

## تجزیه و تحلیل شاخص های گروس آناتومیک کلیه در رت نر بدنبال مسمومیت سرب با استفاده از روش استریولوژیک

دکتر زهرا حیدری\*، دکتر حمیدرضا محمودزاده ثاقب\*، دکتر هوشنگ رفیق دوست\*\*

دکتر عباسعلی معین\*\*

\* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، بخش بافت شناسی  
\*\* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، بخش آناتومی

### چکیده

سرب یکی از فلزات سنگین است که اثرات منفی بر عملکرد کلیه داشته و باعث نفروپاتی می شود. هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات شاخص های گروس آناتومیکی کلیه پس از کاربرد استات سرب با استفاده از یک روش بدون تورش استریولوژی است. در این مطالعه تجربی ۶۶ سر موش صحرانی آزمایشگاهی نر بالغ بصورت تصادفی انتخاب و در ۳ گروه شاهد و ۳ گروه آزمایش ( $n=11$ ) به شرح زیر قرار داده شدند. گروه های آزمایش به ترتیب مورد تجویز محلول آشامیدنی استات سرب ۰/۱۳٪ به مدت ۴، ۸ و ۱۲ هفته قرار گرفتند، گروه های شاهد همان مدت آب مقطر دریافت کردند. در پایان دوره تجویز و خارج ساختن کلیه ها، پس از ثابت کردن توسط فیکساتیو *Lillie* تغییر یافته و قالب گیری در آگار ۷٪، برش های ۱ میلیمتری از هر کلیه تهیه شد. تجزیه و تحلیل استریولوژیک شامل تعیین حجم کلیه کامل، حجم کورتکس و مدولا با استفاده از اصول کاوالیه انجام شد. سپس شاخص های فوق در گروه ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه با یکدیگر مقایسه گردید. اختلافات در سطح ( $P < 0/05$ ) معنی دار در نظر گرفته شد.

میانگین حجم کل کلیه در گروه های تجویز استات سرب نسبت به گروه های شاهد مربوطه افزایش نشان داد که این تفاوت در گروه های ۸ و ۱۲ هفته از نظر آماری معنی داری بود ( $P < 0/01$ ). میانگین حجم کورتکس کلیه در گروه های تجویز استات سرب در مقایسه با شاهد های مربوطه افزایش نشان داد اما این افزایش تنها در گروه تجویز ۱۲ هفته معنی دار بود ( $P < 0/01$ ). میانگین حجم مدولای کلیه در گروه های دریافت کننده محلول استات سرب نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این افزایش نیز تنها در گروه تجویز ۱۲ هفته ای از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0/01$ ). مقایسه حجم کامل کلیه و حجم کورتکس کلیه در گروه های تجویز سرب نشان داد که حجم کل کلیه در گروه تجویز ۱۲ هفته ای با دو گروه ۴ و ۸ هفته ای تفاوت معنی دار آماری نشان می دهد ( $P < 0/01$ ). این مطالعه با استفاده از روش کمی، دقیق و بدون سوگرایی استریولوژی احتمال آسیب کلیوی بدنبال مسمومیت طولانی مدت با سرب را نشان داد. (مجله طبیب شرق، سال پنجم، شماره ۲، تابستان

۱۳۸۲، ص ۱۲۳ تا ۱۳۴)

کلواژه ها: سرب، استریولوژی، گروس آناتومی، کلیه، رت

### مقدمه

معرض خطر جدی قرار گرفته است.<sup>(۱)</sup> آلودگی سرب غیر آلی به علت فرایندهای صنعتی و دود حاصل از خودروهای بنزینی بسیار گسترده و قابل توجه بوده است.<sup>(۲)</sup> منابع مختلف

با پیشرفت صنعت و گسترش استفاده از مواد شیمیایی حاوی سرب، محیط زیست به مقدار زیادی با این ماده سمی آلوده شده و در نتیجه حیات انسان و سایر موجودات در

است می توان به سیتومگالی و اینکلوژن بادی داخل هسته ای اشاره کرد.<sup>(۷-۹)</sup> از اثرات غیر قابل برگشت که در انسان و حیوان بررسی شده اند می توان به فیروز بینابینی و نارسایی مزمن کلیه اشاره کرد.<sup>(۷،۸،۱۰)</sup> به طوری که شاید مهمترین علت نارسایی مزمن کلیه، مسمومیت با سرب باشد که با ایجاد نفروز توبولار بینابینی باعث این حالت می شود.<sup>(۱۱)</sup>

مهمترین و وسیعترین بررسی در مورد اثرات مسمومیت با سرب در کلیه توسط هندرسن انجام شد. تعداد زیادی از گلوپرونها، حدوداً یک سوم تا یک چهارم، حذف شده بودند، بدون اینکه اثری از آنها بر جای مانده باشد.<sup>(۱۲)</sup> در اتوپسی اغلب کلیه ها دارای نمای مجاله شده بودند و برخی نیز افزایش وزن نشان داده، فیروز خفیف نیز در کورتکس مشاهده شد و قطر کورتکس هم کاهش یافته بود. نمای کورتیکو مدولاری و طرح عروقی کورتکس طبیعی بود. همچنین مشخص شد که در اغلب موارد توبولهای کلیه دچار آتروفی و یا اتساع شده بودند.<sup>(۱۲)</sup> در مطالعه دیگری بر روی رت بدنبال مسمومیت با سرب افزایش وزن کلیه در گروه مورد آزمایش گزارش گردید. همچنین افزایش پیشرونده ضایعات فوکال و مولتی فوکال، ائوزینوفیلی سیتوپلاسمی در سلولهای لوله‌های کلیوی و افزایش اینکلوژنهای سیتوپلاسمی و تغییرات مهمی نیز در توبولهای کلیه بخصوص توبولهای نزدیک گزارش شد.<sup>(۱۳)</sup> در مورد اثرات سرب بر کلیه بررسی وسیعی توسط گروهی از محققین در سال ۱۹۹۲ در آمریکا انجام شد، در این بررسی وزن کلیه ها در گروه آزمایش به طور واضحی افزایش یافته بود، آنها این افزایش وزن را ناشی از افزایش بافت کلیه و ادم دانستند.<sup>(۱۰)</sup> هیپرتروفی سلولهای اپی تلیال توبول پروگزیمال و هسته آنها، اولین بار در ماه سوم بعد از تجویز سرب دیده شد. هیپرتروفی کلیه (که باعث افزایش وزن کلیه ها می شود) در خلال سه ماه اول تجویز سرب دیده می شود و شاید به علت افزایش

محیطی دیگری نظیر رنگ‌ها، مداد، لوازم نقاشی و ظروف سفالی، باتری ها و صنایع باتری سازی و صنایع نظامی<sup>(۳)</sup> و همچنین استفاده از سرب در فن آوریهای نوین، نظیر محافظ در برابر اشعه در نمایشگر رایانه‌ها، تلویزیون، ایجاد تصاویر مغناطیسی تشخیصی (MRI) و فن آوری پزشکی هسته‌ای، سوپرهادی‌ها و همچنین فیبر نوری<sup>(۴)</sup> باعث شده‌اند که علی‌رغم حذف سرب از بنزین در بسیاری از کشورها، هنوز برخورد با سرب بسیار زیاد و میزان سرب بدن افراد معمولاً بسیار بیشتر از حد مجاز تعیین شده توسط سازمان بهداشت جهانی باشد.<sup>(۵)</sup>

سرب در بدن پستانداران از طریق سیستم گوارش و تنفس و پوست جذب شده و اثرات سمی خود را در اعضا مختلف بدن اعمال می‌نماید. این ماده بعد از انتقال در خون در کلیه، کبد، طحال، دستگاه اعصاب مرکزی، مغز استخوان و ماهیچه‌ها تجمع یافته و نتیجه آن اختلال در عملکرد اعضای ذکر شده می‌باشد.<sup>(۵)</sup>

کلیه ها به علت ماهیت و عملکردشان نسبت به اثرات سمی فلزات آلوده کننده نظیر سرب بسیار حساس و آسیب پذیر هستند. این مسئله با افزایش میزان بیماری های کلیوی در مناطق شهری و صنعتی مشخص می شود.<sup>(۶)</sup> در اروپا سالانه ۳۵۰۰ میلیون یورو به درمان بیماریهای کلیه اختصاص می یابد. حدود ۳۰ درصد بیماریهای کلیوی ناشی از اختلالات ژنتیکی، ۲۰ درصد ناشی از عوامل شیمیایی و درمانی و ۵۰ درصد آن ناشی از عوامل ناشناخته است.<sup>(۶)</sup>

در رابطه با اثرات سرب بر روی کلیه ها مطالعات توصیفی زیادی صورت گرفته است که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

سرب در کلیه ها اثرات غیر قابل اجتنابی بصورت اثرات قابل برگشت و غیر قابل برگشت داشته و باعث نفروپاتی می شود.<sup>(۷)</sup> از اثرات قابل برگشت که در حیوانات ثابت شده

سنتر پروتئینهای وابسته باشد.<sup>(۱۰)</sup>

مطالعه *Vyscosil* و همکاران نشان داد که مسمومیت با سرب ۱ درصد در رتهای ماده باعث افزایش وزن نسبی کلیه آنها می شود.<sup>(۶)</sup> مطالعه دیگر آنها افزایش چشمگیر وزن کلیه ها در هر دو جنس را نشان داد.<sup>(۱۲)</sup>

همچنین بدنبال تجویز استات سرب ۰/۵ درصد برای دوره های بیشتر از سه ماه، افزایش وزن و هیپرتروفی کلیه بروز می کند.<sup>(۱۰،۱۴)</sup> علی رغم مطالعات توصیفی وسیعی که در ارتباط با سرب و اثرات آن بر کلیه صورت گرفته، تاکنون در مورد تغییرات استریولوژیک کلیه بدنبال مسمومیت با سرب مطالعات کمتری انجام شده است، زیرا روش های جدید استریولوژی در دو دهه اخیر استفاده کاربردی پیدا کرده است. در یک مطالعه استریولوژیک بر اساس اصول کاوالیه و روش دیسکتور فیزیکی که بر روی مقاطع بافت شناسی کلیه رت انجام شده است، محاسبه حجم و تعداد گلومرولهای کلیه در دوزهای ۰/۵ درصد و ۱ درصد سرب در دوره های ۴ و ۸ و ۱۲ هفته ای صورت گرفته است و افزایش معنی دار حجم گلومرولها در تمام دوره ها، در هر دو گروه تجویز سرب نشان داده شد.<sup>(۱۵،۱۶)</sup>

در طی دو دهه اخیر، علم استریولوژی رشد قابل ملاحظه ای داشته است بطوریکه امروزه برای بدست آوردن اطلاعات سه بعدی از تصاویر دو بعدی، استریولوژی انتخاب اول می باشد.<sup>(۱۷)</sup> استریولوژی جهت بدست آوردن و تجزیه و تحلیل اطلاعات سه بعدی بر اساس مشاهده از سطح مقطع دو بعدی یا تصویر پروجکت شده آن بکار می رود.<sup>(۱۸،۱۹)</sup> در واقع استریولوژی با منظور کردن دیدگاه ریاضی و آماری از تصاویر دو بعدی مقاطعی که در واقع سه بعدی بوده اند، اطلاعات سه بعدی استخراج می نماید.<sup>(۱۹،۲۰)</sup> با کمک علم استریولوژی می توان پارامترهایی نظیر تعداد، اندازه و حجم را از روی تصاویر مقاطع دو بعدی محاسبه نمود.<sup>(۱۸، ۲۰)</sup>

روشهای مختلفی برای محاسبه حجم سوژه های بافتی وجود دارد اما اکثر این روشها دارای تورش بوده و ناکارآمد می باشند. محاسبه حجم با بهره گیری از اصل کاوالیه (*Cavalieri Principle*) برخلاف روشهای دیگر فاقد تورش و کارآمد می باشد.<sup>(۲۱،۱۹)</sup>

از آنجا که محاسبه شاخص های اصلی گروس آناتومیک کلیه در شناخت مورفولوژی کمی و چگونگی عملکرد این اندام حیاتی در حالت سلامتی و بیماری اهمیت دارد، چنانچه با استفاده از تغییر شاخص های گروس آناتومیک بتوان میزان پیشرفت ضایعات کلیوی را پیش بینی کرد، با کاربرد روشهای غیر تهاجمی نظیر سونوگرافی و یا *CT* اسکن براحتی می توان با مشخص نمودن شاخص های گروس آناتومیکی کلیه و مقایسه آنها با حدود طبیعی به میزان آسیب کلیوی پی برد. به همین منظور در مطالعه حاضر تغییرات شاخص های گروس آناتومیک کلیه شامل حجم کلیه کامل، حجم کورتکس، حجم مدولا و نسبت حجمی کورتکس و مدولا به کلیه کامل بدنبال مسمومیت سرب با استفاده از روش استریولوژی مورد مطالعه قرار گرفت.

### روش کار

در این مطالعه تجربی ۶۶ سر موش صحرانی آزمایشگاهی بالغ از نژاد *Wistar* در محدوده وزنی  $10 \pm 150$  گرم از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تهیه شد. قبل از شروع آزمایش جهت سازگاری حیوانات با محیط به مدت دو هفته با دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت  $3 \pm 22$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس حیوانات به شش گروه ۱۱ تایی تقسیم شدند. سه گروه شاهد ( $C_1, C_2, C_3$ ) در طی دوره های ۴، ۸ و ۱۲ هفته ای آب مقطر<sup>(۲۲،۱۲)</sup> و

کامل در هر یک از مقاطع کلیه بصورت مستقل از یکدیگر به کمک رایانه شمارش، سپس مجموع نقاط برخورد در تمام مقاطع محاسبه شده، در مساحت هر نقطه و متوسط ضخامت مقاطع ضرب شد تا حجم بدست آید.

در این روش از آنجائیکه موقعیت اولین مقطع تصادفی بوده است عدم سوگیری و تورش تضمین شده است. (۱۹، ۲۵، ۲۶) می توان سطح مقطع را با استفاده از گریدهای شمارش نقاط استریولوژیک که بصورت تصادفی با سطح مقطع مورد نظر برخورد می نمایند محاسبه نمود. (۱۹، ۲۵، ۱۸، ۲۷، ۲۸) برای انجام این محاسبات لازم است که ابتدا قلمرو اطراف هر نقطه محاسبه شود. از آنجائیکه نقطه فاقد بعد است، از گریدهائی متشکل از علائم صلیبی دو بعدی، استفاده شد. بر حسب قرارداد رایج نقطه به گوشه بالا و سمت راست صلیب نسبت داده شد و اگر آن گوشه از صلیب با پروفیل (Profile) مقطع مورد نظر برخورد نماید، حتی در صورتیکه سه گوشه دیگر برخورد نداشته باشند، آن نقطه شمارش گردید. (۲۵)

شمارش نقاط مطابق با اصول ذکر شده انجام گردید و حجم کورتکس، مدولا و کلیه از رابطه زیر حساب گردید: (۱۸، ۱۹، ۲۵)

$$V = \frac{\sum_{i=1}^m P_i \cdot a / p \cdot \bar{t}}{M^2}$$

$a/p$  قلمرو اطراف هر نقطه بر حسب میلیمتر مربع و  $\bar{t}$  برابر با یک میلیمتر بود.

ضریب خطای استریولوژیک:

ضریب خطای شمارش، روشی ریاضی و سودمند است که نشان دهنده میزان شک و تردید در ارتباط با تخمین مورد نظر می باشد. ضریب خطای شمارش بصورت نسبت خطای استاندارد به میانگین قابل تعریف و اندازه گیری می باشد. در این روش، باید چندین بار شمارش بر روی هر نمونه صورت

گروه های آزمایش ( $T_1, T_2, T_3$ ) نیز در طی دوره های مذکور محلول استات سرب ۰/۱۳ درصد به عنوان آب آشامیدنی مصرفی روزانه دریافت کردند. (۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۲)

در هر گروه پس از به پایان رسیدن دوره، حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی کتامین ۵۰ mg/kg بیهوش شدند. پس از باز کردن جدار قدامی طرفی حفره شکم و انجام پرفیوژن عروقی با فیکساتیو Lillie تغییر یافته از طریق شریان کلیوی، کلیه ها از بدن خارج شد، پس از جداسازی کپسول، کلیه ها کدگذاری و به منظور تکمیل روند ثبوت بافتی در فیکساتیو Lillie تغییر یافته با pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ قرار داده شدند. پس از ثبوت کامل بافت از هر حیوان یکی از کلیه ها بصورت تصادفی انتخاب شد. (۲۳، ۲۴) پس از شستشو در محلول سالین نرمال، کلیه در آگار ۷ درصد قالب گیری شد (۱۹، ۲۵) سپس توسط دستگاه Tissue Slicer برشهای ۱ میلیمتری از کلیه تهیه شد. برای اینکه محاسبه حجم بدون هیچگونه سوگرایی و تورشی انجام شود، موقعیت اولین برش در نمونه کاملاً تصادفی بود. (۱۹، ۲۵، ۲۶) اولین برش بدست آمده از کلیه ضخامتی بیشتر از صفر و کمتر از یک میلیمتر داشت که در هر نمونه اولین برش بدست آمده با ضخامت متغیر حذف گردید، (۱۹) سپس سایر برش ها که در نمونه های مختلف بسته به اندازه کلیه بین ۱۱ تا ۱۸ عدد بودند، به دقت جمع آوری شدند. برش ها پس از تمیز کردن قطعات آگار از اطراف شان با حفظ جهت قدامی خلفی و نظم و ترتیب آنها که هنگام برش خوردن بدست آمده بود قرار گرفتند. برای محاسبه حجم کلیه، حجم کورتکس و حجم مدولا با استفاده از روش استریولوژیک و اصل کوالیه حجم به ترتیب زیر تخمین زده شد. ابتدا به کمک اسکنر تصاویر مقاطع مربوط به هر کلیه و گرید استاندارد متشکل از نقاط سازماندهی شده به رایانه منتقل شد. تعداد نقاط برخورد گرید با کورتکس و مدولا و کلیه

## یافته ها

مقایسه شاخص های گروس آناتومی کلیه شامل حجم کامل کلیه، حجم کورتکس، حجم مدولا، نسبت حجمی کورتکس و مدولا به کلیه کامل در گروهی که به مدت ۴ هفته تحت تجویز سرب قرار داشت با شاهد مربوطه تفاوت معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). (جدول ۱)

در گروهی که به مدت ۸ هفته تحت تجویز سرب قرار داشت، افزایش حجم کلیه به میزان ۲۵/۶ درصد نسبت به شاهد مربوطه مشاهده شد که مقایسه آماری تفاوت معنی داری بین دو گروه نشان داد ( $P < 0.01$ ). (جدول ۱) افزایش حجم کورتکس به میزان ۲۱ درصد و حجم مدولا به میزان ۳۲/۳ درصد بود که قابل توجه بوده اما از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ) نسبت حجمی کورتکس و مدولا به کلیه کامل نیز تغییر معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). (جدول ۱)

در گروهی که به مدت ۱۲ هفته تحت تجویز سرب قرار داشت، تغییرات چشمگیر شاخص های گروس آناتومی کلیه نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، بطوری که در گروه تجویز نسبت به شاهد، افزایش حجم کلیه کامل به میزان ۵۸/۲ درصد، افزایش حجم کورتکس به میزان ۷۴/۴ درصد و افزایش حجم مدولا به میزان ۳۸ درصد روی داده بود که در تمام این موارد تفاوت بین دو گروه از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.01$ ). نسبت حجمی کورتکس و مدولا به کلیه کامل تغییر معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). (جدول ۱)

مقایسه شاخص های گروس آناتومیک کلیه در رتهای گروه های شاهد ۴ و ۸ و ۱۲ هفته با یکدیگر نشان دهنده افزایش ۸/۷ درصد و ۳/۵ درصد حجم کلیه کامل بود که این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ).

تغییرات حجم کورتکس، مدولا، نسبت حجمی

گیرد و پس از محاسبه میانگین و خطای استاندارد میانگین نسبت آن دو را بصورت *Mean* مشخص نمود، اما روش های ریاضی استریولوژی، روش های ساده و مختلفی است که بدون انجام شمارش تکراری باعث تسهیل محاسبه ضریب خطا می شود. <sup>(۲۹)</sup> برای محاسبه ضریب خطا در تخمین حجم با تکیه بر اصول کاوالیه روش های مختلفی وجود دارد، اما ساده ترین و متداولترین روش پیش بینی میزان خطا از روی اطلاعات بدست آمده هنگام شمارش نقاط می باشد که بر اساس تئوری *Matheron* می باشد. <sup>(۱۸، ۲۵)</sup> وقتی سطح مقطع توسط شمارش نقاط محاسبه شود رابطه ریاضی زیر مورد استفاده قرار می گیرد. <sup>(۲۵)</sup>

$$CE = \frac{\left(\frac{3a + c - 4b}{3}\right)^{1/2}}{2 \sum_{i=1}^m P_i}$$

در این رابطه نحوه محاسبه *a* و *b* و *c* به ترتیب زیر است:

$$a = \sum_{i=1}^m P_i \cdot P_i$$

$$b = \sum_{i=1}^m P_i \cdot P_i + 1$$

$$c = \sum_{i=1}^m P_i \cdot P_i + 2$$

ضریب خطای شمارش در استریولوژی تا حد ۱۰ درصد قابل قبول است. <sup>(۲۵)</sup>

پس از استخراج اطلاعات استریولوژیک، تجزیه و تحلیل اطلاعات به کمک نرم افزار *SPSS 10.05* با روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه *One-way ANOVA* انجام شد، در صورت وجود اختلاف بین گروه ها، از تست *HSD Tukey* به عنوان *Post test* استفاده گردید. نتایج بصورت  $(Mean \pm SEM)$  بیان شده و ( $P < 0.05$ ) معنی دار در نظر گرفته شده است.

مدولای کلیه در گروه تجویز ۸ هفته‌ای در مقایسه با گروه ۴ هفته‌ای به میزان ۱۰/۶ درصد و از نظر آماری معنی دار است ( $P < 0/01$ ). افزایش حجم مدولا در گروه تجویز ۱۲ هفته‌ای در مقایسه با گروه ۴ هفته‌ای ۳۵/۶ درصد بود که به لحاظ آماری معنی دار است ( $P < 0/01$ )، اما نسبت به گروه ۸ هفته‌ای ۲۲/۶ درصد بود که از نظر آماری این تفاوت معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ).

نسبت حجمی کورتکس به کلیه کامل در گروه‌های ۴، ۸ و ۱۲ هفته‌ای تجویز، به ترتیب ۵۶ درصد و ۵۹ درصد و ۶۰ درصد بود یعنی با افزایش دوره در معرض سرب بودن، حجم کورتکس نسبت به کل کلیه از افزایش جزئی برخوردار است اما مقایسه گروه‌ها با یکدیگر اختلاف آماری معنی داری را نشان نمی‌دهد ( $P > 0/05$ ).

نسبت حجمی مدولا به کل کلیه در گروه‌های تجویز به ترتیب ۴۴ درصد و ۴۱ درصد و ۴۰ درصد است که با افزایش دوره در معرض بودن، کاهش جزئی نشان داده که از نظر آماری معنی داری نیست ( $P > 0/05$ ).

کورتکس و مدولا به کلیه کامل نیز تفاوت معنی داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ) (جدول ۱). تغییرات شاخص های گروس آناتومیک کلیه در رتهای گروه‌های تجویز استات سرب ۴ و ۸ و ۱۲ هفته نشان داد که افزایش حجم کلیه پس از ۸ هفته تجویز سرب نسبت به ۴ هفته ۱۷/۸ درصد است که از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0/05$ )، اما در گروه تجویز ۱۲ هفته نسبت به ۴ هفته افزایش حجم کلیه به میزان ۱۶/۵۳ درصد و نسبت به گروه تجویز ۸ هفته ۳۰/۴ درصد بود که در هر دو مورد تفاوت ها از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0/01$ ). افزایش حجم کورتکس کلیه در گروه‌های تجویز ۸ هفته نسبت به ۴ هفته به میزان ۲۳/۲ درصد بود. این مسئله گرچه افزایش حجم کورتکس را با افزایش زمان تجویز سرب نشان می‌دهد اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ). در حالیکه در گروه تجویز ۱۲ هفته‌ای افزایش حجم کورتکس نسبت به گروه تجویز ۴ هفته‌ای ۶۷/۸ درصد و نسبت به گروه ۸ هفته‌ای ۳۶/۲ درصد بود که از نظر آماری این تفاوت در مقایسه با هر دو گروه دیگر معنی دار است ( $P < 0/01$ ). افزایش حجم

جدول ۱- میانگین تغییرات حجم شاخص های گروس آناتومیک و نسبت های حجمی کلیه (%) در گروه‌هائی که ۴، ۸ و ۱۲

هفته تمت تجویز قرار داشتند. ( $Mean \pm SEM$ )  $**P < 0.01$ ,  $*P < 0.05$

شاخص گروس آناتومیک	گروه شاهد $CI$	گروه تجویز استات $TI$	گروه شاهد $C2$	گروه تجویز استات $T2$	گروه شاهد $C3$	گروه تجویز استات $T3$
حجم کل کلیه	۰۵±۸۵/۵۵ ۵۷۱/	۴۱±۶۲/۰۲ ۶۶۲/	۴۳±۱۰۴/۶ ۶۲۱۹	۶۳±۸۶/۵۶ **۷۸۰	۶±۱۰۲/۹۵ ۶۴۳/	۸±۱۳۰/۳۳ **۱۰۱۷
حجم کورتکس	۹۴±۶۲/۰۱ ۳۳۹/	۱۹±۴۳/۴۲ ۳۷۰/	۸۹±۹۲/۷۷ ۳۷۶	۸۴±۸۰/۷۴ ۴۵۶	±۱۱۲/۳۱ ۳۵۶/۰۶	۴۳±۱۷۸/۵۱ **۶۲۱
حجم مدولا	۱۶±۵۵/۱۶ ۲۳۱/	±۳۷۱/۴۴ ۲۹۲/۲۴	۵۴±۶۴/۷۲ ۲۴۴	۸۴±۶۸/۷۱ ۳۲۳	۵۴±۹۵/۵۸ ۲۸۷/	۳۷±۱۰۳/۷۹ **۳۹۶
نسبت حجم کورتکس به کلیه کامل	%۶۰	%۵۶	%۶۰	%۵۹	%۶۰	%۵۹
نسبت حجم مدولا به کلیه کامل	%۴۰	%۴۴	%۴۰	%۴۱	%۴۰	%۴۰

طیبق شرق، سال پنجم، شماره ۲، تابستان ۸۲

$CI, C2, C3$  به ترتیب گروه‌های شاهد مربوط به دوره های ۴، ۸ و ۱۲ هفته و  $TI, T2, T3$  گروه های تجویز استات سرب ۰/۱۳٪ طی دوره های مذکور می باشد

## بحث

در مطالعه حاضر شاخص های گروس آناتومی کلیه در گروه های شاهد و تجویز سرب با یکدیگر مقایسه شدند. میانگین حجم کل کلیه در گروه های تجویز استات سرب نسبت به گروه های شاهد مربوطه افزایش نشان داد که این تفاوت در گروه های ۸ و ۱۲ هفته از نظر آماری معنی داری بود ( $P < 0/01$ ). میانگین حجم کورتکس و مدولای کلیه در گروه های تجویز استات سرب در مقایسه با گروه شاهد نشان دهنده افزایش حجم کورتکس و نیز مدولای کلیه می باشد اما این افزایش تنها در گروه تجویز ۱۲ هفته از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0/01$ ). در مقایسه شاخص های گروس آناتومیک کلیه در گروه های تجویز حجم کل و حجم کورتکس کلیه در گروه تجویز ۱۲ هفته ای با دو گروه ۴ و ۸ هفته ای تفاوت معنی دار آماری را نشان داد ( $P < 0/01$ ). علی رغم مطالعات توصیفی وسیعی که در ارتباط با سرب و کلیه صورت گرفته، تاکنون در مورد تغییرات استریولوژیک کلیه بدنبال مسمومیت با سرب مطالعات کمتری انجام شده است، زیرا روش های جدید استریولوژی در دو دهه اخیر استفاده کاربردی پیدا کرده است. در یک مطالعه استریولوژیک که بر اساس اصل کاوالیه و روش دیسکتور فیزیکی بر روی مقاطع بافت شناسی کلیه در رت انجام شده، محاسبه حجم و تعداد گلومرولهای کلیه در دوزهای ۰/۵ درصد و ۱ درصد سرب در دوره های ۴ و ۸ و ۱۲ هفته ای صورت گرفته است و افزایش معنی دار حجم گلومرولها در تمام دوره ها و در هر دو گروه تجویز نشان داده شد. تغییرات کاهشی تعداد گلومرولها در دوره ۴ هفته ای در هر دو گروه تجویز و در دوره ۸ هفته ای در دوز ۰/۵ درصد معنی دار نبود در حالیکه گروه ۱ درصد به مدت ۸ هفته و در هر دو دوز ۰/۵ درصد و ۱ درصد سرب به مدت ۱۲ هفته کاهش معنی دار در تعداد گلومرولها مشاهده

شد. (۱۵،۱۶) کاهش تعداد گلومرولها نشان دهنده آسیب جدی به کلیه بوده و افزایش حجم سایر گلومرولها نیز به منظور جبران عملکرد گلومرولهای از دست رفته و از سوی دیگر به منظور تطابق با شرایط جدید و دفع مواد سمی از بدن صورت گرفته است. این مطالعه نشان داد که در یک دوره طولانی مصرف سرب، هیپرتروفی قسمت های مختلف کلیه شامل کورتکس و مدولا به همراه افزایش وزن مرطوب کلیه قابل ملاحظه و از نظر آماری نیز معنی دار می باشد (۱۶،۱۵) که این نتایج با دستاوردهای مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در دوره طولانی مدت مسمومیت سرب آسیب های جدی در کلیه به وقوع می پیوندد و عملاً با تخریب گلومرولها به عنوان نماینده واحدهای عملکردی و ساختمانی کلیه، عملکرد کلیه بصورت تدریجی دچار اختلال می گردد. اگرچه افزایش حجم نفرون های باقی مانده و گلومرولها به منظور جبران نفرون های از بین رفته حائز اهمیت است اما در هر حال در صورت طولانی تر شدن دوره مسمومیت بطور قطع اثرات تخریبی بیشتری رخ داده و باعث از بین رفتن تعداد بیشتری از نفرونها و از کار افتادن کلیه بصورت پیشرونده خواهد شد. نشان داده شده است که در بیماری های مختلف تعداد گلومرولها کاهش می یابد. (۱۵،۱۶) پژوهشی دیگر بر روی رت نشان داده که بدنبال افزایش خود بخود فشار خون سیستمیک، کاهش معنی داری در تعداد گلومرولها رخ می دهد. (۳۰) در بیماری های پیشرفته کلیوی تعداد زیادی از گلومرولها از بین می روند. (۳۱) در مطالعه ای دیگر که بر روی رت انجام شد هیچ تغییری در گلومرولها مشاهده نشد و بیان گردید که علائم تغییرات در سلول های گلومرولی بعد از گذشت ۶ هفته

هیپرتروفی لوله‌های پیچیده نزدیک می‌باشد.<sup>(۱۰)</sup> از سوی دیگر دیده شده که در پاسخ به مسمومیت با سرب، افزایش ساخت پروتئین‌ها در کورتکس کلیه بوقوع می‌پیوندد.<sup>(۱۰، ۳۴، ۳۵)</sup> بنابراین هیپرتروفی کلیه را می‌توان به دلیل سنتز پروتئین در این ناحیه و هیپرتروفی لوله‌های پیچیده نزدیک دانست. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نسبت حجمی کورتکس به کل کلیه و نسبت حجمی مدولا به کل کلیه در گروه‌های شاهد و تجویز از نظر آماری معنی‌دار نیست ( $P > 0.05$ ). این امر نشان می‌دهد که در اثر مسمومیت سرب تغییرات هیپرتروفیک و افزایش حجم کورتکس و مدولا بطور هماهنگ با یکدیگر اتفاق افتاده است به همین علت نسبت آنها تفاوت واضحی نشان نداده است.

احتمالاً در رت مسمومیت با سرب در دوره‌های طولانی مدت (بیش از ۸ هفته) می‌تواند اثرات بارزی بر روی کلیه بصورت تغییر حجم شاخص‌های گروس آناتومیک نشان دهد که می‌تواند نشان آسیب کلیوی بدنال مسمومیت طولانی مدت با سرب باشد.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه دست‌اندرکاران حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان که با حمایت مالی طرح امکان انجام آنرا فراهم نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

از تجویز سرب هویدا گردید.<sup>(۳۲)</sup> در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که شاخص‌های گروس آناتومیک معمولاً پس از ۴ هفته مسمومیت با سرب تغییر واضحی نسبت به شاهد نشان نمی‌دهند، در حالیکه در گروه‌های ۸ و به خصوص ۱۲ هفته این شاخص‌ها بطور معنی‌داری تغییر نشان می‌دهند.

مشاهدات بالینی متعددی نشان داده است که بطور قطع با پیشرفت بیماری‌های کلیوی تغییرات عمده در حجم توده گلومرولی اتفاق می‌افتد.<sup>(۳۳)</sup> از سوی دیگر گزارش شده است پس از گذشت ۳ ماه مسمومیت با سرب میزان پالایش کلیوی بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد.<sup>(۱۰، ۱۴)</sup> این افزایش حجم و به تبع آن افزایش پالایش گلومرولی نه تنها به منظور دفع مسمومیت و مواد سمی از خون صورت می‌گیرد بلکه جهت جبران عملکرد گلومرول‌های از بین رفته نیز می‌باشد.

در یک مطالعه بدنال تجویز استات سرب ۰/۵ درصد برای دوره‌های بیشتر از سه ماه، اندازه‌گیری قطر گلومرول‌ها هیچگونه تفاوتی را بین گروه‌های شاهد و آزمایش با دوره‌های متفاوت تجویز نشان نداد.<sup>(۱۰)</sup> همچنین این مطالعه نشان داد که میزان پالایش گلومرولی (*Glomerular Filtration Rate = GFR*) از ماه سوم به بعد، همراه با وزن کلیه، افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده هیپرتروفی کلیه می‌باشد<sup>(۱۰، ۱۴)</sup> اما هیپرتروفی کلیه همراه با هیپرتروفی گلومرول‌ها نبوده و افزایش وزن و حجم کلیه مربوط به

## References

- 1- Wallace Hayes A. Principles and methods of toxicology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Taylor & Francis; 2001. 667-9.
- 2- Castellino N, Aloj S. Extracellular distribution of lead in the liver and kidney of the rat. Brit J Indust Med 1969; 26:139-43.



- 3- Nriagu JO. Saturnine gout among Roman aristocrats: Did lead poisoning contribute to the fall of the Empire? *N Engle J Med* 1983; 308:660-3.
- 4- Bennet WM. Lead nephropathy. *Kidney Inter* 1985; 28:212-20.
- 5- Hilderbrand DC, Raymond D, Griffin WT, Fahim MS. Effect of lead acetate on reproduction. *Am J Obstet Gyneacol* 1973; 115:1058-65.
- 6- Vyskocil A, Semecky V, Fiala M. Renal Alteration in female rats following to sub chronic lead exposure. *J of Applied Toxicology* 1995; 15:257-62.
- 7- Loghman H. Renal effects of environmental & occupational lead exposure. *Environ Health Prespect* 1997; 105:928-39.
- 8- Khalil Manesh F, gonick HC, Cohen AH, et al. Experimental model of lead nephropathy II- effect of removal from lead exposure and chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA). *Environ Resear* 1992; 58:35-54.
- 9- Witzmann FA. Regional protein alteration in the rat kidneys induced by lead exposure. *Electrophoresis* 1998; 20:943-51.
- 10- Khalil-Manesh F, gonick HC, Cohen AH, et al. Experimental model of lead nephropathy. *Kidney international* 1992; 41:1192-203.
- 11- Ghorbel F, Boujelbene M, makni AF, et al. Effect of chronic lead exposure on kidney function in male and female Rats: Determination of a lead exposure biomarker. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2001; 109:457-63.
- 12- Vyskocil A, Cizkova M, Tejnorova I. Effect of prenatal and postnatal Exposure to lead on kidney function in male Rats. *Journal of Applied Toxicology* 1995; 15:327-8.
- 13- Yagminas AP, Franklin CA, Villeneuve DC, et al. Subchronic oral toxicity of triethyl lead in the male weanling rat, Clinical, Biochemical, Hematological and Histopathological effects. *Fundament and Appl Toxicol* 1990; 15:580-96.
- 14- O'Flaherty EJ, Adams WD, Hammond PB, Taylor E. Resistance of rat to development of lead-induced renal functional deficits. *J Toxicol Environ Health* 1986; 18:61-75.
- 15- Heidari Z, Mahmoudzadeh Sagheb HR, Dezfolian AR, et al. A stereological analysis of renal glomeruli following chronic Lead intoxication in rat during a continuous period of 8 weeks. *Acta Medica Iranica* 2002; 40:73-8.

۱۶- محمودزاده ثاقب حمیدرضا، حیدری زهرا، دزفولیان عبدالرحمن، چیت نیس پادماگار، نوری محمد حسین. تجزیه و تحلیل استریولوژیک گلومرولهای کلیه بدنبال مسمومیت مزمن سرب در رت در یک دوره ۱۲ هفته ای پیوسته. مجله دانشگاه شهید صدوقی یزد. سال دهم، شماره ۲، سال ۱۳۸۲، ص ۶-۸۰.

- 17- Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume you can make an ass out of you and me: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 1996;188:1-15.
- 18- Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Neph* 1999;10:1100-20.
- 19- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.
- 20- Weible ER. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *Royal Microsc Soc* 1989;393-403.
- 21- Benedtsen TF, Nyengaard JR. Unbiased estimation of particle number using sections – an historical perspective with special reference to the stereology of glomeruli. *J of Microscopy* 1989;153:93-102.
- 22- Shelton KR, Egle PM. The proteins of lead-induced intranuclear inclusion bodies. *J Biolog Chem* 1982; 257:1802-7.
- 23- Marcussen N. A tubular glomeruli in renal artery stenosis. *Lab Invest* 1991;65:558-65.
- 24- Hinchliffe SA, Lynch MRJ, Sargent PH, et al. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaeco* 1992;99:296-301.
- 25- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology three-dimensional measurement in microscopy. *BIOS Scientific Publishers* 1998;1-106,151-76.
- 26- Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in Stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147:229-36.
- 27- Nyengaard JR, Flyvbjerg A, Rash R. The impact of renal growth in experimental diabetes on number and sizes of proximal and distal tubular cells in rat kidneys. *Diabetologia* 1993;36:1126-31.
- 28- Cahill MM, Ryan GB. Biphasic glomerular hypertrophy in rats administered puromycin aminonucleoside. *Kidney Int* 1996;50:768-75.
- 29- <http://www.health.au.dk./neuro/mjw/sampling.htm>.
- 30- Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvang MJ. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1994;12:1373-6.
- 31- Basgen JM, Steffes MW, Stillman AE, Mauer SM. Estimating glomerular number in situ using magnetic resonance imaging and biopsy. *Kidney Int* 1994; 45:1668-72.

- 32- Goyer RA. The renal tubule in lead poisoning I- Mitochondrial swelling and aminoaciduria. Lab Invest 1968;19:71-7.
- 33- Pesce C. Glomerular number and size: facts and artifacts. Anat Rec 1998;251:66-71.
- 34- Choie DD, Richter GW. Cell proliferation in mouse kidney induced by lead. I- synthesis of deoxyribonucleic acid. Lab Invest 1974;30:647-51.
- 35- Stowe HD, Goyer RA, Krigman MM, et al. Experimental oral lead toxicity in young dogs. Arch Path 1973;95:106-16.

## ***Analysis of Gross Anatomical Parameters of Kidney in Male Rats Following Lead Poisoning by Using a Stereological Method***

**Heidari Z. PhD \*, Mahmoudzadeh Sagheb HR. PhD \*, Rafighdoost H. PhD \*\*, Moien AA. PhD \*\***

*Lead is one of the heavy metals, which has adverse effects on renal function and driving to nephropathy. The aim of present experiment was to surveyed changes in gross anatomic parameters of kidney following lead poisoning by an unbiased stereological technique.*

*In this experimental study 66 male adult Wistar rats selected randomly and divided into 6 groups, 3 control and 3 administration groups (n=11). Administration groups received a solution of 0.13% lead acetate as drinking water for a period of 4, 8 and 12 weeks respectively. Simultaneously controls received distilled water at the same periods respectively. Thereafter at the end of each period kidney dissected and after fixation in Lillie's solution, embedded in 7% agar, sectioned into 1 millimeter slices by means of a tissue slicer. Then stereological analysis includes determining total volume of kidney, volume of renal cortex and medulla performed by a method based on Cavalier's principle. Data were analyzed by one-way ANOVA and differences between groups less than 0.05 considered significant.*

*There was an increase in mean total volume of kidney in administration groups compared to their controls. This was significant in groups, which received lead acetate as drinking water for 8 and 12 weeks ( $P<0.01$ ). Mean cortical volume increased in administration groups in comparison to own controls. This was significant just in 12-weeks group ( $P<0.01$ ). Mean medullary volume increased in administration groups in comparison to own controls. This was also significant only in 12-week group ( $P<0.01$ ). Total volume and cortical volume of kidney in lead administration groups showed that total volume in 12 weeks administration group had significant differences in comparison with 4-weeks and 8-weeks groups ( $P<0.01$ ). There was also showed in 12-weeks administration group a significant difference in comparison with two*

other administration groups ( $P<0.01$ ). There was also a significant difference between medullary volumes of 12-weeks administration group with 4-weeks administration group ( $P<0.01$ ) but when it was compared with 8-weeks administration group, there was not any significant difference between these groups ( $P<0.05$ ).

This study by using a quantitative and precise stereological method showed that Lead may cause renal injuries in long periods.

**KEY WORDS:** Lead, Stereo logy, Gross anatomy, Kidney, Rat

\*Anatomical sciences dept, Anatomy section, Faculty of medicine, Zahedan University of medical sciences and health services, Zahedan, Iran.

\*\* Anatomical sciences dept, Histology section, Faculty of medicine, Zahedan University of medical sciences and health services, Zahedan, Iran.