



## ● مقالات تحقیقی (۵)

# مطالعه بافت شناسی مراحل تکاملی تمایز گلومرولها

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<sup>(۱)</sup> از نژاد SD<sup>(۲)</sup> نوزاد ۱۲، ۳، ۶، ۹، ۱۲ روزه مورد بررسی کیفی بافت‌شناسی قرار گرفتند. تمام حیوانهای کلروفرم ببیوش گردیدند، کلیه چپ حیوان برداشته شده و در فرمالین سالین باضافه ۵ میکرون از آنها تهیه گردید. این مقاطع با روشهای همانتوکسیلین- آئورزین، پریودیک اسیدرآزین شیف و نیترات نقره کلوییدی رنگ امیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. مطالعات حاصل نشان داد که گلومرولهای کلیوی<sup>۴</sup> مرحله تکاملی وزیکول کلیوی، جسم  $\diamond$  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 احتشایی و جداری ایجاد می‌گردد. لایه پایه<sup>(۵)</sup> گلومرولی در مرحله سوم مشاهده گردید. گلومرولهای ناحیه ژوکستامدولاری (مجاور مدول) 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-Basal lamina

۳-Spruge Dawley

فاطمه ملک

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

دکتر محمد تقی الطريحي

استادیار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بافت‌شناسی

دکتر عليقلی سبهانی

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



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 ۱۰ درصد ثابت گردیدند. بعد از ثابت کردن، نمونه‌ها با استفاده از روش پاساز به وسیله پارافین جامد آماده گردیدند. مراحل پاساز بافتی عبارت بودند از:

آبغیری، الكلگیری، شفاف کردن، آغشتنگی و قالب‌گیری سپس بافت‌ها توسط دستگاه میکروتوم<sup>(۵)</sup> 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 اتوژین رنگ‌آمیزی شدند. در ضمن برای تعدادی از نمونه‌ها روش‌های رنگ‌آمیزی پاس و نیترات نقره کلوبیدی برای نشان دادن لایه پایه گلومرولی در مراحل مختلف تکاملی گلومرول مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تهیه لام‌های سفید و رنگ‌آمیزی، لام‌ها با میکروسکوپ نوری<sup>(۶)</sup> با استفاده از بزرگنمایی‌های شیئی ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفته و عکسبرداری شدند.

می‌شوند<sup>(۸)</sup>. 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<sup>(۹)</sup>. در نفریت همین ساختمان و فرا ساختمان غشاء پایه گلومرولی دچار آسیب می‌شود<sup>(۱۰)</sup>. مطالعات دیگر روی تمایز اپی‌تیلیوم مویرگ گلومرول نشان داد که تجویز پروتامین سولفات به مادران باردار موجب عبور این ماده از جفت و تأخیر در رشد و تمایز این اپی‌تیلیوم می‌شود<sup>(۱۱)</sup>. بنابراین به نظر می‌رسد که بررسی و مطالعه تمایز کلیه‌ها، علاوه بر بررسی مراحل تکاملی کلیه‌ها در شناسایی بیماریها نیز بسیار مؤثر است. از آنجاییکه غیرممکن است اوردن 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<sup>(۹)</sup>. 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 باری نماید. باشد که گامهای دیگری در این زمینه برداشته شود و پرده‌های دیگری از روی سایر ابهامات کثار رود.

## مقدمه

مدت زمانی است که تمایز کلیه‌ها به عنوان یکی از مسائل مهم علم جنین‌شناسی مورد توجه واقع شده است. شاید بتوان مدعی شد که امروزه پیشرفتهای چشمگیری در این رابطه به دست آمده است، 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<sup>(۱)</sup> 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<sup>(۲)</sup>.

لارسن<sup>(۲)</sup> در سال ۱۹۷۵ چهار مرحله تکاملی را برای گلومرولها ذکر نمود<sup>(۲)</sup>. همچنین برن استین<sup>(۳)</sup> تمایز جوانه مستانفیک به نفرونها را در سال ۱۹۸۱ گزارش نمود و چهار مرحله تکاملی پیشنهاد شده توسط لارسن را تأیید کرد<sup>(۴)</sup>. بوهل<sup>(۴)</sup> و همکارانش با مطالعه هیستو پاتولوژیک کلیه اعلام نمود که در بسیاری از بیماریهای کلیوی نوعی برگشت به حالت جنینی دیده می‌شود<sup>(۵)</sup>. در این رابطه به بیماریهایی نظیر لبیوئید 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<sup>(۶,۵)</sup>.

در این بیماریها کمپلکس‌های اتصال بین سلولها و لایه پایه نیز سرانجام جانشین شکافهای غشایی می‌گردد<sup>(۷)</sup>. در حالی که در طی مراحل تکامل کمپلکس‌های اتصالی توسط شکافهای غشایی جایگزین

## روش کار

برای نمونه‌گیری ۲۵ نوزاد از بیان SD را که تحت شرایط استاندارد از لحظه آب و غذا نگهداری شده بودند از انسیتیو رازی ایران تهیه گردیدند. این نوزادها در پنج گروه به

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

## نتایج

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

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

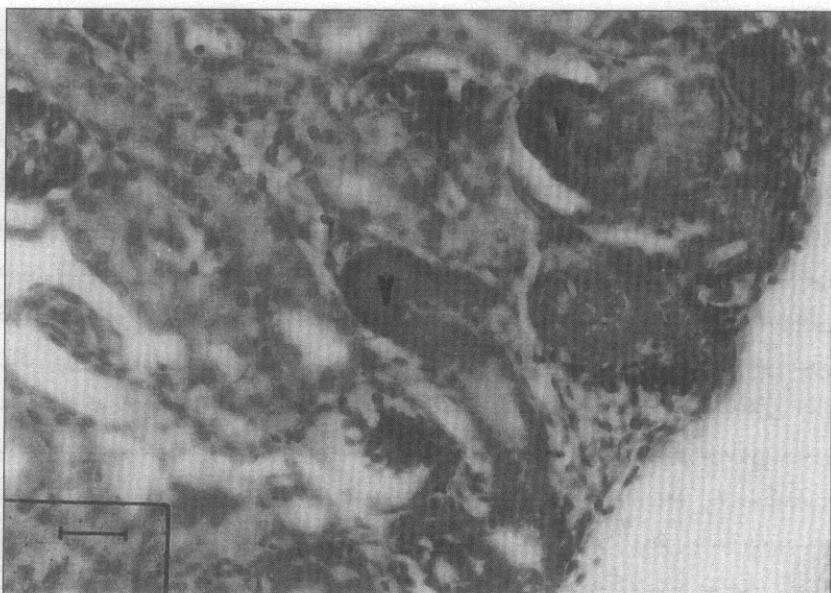
۲- مرحله جسم S شکل (اکثر آنها در روز سوم بعد از تولد مشاهده گردیدند).

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

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

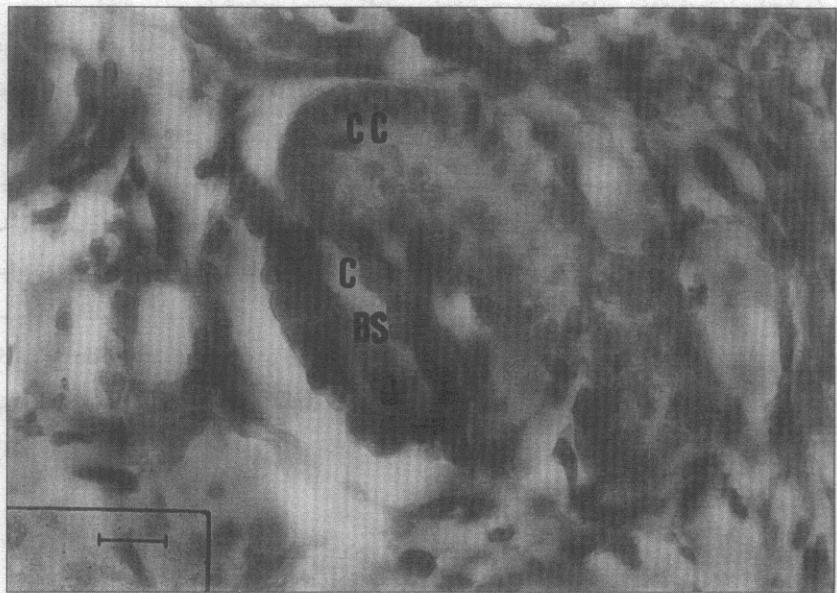
در مرحله وزیکول کلیوی، وزیکول کلیوی هیچ‌گونه شباهتی به گلومرول بالغ نداشته و شامل یک دسته سلولهای اپی‌تیالی منشوری است که به صورت یک توده مجتمع دیده می‌شود. لایه پایه گلومرولی در این مرحله دیده نمی‌شود. مویرگ‌های گلومرولی در وزیکول دیده نمی‌شوند (تصویر ۱).

در مرحله دوم گلومرول‌ها یک حالت شکل را تشکیل داده‌اند بطوریکه ۱ تا ۴ مویرگ در مقطع عرضی گلومرول مشاهده می‌شود. در این مرحله اپی‌تیلیوم گلومرولی و توبولی از یکدیگر متمایز و سلولهای اپی‌تیلیوم توبولی به صورت سلولهای مکعبی هستند (تصویر ۲). شروع تشکیل فضای بومن در مرحله جسم S شکل و از قسمت داخلی کمان S می‌باشد (تصویر ۲). در رنگ‌آمیزی‌های پاس و نیترات نقره کلوییدی لایه پایه گلومرولی در مرحله دوم تکاملی مشاهده نگردید.



تصویر شماره (۱): مرحله وزیکول کلیوی (۷) را نشان می‌دهد بطوری که سلولهای اپی‌تیالی 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

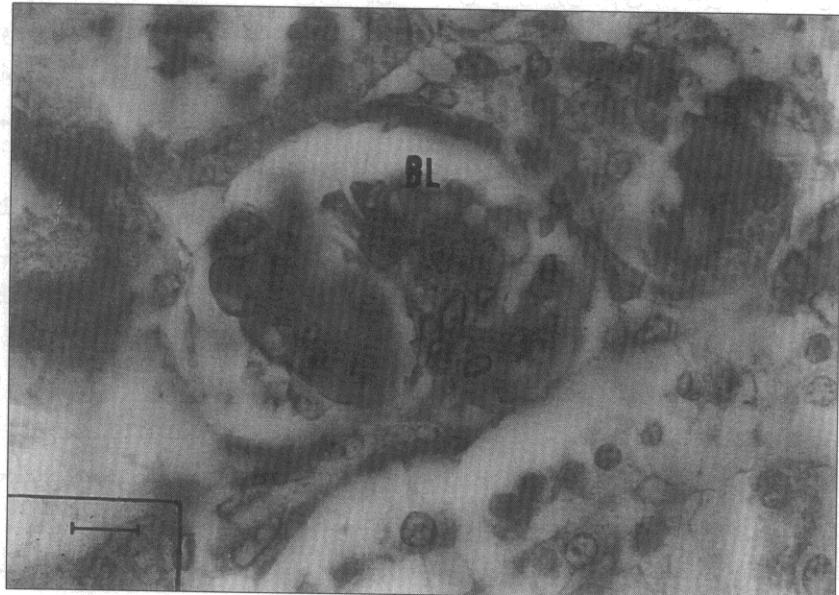


در مرحلهٔ حلقهٔ مویرگی در حال تکامل، گلومرول شباهت زیادی به گلومرول بالغ پیدا کرده، دایرهٔ شکل بوده و شامل ۵ مویرگ یا بیشتر در هر مقطع عرضی است. در این مرحله بین اپی‌تیلیوم احشایی و جداری فضای مشخص ایجاد می‌شود که فضای ادراری یا فضای بومن نامیده می‌شود. سلولهای جداری در این مرحله به صورت سلولهای سنگفرشی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

بوله شدن گلومرول در این مرحله از تکامل آغاز می‌گردد که در رنگ‌آمیزی پاس مشخص است (تصویر<sup>(۳)</sup>) 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. (تصویر<sup>(۳)</sup>).

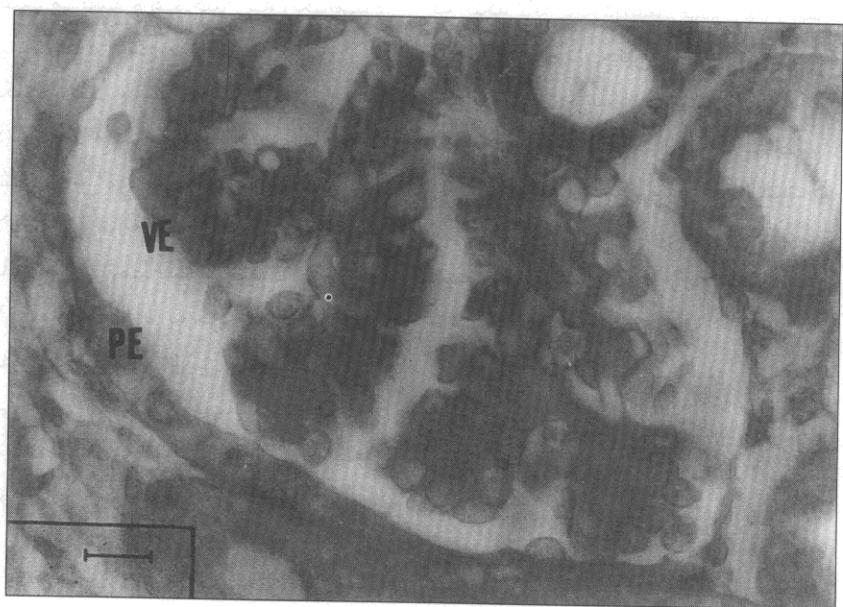
گلومرول در مرحلهٔ چهارم تکاملی بیضی شکل بوده، حاوی حلقه‌های مویرگی متعدد است. در این مرحله اپی‌تیلیوم احشایی و جداری کاملاً از یکدیگر تمایز یافته‌اند و بوله شدن گلومرول در این مرحله کامل گردیده است. در داخل هر بول سلولهای مجازیال به صورت سلولهایی نامنظم دیده می‌شوند که هسته آنها به شدت رنگ می‌گیرد. لایهٔ 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<sup>(۴)</sup>)

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 بوله 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 اپی‌تیلیوم جداری (PE) و احشایی (VE) کاملاً از هم فاصله گرفته‌اند.

بزرگنمایی - ۴۰۰، رنگ‌آمیزی PAS

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 مرحله 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 می‌گردد 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 موقیت در درمان بالیستی بیماریهای کلیوی تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه‌ها از دیدگاه تکاملی بیشتر مدنظر واقع شود.

۱-Malpighie

۲-Maunsbach

۳-Lewis

۴۰ روزه اقدام کردن و مطالعات خود را به این دو روز محدود [۱۵]، البته به نظر می‌رسد این فاصله 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، حلقة 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 کلوبیدی به بررسی وجود لایه پایه در مراحل مختلف تکاملی پرداختیم زیرا لایه پایه گلومرولی به علت وجود گلیکوپروتئین‌ها جزء مواد پاس مثبت می‌باشد و همچنین به رنگ آمیزی نیترات نقره پاسخ می‌دهد. در مرحله ۱ و ۲ تکاملی یعنی مرحله وزیکول کلیوی و جسم S شکل ما موفق به تشخیص این لایه نشدمیم. این موضوع مؤید عدم تشکیل این لایه در این مراحل است که با نتایج لارسن و مانزباخ [۱۸] مطابقت می‌کند. در مراحل ۳ و ۴ تکاملی لایه پایه به خوبی دیده می‌شود که مطالعات لویس [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

## بحث

بررسی تمایز کلیه‌ها برای اولین بار در سال ۱۶۶۶ توسط مارسلومالپیگی<sup>(۱)</sup> 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 کوریوسکلهای مالپیگی نامیده شدند اما مالپیگی در پیش‌بینی این مطلب که این کوریوسکلهای کلیوی در واقع شامل یک شبکه مویرگی بسیار پیچیده هستند دچار مشکل بود.

سرانجام ولیام 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 [۱۲].

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 اولیه پس از تولد ادامه می‌یابد تا گلومرولها به بلوغ کامل برسند [۱۴, ۱۱].

لارسن و مانزباخ نیز در سال ۱۹۸۰ به بررسی تمایز کلیه موش رت در نوزادان ۳ و

## مراجع

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

- culture. *Lab Invest* 1981; 45:183-190.
5. Bohle A, Schubert 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 International* 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. Ultrastructural change of the glomerular basement membrane in rats with Heyman 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.