محاسبه تغییرات تعداد گلومرولهای کلیوی در رت نر دیابتی شده با استفاده از تکنیکهای استریولوژیک

زهرا حیدری Ph.D.☆♦، حمیدرضا محمود زاده ثاقب Ph.D.☆، سیدمحمدحسین نوری موگهی Ph.D.★

☆دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی

★دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی

♦آدرس مکاتبه: زاهدان، صندوق پستی ۳۹۶-۹۸۱۳۵، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

دانشکده علوم پزشکی، گروه بافت‌شناسی

چکیده

* **هدف:** این مطالعه به منظور نشان دادن اثرات دیابت شیرین بر روی تعداد گلومرولهای کلیوی در رت نر دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین با استفاده از روش استریولوژیک انجام گرفته است.

* **مواد و روشها:** ۴۸ رت از نژاد Wistar به طور تصادفی به هشت گروه تقسیم شدند (n= ۶). دیابت با تزریق داخل وریدی ۹۰mg/kg استرپتوزوتوسین در یک میلی لیتر استات بافر در ۴ گروه ایجاد شد و ۴ گروه دیگر به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات گروه تجویز و شاهد مربوطه به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماه بعد از کاربرد استرپتوزوتوسین بیهوش و تشریح شدند و کلیهٔ آنها خارج گردید. سپس مراحل تثبیت، نمونه برداری استریولوژیکی، پاساژ بافتی، قالب‌گیری با پاراپلاست، برش و رنگ‌آمیزی مقاطع انجام گرفت و شمارش گلومرولها با استفاده از تکنیک Physical Disector /Fractionator که یک روش استریولوژیک نوین و بدون سوگیری است انجام شد. اطلاعات حاصل با استفاده از آزمونهای آماری Mann-Whitney U Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** شمارش گلومرولها در گروههای تجویز و مقایسهٔ آنها با گروههای شاهد مربوطه نشان داد که پس از القاء دیابت به دنبال تجویز استرپتوزوتوسین در دوره‌های ۳، ۶ و ۹ ماهه هیچ تغییر معنی داری در تعداد گلومرولها مشاهده نمی‌شود (P> 0.05). در حالی که در دوره طولانی‌تر (۱۲ ماه) کاهش تعداد گلومرولها از نظر آماری معنی‌دار بود (P= 0.030).

* **نتیجه‌گیری:** القاء دیابت توسط استرپتوزوتوسین در دوره‌های کمتر از ۹ ماه موجب تغییر معنی داری در تعداد گلومرولهای کلیه در رت نمی‌شود، در حالی که در دوره ۱۲ ماهه می‌تواند موجب کاهش معنی دار تعداد گلومرولها شود.

گل واژگان: دیابت شیرین، استرپتوزوتوسین، استریولوژی، کلیه، رت

مقدمه

بیماری کلیوی یک ناراحتی شایع در جریان دیابت شیرین می‌باشد. نفروپاتی دیابتیک علت اساسی نارسایی کلیوی مرحله پایانی (End Stage Renal Disease= ESRD) در کشورهای غربی می‌باشد. بیماری کلیوی علت اصلی مرگ و میر بیماران دیابتی و یک مشکل کلینیکی مهم در دیابت غیر وابسته به انسولین می‌باشد (۱).

به علت ارتباط بین ساختمان و عملکرد (۲)، مطالعهٔ تعداد گلومرولهای کلیوی برای درک شروع و پیشرفت دیابت اهمیت دارد. فراوانی نفروپاتی کلینیکی در بیماران دیابتی نوع I همان‌طور که در چندین مطالعه گزارش شده است ۴۰ تا ۵۰ درصد است، و گفته می‌شود که در بیماران دیابتی نوع II به میزان ۱۵ تا ۳۰ درصد اتفاق می‌افتد (۳). همانند سایر بیماریهای کلیوی مزمن، در جریان نفروپاتی دیابتیک ممکن است گلومرولها ناپدید شوند. بدون اینکه هیچ اثر قابل تشخیصی از آنها بر جای بماند (۴). ظرفیت عملکرد کلیوی بستگی به تعداد نفرونها دارد، یعنی تعداد گلومرولها، می‌تواند به عنوان پارامتر اصلی برای پی‌گیری و پیش‌گویی در مورد عملکرد کلیه مورد توجه قرار گیرد (۵). معمولاً در حیوانات آزمایشگاهی نفروپاتی دیابتیک توسط القاء دیابت با مواد شیمیایی صورت می‌گیرد و برای این منظور استرپتوزوتوسین (Streptozotocin= STZ) به کار برده می‌شود. به هر حال، گر چه STZ پتانسیل ذاتی برای ایجاد نفروتوکسیسیته دارد اما زمانی که به منظور ایجاد دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرد محافظت از کلیه ضرورت ندارد. به همین دلیل STZ استفادهٔ بیشتری نسبت به آلوکسان دارد (۶، ۷).

طی دو دههٔ اخیر تعداد کل گلومرولها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۸، ۹). تکنیکهای استریولوژیک جدید نظیر Physical Disector/Fractionator روش مناسبی برای ارزیابی تعداد گلومرولها، با سرعت و دقت بیشتر می‌باشند (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲) اساساً Fractionator یک پروتکل نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک از بافت مربوط به یک عضو است و هدف آن انتخاب یک نمونهٔ کوچک از آن عضو می‌باشد. این روش اغلب همراه با تکنیک Disector به کار برده می‌شود. در این حالت احتمال شمارش نمونه‌های کوچک و بزرگ، برابر می‌باشد (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶).

هدف مطالعهٔ حاضر تعیین تغییرات تعداد کل گلومرولهای کلیوی به دنبال دوره‌های مختلف القاء دیابت قندی در رت با استفاده از استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مواد و روشها

* مدل حیوانی

۴۸ رت پنج ماهه از نژاد Wistar به طور تصادفی انتخاب و به هشت گروه تقسیم شدند (n= ۶). رتهای گروههای تجویز در ۴ گروه قرار داده شده و با تزریق یک دوز داخل وریدی استرپتوزوتوسین به میزان ۹۰mg/kg در یک میلی لیتر استات بافر دیابتی شدند (۱۷). رتهای گروه شاهد نیز بدون تجویز در ۴ گروه قرار داده شدند. تمام حیوانات در شرایط استاندارد حیوانخانه با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. ایجاد دیابت به صورت سطح قند خون ناشتای بیشتر از ۲۸۰mg/dl، چهل و هشت ساعت بعد از کاربرد استرپتوزوتوسین مشخص گردید (۱۸). حیوانات گروههای تجویز به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماه بعد از تجویز استرپتوزوتوسین، به وسیلهٔ کتامین هیدروکلراید بیهوش شدند و کلیه راست آنها با پرفوزیون فیکساتیو لیلی (Lillie´s Fixative) از طریق آئورت ثابت گردید (۱۹). پس از برداشتن کلیه و جدا کردن کپسول آن، جهت تکمیل فیکسایون به مدت ۲۴ ساعت در همان فیکساتیو قرار داده شد.

* استریولوژی

برای نمونه‌گیری یک جزء (Fraction) مشخص از کلیه، تکنیک Fractionator مورد استفاده قرار گرفت و سپس گلومرولها در این جزء شمرده شد. سرانجام تعداد گلومرولهای نمونه در معکوس جزء مشخصی که برای نمونه گیری استفاده شده بود ضرب و به این ترتیب بدون سوگیری تعداد گلومرولها در تمام کلیه تخمین زده شد. برای کاهش تغییرات در تخمین، کلیه‌ها در آگار ۶درصد قالب‌گیری شدند. سپس کلیه‌ها به موازات محور عرضی شان توسط دستگاه برش بافت (Tissue Slicer) با دقت ۰/۱ میلیمتر به Sliceهای مساوی یکدیگر به ضخامت ۱ میلیمتر برش داده شدند (۱۰). در این مرحله یک سوم Sliceهای به دست آمده به صورت تصادفی سیستماتیک انتخاب شدند (f1). Sliceهای انتخاب شده مجدداً در آگار قالب‌گیری شدند و به Stripهایی برش داده شدند و یک سوم از این Stripها نیز با نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک انتخاب شدند (f2). مدولا بریده و جدا شد ولی برای اطمینان از اینکه هیچ گلومرولی حذف نشده باشد، حاشیهٔ نازکی از مدولا حفظ شد. بافت کورتیکال انتخاب شده، به صورت معمول توسط الکل با درجات صعودی و زایلن پردازش و در پاراپلاست آغشته و قالب‌گیری شد. برشهایی به ضخامت ۱۰ میکرومتر نیز از قالبها تهیه گردید. تمام بافت به طور کامل برش داده شد و با نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک هر هشتمین مقطع Section و زوج آن انتخاب گردید (f3) و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین - ائوزین انجام گرفت. جهت مقاطع انتخاب شده با استفاده از دو میکروپروژکتور (Ken-A-Vision X-1000-1) مشابه در میدان دید مشابهی تنظیم شدند. تصاویر میکروسکوپی مقاطع روی میز کار انداخته و گرید شمارش نقاط روی تصویر پروجکت شده انداخته شد، سپس آخرین مرحلهٔ نمونه‌گیری انجام شد (f4). شمارش بر روی یک جزء مشخص از مقطع بافت‌شناسی که یک Areal Fraction نامیده می‌شود انجام شد بدین معنا که ۰/۴ بافت روی یک لام برای شمارش گلومرولهای کلیه مورد بررسی قرار گرفت (۲۰، ۲۱). در این جزء مشخص، تمام گلومرولها با استفاده از روش استریولوژیکی Physical Disector

شمارش شد. یک گلومرول اگر در میدان دید نمونه گیری شده، در مقطع مرجع Refference ظاهر ولی در مقطع شاهد Look up دیده نشد، شمارش گردید (۲۲، ۲۳، ۲۴). برای به دست آوردن تخمینی از تعداد کل گلومرولها عدد محاسبه شده در نمونهٔ آخر در معکوس اجزاء F4، F3، F2، F1 ضرب شد (۱۰). برای کاهش تنوع Intra-individual و Inter-individual عمل شمارش دو بار در دو جهت و به وسیلهٔ دو فرد مجرب صورت گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری میانگین شمارشهای صورت گرفته در هر کلیه در نظر گرفته شده است.

* تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney U Test اختلافات پارامترها بین دو گروه از نمونه‌ها در مورد یک متغیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف آماری در سطح $P< 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده و به صورت میانگین ± خطای استاندارد تعریف گردیده است.

یافته‌ها

در تمام گروهها غلظت گلوکز خون ۱۰ روز پس از شروع آزمایش و در هر یک از گروهها، ۳ روز قبل از کشتن حیوان در پایان دوره اندازه‌گیری شد و دیابتیک بودن آنها اثبات گردید (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: میانگین ± خطای استاندار غلظت گلوکز خون در گروههای شاهد و دیابتی ۱۰ روز پس از شروع آزمایش

گروهها		غلظت گلوکز خون بر حسب mg/dl
گروه اول، بعد از ۱۰ روز	شاهد	۱۱۵/۲۲ ± ۳/۵۱
	دیابتی	۲۹۹/۶۵ ± ۲/۶۵
گروه دوم، بعد از ۱۰ روز	شاهد	۱۱۲/۱۹ ± ۲/۵۲
	دیابتی	۲۷۸/۱۲ ± ۲/۶۲
گروه سوم، بعد از ۱۰ روز	شاهد	۱۰۷/۴۵ ± ۵/۲۱
	دیابتی	۳۰۱/۲۲ ± ۱/۲۷
گروه چهارم، بعد از ۱۰ روز	شاهد	۱۱۲/۲۲ ± ۲/۸۲
	دیابتی	۲۹۷/۲۱ ± ۲/۲۹

جدول ۲: میانگین ± خطای استاندار غلظت گلوکز خون در گروههای شاهد و دیابتی در پایان دوره‌های مختلف سه روز قبل از کشتن حیوانات

گروهها		غلظت گلوکز خون بر حسب mg/dl
گروه اول، مدت ۲ ماه	شاهد	۱۱۹/۸۸ ± ۲/۴۲
	دیابتی	۲۴۰/۸۸ ± ۲/۱۲
گروه دوم، مدت ۶ ماه	شاهد	۱۰۹/۰۸ ± ۲/۲۱
	دیابتی	۳۱۲/۴۲ ± ۶/۵۱
گروه سوم، مدت ۹ ماه	شاهد	۱۱۲/۷۶ ± ۲/۹۸
	دیابتی	۲۸۹/۳۶ ± ۲/۰۶
گروه چهارم، مدت ۱۲ ماه	شاهد	۱۰۹/۷۲ ± ۴/۱۷
	دیابتی	۲۲۹/۱۴ ± ۲/۸۵

تعداد کل گلومرولها در گروهی که به وسیلهٔ استرپتوزوتوسین در طی سه ماه دیابتیک شده بود نسبت به شاهد مربوط حدود ۴۷/۰ درصد افزایش نشان داد اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($P= 0.818$). در گروه دیابتی بعد از ۶ ماه تعداد کل گلومرولها کاهشی حدود ۲/۸۴ درصد در مقایسه با گروه شاهد خود نشان داد ولی این اختلاف نیز از لحاظ آماری معنی دار نبود ($P= 0.485$).

۹ ماه پس از القا دیابت نیز کاهشی غیر معنی دار حدود ۴/۳۶ درصد در تعداد کل گلومرولها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P= 0.180$). ۱۲ ماه پس از القاء دیابت تعداد کل گلومرولها نسبت به گروه شاهد ۱۳/۴۴ درصد کاهش نشان داد که از لحاظ آماری این اختلاف معنی دار بود ($P= 0.030$)، (جدول شماره ۳).

بحث

یافته اصلی این مطالعه نشان دهنده کاهش معنی دار تعداد گلومرولها در دیابت طولانی مدت (۱۲ ماهه) القاء شده توسط استرپتوزوتوسین است. از طرفی تغییراتی در تعداد گلومرولها در گروههای دیگر وجود داشت ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

گلومرول محل شایع اختلال عملکردی در نفروپاتی دیابتیک می‌باشد و نارسایی کلیوی مرحله پایانی (ESRD) با مسدود شدن گلومرولها ارتباط دارد (۲۵). به علاوه، یک تحقیق نشان داده است که گلومرولها در جریان بیماریهای کلیوی مزمن ناپدید می‌شوند (۲۶).

جدول ۳: تعداد کل گلومرولها در گروههای شاهد و دیابتی شده در دوره‌های زمانی مختلف و مقایسه آنها با آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney U Test

گروههای		میانگین تعداد گلومرولها	ضریب خطای شمارش	خطای استاندارد	مینیمم	ماکزیمم	درصد ضریب تغییرات
گروه اول، مدت ۲ ماه	شاهد	۲۲۷۲۸	۲/۲درصد	۵۵۹	۲۱۰۰۰	۲۳۴۵۸	۶/۰۲
	دیابتی	۲۲۸۳۶	۲/۷درصد	۲۸۳	۲۱۴۴۱	۲۴۱۸۲	۳/۱۲
گروه دوم، مدت ۶ ماه	شاهد	۲۲۰۲۸	۲/۵درصد	۳۷۱	۲۱۸۸۸	۲۴۸۵۱	۵/۰۱
	دیابتی	۲۲۳۷۲	۲/۶درصد	۵۰۶	۲۱۰۰۹	۲۴۱۵۸	۵/۵۲
گروه سوم، مدت ۹ ماه	شاهد	۲۲۸۲۲	۲/۶درصد	۳۵۴	۲۱۵۸۷	۲۴۱۷۴	۴/۸۷
	دیابتی	۲۱۸۳۸	۲/۸درصد	۲۱۶	۲۰۲۲۳	۲۳۰۰۹	۳/۶۶
گروه چهارم، مدت ۱۲ ماه	شاهد	۲۲۷۲۲	۲/۳درصد	۶۸۹	۱۹۳۵۸	۲۴۱۰۰	۷/۴۲
	دیابتی	۱۹۷۶۰*	۲/۲درصد	۵۱۶	۱۸۲۷۵	۲۱۲۱۵	۵/۸۶

* کاهش معنی دار در مقایسه با گروه شاهد در دوره زمانی ۱۲ ماهه $P= 0/03$

مطالعهٔ دیگری نشان داده است که دیابت طولانی مدت باعث افزایش گلومرولهای مسدود شده در مقایسه با شاهد می‌شود و این با طول مدت دیابت ارتباط نزدیکی داشته است (۲۷). از طرف دیگر، بعضی مؤلفین دریافته‌اند که بایستی در بیماران دیابتی، همبستگی نزدیکی بین میزان فیلتراسیون گلومرولی (Glomerular Filtration Rate=GFR) و سطح ناحیهٔ گلومرولی وجود داشته باشد. گرچه این بیماران تظاهرات کلینیکی نفروپاتی دیابتی را نشان می‌دهند ولی اورمی ندارند. بنابراین چنین تصور می‌کنند که در جریان بیماری کلیوی هیچ گلومرولی ناپدید نمی‌شود (۲۸، ۲۹، ۳۰). طی مطالعهٔ دیگری که مقایسهٔ بین تعداد گلومرولهای کلیه بیماران دیابتیک نوع I (وابسته به انسولین) و نوع II (غیر وابسته به انسولین) با استفاده از روش Fractionator انجام شده بود، هیچ تفاوت معنی‌داری در تعداد گلومرولها بین بیماران دیابتی نوع I و II بدون گلومرولوپاتی دیابتی شدید و بیماران غیر دیابتی مشخص نشد. بیماران دیابتی با پلی‌اوری که در مراحل اولیهٔ نفروپاتی دیابتی بودند نیز تعداد گلومرولهای نرمال داشتند. از طرف دیگر یک زیرگروه که به عنوان بیماران دیابتیک نوع I با گلومرولوپاتی دیابتی شدید تقسیم‌بندی شده بودند در مقایسه با بیماران دیابتی نوع I با گلومرولوپاتی خفیف یا بدون گلومرولوپاتی بطور معنی‌داری کاهش در تعداد گلومرولها نشان داد (۴).

نتایج مطالعهٔ حاضر نیز مشخص کرد که تعداد گلومرولها در گروهی که توسط استرپتوزوتوسین به مدت طولانی (۱۲ ماه) دیابتی شده بودند به طور معنی‌داری کاهش نشان داد در حالی‌که در مورد گروههای دیابتی کمتر از ۹ ماه این تفاوت معنی دار نبود. از این جهت مطالعه حاضر مؤید این فرضیه است که در دیابت طولانی مدت تعدادی از گلومرولها مسدود و ناپدید می‌شوند. در این مطالعه، دیابت قندی در مدل حیوانی القا شده است، نتایج این مطالعه با مطالعاتی که در مراحل اولیهٔ دیابت روی انسان انجام شده تضاد دارد. به علاوه همان طور که در سایر مطالعات نیز ثابت شده است هیچ تغییر قابل توجهی در تعداد گلومرولها طی دورهٔ کوتاه مدت و در مراحل اولیهٔ دیابت در رتها وجود ندارد (۲۷، ۲۸، ۳۰).

یک توضیح احتمالی برای این نتایج آنست که بیماران دیابتی و یا حیوانات دیابتی شده تجربی، با پیشرفت گلومرولوپاتی دیابتیک گلومرولهای خود را از دست می‌دهند. در طولانی مدت، گلومرولهای مسدود شده احتمالاً ناپدید می‌شوند و از نظر تئوری این امر می‌تواند منجر به کاهش تعداد گلومرولها شود. در مجموع می‌توان گفت، در شروع دیابت هیچ موردی از تعداد غیر طبیعی گلومرولها وجود ندارد و در جریان نفروپاتی شدید، گلومرولها ناپدید خواهند شد. به عبارت دیگر با پیشرفت بیماری دیابت و کاهش تعداد گلومرولها، ایجاد گلومرولوپاتی دیابتیک تسهیل خواهد شد.

به علاوه از آنجایی که تعداد گلومرول یک موضوع مهم مرتبط با ESRD است، یک روش کمی برای محاسبهٔ این پارامترها در کلیه ضرورت دارد (۸، ۲۹). با استفاده از Fractionator برای نمونه گیری از عضو مورد نظر و کاربرد مناسب روش Disector، سوگیری ذاتی که در سایر روشهای قدیمی وجود دارد حذف شده و به این ترتیب، روش استریولوژیکی Physical Disector/Fractionator یک استاندارد طلایی برای تخمین تعداد در محیط سه بعدی است (۸، ۲۲، ۳۱). در این مطالعه برای افزایش کارایی، ترکیب نمونه گیری Fractionator با بهره گیری از اصول Disector محض به‌کار برده شد. با به‌کارگیری این تکنیک چروکیدگی بافت نیز نمی‌توانست منشا سوگیری ذاتی در شمارش تعداد گلومرولها باشد.

بر اساس این مطالعه، نتیجه گرفته شد که گر چه هیچ تغییر قابل توجهی در تعداد کلی گلومرولها در دوره‌های کوتاه مدت مشاهده نمی‌شود اما از دست رفتن گلومرولها و کاهش تعداد آنها می‌تواند به عنوان علامت برجستهٔ پیشرفت بیماری نفروپاتی دیابتیک در رتهایی که توسط استرپتوزوتوسین دیابتی شده‌اند منظور گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و سپاس خود را از آقای دکتر مسعود صالحی ریاست سابق دانشکدهٔ پزشکی زاهدان و آقای محمد علی شهریاری ریاست امور عمومی و اداری دانشکده بخاطر همکاریهای ارزنده‌شان در فراهم نمودن تسهیلات لازم برای انجام این تحقیق اعلام نمایند. همچنین، از آقای دکتر محمدحسین سرمست ریاست سابق دانشکدهٔ پزشکی اهواز و همکارانشان به جهت همکاری مشتاقانه در فراهم نمودن مقدمات انجام این کار صمیمانه تشکر می‌گردد.

References

1. Cooper ME: Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. Lancet 1998; 352: 213-219

2. Schmitz A, Nyengaard JR, Bendtsen TF: Glomerular volume in type 2 (noninsulin-dependent) diabetes estimated by a direct and unbiased stereologic method. Lab Invest. 1990; 62: 108-113

3. Tung P, Levin SR: Nephropathy in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Am J Med 1988; 85: 131-136

4. Bendtsen TF, Nyengaard JR: The number of glomeruli in type I (insulin-dependent) and type 2 (non-insuline-dependent) diabetic patients. Diabetologia 1992; 35: 844-850

5. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, Van Velsen D: Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle.Lab Investi 1991; 64: 777-784

6. Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC: The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. Ren Physiol 1984; 7: 78-89

7. Thora C, Rasch R: Stodklide-Jorgensen, Flyvbjerg A. Relationship between MRI and morphometric kidney measurements in diabetic and nondiabetic rats. Kidney Int 1997; 51: 50-56
8. Bendtsen TF, Nyengaard JR: Unbiased estimation of particle using sections- an historical perspective with special reference to the stereology of glomeruli. J Microsc 1989; 153: 93-102
9. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N: The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis.APMIS 1988; 96: 857-881
10. Howard CV, Reed MG: Unbiased Sereology: Three Dimensional Measurment in Microscopy.Bios Scientific Publication, 1998: 69-106
11. Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB: Total number of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. Cell Tissue Res 1992; 279: 37-45
12. Pesce C: Glomerular number and size: Facts and artifacts. Anatomical Record 1998; 251: 66-71
13. Berka JL, Alcon D, Bertram JF, Ryan GB: Shinner SL. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on glomerular number, juxtaglomerular cell activity and rennin content in experimental unilateral hydronephrosis. J Hypertens 1994; 12: 735-743
14. Basgen JM, Steffes MW, Stillman RD, Mauer SM: Estimating glomerular number in situ using magnetic resonance imaging and biopsy. Kidney Int 1992; 41: 1085-1089
15. Skov K, Nyengaard N, Mulvany MJ: Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 1994; 12: 1373-1376
16. Bains RK, Sibbons PD, Murray RD, Howard CV, Van Velzen D: Stereological estimation of the absolute number of glomeruli in the kidney of lambs. Res Vet Sci 1996; 60: 122-125
17. Andrade I, Monsalve S, Escobedo CRM: de le Pena J, Polanco AC, Palomino MA: Ferial Velasco A. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats. Acta Histochem. Cytochem. 2000; 33(3): 201-208
18. Han K, Zhou H, Pfeifer U: Inhibition and restimulation by insulin of cellular autophagy in distal tubular cells of the kidney in early diabetic rats. Kidney blood press Res 1997 20: 258-263
19. Kiernan JA: Histological & Histochemical methods: Theory and practice. 2end edition. Pergamon press Oxford England 1990: 10-31, 90-102
20. Basger JM, Steffes MW, Stillman AE, Mauer SM: Estimating glomerular number in situ using magnetic resoriance imaging and biopsy. Kidney Int 1994; 45: 1668-1672
21. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight and body surface in normal man. Anat Recor 1992; 232: 194-201
22. Sterio DC: The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. J Microsc 1984; 134: 127-136
23. Nyengaard JR: Stereologic methods and their application in kidney research. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 1100-1123
24. Heidari Z, Mahmoudzadeh Sagheb HR, Dezfoulian AR, Barbarestani M, Noori SMH: A stereological analysis of renal glomeruli following chronic lead intoxication in rat during a continuous period of 8 weeks. Acta Medica Iranica 2002; 40: 73-78
25. Rasch R, dorup J: Quantitative morphology of rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. Diabetologia 1997; 40: 802-809
26. Moritz AR, Hayman M: The disappearance of glomeruli in chronic kidney disease. Am J Pathol 1934; 80: 505-18
27. Gundersen HJG, Asterby R: Glomerular size and structure in diabetic mellitus. II. Late abnormalities. Diabetologia 1977; 13: 43-48
28. Ellis EN, Steffes MW, Goetz FC, Sutherland DER, Mauer SM: Glomerular filtration surface in type 1 diabetes mellitus. Kidney Inter 1986; 29: 889-894
29. Asterby R, Parving HH, Hommel E, Jrgensen HE, Lkkegaard H: Glomerular structure and function in diabetic glomerlopathy. Early to advanced stages. Diabetes 1990; 39: 1057-1063
30. Johnson KJ, Wreford NG, Hoy WE, Bertram J: Estimating total glomerular number in human kidneys with a physical disector/fractionator combination. Image Anal Stereol 2000; 20: 105-108
31. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG: Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J Microsc 2001; 204: 232-246