

# اثر استات سرب بر ساختار بافتی کلیه موش صحرایی یک روزه نژاد ویستار

دکتر مهناز آذرنیا

گروه بافت شناسی دانشگاه تربیت معلم

دکتر عباس شکور

متخصص آسیب شناسی قانونی، معاونت امور پژوهشی آموزشی سازمان پزشکی قانونی کشور

وحید حمایت خواه جهرمی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی دانشگاه تربیت معلم

## چکیده

تزیق سرب، روی سیستم عصبی، استخوان، سیستم هماتوپتیک و کلیه، عملکرد سمی ایجاد می کند. از بین این بافتها، سرب در بالاترین سطح در کلیه تجمع می کند و باعث ایجاد تغییرات پاتوبیولوژیکی مشخص در ساختمان و عملکرد کلیه می گردد. مسمومیت انسان با این فلز سمی باعث می شود، که حالت بند بندی لوله ای در کلیه ها از بین رفته و آتروفی و فیبروز موضعی ایجاد شود. در این مطالعه تاثیر سرب بر ساختار بافتی کلیه موش صحرایی یک روزه مورد بررسی قرار گرفت. در طی دوران حاملگی به موشهای گروه تجربی، سرب محلول در آب مقطر به مقدار ۰/۶ گرم، در لیتر به صورت خوراکی و محلول در آب آشامیدنی و به موشهای گروه کنترل، فقط آب مقطر به صورت خوراکی داده شد. نوزادان آنها در روز اول زایمان تشریح شدند و ابتدا مورد بررسیهای مورفومتریک و سپس با میکروسکوپ نوری، مورد بررسیهای هیستوپاتولوژیک قرار گرفتند. مطالعات حاصله از این تجربه نشان داد که در این مقدار سرب، اختلاف معنی داری در افزایش وزن بدن و افزایش ضخامت کورتکس و مدولا و قطر گلوبرول و کاهش فضای کپسول بومن مشاهده می شود و ضایعاتی نیز از قبیل نکروز، گست گرانولار، ارتشاح خفیف آماسی در بافت بینابینی، آتروفی لوله ای به صورت منطقه ای و افزایش سلولاریت مزانژیتال در ساختار بافتی کلیه، ایجاد گردید. هیچگونه تغییر پاتولوژیکی در موشهای گروه کنترل مشاهده نشد. موشهایی که سرب دریافت کرده بودند به طور معنی داری، وزن بدنی بیشتری نسبت به موشهای گروه کنترل داشتند و این امکان وجود دارد که شاید این اختلافات وزنی به بعضی از تغییرات بافتی ایجاد شده مرتبط باشد. با توجه به مطالعات بسیاری که انجام گرفته است، مشخص شده است که سرب به آسانی قادر است از جفت عبور نماید و بر جنین اثر بگذارد. به این ترتیب تغییرات و ضایعات مشاهده شده در گروه تجربی را می توان به سهولت به تاثیر سرب نسبت داد.

## مقدمه

کلیوی غیرقابل برگشت، تا ۱۲ ماه ادامه پیدا می کند (۱۹۸۰).  
*Aviv et al*. سمیت مزمن سرب در کلیه انسان، باعث می شود که حالت بندبندی لوله ای از بین برود و آتروفی لوله ای و فیبروز موضعی ایجاد شود (Bennett, ۱۹۸۵). در این تحقیق اثر استات سرب بر اثر تجویز سرب به موش صحرایی حامله در کلیه نوزاد یک روزه آن، بر ساختار بافتی کلیه موش صحرایی یک روزه نژاد ویستار، مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روشها

## ۱- مواد

- استات سرب به مقدار  $0.16 \text{ g/lit}$  به صورت خوراکی و محلول در آب مقطر برای تیمار کردن گروه تجربی  
 - آب مقطر برای تیمار کردن گروه کنترل  
 - محلول فیزیولوژی رینگر جهت شستشوی کلیه  
 - رنگ *H and E* جهت رنگ آمیزی

## ۲- حیوانات

از ۳۰ موش صحرایی ماده و ۱۰ موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم جهت انجام این تحقیق استفاده گردید، حیوانات که از موسسه تحقیقاتی پاستور تهیه شده بودند، در اتاق مخصوص پرورش حیوانات در دانشگاه تربیت معلم، تحت شرایط استاندارد (۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۸-۱۸) در قفسهای مخصوص نگهداری شدند.

آب و غذا به مقدار کافی در تمامی اوقات در اختیار حیوانات قرار داشت.

سپس هر حیوان نر را با سه حیوان ماده جهت جفتگیری هم قفس کردیم تا حیوانات ماده، باردار شوند. بعد از این مدت حیوانات نر را جدا کردیم. بعد از مراحل جفتگیری و مشاهده پلاک واژنی، حیوانات ماده حامله به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند.

## ۳- تیمار کردن حیوانات

در طی دوران حاملگی به حیوانات ماده حامله گروه تجربی، محلول استات سرب  $0.16 \text{ g}$  گرم در لیتر به صورت خوراکی و

امروزه به دلیل گسترش صنعت و استفاده روزافزون بشر از مواد شیمیایی مختلف، هوای اطراف و محیط زیست ما به انواع مواد سمی و خطرناک آلوده شده است. یکی از این مواد، که در هوا به مقدار زیاد وجود دارد و مسمومیت‌های شدیدی را موجب می شود، سرب است. هرچند مراکز صنعتی بیشماری که از سرب استفاده می کنند از بین رفته اند، با این وجود ورود بیش از حد سرب به محیط زیست، به عنوان مساله ای که سلامت عمومی را تهدید می کند، ادامه دارد (۱۹۷۶، *Smithberg*).

کودکان در مقایسه با بالغین در برابر اثرات محیطی سرب آسیب پذیرتر هستند. چون جذب معده ای روده ای سرب در کودکان بیشتر است. بیشترین خطری که افراد بالغ را تهدید می کند گردوغبار ناشی از سرب در صنعت است (۱۹۸۶ *Pollock and, Ibels*) بیش از چندین سال است که مسمومیت با سرب یا *Pulmbism* شناخته شده است و یکی از قدیمی ترین عناصری است که انسان را تحت تاثیر قرار می دهد. *Nikander*, ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد، اولین کسی بود که علائم مسمومیت کلیوی ناشی از سرب را، که شامل قولنج و رنگ پریدگی بود. شرح داد (۱۹۸۲، *Wedeen*). از بین بافتهای مختلف، سرب در بالاترین سطح در کلیه تجمع پیدا می کند و تغییرات پاتوبیولوژیکی مشخصی، در ساختمان و عمل کلیه، بوجود می آید (۱۹۷۱، *Goyer*). علائم کلیوی مسمومیت با سرب در شرایط حاد، در حیوانات و انسان شرح داده شده است که عبارتند از گلیکوزوریا، آمینواسیدوریا و فسفاتوریا. مطالعات نشان داده اند که سرب می تواند، به طور مستقیم عملکرد ناقلین آمینواسیدهای خنثی و بازی را در میکروویلوس های روده و کلیه مهار کند. از آنجا که سرب همچنین قادر است سنتز ۱، ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین *D* را کاهش دهد، بنابراین هیپرفسفاتوریا و هیپوفسفاتمی ایجاد شده در اثر سمیت سرب در کودکان، می تواند به دمینرالیزاسیون و راشی تیسس استخوان منجر شود (۱۹۹۵، *Waldegger et al*).

در حیوانات تجربی، تزریق غلظتهای بالای سرب، منجر به افزایش فیلتراسیون گلومرولی می شود. این روند بصورت کاهش پیش رونده در میزان فیلتراسیون گلومرولی و نقایص

## ۵- محاسبات آماری

در بررسی اخیر، اطلاعات حاصله با استفاده از کامپیوتر و با کاربرد تستهای آماری  $T$ -test و آنالیز واریانس در سطح احتمال ( $P < 0/05$ ,  $P < 0/001$ ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و نتایج استخراج گردید.

## نتایج

در این تحقیق به بررسیهای مورفومتریک و هستیوپاتولوژیک ایجاد شده بوسیله سرب در کلیه، بر روی موشهای صحرایی یک روزه پرداختیم.

نتایج حاصله نشان می دهد که وزن نوزادان یک روزه گروه تجربی، وزن، طول، عرض و ضخامت کلیه، اندازه ضخامت کورتکس و مدولا، قطر گلوبول افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد و قطر فضای کپسول بومن به دلیل افزایش سلولاریته گلوبول در گروه تجربی کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد که در جدول ۱ و ۲ نمایش داده شده است. ( $P < 0/05$ ,  $P < 0/001$ )

محلول در آب آشامیدنی و به موشهای گروه کنترل فقط آب مقطر به صورت خوراکی داده شد.

## ۴- مطالعات مورفومتریک و هستیوپاتولوژیک

در اولین روز زایمان، تمامی نوزادان را از مادران آنها جدا کرده و آنها را از نظر وزن بدن به وسیله ترازوی دقیق آنالیتیکال مورد بررسی قرار دادیم. سپس از هر گروه، تعداد ۳۰ موش صحرایی یک روزه را به وسیله اتر بیهوش کرده و آنها را تشریح کردیم. کلیه موشها بعد از جدا کردن، جهت شستشو به داخل محلول رینگر، پستاندار (سرم فیزیولوژی) انتقال داده شدند. وزن کلیه ها بوسیله ترازوی دقیق آنالیتیکال و ابعاد کلیه (طول، عرض و ضخامت) با استفاده از کولیس ورنیه دار اندازه گیری شد. در مرحله بعد کلیه ها جهت ثبوت به داخل فیکاتیو انتقال داده شدند و بعد از قالب گیری، برش برداری و تهیه لام، لامها با رنگ  $H$  and  $E$  رنگ آمیزی شدند و برای مطالعات هستیوپاتولوژیکی به کمک میکروسکوپ نوری و تهیه عکس آماده شدند.

مشاهدات	وزن بدن (g)	وزن کلیه (g)	طول کلیه (mm)	عرض کلیه (mm)	ضخامت کلیه (mm)
گروه کنترل	4/5499± 0/1562	1/835x10-2± 4/204x10-2	4/9550± 4/833x10-2	2/9317± 30/959x10-2	2/83± 4/261x10-2
گروه تجربی	5/0763± 9/607x10-2	2/292x10-2± 6/652x10-4	5/2083± 4/064x10-2	3/21± 3/050x10-2	3/0933± 2/339x10-2
P	P<0/001	P<0/001	P<0/05	P<0/001	P<0/05

جدول ۱ - نتایج تحلیل آماری در مورد وزن بدن، طول، عرض و ضخامت کلیه در رتهای یک روزه

مشاهدات	ضخامت کورتکس (میکرون)	ضخامت مدولا (میکرون)	قطر گلوبول (میکرون)	قطر فضای بین گلوبولی (میکرون)
گروه کنترل	415/22± 26/2131	878/74± 20/2258	59/3333± 1/2293	8/5333± 0/3706
گروه تجربی	482/56± 21/8184	936/24± 14/052900	68/4± 1/8405	3/9333± 0/3105
P	P<0/001	P<0/001	P<0/05	P<0/001

جدول ۲ - نتایج تحلیل آماری در مورد ضخامت کورتکس، مدولا، قطر گلوبول و قطر فضای بین گلوبولی کلیه در موشهای یک روزه

قسمتهایی از کلیه از قبیل گلوبول ها، لوله خمیده نزدیک، لوله خمیده دور و کپسول بومن تغییراتی را در نمونه های

در برشهای سریال که از بافت کلیه موشهای یک روزه گروه کنترل و گروه تجربی، تهیه شده بود و به کمک میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت، ساختمان

د: در نمونه های تجربی، آتروفی لوله ای به صورت منطقه ای دیده می شود که لوله ها از بین رفته و یا در حال از بین رفتن می باشند و جای آنها را بافت فیبری پر می کند. این ضایعات در نمونه های کنترل دیده نمی شود (تصاویر ۷ و ۸).

ه: در نمونه های تجربی، افزایش سلولار پاره مزانژیال (پرسلولی شدن گلمرولها) به چشم می خورد که نمای برگ شبدری به خود گرفته است. به دلیل تحریکاتی که به سلولها وارد می شود تقسیمات میتوزی شروع می شود و بر تعداد سلولها افزوده می شود. به دلیل افزایش سلولار پاره گلمرولی، فضای کپسول بومن نیز کاهش می یابد. چنین حالتی در نمونه های کنترل دیده نمی شود (تصاویر ۹ و ۱۰).

تجربی نشان داد و ضایعات بافتی مشاهده شد، که این تغییرات و ضایعات بافتی به قرار زیر است:

الف: در نمونه های تجربی، نکروز سلولی در توبول ها و بویژه توبول پروکسیمال مشاهده می شود. نکروز به قدری وسیع است که حدود سلولها از هم قابل تشخیص نیست و تشخیص توبول دیستال از توبول پروکسیمال مشکل می باشد. در نمونه های کنترل هیچگونه تغییری دیده نمی شود (تصاویر ۱ و ۲).

ب: در نمونه های تجربی، گست دانه دار قابل مشاهده است که به شکل یک ماده هموزن و یکنواخت به نظر می رسد و به دلیل اختلال در عمل فیلتراسیون و عدم باز جذب مواد و بویژه پروتئین ها توسط سلولها ایجاد می گردد. در نمونه های کنترل، آماس دیده نمی شود (تصاویر ۵ و ۶).



تصویر ۲ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه تجربی

بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی *H and E*

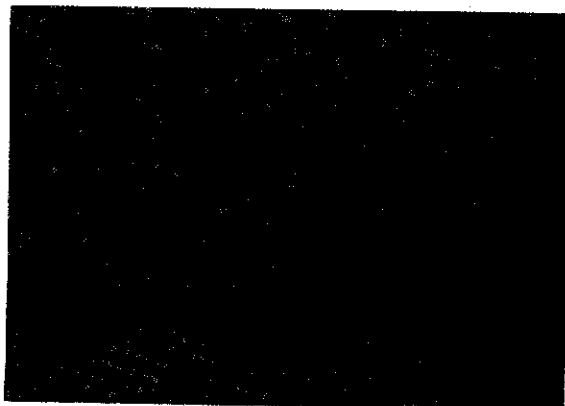
به نکروز سلولی در توبولهای دیستال و پروکسیمال توجه شود (N). نکروز به قدری وسیع است که امکان تشخیص توبولها از همدیگر وجود ندارد.



تصویر ۱ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه کنترل

بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی *H and E*

P - توبول پروکسیمال D - توبول دیستال  
در این فتومیکروگراف نکروز مشاهده نمی شود.



تصویر ۴ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه تجربی بزرگنمایی ۸۰۰، رنگ آمیزی *H and E* به کاست گرانولار توجه شود (c). کاست به شکل ماده هموژن و یکنواخت بنظر می رسد که به دلیل اختلال در عمل فیلتراسیون ایجاد می شود.



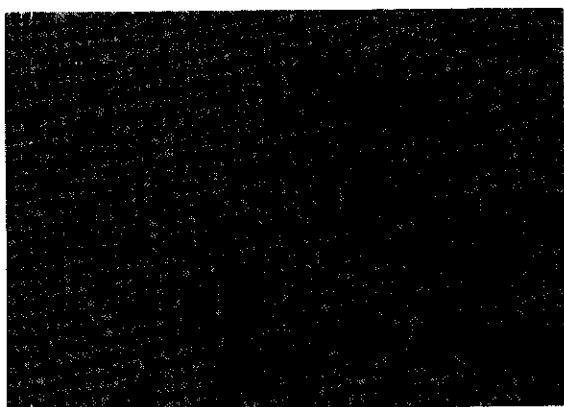
تصویر ۳ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه کنترل. بزرگنمایی ۸۰۰، رنگ آمیزی *H and E* اثری از کاست گرانولار دیده نمی شود



تصویر ۶ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه تجربی بزرگنمایی ۸۰۰، رنگ آمیزی *H and E* به ارتشاح خفیف آماسی در بافت بینابینی و افزایش لنفوسیتها توجه شود (L)



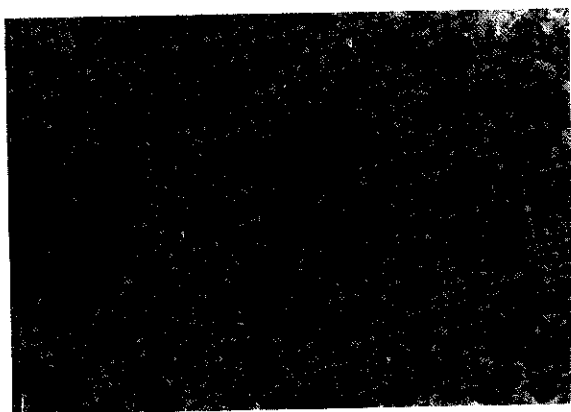
تصویر ۵ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه کنترل. بزرگنمایی ۸۰۰، رنگ آمیزی *H and E* - بافت بینابینی در این فتومیکروگراف آماس مشاهده نمی شود.



تصویر ۸ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه تجربی بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی *H and E* به آتروفی شدن لوله ها بصورت منطقه ای توجه شود (A). لوله ها از بین رفته و یا در حال از بین رفتن هستند و بافت فیبری جانشین آنها شده است



تصویر ۷ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه کنترل. بزرگنمایی ۴۰۰، رنگ آمیزی *H and E* *D* - توبول دیستال *P* - توبول پروکسیمال در این فتومیکروگراف لوله ها کاملاً طبیعی اند و دستخوش آتروفی نشده اند.



تصویر ۱۰ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه تجربی بزرگنمایی ۲۰۰۰، رنگ آمیزی *H and E* به افزایش سلولاریته گلومرول و کاهش فضای کپسول بومن در توجه شود. *G* - گلومرول



تصویر ۹ - فتومیکروگراف از مقطع کلیه موش صحرایی یک روزه گروه کنترل بزرگنمایی ۲۰۰۰، رنگ آمیزی *H and E* *G* - گلومرول *B* - فضای کپسول بومن این فتومیکروگراف هیچ گونه تغییری مشاهده نمی شود.

## بحث

مطالعات نشان داده اند، که سرب به آسانی قادر است از جفت عبور نماید و بر جنین اثر بگذارد (Clark, 1977) و به این ترتیب تغییرات و ضایعات مشاهده شده در گروه تجربی را می توان به راحتی به تاثیر سرب نسبت داد. با توجه به نتایج بدست آمده، چنین ملاحظه می شود که رشد و نمو در موشهای صحرایی یک روزه گروه تجربی، که مادران آنها در طی دوران بارداری سرب به مقدار ۰/۱۶ گرم در لیتر دریافت کرده اند، افزایش یافته است. افزایش رشد و نمو در مورد موشهای یک روزه گروه تجربی، به صورت افزایش وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل، مشاهده می شود ( $p < 0.001$ ). هم چنین علاوه بر افزایش وزن بدن، وزن کلیه در موشهای یک روزه گروه تجربی، افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل پیدا کرده است ( $p < 0.001$ ) Singh و همکارانش در سال ۱۹۷۶ گزارش کردند، که افزایش وزن موشهای تغذیه شده با سرب، به دلیل تمرکز و تجمع سرب، در اندامهای مختلف بدن آنها می باشد. هم چنین Vyskocil و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان دادند، که وزن کلیه در موشهای تیمار شده با سرب، نسبت به رتهای گروه کنترل، افزایش معنی داری پیدا کرده است. این را افزایش در ابعاد کلیه به دلیل آماس و تکثیر سلولی در بافت کلیه است.

از بین بافتهای مختلف، سرب در بالاترین سطح در کلیه تجمع می کند و باعث ایجاد تغییرات پاتوبیولوژیکی مشخص، در ساختمان و عملکرد کلیه می شود (Goyer, 1971). فاز اولیه مسمومیت با سرب، در کلیه موش بوسیله ظهور تغییرات مخرب و دژنراتیو مثلاً نکروزیس در توبول های پروکسیمال کلیه، مشخص می شود (تصویر ۲). مسمومیت با سرب در کلیه انسان باعث می شود که حالت بندبندی لوله ای از بین برود و آتروفی ایجاد شود (تصویر ۸). مسمومیت طولانی تر با سرب، باعث ایجاد تغییرات شدید و غیرقابل برگشتش در اپی تلیوم توبول های کلیه، از قبیل تخریب، تکثیر (تصویر ۱۰) و خسارتهای نئوپلاستیک می گردد (Nolan & Shikhh, 1985 Bennett). کلیه یکی از بافتهای هدف، در

مسمومیت های ناشی از سرب است. این چنین فرض می شود که پروتئین های اختصاصی کلیوی متصل شونده به سرب (a - ۲ میوگلوبین) که قادرند انتقال سرب به داخل هسته و اتصال آن را، به DNA تسهیل کنند، ممکن است به عنوان رسپتورهای اختصاصی بافت، برای سرب عمل کنند با این پدیده این نظر که چرا فقط سلولهای مشخصی در بافتهای ویژه، بوسیله این فلز تحت تاثیر قرار می گیرند توجیه شود (Fowler, 1989). پروتئین های کلیوی متصل شونده، به سرب، با داشتن یک محصول کلیواژی N - ترمینال a - ۲ میوگلوبین، که در حضور سرب، به صورت اجتماع به سر می برد، یافت می شود. تجمع این پروتئین در توبولهای پروکسیمال کلیه، باعث مرگ آنها می شود و نکروزیس رخ می دهد (Fowler & Duval, 1991). با توجه به شباهت مسیر متابلیکی سرب و کلسیم، اختلال در اعمال سلولی وابسته به کلسیم را می توان یکی از مکانیسم های موثر در بروز ناهنجاریهای ناشی از مسمومیت سرب دانست. (1984, Pounds). پروتئین های گیرنده کلسیم نظیر کالمودولین، کالسمی مدین ها، پروتئین کیناز C، تروپونین و غیره می باشند. مطالعات نشان داده اند که سرب در جایگاههای اتصال به این پروتئین ها با کلسیم رقابت می کند و جانشین آن می شود و سیستم رسپتوری را مختل می کند. اختلال در اعمال آنزیم پروتئین کیناز C، به خصوص از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. پروتئین کیناز C توسط کلسیم و دی آسپیل گلسیرول فعال می شود و طیف وسیعی از کینازها و فسفاتازها را فعال می کند، لذا بر روند تقسیم سلولی، تکثیر و ارتباط سلولی و غیره تاثیر می گذارد.

احتمالاً سرب در نتیجه اختلال در سیستم رسپتوری پروتئین کیناز C، وارد عمل می شود و سبب بروز ضایعات و تغییرات بافتی، در کلیه می گردد. نتایج فوق، اثرات پاتولوژیک سرب بر ساختار بافتی کلیه موش صحرایی یک روزه نژاد ویستار را، مورد تایید قرار میدهد.

- 1 \_ Aviv A, Bernstein J, Goldsmith DI, Spitzer A. (1980). Lead intoxication during development: its late effects on kidney function and blood pressure. *Kidney Int.*, 17, pp (430-437).
- 2 \_ Bennett, W.M.(1985). Lead nephropathy. *Kidney Int.*, 28, pp (212-220)
- 3 \_ Clark A.R.L. (1977). Placental transfer of lead and its effects on the newborn postgrad. *Med. J.*, 53, PP (667-678).
- 4 \_ Fowler BA. (1989). Biological roles of high affinity metal-binding proteins in medicatang cell injury. *Comments Toxicol.*, 3, pp (27-46).
- 5 \_ Fowler BA, Duval G. (1991). Effects of lead on the kidney: roles of high-affinity lead- binding proteins. *Environ Health Perspect.*, 91, pp (77-80).
- 6 \_ Goyer, R.A. (1971). Lead and the kidney. *Curr. Topics. Pathol.*, 55,pp (147-176).
- 7 \_ Nolan, C.V., and Shaikh, Z.A. (1992). Lead nephrotoxicity and associated disorders: Biochemical mechanisms. *Toxicology.* 73,pp (127-146).
- 8 \_ Pollock C.A, Ibels L.S. (1986). Lead intoxication in industry. *Med. J. Aust.*, 145, pp (635-639).
- 9 \_ Pounds J.G. (1984): Effects of lead intoxication on calcium homeostasis and calcium-mediated cell function. *A review neurotoxicol.*, 5, pp (295-332).
- 10 \_ Singh N.P., Thind I.S., Vital I.F, and Pawlow M. (1976). Lead content of tissues of baby rats born of and nourished by lead poisoned mothers. *J. Lab. Clin. Med.*, 87, pp (273-280)
- 11 \_ Smithberg M. (1967). Inbred strains of mice in teratology. *Advan. Teratol.*, 2, pp (258-288).
- 12 \_ Vyskocil, A., Cizkova, M., Tejnorova, I. (1995). Effects of prenatal and postnatal exposure to lead on kadniy function in male and female rats., 15, pp (327-328).
- 13 \_ Waldegger S, Schmidt F, Harzer T, Gukbins E, Schuster A, Biber J, and Lang F. (1995). *Heavy Int.*, 47, pp (1677-1681).
- 14 \_ Wedeen RP. (1982). The role of lead in renal failure. *Clin. Exp. Dialysis. Apheresis.*, 6 pp (113-146).