen N, Peter D, Olsen TS: Atubular glomeruli in lithium-induced chronic nephropathy in rats. *Lab Invest* 1989;61(3):295.
- [17] Hinchliffe SA, Sargent PH, Chan YF et al.: Medullary ray glomerular counting as a method of assessment of human nephrogenesis. *Pathol Res Pract* 1992;188(6):775-82.
- [18] Olivetti G, Anversa P, Malissari M et al.: Morphometry of the renal corpuscle during postnatal growth and compensatory hypertrophy. *Kidney Int* 1980;17:438-54.