

آنالیز استریولوژیک گلمرولهای کلیه بدنبال مسمومیت مزمین با سرب در موش صحرانی آزمایشگاهی در یک دوره پیوسته ۸ هفته‌ای

حمیدرضا محمودزاده ثاقب*، عبدالرحمن دزفولیان**، سید محمد حسین نوری***، زهرا حیدری*، پادماکار چیت نیس**
*دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، (بخش بافت‌شناسی)

چکیده

مقدمه: روشهای استریولوژیک بمنظور به‌دست آوردن اطلاعات کمی در ارتباط با ساختمانهای سه بعدی از مقاطع بافتی بکار می‌روند. هدف پژوهش حاضر استفاده از تکنیک‌های جدید و بدون نورش استریولوژی جهت بررسی تغییرات حجم و تعداد گلمرولهای کلیه پس از کاربرد مزمین 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 گلمرولها را درگیر می‌نماید. در مورد اثرات سرب روی بافت کلیه و گلمرولها مطالعات هیستولوژیک کیفی زیادی انجام شده است و در مواردی تغییر در حجم و تعداد گلمرولها گزارش شده است.

مواد و روشها: چهار گروه رت نر بالغ (هر گروه $n = 9$) بصورت تصادفی انتخاب شد. گروههای آزمایش به ترتیب مورد تجویز محلول آشامیدنی استات سرب ۰/۵ درصد و ۱ درصد به مدت ۸ هفته قرار گرفتند. گروه شاهد آب مقطر و گروه شاهد مثبت محلول اسید استیک ۰/۴ درصد در همان مدت دریافت کردند. آنالیز استریولوژیک شامل تعیین حجم مرجع (VReference) کسر حجمی گلمرولها (VVGlom) و حجم گلمرولها (VGlom) با استفاده از اصول کاوالیه انجام شد. چگالی عددی گلمرولها (NVGlom) و تعداد کل گلمرولها (NTGlom) نیز با روش دیسکتور فیزیکی محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان می‌دهد تعداد گلمرولها در گروه مورد تجویز استات سرب ۱ درصد کاهش معنی داری نسبت به گروههای شاهد و شاهد مثبت از خود نشان می‌دهد ($P < 0.05$)، اما در گروه مورد تجویز استات سرب ۰/۵ درصد تفاوت معنی داری مشاهده نمی‌شود. از طرف دیگر بدنبال مسمومیت با سرب حجم کل گلمرولها در هر دو گروه مورد تجویز (۰/۵ درصد و ۱ درصد) در مقایسه با گروههای شاهد و شاهد مثبت تفاوت معنی دار آماری از خود نشان می‌دهد ($P = 0.01$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: بررسی حاضر نتایج تحقیقات هیستولوژیک مشاهده‌ای کیفی را با روشی دقیق و بدون سوگیری تأیید نموده نشان دهنده تغییرات در تعداد و حجم گلمرولهای کلیه بدنبال مسمومیت با سرب می‌باشد.

مقدمه

قرارگیری آنها در فضای سه بعدی حقیقی استوار شده بود، به عبارت دیگر یک پیش فرض یا مدل در ارتباط با سوزن مورد نظر (گلمرول) در نظر گرفته می‌شد(۱). روشهای مختلفی برای محاسبه تعداد و حجم گلمرولها وجود دارد اما اکثر این روشها

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

می‌باشد. این اثرات هم لوله‌ها و هم گلومرول‌های کلیوی را درگیر می‌سازد (۶).

بیماری‌های کلیوی از عوارض مسمومیت با سرب می‌باشد که قسمت‌های مختلف بافت کلیه از جمله گلومرولها را بصورت‌های متفاوتی تحت تأثیر قرار می‌دهد، از جمله اسکروزگلومرولی و به دنبال آن کاهش میزان پالایش خون به وقوع می‌پیوندد (۷). مطالعات هیستوپاتولوژیک با مشاهده در محیط دو بعدی از بین رفتن و کاهش تعداد گلومرولها و افزایش حجم گلومرولهای باقی‌مانده را به دنبال مسمومیت مزمن با سرب گزارش کرده‌اند (۸). همچنین گزارشاتی مبنی بر عدم تغییر بیشتر گلومرولها بجز افزایش تعداد سلولهای اندوتلیال و مزانژیال گلومرولی به دنبال آلودگی با سرب شده است (۶). مطالعات کیفی دیگر مبتنی بر اندازه‌گیری قطر گلومرولها بدنبال مسمومیت مزمن 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 (۹).

از آنجائیکه دفع مواد زاید حاصل از متابولیزم بطور عمده توسط پالایش و ترشح از موینه‌های گلومرولی صورت می‌گیرد محاسبه تعداد و حجم گلومرولها که بطور غیر مستقیم نماینده سطح پالایش‌کننده می‌باشد از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد بدین جهت تعیین تفاوت حجم کل گلومرولها به عنوان شاخصی از سطح کل پالایش گلومرولی ذر نظر گرفته می‌شود (۱۰)، بنابراین محاسبه تعداد و حجم گلومرولها اهمیت زیادی را در ارتباط با عملکرد کلیه در بیماریهای مختلف کلیوی دارد.

مواد و روشها

چهار گروه (n=۹) رت نر بالغ از نژاد Wistar در محدوده وزنی ۹۴±۱۰ گرم تهیه شده از مؤسسه حصارک کرج بصورت تصادفی انتخاب شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت ۲۲±۲ و دسترسی آزادانه به آب و غذا در قفس‌های مجزاً قرار گرفتند. گروه‌های تجویز محلول استات سرب ۰/۵ درصد و ۱ درصد را به‌عنوان آب آشامیدنی دریافت کردند. به منظور جلوگیری از رسوب، استات سرب در آب مقطر حاوی ۰/۴ درصد اسید استیک حل شد. گروه شاهد آب مقطر و گروه شاهد مثبت محلول ۰/۴ درصد اسید استیک به عنوان آب

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 استوار بود، بر پایه مقاطع جفت (Paired Sections) قرار دارد، این روشهای جدید فاقد تورش (Unbiased) و در عین حال کارآمد (Efficient) می‌باشند (۲). محاسبه حجم با بهره‌گیری از اصول کاوالیه (Cavalieri Principle) و 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.

تاریخچه مسمومیت با سرب موازی با تمدن بشر است. استخراج معادن نقره در دوران امپراطوری روم باعث استخراج مقادیر زیادی سرب به همراه نقره شد. به احتمال زیاد در آن دوران مسمومیت با سرب از راه خوراکی و به دلیل استفاده از وسایل و لوله‌های حاوی رنگدانه‌های سربی برای انتقال و توزیع غذا بوده است (۴). سرب یکی از فلزات سنگین است و به دلیل ویژگی‌های خاص خود کاربرد وسیعی در زندگی بشر دارد. به دلیل مقاومت در برابر مواد خورنده برای نگهداری مایعات خورنده بکار میرود. مقادیر زیادی سرب در باطری سازی و همچنین در لباسهای محافظ در برابر اشعه و ارتعاش مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه استفاده از سرب در ساخت رنگ، حشره‌کشها و نیز افزودن آن به بنزین در بسیاری از کشورها ممنوع شده است اما در کشور ما استفاده از آن حداقل بصورت افزودن به بنزین همچنان ادامه دارد.

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. جذب گوارشی و توزیع سرب در حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش صحرانی آزمایشگاهی (Rat) شبیه انسان می‌باشد (۵). از جمله تأثیرات نامطلوب سرب اختلال در عملکرد طبیعی کلیه

شمارش تعداد گلومرولها با روش دیسکتور فیزیکی: برای انجام این عمل از دو میکروپروژکتور استفاده گردید و در زمان واحد تصویر حاصل 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 گلومرول مورد مشاهده با خطوط ممنوع گرید دیسکتور نیز برخورد نداشت آن گلومرول شمرده شد و در غیر این صورت از شمارش آن خودداری شد (۳). سپس با استفاده از فرمول زیر دانسیته عددی گلومرولها محاسبه شد:

$$N_v = \frac{\sum \bar{Q}}{a/f \cdot h \cdot \sum P}$$

$\sum \bar{Q}$ 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 دیسکتور در مرکز دارای یک نقطه می باشند 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 (۳-۱):

$$N_{Total} = N_{V(Glomeruli)} \cdot V_{Cortex}$$

نتایج حاصل از محاسبات استریولوژیک توسط نرم افزار (SPSS 9.0) مورد آنالیز واریانس یک طرفه بین سوزهای و آزمونهای آماری (Tukey (HSD) ، Scheffe و $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج بصورت میانگین \pm 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 ۰/۵ درصد برابر با $0.31 \pm 13/16$ می باشد، همچنین میانگین حجم گلومرولها در گروهی که طی این مدت استات سرب ۱ درصد دریافت کرد برابر با $0.45 \pm 12/08$ است و در گروه شاهد برابر با 0.19 ± 9.35 و

آشامیدنی دریافت کردند. پس از ۸ هفته حیوانات توسط اتر بی هوش شدند و کلیه ها در آورده شد. پس از جداسازی کپسول، کلیه در فیکساتیو Lillie تغییر یافته به مدت ۷۲ ساعت برای انجام ثبوت بافتی قرار داده شد. سپس از هر حیوان یک کلیه بصورت تصادفی انتخاب شد و پس از شستشو در محلول سالین نرمال در آگار ۷ درصد قالب گیری شد. بلافاصله پس از قالب گیری، قالب حاوی کلیه به قطعات ۱ میلیمتری بریده شد. بدین ترتیب برخورد تیغ برنده با اولین قسمت کلیه کاملاً تصادفی بود (۸). سپس بجز اولین برش که از نمونه گیری حذف شد بقیه قسمت ها را 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، ۱۲).

روش استریولوژی: محاسبه حجم مرجع (V_{Ref}) که در مطالعه حاضر حجم کورتکس کلیه می باشد با استفاده از اصول کواولیه به ترتیب زیر صورت گرفت. اسلاید اول در هر سری مقاطع جفت انتخاب شد تصویر مقطع مربوط توسط میکروپروژکتور بر روی میز کار انداخته شد. سپس یک ترانس پرنسی متشکل از شبکه نقاط منظم بصورت تصادفی بر روی نمونه انداخته شد نقاط برخورد کرده با کورتکس در تمام مقاطع اول هر کلیه شمارش شد، پس از آن با استفاده از فرمول زیر حجم کورتکس محاسبه شد:

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

$\sum P$ مجموع نقاط برخورد کرده با کورتکس، $a(p)$ قلمرو اطراف هر یک از نقاط سیستم آزمون و \bar{t} متوسط ضخامت مقاطع می باشد (۱۲-۱۳). حجم گلومرولها به این طریق محاسبه شد که ابتدا کسر حجمی گلومرولها ($V_{V(Glomeruli)}$) از رابطه زیر و با کمک شبکه نقاط منظم محاسبه گردید:

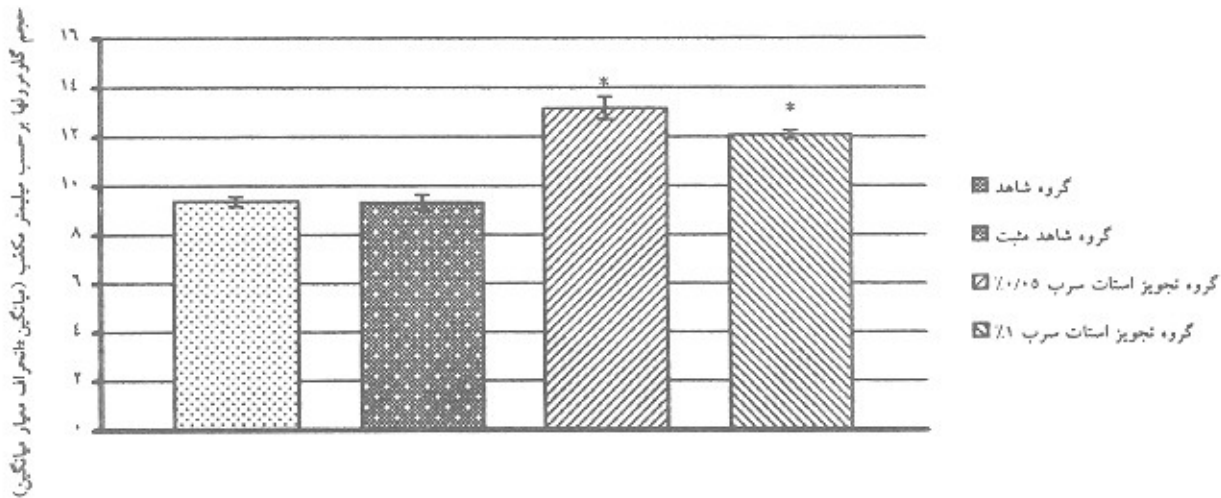
$$V_{V(Glomeruli)} = \frac{\text{Volume of glomeruli in refrence space}}{\text{Volume of cortex}} = \frac{\sum P(Glomeruli)}{\sum_{i=1}^m P(Cortex)}$$

عبارت است از مجموع نقاط سیستم آزمون برخورد کرده با گلومرولها و $\sum_{i=1}^m P(Cortex)$ تعداد نقاط برخورد کرده با کورتکس کلیه می باشد. سپس حجم کل گلومرولها از رابطه زیر حساب شد (۱۴):

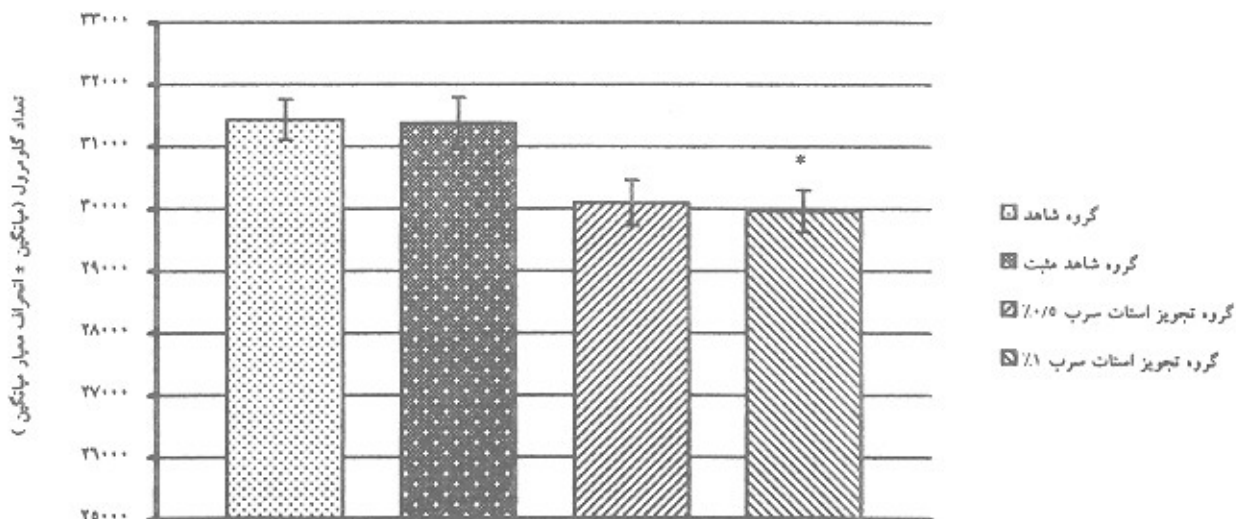
$$V_{Total(Glomeruli)} = V_{(Cortex)} \cdot V_{V(Glomeruli)}$$

و نیز بین دو گروه تجویز استات سرب ۰/۵ درصد و ۱ درصد از نقطه نظر آماری معنی دار نمی باشد ($P > 0.05$) نمودار (۱).

گروه شاهد مثبت برابر با 0.18 ± 9.31 که تفاوت آماری معنی داری نسبت به گروههای شاهد و شاهد مثبت از خود نشان می دهد ($P = 0.01$). در همین حال تفاوت بین دو گروه شاهد و شاهد مثبت



نمودار ۱- تأثیر سرب بر حجم گلومرولهای کلیه در گروههایی که ۸ هفته تحت تجویز قرار داشتند ($p = 0.01$)



نمودار ۲- تعداد گلومرولهای کلیه (N_{total}) در گروههایی که ۸ هفته تحت تجویز استات سرب قرار داشتند ($p < 0.05$)

تفاوت بسیار زیادی در اندازه گلومرولها ایجاد می‌شود (۱۷). مطالعه حاضر بصورت کمی صورت گرفت و با توجه به اهمیت گلومرولها بر روی عملکرد کلیه تغییرات در تعداد و حجم گلومرولها مورد توجه قرار گرفته است. تعداد گلومرولهای کلیوی در گروهی که مورد تجویز استات سرب ۱ درصد قرار داشتند تغییرات معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد و شاهد مثبت از خود نشان می‌دهد در حالیکه در گروه مورد تجویز استات سرب ۵٪ درصد تفاوت معنی داری در مقایسه با گروههای فوق‌الذکر مشاهده نمی‌شود. نتایج این تحقیق نتایج پژوهشهای کیفی را دنبال تجویز مقادیر ۵٪ درصد و ۱ درصد استات سرب در آب آشامیدنی را مورد تأکید قرار می‌دهد. در مطالعه‌ای که با تجویز دوز ۱ درصد 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 (۹، ۱۸). در تحقیقات مختلف افزایش وزن کلیه بدنال مسمومیت با سرب نشان داده شده است (۷)، در تمام این مطالعات افزایش وزن و هیپرتروفی کلیه به تغییرات در لوله‌های پیچیده نزدیک نسبت داده شده است اما برخلاف این گزارشات که براساس مشاهده مستقیم یا اندازه‌گیری بصورت دو بعدی بوده است، در مطالعه حاضر اندازه گلومرولها و در نهایت حجم کل گلومرولها در محیط سه بعدی و با استفاده از تکنیک‌های استریولوژی محاسبه گردیده و مقایسه حجم گلومرولها در گروه‌های شاهد و تجویز استات سرب نشان دهنده افزایش معنی‌دار حجم گلومرولها در گروه‌های تجویز استات سرب نسبت به گروه‌های شاهد می‌باشد. در مطالعه دیگری که روی نمونه‌های انسانی صورت گرفته، ناپدید شدن تعداد زیادی از گلومرولها، بدون اینکه هیچ اثری از خود بر جای بگذارند، گزارش شده است و تأکید شده که مهمترین ویژگی مسمومیت مزمن با سرب ناپدید شدن گلومرولها است و گلومرولهای باقی‌مانده بعضی به مقدار زیادی بزرگ شده‌اند و بعضی دیگر اندازه طبیعی خود را حفظ کرده‌اند. این مطالعه نیز بر اساس مشاهده مستقیم در محیط دو بعدی صورت گرفته است (۸). در تحقیق حاضر شمارش تعداد گلومرولها با بهره‌گیری از روش دیسکتور فیزیکی در یک محیط سه بعدی صورت گرفت و نشان داد که کاهش تعداد گلومرولها در گروه‌های مورد تجویز استات سرب ۵٪ درصد و ۱ درصد در مقایسه با گروه شاهد از نقطه نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. همچنین

میانگین تعداد کل گلومرولها و در گروهی که مورد تجویز استات سرب ۱ درصد قرار گرفتند برابر با 339 ± 29962 می‌باشد که در مقایسه با گروه شاهد با میانگین 331 ± 31431 و گروه شاهد مثبت با میانگین 209 ± 31376 تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان می‌دهد ($P < 0.05$). میانگین تعداد کل گلومرولها و در گروهی که مورد تجویز استات سرب ۵٪ درصد قرار گرفتند برابر با 3092 ± 365 می‌باشد و تفاوت معنی‌دار آماری بین این گروه و گروه‌های شاهد و شاهد مثبت وجود ندارد. از طرف دیگر تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شاهد و شاهد مثبت و نیز بین دو گروه مورد تجویز استات سرب با یکدیگر مشاهده نشد، نمودار (۲).

بحث

آلودگی با سرب حالت تجمعی دارد، در انسان به آهستگی اما بطور پی‌شونده ایجاد شده و سرانجام باعث از کار افتادن کلیه‌ها می‌شود (۱۵). پژوهش حاضر به شرح تأثیرات استات سرب بر روی بافت کلیه از دیدگاه کمی در یک دوره ۸ هفته‌ای پیوسته در مدل آزمایشگاهی پرداخته است. در انسان بالغ مواجهه پیوسته با سرب بویژه در محیط‌های کاری که با سرب سروکار دارند باعث ضایعات کلیوی مزمن و پی‌شونده می‌شود و در صورت پیشگیری از آلودگی تنها قسمت اندکی از ضایعات وارده قابل برگشت خواهد بود. مطالعات قبلی که بر روی مدل‌های آزمایشگاهی در ارتباط با ضایعات کلیوی بدنال مسمومیت با سرب صورت گرفته نشان می‌دهد که شدت ضایعات وارده بر بافت کلیه به مدت و میزان آلودگی با سرب بستگی دارد (۹). در یک مطالعه نشان داده شده که رت‌هایی که به میزان ۲ درصد استات سرب در آب آشامیدنی دریافت کرده‌اند مبتلا به ضایعات هیستوپاتولوژیک در کلیه‌ها شده‌اند (۱۶)، اما برخلاف آن در مطالعه حاضر کلیه گروه‌هایی که دوزهایی بالاتر از ۲ درصد دریافت کردند پس از گذشت 3 ± 14 روز به دلیل امتناع از مصرف آب آشامیدنی حاوی استات سرب تلف شدند. گزارش شده است که تجویز مقدار ۵٪ درصد استات سرب برای مدت ۲ ماه هیچگونه تغییر هیستولوژیک و تغییر در عملکرد کلیه ایجاد نمی‌کند در حالیکه بدنال تجویز مقدار ۱ درصد استات سرب برای مدت ۳ ماه باعث تغییرات هیستولوژیک در لوله‌های پیچیده نزدیک می‌شود (۹). همچنین در مسمومیت با لیتیم مشاهده شده است که

کاهش تعداد گلومرولها همراه با افزایش حجم کل گلومرولی مشاهده می‌شود، بنابراین نه تنها سطح تصفیه‌ای 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. در یک نتیجه‌گیری نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در مسمومیت مزمن با سرب جمعیت زیادی از گلومرولها دچار تغییر می‌شوند 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 می‌شود اندازه‌گیری سه بعدی سایر عناصر تشکیل دهنده نفرون و لوله های ادراری و اندازه‌گیری کمی تعداد و حجم سلولهای مختلف و به ویژه اندازه‌گیری ضخامت غشاء پایه گلومرولی در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

بعضی مطالعات حاکی از آن است که بدنبال تجویز استات سرب حجم گلومرولهای کلیوی افزایش می‌یابد اما تغییرات قابل ملاحظه‌ای در ساختار بافت‌شناسی گلومرولها مشاهده نمی‌شود، تنها مطالعه در بعضی حیوانات افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال و احتمالاً مزانژنال در در لایه احشائی کپسول بومن گزارش شده است (۶). 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 باقی‌مانده در گروههای 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 (۱۹)، از این جهت در مسمومیت مزمن با سرب

منابع

1. Mayhew TM, Gundersen HJG. 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the dissector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat.* 1996; 188: 1-15
2. 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(1): 93-102.
3. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. *J.of Microscopy.* 1984; 134:127-136.
4. Nriagu JO: Saturnine gout among Roman aristocrats: Did lead poisoning contribute to the fall of the Empire? *N.Engl.J.Med.* 1983; 308: 660-663.
5. Conrad ME, Barton JC: Factor affecting the absorption and excretion of lead in the rat. *Gastroenterology.* 1978 ; 74: 731-740
6. Vyskocil A, Semecky V, Fialia Z, Cizkova M, Viau C: Renal alteration in female rats following subchronic lead exposure. *J. of App. Toxicology.* 1995; 15(4): 257-262.
7. Goyer RA: Renal changes associated with lead exposure. In: *Dietary and environmental lead: Human Health. Effects.* KRMAhaffey, Ed., Elsevier, New York, pp.315-338 1985
8. Inglis JA, Henderson Da, Emmerson BT. The pathology and pathogenesis of chronic lead nephropathy occurring in Queensland. *J. of Path.* 1978; 124(2): 65-76
9. Khalil-Mansh F, Gonick HC, Cohen Ah, Alinovi R, Bergamashi E, Mutti A, Rosen VJ, Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high – dose lead administration . *Kidney International.* 1992; . 41: 1192-1203.
10. 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.
11. Kiernan JA. *Histological & histochemical methods: Theory & practice* 2nd edition. 1990; pp. 10-31
12. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, Vanvelzen D. Human intrauterinerenal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the 'dissector' method and Cavalieri principle. *Lab Invest.* 1991; 64:777-784
- 13- Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. of Microscopy.* 1987; 147:229-263
14. Michel RP, Cruz-Orive LM. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung estimation of volume and plural surface area. *J of Microscopy.* 1988; 150: 117-136.
15. Wedeen RP, Maesaka JK, WeinerB, Lipat GA, Lyons MM, Vitale TF, Joselow MM. Occupational lead nephropathy. *Am J Med.* 1975; 59: 630 641.
16. 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 Applied Toxicol.* 1989; 9(6): 305-399
17. Marcussen N, Ottosen PD, Christensen S, Olsen S. A tubular glomeruli in Lithium-induced chronic nephropathy in rats. *Lab Invest.* 1989; 61(3): 295-301
18. O' Flaherty EJ, Adams WD, Hammond PB, Taylor G. Resistance of the rat to development of lead induce renal functional deficits. *J.Toxicol. Environ Health.* 1986; 18(1): 61-75.
19. Schmiss A, Nyengaard JR, Benedtsen TF. Glomerular volume in type 2 (noninsulin-dependent) diabetes by a direct and unbiased stereologic method. *Lab. Invest.* 1990; 62(1) 108-113.