

بررسی ساختار و مکان‌یابی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در نفرون‌های کلیه‌ی موش نود (*Nude BALB/c*)

سمیه رضوی^۱، صابر خدابنده^{۲*}، محسن آسوری^۳، رمضان بهزادی^۴ و سعید کاووسیانی^۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۷

چکیده

کلیه‌ی موش یک مدل مناسب برای تحقیق مربوط به ساختار و فیزیولوژی کلیه‌ی پستانداران از جمله انسان است. در بین حیوانات آزمایشگاهی، از موش *Nude* به عنوان مدل در مطالعات مربوط به سرطان استفاده می‌گردد. به دلیل اهمیت رابطه‌ی بین پمپ سدیم و پتاسیم و سرطان، ساختار نفرون و مکان‌یابی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در بخش‌های مختلف کلیه‌ی موش *Nude* مورد بررسی قرار گرفت. شش سر موش *Nude* از انستیتو پاستور (شعبه‌ی آمل) تهیه و کلیه‌ی آن‌ها جداسازی شد، سپس بر اساس روش‌های متداول برای بافت‌شناسی آماده‌سازی گردید. تعدادی از مقاطع بافتی با استفاده از روش هماتوکسیلین-اوتوژین رنگ‌آمیزی شد و مکان‌یابی Na^+, K^+ -ATPase با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (رنگ‌آمیزی ایمونوآنزیمی غیرمستقیم: Indirect Immunoenzyme Staining) انجام گرفت. مشاهدات بافت‌شناسی نشان داد که کلیه‌ی موش *Nude* از دو بخش کورتکس و مدولا تشکیل شده است. بخش کورتکس آن آنالوگ کورتکس کلیه‌ی انسان و بخش مدولای آن نیز آنالوگ مدولای کلیه‌ی انسان است. تصاویر ایمونوهیستوشیمی بیش‌ترین میزان فلئورسنت یا به عبارتی حضور Na^+, K^+ -ATPase را به ترتیب در لوله‌ی نزدیک، قطعه‌ی ضخیم صعودی قوس هنله، لوله‌ی دور و مجاری جمع‌کننده نشان دادند. نتایج این مطالعه بیانگر آن است که تفاوت در میزان حضور آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در بخش‌های مختلف کلیه می‌تواند معرف عملکرد متفاوت این بخش‌ها در جذب یون‌ها باشد. همچنین روش ایمونوهیستوشیمی برای تغییرات حضور آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در اثر استفاده از داروها و اثرات جانبی آن روی عملکرد کلیه مناسب به نظر می‌آید.

کلمات کلیدی: پمپ سدیم - پتاسیم، کلیه، نفرون، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

شناسی و مطالعات سرطان از این حیوانات استفاده می‌شود (Belizário 2009). با توجه به نقش مهم کلیه در عمل فیلتراسیون خون، در بررسی اثرات داروهای مختلف از جمله داروهای ضد سرطان مطالعه‌ی ساختار و نقش این اندام در موش *Nude* حائز اهمیت است (Kintzel and Dorr 1995). کلیه یک اندام پیچیده با عملکردهای بسیار شامل: دفع فرآورده‌های زاید متابولیک و مواد شیمیایی، تنظیم تعادل آب (حجم مایع و تنظیم اسمولاریته مایعات

موش *Nude* یک مدل حیوانی آزمایشگاهی دارای نقص سیستم ایمنی است. تضعیف یا از بین رفتن غده‌ی تیموس این حیوانات به وسیله‌ی جهش ژنتیکی، سبب شده است که برای تحقیقات زیست پزشکی دارای ارزش بسیاری باشند. این مدل‌های حیوانی می‌توانند بدون هیچ پاسخ ردی، بسیاری از انواع مختلف پیوند بافت و تومور را دریافت کنند. امروزه در طیف گسترده‌ای از پژوهش‌ها از جمله بیماری‌های عفونی، سلول‌های بنیادی، ایمنی-

^۱ دانشجوی کارشناسی‌ارشد زیست‌شناسی دریا-علوم جانوری، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

^{۲*} دانشیار، گروه بیولوژی دریا، دانشکده‌ی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

^۳ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، آمل

^۴ کارشناس بخش حیوانات آزمایشگاهی، انستیتو پاستور ایران، آمل

^۵ کارشناس بخش کشت سلولی، انستیتو پاستور ایران، آمل

اما به دلیل فقدان مطالعات ساختاری روی کلیه‌ی موش Nude و خصوصاً روی مکان‌یابی Na^+ , K^+ -ATPase، این تحقیق حائز اهمیت است.

مواد و روش کار

تعداد ۶ سر موش *Nude BALB/c* ماده با ۵-۶ هفته سن از انستیتو پاستور آمل تهیه شد. بعد از بیهوش کردن موش‌ها با کلروفورم تشریح صورت گرفت، کلیه‌ی موش‌ها پس از جداسازی، برای انجام مراحل بعدی که شامل بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی بود، به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شدند و سپس در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند.

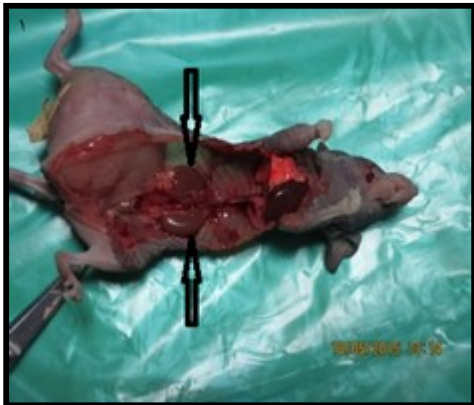
مراحل آب‌گیری با استفاده از الکل‌های ۷۰ درصد (یک ساعت) و ۱۰۰ درصد (دو ساعت) و الکل بوتانول (دو ساعت) و در نهایت زایلن (دو مرحله‌ی دو ساعته) انجام شد. نمونه‌ها بعد از ۲ بار تعویض به مدت ۶ ساعت و ۸ ساعت در پارافین مایع (داخل آون با دمای 60°C)، در داخل پارافین (مرک آلمان) قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم (مدل DS-8402، شرکت دیدسبز)، برش‌های طولی با ضخامت ۴ میکرومتر تهیه گردید. برش برای مطالعات بافت‌شناسی بر روی لام‌های شسته شده در الکل ۷۰ درصد قرار داده شده و لام‌ها ۲۴ ساعت در آون در دمای 37°C نگهداری شدند. بعد از پارافین-زدایی (به کمک زایلن)، رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول هماتوکسلین-ائوزین صورت گرفت. لام‌ها با میکروسکوپ نوری (Nikon, Japan) مجهز به دوربین Olympus DP72 مطالعه و عکس‌برداری شدند (Khodabandeh et al. 2009, Khodabandeh et al. 2005, Martoja and Martoja 1967).

تعیین مکان پمپ سدیم-پتاسیم در کلیه، با استفاده از مکان‌یابی دانسیته‌ی فلئوئورسنت آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase با استفاده از آنتی‌بادی اول $\text{IgG}\alpha_5$ (Monoclonal Antibody Raised Against the a-subunit of the Hybridoma (Chicken NKA; Developmental Studies

بدن) و هموستاز الکترولیت‌ها (H^+ , Cl^- , K^+ , Na^+ ، HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-})، تنظیم فشارخون شریانی، تنظیم تعادل اسیدی-بازی، تولید اریتروپوئین (تحریک ساخت گلبول قرمز)، عملکرد هورمونی، تولید کلسیتریول (فرم فعال ویتامین D)، و به طور کلی فیلتراسیون خون است (Hall 2011). سلول‌های اپیتلیال کلیوی قادر به حمل مقادیر زیادی از الکترولیت‌ها، در مقابل شیب الکتروشیمیایی می‌باشند، که از طریق انواعی از پمپ‌های خاص صورت می‌پذیرد و در میان آن‌ها پمپ سدیم-پتاسیم (Na^+ , K^+ -ATPase) نقش حیاتی دارد (Doucet 1988). آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase عامل اصلی جا به جایی فعال نمک و حرکت آب در خلال بافت اپیتلیالی می‌باشد. Na^+ , K^+ -ATPase آنزیم اساسی پمپ سدیم-پتاسیم است که در غشای پلاسمایی قرار گرفته و مسئول خروج فعال سدیم و ورود پتاسیم به داخل سلول است (Khodabandeh et al. 2005, Khodabandeh and Golzari 2006). Na^+ , K^+ -ATPase به کمک هیدرولیز مولکول ATP، سه یون سدیم را به بیرون و دو یون پتاسیم را به داخل سلول انتقال می‌دهد (1ATP /3Na/2K) (Cieluch et al. 2004). در واقع آنزیم، ATP را برای انتقال متقابل سدیم و پتاسیم در مقابل شیب الکتروشیمیایی هیدرولیز می‌کند، بنابراین شیب شیمیایی قوی و معکوس برای Na^+ و K^+ در طول غشای پلاسمایی تولید می‌شود (Doucet 1988). با توجه به عملکرد آنزیم Na^+ , K^+ -ATPase در بخش‌های مختلف کلیه و همچنین نقش حیاتی پمپ در بقا، تکثیر، چسبندگی و مهاجرت سلول‌های سرطانی (Chen 2014) و پیشرفت داروهای ضد سرطان جدید مؤثر بر پمپ سدیم-پتاسیم، نقش این پمپ در درمان سرطان دارای اهمیت است (Garcia 2015). از این رو تحقیق حاضر به منظور بررسی بافت کلیه این موش‌ها با محوریت مشخص کردن مکان حضور پمپ سدیم-پتاسیم در بخش‌های مختلف کلیه انجام گرفت. اگر چه مطالعات روی ساختار کلیه‌ی موش به عنوان مدل بسیار زیاد است

نتایج

کلیه‌ی موش Nude از نظر ظاهری دارای رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز است و با پوششی از بافت همبند نازک پوشیده شده است و در حفره‌ی شکمی زیر ستون مهره‌ها (از مهره‌ی ۲۲ تا مهره‌ی ۲۴ کمری) قرار دارد (شکل ۱).



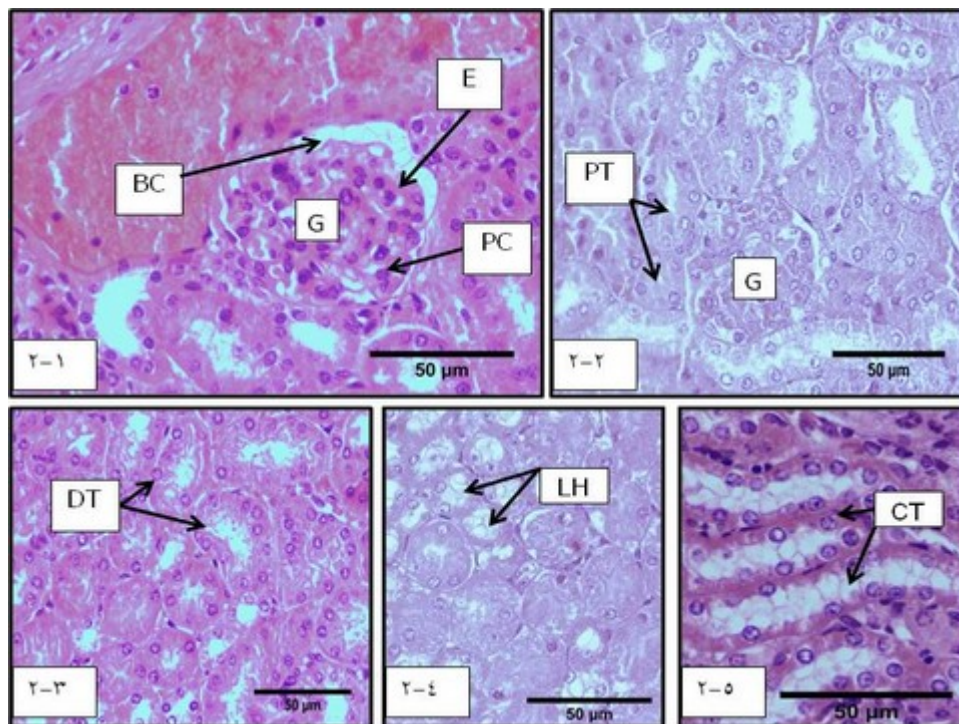
شکل ۱: موقعیت و شکل ظاهری کلیه‌های موش نود از نمای شکمی

بررسی بافت‌شناسی نشان داد که کلیه‌ی موش nude از دو بخش کورتکس خارجی و مدولای داخلی تشکیل شده است. کورتکس خارجی کلیه، متشکل از جسمک کلیه (شامل کپسول بومن و گلومرول) و لوله‌ها (لوله‌ی نزدیک و لوله‌ی دور) و مدولای داخلی متشکل از لوله‌ی هنله و مجاری جمع‌کننده بود (شکل‌های ۲ و ۳). ساختار گلومرول که شامل سلول‌های اندوتلیال، دیواره‌ی رگ‌های خونی، سلول‌های خونی و سلول‌های پودوسایت است به خوبی دیده شدند (شکل ۱-۲). لوله‌ی نزدیک با سلول‌های مکعبی دارای هسته‌های نسبتاً کروی و مرکزی و نوار مسواکی رأسی قابل تشخیص بود (شکل ۲-۲). در لوله‌ی دور که دومین لوله از بخش قشری کلیه است، اپیتلیال با سلول‌های مکعبی آستر شده و دیواره‌ی سلولی به شکل منظمی قرار گرفته بود. سلول‌ها بزرگ، گرد و دارای سیتوپلاسم بازوفیلیک بودند و هسته‌های گرد و یوکروماتیک داشتند و فاقد نوار مسواکی رأسی (brush border) بودند (شکل ۳a-۲). ماکولا دنسا که بخشی از لوله‌ی دور است در نزدیکی گلومرول و شبکه عروقی

Bank, the university of Iowa, USA FITCMouse Anti-fluorescein Antibody (Jackson Immuno Research, USA) و میکروسکوپ فلئوئورسانس انجام گرفت (Khodabandeh et al. 2009, Taghizadeh et al. 2011). برای مطالعه‌ی ایمنوهیستوشیمی، مراحل انجام شده تا مرحله‌ی برش بافت مانند مراحل بافت-شناسی انجام شد. لام‌های حاوی مقاطع کلیوی بعد از پارافین‌زدایی در زایلن و آب‌گیری در الکل اتانول (۱۰۰ درصد، ۸۰ درصد، ۵۰ درصد)، به مدت ۲ دقیقه در محلول PBS_1 یا (۳ قرص phosphate buffered saline در ۱۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۱۰ دقیقه در PBS_2 (۲۵۰ میلی‌لیتر PBS_1 + ۲/۱۸ گرم کلرید سدیم + ۴۰ ماکرولیتیر Tween ۲۰)، ۲۰ دقیقه در PBS_3 (۲۰۰ میلی‌لیتر PBS_2 + ۱۰ گرم شیر خشک Regiler) قرار داده شدند. سپس لام‌ها جهت بازیابی آنتی‌ژن با استفاده از بافر سیترات (10 nM pH=6) در آون ماکروویو در حداکثر قدرت به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و این کار سه بار تکرار شد. بعد از خنک شدن، لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شدند و در محیط مرطوب نگهداری شدند. آنتی‌بادی $\text{IgG}_{\alpha 5}$ در PBS_4 (۲ میلی‌لیتر PBS_3 + ۸ میلی‌لیتر آب مقطر)، به نسبت ۵۰ درصد آنتی‌بادی + ۵۰ درصد PBS_4 رقیق شد، روی هر لام ۲ تا ۳ قطره از آنتی‌بادی $\text{IgG}_{\alpha 5}$ رقیق شده (به میزان $20 \mu\text{g/ml}$ برای ۱۰ لام) قرار گرفت. لام‌ها به مدت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. بعد از شستشوی آنتی‌بادی اول اضافی با PBS ، ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی دوم FITC (۱۵ ماکرولیتیر آنتی‌بادی $+985 \mu\text{g/ml}$ PBS_4) به هر لام اضافه شد و به مدت ۱/۵ ساعت در محیط تاریک نگهداری شدند. سپس لام‌ها با PBS شستشو و با استفاده از چسب انتالان (مرک آلمان) مونتاژ شدند و توسط میکروسکوپ فلئوئورسانس olympus (Sigma, ref. 7534) با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده و از آن‌ها با دوربین Olympus DP72 عکس‌برداری انجام گرفت (Cieluch et al. 2004, Khodabandeh et al. 2009).

فلورسنت بودند (شکل ۱-۳). سلول‌های لوله‌ی نزدیک فلورسنت قابل توجهی را نشان دادند (شکل ۲-۳). قطعه‌ی ضخیم نزولی قوس هنله، فلورسنت ضعیفی را نشان داد (شکل ۳-۳). ایمونوفلورسانس قوی در قطعه‌ی ضخیم صعودی قوس هنله مشاهده شد (شکل ۴-۳) در لوله‌ی دور نیز ایمونوفلورسانس قوی بود (شکل ۵-۳) و در مجاری جمع‌کننده میزان فلورسنت کم بود (شکل ۶-۳). در نهایت با اندازه‌گیری نیمه‌کمی میزان فلورسنت توسط نرم‌افزار image j بیش‌ترین میزان فلورسنت و به عبارتی حضور Na^+ , K^+ -ATPase، به ترتیب در توپول پروگزیمال، قطعه‌ی ضخیم صعودی لوپ هنله، توپول دیستال و مجاری جمع‌کننده دیده شد.

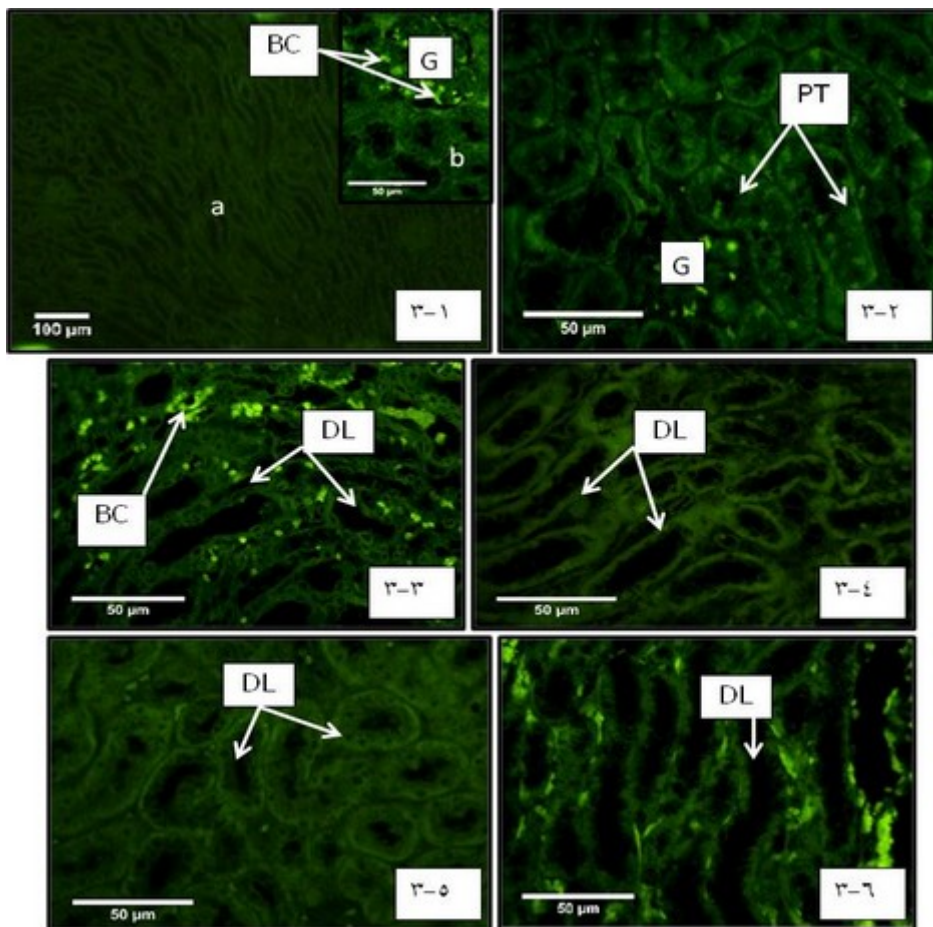
قرار دارد و با سلول‌های کشیده و هسته مشخص قابل تشخیص بود (شکل ۲b-۲). قوس هنله به شکل واضحی از بقیه قسمت‌های نفرون بر اساس پوشش کم سلول‌های اپیتلیالی و سیتوپلاسم همگن ائوزینوفیلیک قابل تشخیص بود (شکل ۲-۴) و لوله‌های جمع‌کننده با سلول‌های یکسان ستونی دیده شدند (شکل ۵-۲). به علاوه مواد ترشچی دفعی در بخش جامی شکل کپسول بومن و مجاری جمع‌کننده قابل مشاهده بود (شکل ۱-۲ و ۵-۲). بررسی ایمونوهیستوشیمی به صورت نیمه‌کمی به وسیله‌ی نرم‌افزار Image j نشان داد که Na^+ , K^+ -ATPase در هر دو بخش کورتکس و مدولا حضور داشته و میزان حضور آن در نواحی مختلف کلیه متفاوت بود. گلومرول‌ها فاقد



شکل ۲: بافت‌شناسی کلاسیک کورتکس و مدولای کلیه در موش نود BALB/c (رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین).

- ۲-۱: ساختار گلومرول در موش nude که سلول‌های اندوتلیال دیواره‌ی رگ‌های خونی، سلول‌های خونی، سلول‌های پودوسایت و مواد ترشچی دفعی در بخش جامی شکل کپسول بومن به خوبی دیده می‌شوند.
- ۲-۲: توپول پروگزیمال با سلول‌های مکعبی، هسته‌های نسبتاً کروی، نوار مساکی رأسی قابل تشخیص است.
- ۲-۳: توپول دیستال با سلول‌های استوانه‌ای قابل تشخیص‌اند.
- ۲-۴: لوپ هنله با پوشش کمی از سلول‌های اپیتلیالی قابل تشخیص است.
- ۲-۵: لوله‌های جمع‌کننده با سلول‌های یکسان ستونی و مواد ترشچی قابل تشخیص است.

G: Glomerulus; BC: Blood Cell; E: Endothelial of vessel; PC: Podocyte; EM: Excretory Materials; PT: Proximal Convoluted Tubule; DT: Distal Convoluted Tubule; LH: Loop of Henle; CD: Collecting Ducts.



شکل ۳: مکان‌یابی سلول‌های غنی از آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (مکان حضور پمپ سدیم-پتاسیم) در کلیه‌ی موش نود BALB/c (به روش ایمونوهیستوشیمی (IIS) - فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر (فیلترهای شیشه‌ای رنگی) بزرگنمایی $\times 40$)
 ۳-۱: (a): نمای کلی از کلیه، (b): گلومرول‌ها تاریک و فاقد فلورسنت هستند (G)، سلول‌های خونی (BC).
 ۳-۲: سلول‌های توپول پروگزیمال فلورسنت قابل توجهی را نشان دادند.
 ۳-۳: در قطعه‌ی ضخیم نزولی لوپ هنله با دیواره‌ی نازک، فلورسنت ضعیفی مشاهده می‌شود.
 ۳-۴: در قطعه‌ی ضخیم صعودی لوپ هنله ایمونوفلورسانس قوی مشاهده می‌شود.
 ۳-۵: کل سیتوپلاسم سلول‌های توپول دیستال ایمونوفلورسانس قوی نشان می‌دهند.
 ۳-۶: در بخش قاعده‌ای - جانبی لوله‌های جمع کننده‌ی ایمونوفلورسانس ضعیفی مشاهده می‌شود.

G: Glomerulus; PT: Proximal Convoluted Tubule; DT: Distal Convoluted Tubule; CD: Collecting Ducts; BC: Blood Cell; DL: Thick Piece of Descending Loop; AL: Thick Piece of Ascending Loop.

بحث

ساختارهای لوله‌ای مختلف ساخته شده‌اند. کورتکس شامل: جسمک کلیه (renal corpuscle)، لوله‌ی نزدیک و لوله‌ی دور می‌باشد. جسمک کلیه متشکل از گلومرول و کپسول بومن است. گلومرول، از یک دسته مویرگ‌های ویژه در کپسول بومن تشکیل شده است. لوله‌ی نزدیک

بررسی سری برش‌های کلیه‌ی موش نود نشان داده که دو بخش کورتکس خارجی و مدولای داخلی به راحتی قابل تشخیص هستند. کورتکس خارجی دارای عروق زیادی بوده و بخش مدولای داخلی ضخامت و عروق کمتری داشت. اما هر دو بخش کورتکس و مدولا از

نقش آن‌ها در فیلتراسیون و عدم دخالت در جذب نوترینت‌ها و یون‌ها منطقی به نظر می‌رسد تحقیقی به روش استفاده شده در این مقاله بین تحقیقات پیشین یافت نشد، اما طبق تحقیقات محتوای نسبی آنزیم در سه زیر بخش آناتومیک مشخص شده است: بیش‌ترین میزان در مدولای بیرونی، میزان متوسطی در کورتکس و میزان کمی در مدولا- پایپلای داخلی قرار دارد (Katz 1986). در تحقیق حاضر وجود فلورسنت قوی در لوله‌ی نزدیک بیان‌گر وجود آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ در این بخش است. بر اساس نتایج تحقیقات Bachmann و همکاران در سال ۱۹۸۸ و Verlander در سال ۱۹۹۸، مولکول‌هایی کوچک مانند گلوکز، آمینواسید، آب، الکترولیت‌ها و دیگر املاح به وسیله‌ی انتقال ویژه به میزان زیادی در این لوله، توسط $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ باز جذب می‌شوند (Bachmann 1998, Verlander 1998). در ضمن فلورسنت زیادی در قوس هنله مشاهده شد که این مطابق با یافته‌های پیشین است که سهم فرآیندهای انتقالی فعال (و غیرفعال) در غلظت محلول به ترتیب در قطعه‌ی نزولی و صعودی قوس هنله قطعی است (Ernst and Schreiber 1981) و مطالعات سیتوکمیکال وجود $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ را در بخش نازک نزولی قوس هنله نشان داده است (Verlander 1998). بر خلاف تحقیق حاضر، Katz در سال ۱۹۸۶ اظهار کرد که فعالیت بیش‌تر آنزیم در بخش مدولای خارجی نشان دهنده‌ی این واقعیت است که این بخش حاوی قطعه‌ی ضخیم صعودی مدولایی از هنله است، که در بین قطعات دارای بالاترین غلظت از $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ در کل نفرون است (Katz 1986). در مکان‌یابی آنزیم، در لوله‌ی دور دیده شد که همانند قوس هنله دارای فلورسنت نسبتاً زیادی است که طبق یافته‌های Verlander در سال ۱۹۹۸ اگر چه لوله‌ی دور مانند قطعه-ی ضخیم صعودی هنله در انتقال فعال سدیم به وسیله‌ی $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ قاعده‌ای- جانبی درگیر است و نسبت به آب نفوذناپذیر است، از لحاظ عملکردی فعالیت کم-تری از قطعه‌ی ضخیم صعودی هنله دارد (Verlander

دارای یک لایه از سلول‌های مکعبی اتوزینوفیلیک با سیتوپلاسم دانه‌دار و brush border است. لوله‌ی دور دارای سلول‌های استوانه‌ای، هسته‌های گرد و بزرگ قاعده‌ای، بدون نوار مساوکی رأسی و سیتوپلاسم کم رنگ هستند. در لوله‌ی دور ماکولا دنسا نیز قابل مشاهده است. در ضمن مشاهده شده که قوس هنله با پوشش کمی از سلول‌های اپیتلیالی و لوله‌های جمع کننده با سلول‌های یکسان ستونی قابل تشخیص است. قطعه‌ی ضخیم نزولی لوله‌ی هنله در مدولا مانند لوله‌ی نزدیک در کورتکس است، در حالی که قطعه‌ی ضخیم صعودی از مدولا به لوله‌ی دور کورتکس شباهت دارد. همان طور که قبلاً اشاره شد تحقیقات متعددی روی ساختار کلیه‌ی موش انجام گرفته است ولی در تحقیق حاضر هدف بررسی ساختار کلیه در موش نود بوده است. در تحقیقات پیشین نیز اشاره شده که کلیه‌ی موش شامل کورتکس و مدولا بوده و هر نفرون متشکل از گلومرول، کپسول بومن، لوله-های نزدیک و لوله‌های دور می‌باشد. طبق تحقیق Al-Samawy در سال ۲۰۱۲، لوله‌های نزدیک و دور مسؤول باز جذب ۸۰-۷۰ درصد فیلترای گلومرولی هستند و بخش مدولا شامل لوله‌های جمع‌آوری کننده، قطعه‌های نازک و ضخیم از لوله‌ی هنله است (Al-Samawy 2012). مطالعات نشان داده که لوله‌ی نزدیک به دو بخش پچ‌پچ و مستقیم تقسیم شده است (Bachmann 1988). این لوله بسیار تنگ‌تر از لوله‌ی دور است (Al-Samawy 2012). همچنین Al-Samawy در سال ۲۰۱۲ دریافت که، لوله‌ی دور تا حدودی از لوله‌ی نزدیک کوتاه‌تر است و به تعداد کم‌تری در ناحیه‌ی قشری قرار دارد (Al-Samawy 2012). به طور کلی بررسی نتایج پیشین و نتایج تحقیق حاضر نشان داد که موش نود ساختار عمومی کلیه‌ی پستانداران را داشته، لذا تغییرات ساختاری مشهودی در اثر حذف سیستم ایمنی در این موجود به وجود نمی‌آید. بررسی تصاویر ایمونوهیستوشیمی نشان داد که گلومرول و کپسول بومن بدون فلورسنت (عدم حضور قابل ملاحظه‌ی پمپ سدیم- پتاسیم) می‌باشد که با توجه به

حضور در قطعاتی که مقدار زیادی سدیم را برخلاف شیب غلظت بازجذب می‌کنند مشاهده می‌شود که معمولاً شامل قطعه‌ی ضخیم صعودی و لوله‌ی دور است. فعالیت متوسط در جایی است که سدیم از یک مایع ایزواسموتیک بازجذب می‌شود، یعنی لوله‌ی نزدیک و حضور و فعالیت کم $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ در لوله‌های جمع کننده (که بازجذب سدیم تنظیم می‌شود) و pars recta بوده و به سختی در قطعه‌ی باریک از قوس هنله قابل تشخیص است (Doucet 1988). از مطالعه‌ی حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که کلیه‌ی موش نود از نظر بافت-شناسی ساختاری مشابه با کلیه‌ی انسان دارد و همچنین با توجه به این شباهت، بررسی حضور و فعالیت نسبی پمپ سدیم-پتاسیم و همچنین تغییرات آن در بخش‌های مختلف کلیه می‌تواند در تحقیقات متعدد شاخص مناسبی برای عملکرد کلیه باشد.

(1998). در نهایت وجود $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ در مجاری جمع کننده مشاهده شد، که منطبق با نتایج سایر پژوهش‌ها مبنی بر وجود آنزیم در غشای قاعده‌ای- جانبی مجاری جمع کننده به عنوان قسمت انتهایی نفرون است (Verlander 1998). در نهایت بررسی تحقیقات متعدد روی فعالیت آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ در بخش‌های مختلف کلیه بیان‌گر آن است که وجود آنزیم در طول نفرون، که شامل حضور و فعالیت نسبی آنزیم در بخش-های مختلف است، صرف نظر از روش مورد استفاده و یا گونه‌های مورد مطالعه، مشابه است (Katz 1986). اندازه-گیری میزان فلورسنت در تحقیق حاضر توسط روش نیمه‌کمی با استفاده از نرم‌افزار image j بیش‌ترین میزان فلورسنت یا به عبارتی حضور $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ را در لوله‌ی نزدیک و کم‌ترین میزان فلورسنت را در مجاری جمع کننده نشان داد که به نقش مهم آن‌ها در جذب یون-ها اشاره دارد. بر اساس تحقیقات بیش‌ترین فعالیت و

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری انستیتو پاستور شمال کشور انجام شد. از این رو از کلیه‌ی پرسنل زحمت‌کش این پژوهشگاه و آقای مهندس سیدمصطفی حسینی و خانم حیاتی کمال تشکر را داریم.

منابع

- Al-Samawy, E.R.M. (2012). Morphological and histological study of the kidneys on the Albino rats. Al-Anbar Journal Veterinary Science, 5(1): 115-119.
- Bachmann, S. (1988). Nephron- and Collecting Duct Structure in the Kidney, Rat. 1th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Pp:7-33.
- Belizário, J.E. (2009). Immunodeficient mouse models: an overview. Open Immunology Journal, 2: 79-85.
- Chen, D.; Song, M.; Mohamad, O. and Yu, S.P. (2014). Inhibition of $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. BMC cancer, 14(1): 716.
- Cieluch, U.; Anger, K.; Aujoulat, F.; Buchholz, F.; Charmantier-Daures, M. and Charmantier G. (2004). Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Biology, 207(2): 325-336.
- Doucet, A. (1988). Function and control of $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ in single nephron segments of the mammalian kidney. Kidney International, 34(6): 749-760.
- Ernst, S.A. and Schreiber, J.H. (1981). Ultrastructural localization of $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ in rat and rabbit kidney medulla. The Journal of Cell Biology, 91(3): 803-813.
- Garcia, D.G.; de Castro-Faria-Neto, H.C.; Da Silva, C.I.; Gonçalves-de-Albuquerque, C.F.; Silva, A.R.; De Amorim, L.M.D.F. and de Castro Faria, M.V. (2015). $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ as a target for anticancer drugs: studies with perillyl alcohol. Molecular Cancer, 14(1): 105.

- Hall, J.E. (2011). Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12 th ed. Elsevier Health Sciences. Saunders, London, Pp: 565-567.
- Katz, A.I. (1986). Distribution and function of classes of ATPases along the nephron. *Kidney International*, 29(1): 21-31.
- Khodabandeh, S. and Golzari, A. (2006). Immunolocalization of Na⁺, K⁺- ATPase in the branchial cavity of *Palaemon elegans* (Decapoda, Crustacea) and effects of mercury on Na⁺, K⁺- ATPase Immunoreactivity. *Integrative and Comparative Biology*, 45B: 1153-1161.
- Khodabandeh, S.; Mosafar, S. and Khoshnood, Z. (2009). Effects of cortisol and salinity acclimation on Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter gene expression and Na⁺, K⁺-ATPase activity in the gill of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. *Science Marine*, 73(S1): 111-116.
- Khodabandeh, S.; Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. (2005). Ultrastructural Studies and Na⁺, K⁺- ATPase Immunolocalization in the antennal urinary glands of the lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(10): 1203-1214.
- Kintzel, P.E. and Dorr, R.T. (1995). Anticancer drug renal toxicity and elimination: dosing guidelines for altered renal function. *Cancer Treatment Reviews*, 21(1): 33-64.
- Martoja, R.; Martoja-Pierson, M. *Initiation aux techniques de l'histologie animal*. (1967). Paris, Masson et Cie, P: 345.
- Taghizadeh, Z.; Khodabandeh, S. and Abtahi, B. (2011). Ultrastructure and osmoregulatory function of the kidney in larvae of the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Journal of Fish Biology*, 78(5): 1359-1374.
- Verlander, J.W. (1998). Normal ultrastructure of the kidney and lower urinary tract. *Toxicologic Pathology*, 26(1), 1-17.

The structure and Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in the Kidney Nephron of nude mouse (*Nude BALB / c*)

Razavi, S.¹; Khodabandeh, S.²; Asouri, M.³; Behzadi, R.⁴ and Kavousian, S.⁵

Received: 28.10.2016

Accepted: 04.07.2017

Abstract

The kidney of the mouse is model for the study of the structure and physiology of nephron in mammals, including humans. The laboratory animals, Nude mouse is used frequently as a model in the study of cancer. Due to the importance of the relationship between sodium-potassium pump and cancer, the nephron structure and Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in different parts of the kidney were examined in Nude mouse. Six Nude mouse from Pasteur Institute (Amol Branch) were prepared and their kidneys were isolated, then based on the usual histological method, dehydrating and embedding in paraffin were carried out. A number of tissue sections stained by using hematoxylin and eosin, and localization of Na⁺, K⁺-ATPase was performed using immunohistochemistry method. Histological observation showed that the kidney of the Nude mice composed of two parts: cortex and medulla, cortex is the analogue of the human kidney cortex and medulla is the analogue of the human kidney medulla. Immunohistochemistry photographs showed that the presence of Na⁺, K⁺-ATPase, as an indicator of presence of sodium-potassium pump, is different in segments of kidney. The results of this study suggests that Na⁺, K⁺-ATPase intensity in different segments of kidney shows the different function of ions absorption in these segments. Also immunohistochemical method is useful for the changes of Na⁺, K⁺-ATPase presence, due to using of drugs and their side effects on the kidney function.

Key words: Na⁺-K⁺-ATPase, Kidney, Nephron, Immunohistochemistry

1- MSc Student of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- PhD Student of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

4- Expert in Department of laboratory animals, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

5- Expert in Department of cell culture, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

Corresponding Author: Khodabandeh, S., E-mail: surp78@gmail.com