

آنالیز استریولوژیک گلومرول‌های کلیه بدنبال مسمومیت مزمن با سرب

دکتر حمیدرضا محمودزاده ثاقب* دکتر زهرا حیدری* دکتر عبدالرحمن دزفولیان** دکتر سیدمحمدحسین نوری*** دکتر پادماکار چیت‌نیس**

چکیده

روشهای استریولوژیک به منظور به دست آوردن اطلاعات کمی در ارتباط با ساختمانهای سه بعدی از مقاطع بافتی بکار می‌روند. هدف پژوهش حاضر استفاده از تکنیکهای جدید و بدون تورش استریولوژی جهت بررسی تغییرات حجم و تعداد گلومرولهای کلیه پس از کاربرد مزمن استات سرب بصورت کمی و در محیط سه بعدی می‌باشد. سرب یکی از فلزات سنگین است که اثرات منفی بر عملکرد کلیه دارد. این اثرات هم لوله‌ها و هم گلومرولها را درگیر می‌نماید. در مورد اثرات سرب روی بافت کلیه و گلومرولها مطالعات هیستولوژیک کیفی زیادی انجام شده است و در مواردی تغییر در حجم و تعداد گلومرولها گزارش شده است.

در این مطالعه چهار گروه رت نر بالغ (هر گروه $n=9$) به صورت تصادفی انتخاب شد. گروههای آزمایش به ترتیب مورد تجویز محلول آشامیدنی استات سرب ۰/۵٪ و ۱٪ به مدت ۸ هفته قرار گرفتند. گروه شاهد آب مقطر و گروه شاهد مثبت محلول اسید استیک ۰/۴٪ در همان مدت دریافت کردند. آنالیز استریولوژیک شامل تعیین حجم مرجع ($V_{Refrence}$)، کسر حجمی گلومرولها (V_{VGlom}) و حجم گلومرولها (V_{Glom}) با استفاده از اصول کواولیه انجام شد. چگالی عددی گلومرولها (N_{VGlom}) و تعداد کل گلومرولها (NT_{glom}) نیز با روش دیسکتور فیزیکی محاسبه شد.

نتایج حاصل نشان داد تعداد گلومرولها در گروه مورد تجویز استات سرب ۱٪ کاهش معنی‌داری نسبت به گروههای شاهد و شاهد مثبت از خود نشان می‌دهد ($P < 0.05$). اما در گروه مورد تجویز استات سرب ۰/۵٪ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). از طرف دیگر بدنبال مسمومیت با سرب حجم کل گلومرولها در هر دو گروه مورد تجویز استات سرب (۰/۵٪ و ۱٪) در مقایسه با گروههای شاهد و شاهد مثبت تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان می‌دهد ($P < 0.01$). بررسی حاضر، نتایج تحقیقات هیستولوژیک مشاهده‌ای کیفی را با روشی دقیق و بدون سوگیری تأیید نموده نشان دهنده تغییرات در تعداد و حجم گلومرولهای کلیه بدنبال مسمومیت با سرب می‌باشد (مجله طبیب شرق، سال سوم، شماره ۲، ص ۷۹ تا ۸۶، تابستان ۱۳۸۰).

کل واژه‌ها: استریولوژی، اصل کواولیه، دیسکتور فیزیکی، گلومرول، کلیه، استات سرب

مقدمه

حقیقی استوار شده بود. به عبارت دیگر یک پیش فرض یا مدل در ارتباط با سوژه مورد نظر (گلومرول) در نظر گرفته می‌شد.^(۱) روشهای مختلفی برای محاسبه تعداد و حجم

قبل از سال ۱۹۸۴ روشهای استریولوژیک برای محاسبه تعداد و اندازه ذرات بر پایه فرضیاتی در ارتباط با شکل، اندازه و نحوه قرارگیری آنها در فضای سه بعدی

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، بخش بافت شناسی
 ** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اهواز، دانشکده پزشکی، بخش بافت شناسی
 *** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، دانشکده پزشکی، بخش بافت شناسی

مسمومیت مزمن با سرب گزارش کرده‌اند.^(۷) همچنین گزارشاتی مبنی بر عدم تغییر بیشتر گلومرولها به جز افزایش تعداد سلولهای اندوتلیال و مزانژیال گلومرولی به دنبال آلودگی با سرب شده است.^(۵) مطالعات کیفی دیگری مبتنی بر اندازه‌گیری قطر گلومرولها بدنال مسمومیت با سرب در حیوانات آزمایشگاهی نشان می‌دهد علیرغم اینکه تغییری در قطر گلومرولها رخ نداده است اما در همین حال هیپرتروفی کورتکس کلیه و افزایش میزان پالایش گلومرولی (GFR) بوقوع می‌پیوندد.^(۸)

از آنجائیکه دفع مواد زاید حاصل از متابولیسم بطور عمده توسط پالایش و ترشح از موینه‌های گلومرولی صورت می‌گیرد، محاسبه تعداد و حجم گلومرولها که بطور غیرمستقیم نماینده سطح پالایش‌کننده می‌باشد از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بدین جهت تعیین تفاوت حجم کل گلومرولها به عنوان شاخصی از سطح کل پالایش گلومرولی در نظر گرفته می‌شود.^(۹) بنابراین محاسبه تعداد و حجم گلومرولها اهمیت زیادی در ارتباط با عملکرد کلیه در بیماریهای مختلف کلیوی دارد.

مواد و روش کار

چهار گروه ($n=9$) رت نر بالغ از نژاد Wistar محدود و وزنی 10 ± 94 گرم تهیه شده از مؤسسه حصارک کرج بصورت تصادفی انتخاب شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذا در قفس‌های مجزا قرار گرفتند. گروه‌های تجویز، محلول استات سرب $0/5\%$ و 1% را به عنوان آب آشامیدنی دریافت کردند. به منظور جلوگیری از رسوب، استات سرب در آب مقطر حاوی $0/4\%$ اسید استیک حل شد. گروه شاهد مثبت محلول $0/4\%$ اسید استیک و گروه شاهد آب مقطر به عنوان آب آشامیدنی دریافت کردند. پس از ۸ هفته حیوانات توسط اتر بی‌هوش شدند و کلیه‌ها در آورده شد. پس از جداسازی کپسول، کلیه در فیکساتیو Lillie تغییر

گلومرولها وجود دارد. اما اکثر این روشها دارای تورش (Bias) بوده و ناکارآمد می‌باشند. در سنوات اخیر روشهایی ابداع شده است که بر خلاف روشهای قدیمی که بر پایه جداسازی ذرات و شمارش در مقاطع مستقل بود، بر پایه مقاطع جفت (Paired Sections) قرار دارد. این روشهای جدید فاقد تورش (Unbiased) و کارآمد (Efficient) می‌باشند.^(۱) محاسبه حجم با بهره‌گیری از اصول کاوالیه (Cavalieri's Principles) بوده است. روش دیسکتور (Dissector) به همراه روش کاوالیه تخمینی مستقیم و بدون تورش از تعداد گلومرولها را ممکن می‌سازد.^(۳) در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از اصول کاوالیه محاسبه حجم مرجع (حجم کورتکس) و حجم گلومرولها صورت گرفت. محاسبه تعداد گلومرولها با استفاده از روش دیسکتور فیزیکی (Physical Dissector) به همراه روش کاوالیه به عنوان تنها راه استریولوژیک بدون تورش صورت گرفت. با محاسبه تعداد و حجم گلومرولها در گروه‌های مورد تجویز استات سرب و مقایسه آنها با گروه‌های شاهد بطور غیر مستقیم عملکرد کلیه به دنبال مسمومیت مزمن با سرب مورد مطالعه قرار گرفت.

در انسان جذب سرب از طریق دستگاه تنفس و گوارش صورت می‌گیرد و در سه قسمت مهم بدن شامل خون، استخوان و بافت‌های نرم مانند کبد، مغز، عضلات و کلیه‌ها توزیع می‌شود و جذب گوارشی و توزیع سرب در حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش صحرایی آزمایشگاهی (Rat) شبیه انسان می‌باشد.^(۴) از جمله تأثیرات نامطلوب سرب اختلال در عملکرد طبیعی کلیه می‌باشد. این اثرات هم لوله‌ها و هم گلومرول‌های کلیوی را دربر می‌گیرد.^(۶) بیماری‌های کلیوی از عوارض مسمومیت با سرب می‌باشد که قسمت‌های مختلف بافت کلیه از جمله گلومرولها را به صورت‌های متفاوتی تحت تأثیر قرار می‌دهد. از جمله اسکروز گلومرولی و به دنبال آن کاهش میزان پالایش خون به وقوع می‌پیوندد.^(۶) مطالعات هیستوپاتولوژیک با مشاهده در محیط دوبعدی از بین رفتن و کاهش تعداد گلومرولها و افزایش حجم گلومرول‌های باقی‌مانده را به دنبال

توسط میکروپروژکتور بر روی میز کار انداخته شد. سپس یک ترانس پرنسی متشکل از شبکه نقاط منظم به صورت تصادفی بر روی نمونه انداخته شد نقاط برخورد کننده با کورتکس در تمام مقاطع اول هر کلیه شمارش شد، پس از آن با استفاده از فرمول زیر حجم کورتکس محاسبه شد:

$$V = \sum_{i=1}^m P.a(p).t^{-}$$

مجموع نقاط برخورد کرده با کورتکس، $a(p)$ قلمرو اطراف هر یک از نقاط سیستم آزمون، t متوسط ضخامت مقاطع و m بزرگنمایی می باشد. (۱۲ و ۱۱) حجم گلومرولها به این طریق محاسبه شد که ابتدا کسر حجمی گلومرولها (V_{VGlom}) از رابطه زیر و با کمک شبکه نقاط منظم محاسبه گردید:

$$V_{VGlome} = \frac{\text{Volume of glomeruli in refrence space}}{\text{Volume of Cortex}} = \frac{\sum_{i=1}^m P(\text{Glomeruli})}{\sum P(\text{Cortex})}$$

عبارت است از مجموع نقاط سیستم آزمون برخورد کرده با گلومرولها و $\sum P(\text{cortex})$ تعداد نقاط برخورد کرده با کورتکس کلیه می باشد. سپس حجم کل گلومرولها از رابطه زیر حساب شد. (۱۳)

$$V_{\text{Total (Glomeruli)}} = V_{(\text{cortex})}. V_v(\text{Glomeruli})$$

نیز برخورد نداشت، آن گلومرول شمرده شد و در غیر این صورت از شمارش آن خودداری شد. (۲) سپس با استفاده از فرمول زیر دانسیته عددی گلومرولها محاسبه شد:

$$N_v = \frac{\sum \sigma^-}{a/f.h. \sum p}$$

$\sum \sigma^-$ عبارت است از مجموع گلومرولهایی که شمارش شدند $\sum P$ مجموع نقاط همراه با فریمها که به فضای مرجع برخورد کرده اند، h ارتفاع دیسکتور و a/f مساحت فریم تقسیم بر مربع بزرگنمایی می باشد. هر کدام از فریمهای

یافته به مدت ۷۲ ساعت برای انجام ثبوت بافتی قرار داده شد. سپس از هر حیوان یک کلیه به صورت تصادفی انتخاب شد و پس از شستشو در محلول سالین نرمال در آگار ۷٪ قالبگیری شد. بلافاصله پس از قالبگیری، قالب حاوی کلیه به قطعات ۱ میلی متری بریده شد. بدین ترتیب برخورد تیغ برنده با اولین قسمت کلیه کاملاً تصادفی بود. (۷) سپس بجز اولین برش که از نمونه گیری حذف شد بقیه قسمتها با حفظ جهت پاساژ معمول بافتی داده شد. از قالبهای پارافینی توسط میکروتوم مقاطع جفت با فاصله ۲۱ میکرومتر تهیه و با روش $H\&E$ رنگ آمیزی صورت گرفت. (۱۱ و ۱۰)

روش استریولوژی: محاسبه حجم مرجع (V_{Ref}) که در مطالعه حاضر حجم کورتکس کلیه می باشد با استفاده از اصول کاوالیه به ترتیب زیر صورت گرفت. اسلاید اول در هر سری مقاطع جفت انتخاب شد تصویر مقطع مربوط

شمارش تعداد گلومرولها با روش دیسکتور

فیزیکی: برای انجام این عمل از دو میکروپروژکتور استفاده گردید و در زمان واحد تصویر اصل از دو اسلاید متوالی شاهد و مرجع بر روی میز کار انداخته شد. بزرگنمایی خطی برابر با ۱۷/۷ اندازه گیری شد. با استفاده از گرید مخصوص دیسکتور، ۵۰ میدان دید در هر کلیه بصورت تصادفی منظم انتخاب شد و شمارش گلومرولها صورت گرفت. بدین صورت که اگر نمای گلومرول در مقطع مرجع وجود داشت و در مقطع شاهد مشاهده نشد و در همین حال مورد مشاهده با خطوط ممنوع گرید دیسکتور

تفاوت معنی دار آماری از خود نشان می دهد ($P < 0/05$). میانگین تعداد کل گلومرولها در گروهی که مورد تجویز استات سرب $0/5\%$ قرار گرفتند برابر با 365 ± 30092 می باشد و تفاوت معنی دار آماری بین این گروه و گروههای شاهد و شاهد مثبت وجود ندارد ($P < 0/05$). از طرف دیگر تفاوت معنی داری بین گروههای شاهد و شاهد مثبت و نیز بین دو گروه مورد تجویز استات سرب با یکدیگر مشاهده نشد ($P > 0/05$) (نمودار ۲).

بحث

آلودگی با سرب حالت تجمعی دارد. در انسان به آهستگی اما به طور پیشرونده ایجاد شده و سرانجام باعث از کارافتادن کلیه ها می شود.^(۱۴) پژوهش حاضر به شرح تأثیرات استات سرب بر روی بافت کلیه از دیدگاه کمی در یک دوره ۸ هفته ای پیوسته در مدل آزمایشگاهی پرداخته است. در انسان بالغ مواجهه پیوسته با سرب بویژه در محیط های کاری که با سرب سروکار دارند باعث ضایعات کلیوی مزمن و پیشرونده می شود و در صورت پیشگیری از آلودگی تنها قسمت اندکی از ضایعات وارده قابل برگشت خواهد بود. مطالعات قبلی که بر روی مدل های آزمایشگاهی در ارتباط با ضایعات کلیوی به دنبال مسمومیت با سرب صورت گرفته نشان می دهد که شدت ضایعات وارده بر بافت کلیه به مدت و میزان آلودگی با سرب بستگی دارد.^(۸) در یک مطالعه نشان داده شده که رت هایی که به میزان ۲ درصد استات سرب در آب آشامیدنی دریافت کرده اند مبتلا به ضایعات هیستوپاتولوژیک در کلیه ها شده اند.^(۱۵) اما بر خلاف آن در مطالعه حاضر کلیه گروههایی که دوزهای بالاتر از 2% دریافت کرده اند پس از گذشت 3 ± 14 روز بدلیل امتناع از مصرف آب آشامیدنی حاوی استات سرب تلف شدند. گزارش شده است که تجویز مقدار $0/5\%$ استات سرب برای مدت ۲ ماه هیچگونه تغییر هیستولوژیک و تغییر در عملکرد کلیه ایجاد نمی کند در حالیکه تجویز مقدار 1% استات سرب برای مدت ۳ ماه

دیسکتور در مرکز دارای یک نقطه می باشد. در صورتیکه این نقطه در فضای مرجع قرار گیرد حجم آن دیسکتور به مجموع افزوده خواهد شد.

برای محاسبه تعداد کل گلومرولها چگالی عددی گلومرولها در حجم مرجع ضرب شد تا تعداد کل گلومرولها بدست آمد^(۱-۳):

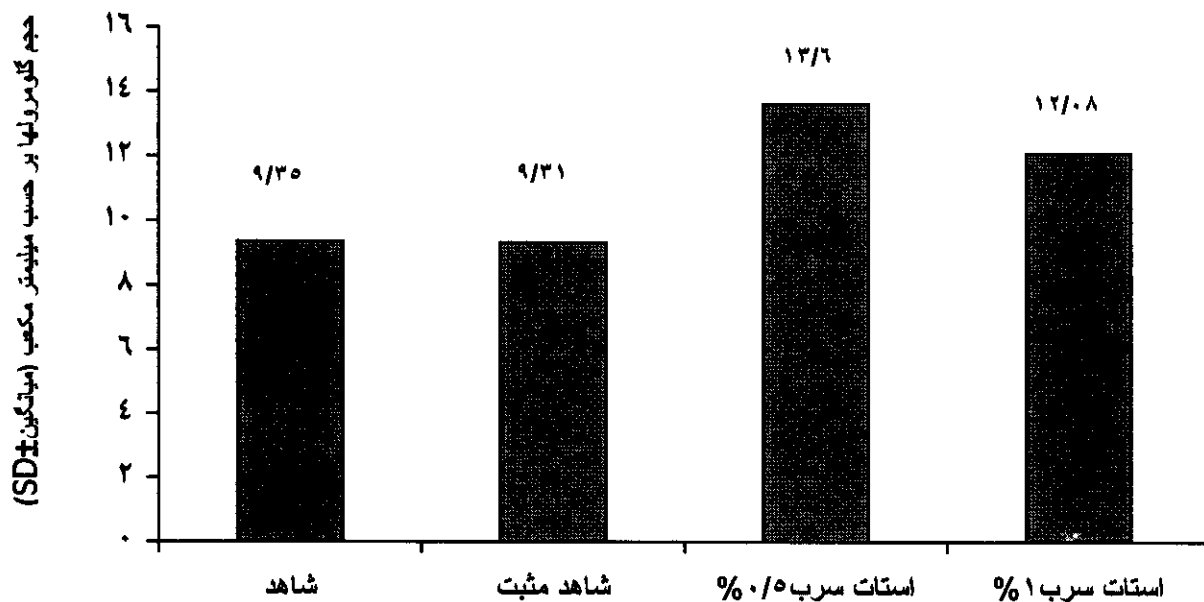
$$N_{Total} = N_{V_{Glomeruli}} \cdot V_{Cortex}$$

نتایج حاصل از محاسبات استریولوژیک توسط نرم افزار SPSS 9.0 توسط آنالیز واریانس یک طرفه بین سوژه ای و آزمونهای آماری (HSD) و Tukey و Scheffe، در سطح $P < 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج حاصل به صورت میانگین و انحراف معیار میانگین بیان شده است.

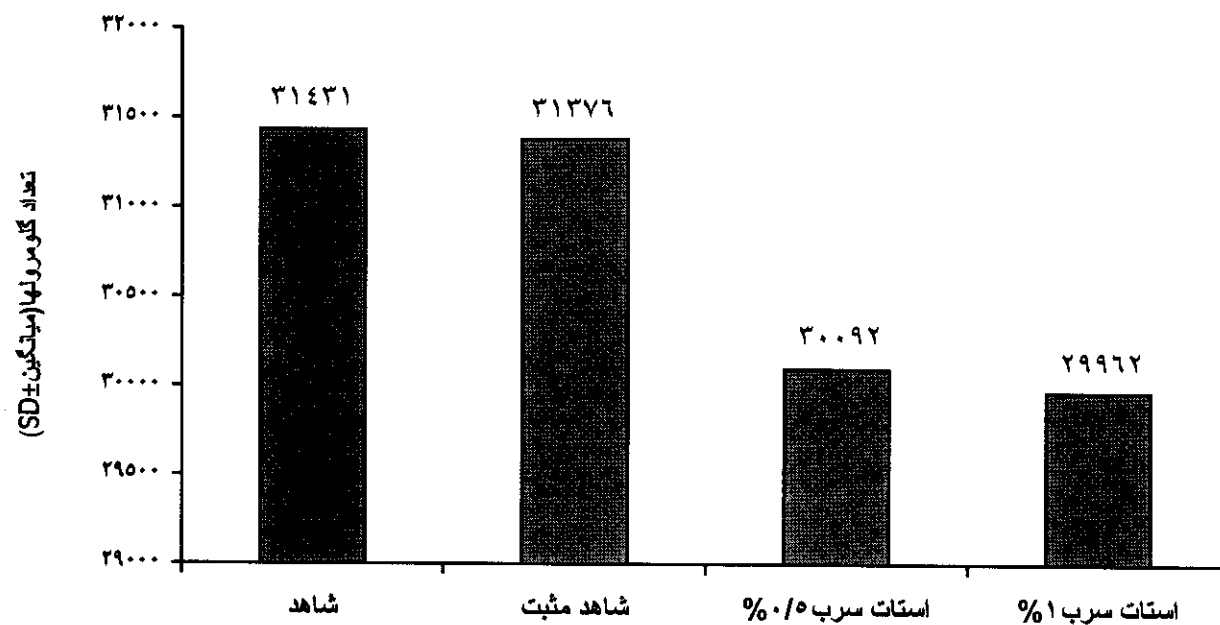
نتایج

یافته های این تحقیق نشان می دهد که میانگین حجم کل گلومرولها به دنبال ۸ هفته تجویز استات سرب $0/5\%$ برابر با $31 \pm 13/6$ میلی متر مکعب می باشد. همچنین میانگین حجم گلومرولها در گروهی که طی این مدت استات سرب 1% دریافت کرده اند برابر با $45 \pm 12/08$ و گروه شاهد مثبت برابر با $31 \pm 9/18$ و گروه شاهد برابر با $35 \pm 9/19$ می باشد که تفاوت آماری معنی داری نسبت به گروههای شاهد و شاهد مثبت از خود نشان می دهد ($P < 0/001$). در همین حال تفاوت بین دو گروه شاهد و شاهد مثبت و نیز بین دو گروه تجویز استات سرب $0/5\%$ و 1% از نقطه نظر آماری معنی دار نمی باشد ($P > 0/05$) (نمودار ۱).

میانگین تعداد کل گلومرولها در گروهی که مورد تجویز استات سرب 1% قرار گرفتند برابر با 339 ± 29962 می باشد که در مقایسه با گروه شاهد با میانگین 331 ± 31431 و گروه شاهد مثبت با میانگین 209 ± 31376



نمودار ۱- تاثیر سرب بر حجم گلومرولهای کلیه در گروههایی که ۸ هفته تحت تجویز استات سرب قرار داشتند ($p < ۰/۰۰۰۱$)



نمودار ۲- تعداد گلومرولهای کلیه در گروههایی که ۸ هفته تحت تجویز استات سرب قرار داشتند ($p < ۰/۰۰۵$)

که مهم ترین ویژگی مسمومیت با سرب ناپدید شدن گلومرولها است و گلومرولهای باقیمانده بعضی به مقدار زیادی بزرگ شده اند و بعضی دیگر اندازه طبیعی خود را حفظ کرده اند. این مطالعه نیز بر اساس مشاهده مستقیم در محیط دو بعدی صورت گرفته است.^(۷) در تحقیق حاضر شمارش گلومرولها با بهره گیری از روش دیسکتور فیزیکی در یک محیط سه بعدی صورت گرفته و نشان داد که کاهش تعداد گلومرولها در گروه های مورد تجویز استات سرب ۰/۵٪ و ۱٪ در مقایسه با گروه شاهد از نقطه نظر آماری معنی دار می باشد. همچنین بعضی از مطالعات حاکی از آن است که بدنال تجویز استات سرب حجم گلومرولهای کلیوی افزایش یافته اما تغییرات قابل ملاحظه ای در ساختار بافت شناسی گلومرولها مشاهده نمی شود. تنها در مطالعه در بعضی حیوانات افزایش تعداد سلولهای اندوتلیال و احتمالاً مزانژنال در لایه احشائی کپسول بومن گزارش شده است.^(۵) اگرچه بررسی افزایش تعداد سلولهای اندوتلیال و مزانژنال در این گزارش بر اساس مطالعات کیفی بوده و نیاز به بررسی استریولوژیک و تعیین میزان این افزایش دارد، اما افزایش حجم گلومرولهای باقی مانده در گروه های دریافت کننده استات سرب در تحقیق حاضر با این نتایج هماهنگی دارد.

سطح تصفیه و شدت تصفیه گلومرولی تا حد زیادی به یکدیگر وابستگی دارند.^(۱۸) از این جهت در مسمومیت مزمن با سرب کاهش تعداد گلومرولها همراه با افزایش حجم کل گلومرولی مشاهده می شود. بنابراین نه تنها سطح تصفیه ای از بین رفته به این ترتیب جبران گردیده است بلکه حجم گلومرولی و نسبت حجم به تعداد گلومرولهای باقیمانده افزایش یافته است. این افزایش دلالت بر افزایش میزان تصفیه دارد. نتیجه گیری از این پژوهش نشان می دهد که در مسمومیت با سرب تعداد زیادی از گلومرولها دچار تغییر می شوند. بنابراین با توجه به اهمیت علم استریولوژی در تعیین کمی تغییرات ناشی از مسمومیت با سرب و ضایعات هیستوپاتولوژیک وارد شده به بافت کلیه، پیشنهاد می شود اندازه گیری سه بعدی سایر عناصر تشکیل دهنده

باعث تغییرات هیستولوژیک در لوله های پیچیده نزدیک می شود.^(۸) همچنین در مسمومیت با لیتیم مشاهده شده است که تفاوت بسیار زیادی در اندازه گلومرولها ایجاد می شود.^(۱۶) مطالعه حاضر بصورت کمی صورت گرفت و با توجه به اهمیت گلومرولها بر روی عملکرد کلیه، تغییرات در تعداد حجم گلومرولها مورد توجه قرار گرفته است. تعداد گلومرولهای کلیوی در گروهی که مورد تجویز استات سرب ۱٪ قرار داشتند تغییرات معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد و شاهد مثبت از خود نشان می دهد. در حالیکه در گروه مورد تجویز استات سرب ۰/۵٪ تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه های فوق الذکر مشاهده نمی شود. نتایج این تحقیق نتایج پژوهشهای کیفی را بدنال تجویز مقادیر ۰/۵٪ و ۱٪ استات سرب در آب آشامیدنی را مورد تأکید قرار می دهد. در مطالعه ای که با تجویز دوز ۱٪ به مدت ۳ ماه بر روی مدل آزمایشگاهی صورت گرفته نشان داده شده است که میزان پالایش گلومرولی (GFR) افزایش یافته و هیپرتروفی و افزایش وزن کلیه نیز بوقوع پیوسته است اما تغییری در قطر گلومرولها بوقوع نپیوسته است.^{(۸) (۱۷)} در تحقیقات مختلف افزایش وزن کلیه بدنال مسمومیت با سرب نشان داده شده است.^(۶) در تمام این مطالعات افزایش وزن و هیپرتروفی کلیه به تغییرات در لوله پیچیده نزدیک نسبت داده شده است اما بر خلاف این گزارشات که بر اساس مشاهده مستقیم با اندازه گیری بصورت دوبعدی بوده است، در مطالعه حاضر اندازه گلومرولها و در نهایت حجم کل گلومرولها در محیط سه بعدی و با استفاده از تکنیک های استریولوژی محاسبه گردیده و مقایسه حجم گلومرولها در گروه های شاهد و تجویز استات سرب نشان داده شده است. مقایسه حجم گلومرولها در گروه های شاهد و تجویز استات سرب نشان دهنده افزایش معنی دار حجم گلومرولها در گروه های تجویز استات سرب نسبت به گروه های شاهد می باشد. در مطالعه دیگری که روی نمونه های انسانی صورت گرفته، ناپدید شدن تعداد زیادی از گلومرولها بدون اینکه هیچ اثری از خود بر جای بگذارند گزارش شده است. تأکید شده

سپاسگزاری

در خاتمه از کلیه مسئولین محترم دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز که امکان این تحقیق را فراهم کردند تشکر و قدردانی می شود.

نفرون و لوله های ادراری، اندازه گیری کمی تعداد و حجم سلولهای مختلف و به ویژه اندازه گیری ضخامت غشاء پایه گلومرولی در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

References

- 1- Mayhew TM, Gundersen HJG. *If you assume, you can make an ass out of you and me: a decade of the dissector for stereological counting of particles in 3D space.* J Anat 1996;188:1-15.
- 2- Benedtsen TF, Nyengarrd JR. *Unbiased estimation of particle number using sections-An historical perspective with special reference to the stereology of glomeruli.* J Microscopy 1989;153:93-102.
- 3- Sterio Dc. *The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the dissector.* J Microscopy 1984;134:127-136.
- 4- Conrad ME, Barton JC. *Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat.* gastroenterology 1978;74:731-40.
- 5- Vyskocil A, Semecky V, Fialia Z, CizkovaM, Viau C. *Renal alteration in female rats following subchronic lead exposure.* J App Toxicol 1995;15:257-262.
- 6- Goyer RA. *Renal changes associated with lead exposure.* In: Kramahaffy H, editor. *Dietary and environmental Lead: Human health effects.* New York:Elsevire; 1985 .P.315-38.
- 7- Inglis JA, Henderson DA, Emmerson BT. *The pathology and pathogenesis of chronic lead nephropathy occurring in Queensland.* J Path1987;124:65-76.
- 8- Khalil Mansh F, Gonick HC, Cohen Ah, Alinovi R, Bergamashi E, Mutti A, Rosen VJ. *Experimental model of lead nephropathy : Continuous high-dose lead administration.* Kidney International 1992;41:1192-203.
- 9- Nyengaard JR, Benedtsen TF. *Glomerular number and size in relation to age, kidney weight and body surface in normal man.* Anatomical record 1991;223:194-201.
- 10- Kiernan JA. *Fixation.*In: Hernan JA. *Histological & histochemical methods: Theory & practice.* 2nd edition;1990.p.10-31.
- 11- Hinchiffe SA, sargent PH, Howard CV, Chan YF, Vanvelzen D. *Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the dissector method and cavalieri principle.* Lab Inves 1991;64:777-84.
- 12- Gundersen HJG, Jensen EB. *The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction.* J Microscopy 1987;147:229-63.
- 13- Michel RP, Cruz-Orive LM. *Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to*

- lung estimation of volume and plural surface area. *J Microscopy* 1988;150:117-36.
- 14- Wedeen Rp, Maesaka JK, Weiner B, Lyons MM, vitale TF, Joselow MM. Occupatiopnal lead nephropathy. *AM J Med* 1975;59:630-4.
- 15-Vyskocil A, Pancl J, Miloslav T, Ettlerova E, Semecky V, Kasparova, et al. Dose related proximal tubular dysfunction in male rats chronically exposed to lead. *J App Toxicol* 1989;9:305-99.
- 16- Marcussen N, Ottosen PD, Christensen S, Olsen S. A tubular glomeruli in Lithium-induced chronic nephropathy in rats. *Lab Inves* 1989;61:295-301.
- 17- O Flaherty EJ, Adams WD, Hammond PB, taylor G. Resistance of the rat to development of lead induced renal functional deficits. *J Toxicol environ health* 1986;18:61-75.