Archive of SID

● مقالات تحقیقی (۵)

مطالعه بافت شناسی مراحل تکاملی تمایز گلومرولها

فاطمه ملک
عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه بافت‌شناسی

دکتر محمدتقی الطریحی
استادیار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بافت‌شناسی

دکتر علیقلی سبحانی
استادیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

چکیده

بررسی تمایز گلومرولهای کلیه و شناسایی این مراحل تکاملی می‌تواند بسیاری از مسائل مربوط به بیماریهای کلیوی را حل نماید. در این مطالعه جهت بررسی تمایز گلومرولهای کلیه در حیوان آزمایشگاهی موش رت[۱] از نژاد SD[۲]، ۲۵ نوزاد ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روزه مورد بررسی کیفی بافت‌شناسی قرار گرفتند. تمام حیوانها با کلروفرم بیهوش گردیدند، کلیه چپ حیوان برداشته شده و در فرمالین سالین ۱۰ درصد ثابت شدند و به روش معمول بافت‌شناسی آماده‌سازی شدند و مقاطع بافتی باضخامت ۵ میکرون از آنها تهیه گردید. این مقاطع با روشهای هماتوکسیلین - ائوزین، پریودیک اسیدرآژین‌شیف و نیترات نقره کلوییدی رنگ امیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. مطالعات حاصل نشان داد که گلومرولهای کلیوی ۴ مرحله تکاملی وزیکول کلیوی، جسم s شکل، حلقه مویرگی در حال تکامل و بلوغ را پشت سر می‌گذارند تا به گلومرولهای تکامل یافته تبدیل شوند. طی مراحل تکاملی بر تعداد مویرگهای گلومرولی و قطر گلومرولها افزوده می‌شود و فضای مشخصی بین سلولهای اپی تلیوم احشایی و جداری ایجاد می‌گردد. لایه پایه[۳] گلومرولی در مرحله سوم مشاهده گردید. گلومرولهای ناحیه ژوکستامدولاری (مجاور مدولا) سریعتر از گلومرولهای ناحیه قشری و بینابینی تکامل می‌یابند. به هر حال در روز دوازدهم بعد از تولد تمامی گلومرولها از نوع بالغ می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: کلیه، نفرون، گلومرول، نوزاد رت، تمایز

۱-Rat
۲-Spruge Dawley
۳-Basal lamina

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مدت زمانی است که تمایز کلیه‌ها به عنوان یکی از مسایل مهم علم جنین‌شناسی مورد توجه واقع شده است. شاید بتوان مدعی شد که امروزه پیشرفتهای چشمگیری در این رابطه به دست آمده‌است، با این حال هنوز مسائل حل نشده بسیاری در این زمینه باقی است. به طور کلی تمایز نفرون به مراحلی اطلاق می‌شود که طی آن سلولهای کلیوی، شکل و عمل نهایی خود را بدست می‌آورند لویس[1] در سال ۱۹۸۵ بعد از مطالعه روی جنین خرگوش و گوسفند گلومرولها را بعنوان اجسام توپر مزودرمی که عروق خونی تا نزدیکی آن کشیده شده معرفی نمود[۲،۱].

لارسن[2] در سال ۱۹۷۵ چهار مرحله تکاملی را برای گلومرولها ذکر نمود[۳]. همچنین برن استین[3] تمایز جوانه متانفریک به نفرونها را در سال ۱۹۸۱ گزارش نمود و چهار مرحله تکاملی پیشنهاد شده توسط لارسن را تأیید کرد[۴]. بوهل[4] و همکارانش با مطالعهٔ هیستو پاتولوژیک کلیه اعلام نمود که در بسیاری از بیماریهای کلیوی نوعی برگشت به حالت جنینی دیده می‌شود[۵]. در این رابطه به بیماریهایی نظیر لیپوئید و نفروزیس و... می‌توان اشاره نمود که در آنها زواید پا (سلولهای احشایی کپسول بومن) از نظر ابعاد تغییر یافته و بسته به شدت بیماری به اشکال مختلف پهن‌تر، صاف‌تر و کوتاهتر در می‌آیند[۶،۵].

در این بیماریها کمپلکسهای اتصال بین سلولها و لایه پایه نیز سرانجام جانشین شکافهای غشایی می‌گردند[۷]. در حالی که در طی مراحل تکامل کمپلکسهای اتصالی توسط شکافهای غشایی جایگزین می‌شوند[۸]. محققین معتقد هستند که لایه پایه گلومرولی از اتصال لایه پایه اندوتلیومی مویرگی و لایه پایه پودوسیتها ایجاد می‌شود که عدم تشکیل یا اختلال در ساختمان آن منجر به کم‌کاری کلیه می‌گردد[۹]. در نفریت همین ساختمان و فرا ساختمان غشاء پایه گلومرولی دچار آسیب می‌شود[۱۰]. مطالعات دیگر روی تمایز اپی‌تلیوم مویرگ گلومرول نشان داد که تجویز پروتامین سولفات به مادران باردار موجب عبور این ماده از جفت و تأخیر در رشد و تمایز این اپی‌تلیوم می‌شود[۱۱]. بنابراین به نظر می‌رسد که بررسی و مطالعه تمایز کلیه‌ها، علاوه بر بررسی مراحل تکاملی کلیه‌ها در شناسایی بیماریها نیز بسیار مؤثر است. از آنجائیکه بدست آوردن نمونه جهت مطالعه کلیه انسان مشکلات فراوانی داشته و در بعضی مواقع غیرممکن است و همچنین گلومرولهای کلیه در نوزادان موش رت به هنگام تولد کاملاً تمایز نیافته و ساختمان کلیه در رت با یک لوب از کلیه انسان مطابقت کامل دارد[۹]. بر این اساس در این مطالعه از حیوان آزمایشگاهی موش رت استفاده شده است. به نظر می‌رسد مطالعه تمایز گلومرولها در نوزادان موش رت می‌تواند ما را در شناسایی مشکلات کلیه در انسان یاری نماید. باشد که گامهای دیگری در این زمینه برداشته شود و پرده‌های دیگری از روی سایر ابهامات کنار رود.

روش کار

برای نمونه‌گیری ۲۵ نوزاد از نژاد SD را که تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شده بودند از انستیتو رازی ایران تهیه گردیدند. این نوزادها در پنج گروه به شرح زیر تقسیم‌بندی شده، مورد مطالعه قرار گرفتند.

۵ نوزاد ۱ روزه، ۵ نوزاد ۳ روزه، ۵ نوزاد ۶ روزه، ۵ نوزاد ۹ روزه، ۵ نوزاد ۱۲ روزه و همچنین چند موش رت بالغ نیز به عنوان شاهد انتخاب گردیدند. در روز آزمایش موشها توسط محلول کلروفروم بیهوش گردیده و در زیر بیهوشی مورد جراحی قرار گرفتند و پس از برداشت کلیه‌های چپ حیوانات و شستشو در محلول فرمالین سالین ۱۰درصد ثابت گردیدند. بعد از ثابت کردن، نمونه‌ها با استفاده از روش پاساژ به وسیلهٔ پارافین جامد آماده گردیدند. مراحل پاساژ بافتی عبارت بودند از:

آبگیری، الکل‌گیری، شفاف کردن، آغشتگی و قالب‌گیری سپس بافت‌ها توسط دستگاه میکروتوم[5] با ضخامت ۵ میکرون برش داده شدند. از هر بافت حدود ۱۰۰ لام سفید میکروسکوپی تهیه گردید. لام‌های مربوط به همه نمونه‌های حیوانی با روش رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. در ضمن برای تعدادی از نمونه‌ها روش‌های رنگ‌آمیزی پاس و نیترات نقره کلوییدی برای نشان دادن لایهٔ پایه گلومرولی در مراحل مختلف تکاملی گلومرول مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تهیهٔ لام‌های سفید و رنگ‌آمیزی، لام‌ها با میکروسکوپ نوری[6] با استفاده از بزرگنمایی‌های شیئی ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفته و عکسبرداری شدند.

۱-Lewis
۲-Larsen
۳-Bernstein
۴-Bohle
۵-Rotatory microtome
۶-Olympus Tokyo

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

مطابق مطالعات انجام شده بر روی نمونه‌ها ۴ مرحلهٔ مختلف تکاملی برای گلومرول‌ها شناسایی گردید که این مراحل عبارتند از :

۱- مرحله وزیکول کلیوی (فقط در روز اول مشاهده گردید).

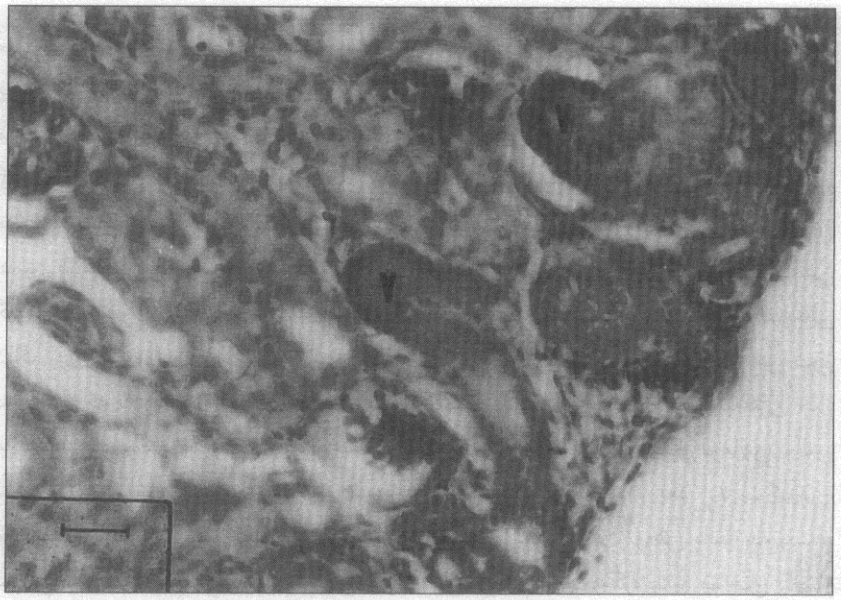
۲- مرحلهٔ جسم s شکل (اکثر آنها در روز سوم بعد از تولد مشاهده گردیدند).

۳- مرحلهٔ حلقهٔ مویرگی در حال تکامل (اکثراً در روزهای ششم و نهم مشاهده گردیدند).

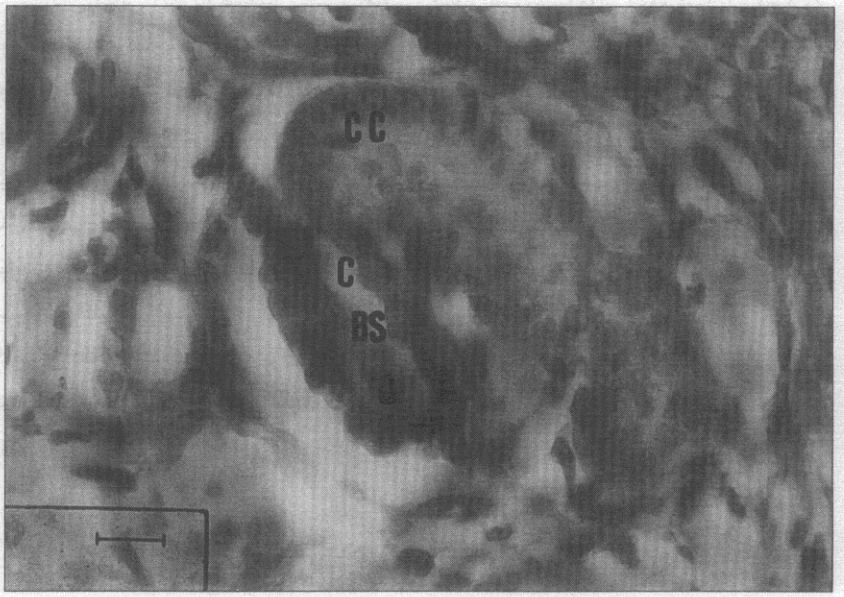
۴- مرحلهٔ رسیدگی یا نهایت تکامل گلومرولی (اکثراً در روز دوازدهم مشاهده گردیدند).

در مرحلهٔ وزیکول کلیوی، وزیکول کلیوی هیچ‌گونه شباهتی به گلومرول بالغ نداشته و شامل یک دسته سلولهای اپی‌تلیال منشوری است که به صورت یک تودهٔ مجتمع دیده می‌شود. لایهٔ پایه گلومرولی در این مرحله دیده نمی‌شود. مویرگ‌های گلومرولی در وزیکول دیده نمی‌شوند (تصویر۱).

در مرحلهٔ دوم گلومرول‌ها یک حالت s شکل را تشکیل داده‌اند بطوریکه ۱ تا۴ مویرگ در مقطع عرضی گلومرول مشاهده می‌شود. در این مرحله اپی‌تلیوم گلومرولی و توبولی از یکدیگر متمایز و سلولهای اپی‌تلیوم توبولی به صورت سلولهای مکعبی هستند (تصویر۲). شروع تشکیل فضای بومن در مرحلهٔ جسم S شکل و از قسمت داخلی کمان S می‌باشد (تصویر۲). در رنگ‌آمیزیهای پاس و نیترات نقره کلوییدی لایه پایه گلومرولی در مرحله دوم تکاملی مشاهده نگردید.



تصویرشماره(۱): مرحله وزیکول کلیوی (V) را نشان می‌دهد بطوری که سلولهای اپی‌تلیال منشوری در داخل وزیکول مشهود هستند و هیچ مویرگی در گلومرولها مشاهده نمی‌شود. بزرگنمایی - ۲۰۰، رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین ائوزین



تصویر شماره(۲): مرحله دوم تکامل (جسم S شکل) را نشان می‌دهد. در این مرحله مویرگها (C) مشاهده می‌گردند. همچنین از داخل کمان S شکل فضای بومن (BS) شروع به تشکیل کرده است. بزرگنمایی - ۴۰۰، رنگ‌آمیزی - هماتوکسیلین ائوزین

www.SID.ir

Archive of SID

در مرحلهٔ حلقهٔ مویرگی در حال تکامل، گلومرول شباهت زیادی به گلومرول بالغ پیدا کرده، دایره شکل بوده و شامل ۵ مویرگ یا بیشتر در هر مقطع عرضی است. در این مرحله بین اپی‌تلیوم احشایی و جداری فضای مشخص ایجاد می‌شود که فضای ادراری یا فضای بومن نامیده می‌شود. سلولهای جداری در این مرحله به صورت سلولهای سنگفرشی دیده می‌شود که کاملاً مشخص و متمایز از سلولهای احشایی هستند.

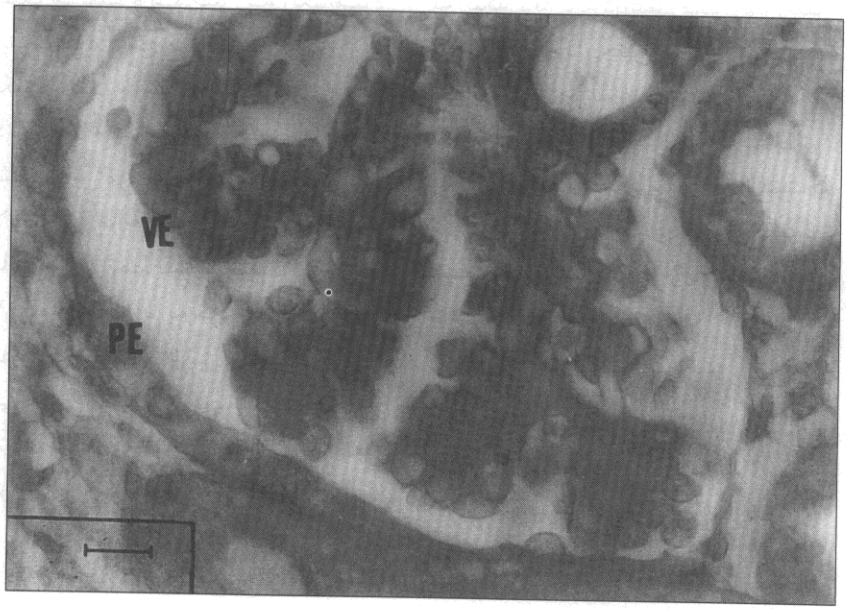
لبوله شدن گلومرول در این مرحلهٔ از تکامل آغاز می‌گردد که در رنگ‌آمیزی پاس مشخص است (تصویر۳) لایهٔ پایه گلومرولی در این مرحله تشکیل می‌شود و در رنگ‌آمیزی اختصاصی، لایهٔ پایه به خوبی دیده می‌شود بطوری که در رنگ‌آمیزی پاس به صورت خطوط قرمز و در رنگ‌آمیزی نیترات نقره به صورت خطوط سیاه مشخص می‌گردند. (تصویر۳).

گلومرول در مرحلهٔ چهارم تکاملی بیضی شکل بوده، حاوی حلقه‌های مویرگی متعدد است. در این مرحله اپی‌تلیوم احشایی و جداری کاملاً از یکدیگر تمایز یافته‌اند و لبوله شدن گلومرول در این مرحله کامل گردیده است. در داخل هر لبول سلولهای مزانژیال به صورت سلولهایی نامنظم دیده می‌شوند که هستهٔ آنها به شدت رنگ می‌گیرد. لایهٔ پایه گلومرولی در این مرحله به صورت کامل تشکیل شده است که در رنگ‌آمیزهای اختصاصی پاس و نیترات نقره به خوبی قابل مشاهده است (تصویر ۴)

با پیشرفت تکامل گلومرول، بر تعداد مویرگهای گلومرولی افزوده می‌شود و همچنین اندازهٔ گلومرول افزایش می‌یابد به طوری که گلومرولها در مرحلهٔ چهارم دارای بزرگترین اندازهٔ خود می‌باشند.



تصویر شماره(۳): مرحله سوم تکامل را نشان می‌دهد لبوله شدن گلومرولها در این مرحله کاملاً مشخص است در این مرحله لایه پایه به خوبی مشخص گردیده است.
بزرگنمایی - ۴۰۰، رنگ‌آمیزی PAS



تصویر شماره(۴): مرحله چهارم تکامل را نشان می‌دهد. در این مرحله فضای بومن (BS) به خوبی مشخص است و اپی‌تلیوم جداری (PE) و احشایی (VE) کاملاً از هم فاصله گرفته‌اند.
بزرگنمایی - ۴۰۰، رنگ‌آمیزی PAS

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بررسی تمایز کلیه‌ها برای اولین‌بار در سال ۱۶۶۶ توسط مارسلومالپیگی[۱] آغاز گردید. او با توصیف دقیق تشریح میکروسکوپی کلیه قدم بزرگی در این زمینه برداشت[۱۲،۱۰] و چنین بیان کرد که قشر کلیه دارای تعداد ساختمانهای غده مانند می‌باشد که این ساختمانها احتمالاً در ارتباط با شریانها و توبولهای کلیوی هستند. بعدها این ساختمانها تحت عنوان کورپوسکلهای مالپیگی نامیده شدند اما مالپیگی در پیش‌بینی این مطلب که این کورپوسکهای کلیوی در واقع شامل یک شبکهٔ مویرگی بسیار پیچیده هستند دچار مشکل بود.

سرانجام ویلیام بومن به نتایج قاطعی در این زمینه دست یافت و پس از سالها تحقیق بیان کرد که اجسام مالپیگی توده‌گردی از رگهایی هستند که توسط یک کپسول احاطه شده‌اند که آن را بعدها کپسول بومن نامیدند[۱۳].

در تحقیقات بعدی روی تمایز کلیه مشخص شد که روند تکامل گلومرولهای کلیه در نوزادان موش رت در هنگام تولد کامل نمی‌گردد و این روند در روزهای اولیهٔ پس از تولد ادامه می‌یابد تا گلومرولها به بلوغ کامل برسند[۱۴،۱۱].

لارسن و مانزباخ نیز در سال ۱۹۸۰ به بررسی تمایز کلیهٔ موش رت در نوزادان ۳ و ۴۰ روزه اقدام کردند و مطالعات خود را به این دو روز محدود[۱۵]، البته به نظر می‌رسد این فاصلهٔ زمانی جهت اظهارنظر دقیق مناسب نمی‌باشد.

در این بررسی، روند تکامل گلومرولهای کلیه از روز تولد تا روز دوازدهم بررسی گردیده است. در این مطالعه ۴ مرحله تکاملی گلومرولها یعنی مراحل وزیکول کلیوی، جسم S شکل، حلقهٔ مویرگی در حال تکامل و بلوغ یا رسیدگی شناسایی گردید که این موضوعها با نتایج مطالعات انجام شده بسیاری از محققین همخوانی دارد[۱۸،۱۵،۴].

پس از شناسایی مراحل تکاملی گلومرولها با استفاده از رنگ آمیزیهای اختصاصی پاس و نیترات نقره کلوییدی به بررسی وجود لایهٔ پایه در مراحل مختلف تکاملی پرداختیم زیرا لایهٔ پایه گلومرولی به علت وجود گلیکوپروتئین‌ها جزء مواد پاس مثبت می‌باشد و همچنین به رنگ‌آمیزی نیترات نقره پاسخ می‌دهد. در مرحلهٔ ۱ و ۲ تکاملی یعنی مرحلهٔ وزیکول کلیوی و جسم S شکل ما موفق به تشخیص این لایه نشدیم. این موضوع مؤید عدم تشکیل این لایه در این مراحل است که با نتایج لارسن و مانزباخ[۲][۱۸] مطابقت می‌کند. در مراحل ۳ و ۴ تکاملی لایهٔ پایه به خوبی دیده می‌شود که مطالعات لویس[۳][۲] نیز این مطلب را تأیید می‌کند. با توجه به مطلب فوق می‌توان نتیجه گرفت که مراحل تکاملی اولیه یعنی مراحل وزیکول کلیوی و جسم S شکل در عمل فیلتراسیون نقشی ایفا نمی‌کنند. در این مطالعه همچنین مشخص گردید که که با پیشرفت تکامل گلومرولی بر تعداد مویرگهای گلومرولی افزوده می‌گردد. به طوری که در مرحلهٔ سوم تکاملی در هر گلومرول تعداد ۵ یا بیشتر مویرگ یافت می‌شود که این یافته نیز با نتایج دیگر محققین اختلافی ندارد[۱۸]. با توجه به اینکه طبق نظر محققین تشکیل لایه پایه گلومرولی به تشکیل لایه پایه عروقی وابسته است[۹] این مسئله نیز عدم تشکیل لایه پایه گلومرولی در مرحله دوم تکامل را تأیید می‌کند. حال با توجه به بیماریهای مورد اشاره در قسمت مقدمه که منجر به برگشت کلیه‌ها به حالت جنینی می‌گردند و با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه که نشان دهنده عدم تشکیل لایه پایه در دو مرحله اول تکاملی (وزیکولی و S شکل) می‌باشد و نظر به اینکه لایه پایه در عمل فیلتراسیون نقش مهمی ایفا می‌کند چنین استنباط می‌شود که یکی از دلایل اولیه عدم کارایی کلیه‌ها در بیماریهای فوق تخریب این لایه باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد، برای موفقیت در درمان بالینی بیماریهای کلیوی تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه‌ها از دیدگاه تکاملی بیشتر مدنظر واقع شود. ■

۱-Malpigie ۲-Maunsbach
۳-Liwis

مراجع

1. Lewis OJ. The development of the blood vessels of the metanephrons. J Anat 1958; 72: 884-907.
2. Lewis OJ. The vascular arrangement of the mamalian renal glomerulus as revealed by a study of its development. J Anat 1958; 92: 433-440.
3. Larsson L. The ultrastructure of the glomerulas. J Ultrastruct Res 1975; 51: 119-139.
4. Bernstein J. Glomerular differentiation in metanephric organ

www.SID.ir

Archive of SID

culture. lab Invest 1981; 45:183-190.

5. Bohle A, Schubrt B, wehrmann M. Transmission and scanning electron microscopy Investigations on the structure of the ultrafilter glomeruli in human acute renal failure. Am J Nephrol 1988; 8:112-117.
6. Grishman E. Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: an electron microscopic study of glomerular podocytes. kidney Interanational 1975; 7(4): 112-122.
7. Jones DB. Correlative scanning and transmission electron microscopy of glomeruli. Lab Invest 1977;37(6): 569-578.
8. Aoki A. Temporary cell junctions in the developing human renal glomerulus. Dev Biol 1976; 15:156-160.
9. Kurtz SM, Feldman J D. Experimental studies on the formation of glomerular basement membrane. J Ultrastruct Res 1982; 19-27.
10. Hironaka K, Makino H, Onbe T, et al. Ulterastructural change of the glomerular basement membrane in rats with Heimen nephritis revealed by ultrahigh resolution scanning electron microscopy. J pathol 1996; 179(1): 112-120.
11. Mbassa G, Elger M, Kriz W. The ultrastructural organization of the basement membrane of Bowman's capsule in the rat renal corpuscle cell. Tissue Res 1988; 253: 151-163.
12. Ekblom P. Determination and differentiation of the nephron. Med Biol 1981; 59: 139-160.
13. Fine LG. Bowman's descriptor of the glomerulus. Am J Nephrol 1985; 5:437-440.
14. Reeves W. Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits, lab Invest 1978; 39(2): 90-96.
15. Ellis NE, Maver M, Steffes W M, et al. Glomerular capillary morphology in normal humans. Lab Invest 1989; 60(2): 231-236.
16. Latta H. The glomerular capillary wall. J Ultrastruct Res 1970;32: 526-544.
17. Latta H. Sialoglycoproteins and filtration barriers in the glomerular capillary wall. J Ultrastruct Res 1975; 51: 354-376.
18. Larsson L, Maunsbach AB. The Ultrastructural development of the glomerular filtration barrier in the rat kidney. J Ultrastruct Res 1980; 72:392-406. ■

www.SID.ir