

بررسی ساختاری و فراساختاری اثرات نورو توکسیک سرب بر عصب رادیال موش صحرایی

چکیده

زمینه و هدف: مسمومیت با سرب یک معضل بهداشت عمومی است که به طور وسیعی تمام جوامع را درگیر کرده است. یکی از عوارض حاصل از مسمومیت با سرب سمیت عصبی است که در این زمینه مطالعات بسیاری انجام شده و عوارضی چون کاهش تراکم نورونی در کورتکس بینایی میمون و مرگ سلولی در هیپوکامپ و کاهش قابل ملاحظه استیل کولین در هیپوکامپ نوزاد رت گزارش شده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی عوارض حاصل از مسمومیت با سرب روی عصب رادیال به عنوان یک عصب مخلوط می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ به چهار گروه شش تنایی تقسیم شدند. به گروه اول اسنات سرب ۴ درصد، گروه دوم اسنات سرب ۲ درصد و به گروه های شم و کنترل آب مقطر و آب آشامیدنی معمولی به مدت یک ماه خوراندند. پس از آن موش ها کشته شده و بعد از خارج نمودن عصب رادیال آن را به منظور مطالعه با میکروسکوپ نوری و الکترونی آماده نمودیم. در بررسی میکروسکوپی، قطر رشته عصبی، قطر آکسون، ضخامت میلین و فراساختار سلول شوان بررسی شد.

یافته ها: در گروه های تجربی کاهش ضخامت غشای میلین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. همچنین در گروه های تجربی کاهش تراکم هسته سلول شوان وجود گرانول در ماتریکس میتوکندری ها، نامنظم بودن لایه های غشای میلین ادم و افزایش فضای ساب پری نوریل و ماکروفاژهای فعال در اطراف سلول شوان دیده شدند.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های فوق به نظر می رسد علائم ناشی از مسمومیت با سرب در اعصاب محیطی ناشی از آسیب به سلول شوان باشد.

کلید واژه ها: سرب - عصب رادیال - میلین - رت - نورو توکسیستی

دکتر مهدی مهدی زاده

دانشیار گروه علوم تشریحی و فلوی *Transgenic Animal*

دانشگاه علوم پزشکی ایران

فاطمه کرمانیان

مریی گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی ارتش

دکتر غلامحسین فرجاء

استادیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

پروانه طباطبایی

کارشناس بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه علوم پزشکی

ایران

نویسنده مسؤول: دکتر مهدی مهدی زاده

پست الکترونیکی: maranaoo@iums.ac.ir

نشانی: بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده

پزشکی، گروه علوم تشریحی

تلفن: ۸۸۰۵۸۶۸۶ - ۰۲۱ - و نمابر: ۸۸۰۵۸۶۸۹

وصول مقاله: ۸۴/۴/۱۵

اصلاح نهایی: ۸۴/۵/۱۵

پذیرش مقاله: ۸۴/۶/۱

مقدمه

مطالعات انجام شده در زمینه توکسیکولوژی سرب در دو گروه انسانی و حیوانات آزمایشگاهی بیش از صد سال قدمت دارد. مطالعات انسانی روی کارگران صنعتی و کودکان شهرهای آلوده انجام شده است. در هر دوی این گروه ها به دنبال مسمومیت مزمن با سرب عوارضی چون کاهش ضریب هوشی، اختلالات رفتاری، ضعف حافظه و یادگیری، اختلالات خلقی و افسردگی مشاهده شده است (۴-۱). این مطالعات نشان داده اند که حتی اگر سطح خونی سرب بسیار کم و در حدود ۱۰ میکروگرم بر ۱۰۰ میلی لیتر باشد اختلالات رفتاری و تاخیر تکامل رفتاری در کودکان دیده می شود (۲). سرب از سد مغزی خونی گذشته و در مغز تجمع می یابد (۵). در مطالعات انجام شده روی حیوانات آزمایشگاهی نیز طیف وسیعی از عوارض توکسیک سرب گزارش شده است که می توان کاهش تراکم نورونی در کورتکس بینایی میمون (۶) و کاهش استیل کولین در هیپوکامپ نوزاد رت (۱) و ایجاد ضایعه در آستروسیت ها و سلول های اندوتلیال سد مغزی خونی را نام برد (۷ و ۸). در سال ۱۹۸۵ محققین متوجه شدند که در خو کچه های هندی مسموم شده با سرب نوروپاتی محیطی مشاهده می شود. این نوروپاتی به صورت تغییرات دژنراتیو در

اعصاب میلینیزه مشاهده شد. در این مطالعه سلول شوان به صورت بالب های پیازی شکل و بسیار بزرگ دیده شد (۹). در مطالعه دیگری که در سال ۱۹۹۱ انجام شده است، در موش های صحرایی بعد از ۶ هفته تماس با سرب هیپرتروفی سلول شوان همراه با بزرگی واضح هسته و سیتوپلاسم مشاهده شد. پس از ۳۰ روز ریکاوری این ضایعات مشاهده نشدند. بنابراین می توان گفت که برگشت پذیر هستند (۱۰).

در مطالعات قبلی که در زمینه بررسی نوروپاتی سرب انجام شده است، کاهش ضخامت میلین گزارش شده است، ولی این که آیا این کاهش به علت آسیب به سلول شوان است یا ناشی از آسیب آکسونی می باشد، مشخص نیست (۱۲). در هیچ یک از منابع نیز ذکر نگردیده که نوروپاتی سرب به طور قطع در عصب محیطی دیده می شود. زیرا با توجه به وجود قوس رفلکس، اختلال ایجاد شده در عصب حسی روی عصب موتور هم تاثیر می گذارد. Bouldin و همکاران در مقایسه نوروپاتی سرب بین عصب سیاتیک و عصب سورال دیده اند که اگر چه هر دو عصب دچار دمیلیناسیون شده اند، ولی تعداد فیبرهای دمیلینه در عصب سیاتیک بیشتر از سورال بوده است. دو فرضیه برای این مسأله در نظر گرفته می شود. یکی تراکم بیشتر سلول های شوان در عصب سیاتیک و دیگر حساسیت

قراردادیم. نمونه‌های میکروسکوپ نوری نیز پس از ۲۴ ساعت فیکس شدن در فرمالین مراحل آب‌گیری و آغشتگی با پارافین را مطابق روتین پشت سر گذاشته و سپس نمونه‌ها را با پارافین قالب‌گیری کرده و برش‌های ۵ میکرونی به صورت عرضی از آنها تهیه شد. این نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی weils که نوعی رنگ‌آمیزی اختصاصی برای غشای میلین است، رنگ شدند. در این نوع رنگ‌آمیزی میلین به رنگ سیاه روی یک زمینه زرد رنگ دیده می‌شود (۹). نمونه‌های نیمه نازک میکروسکوپ الکترونی نیز با تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ تحقیقاتی Olympus, Provis که متصل به کامپیوتر با برنامه Olysia Bioreport است مورد مطالعه قرار گرفتند. با استفاده از این برنامه قطر رشته عصبی، قطر آکسون و ضخامت غلاف میلین اندازه‌گیری شد.

پس از تهیه برش نیمه نازک و مشخص نمودن محل مناسب برای مطالعه، با استفاده از اولترامیکروتوم نمونه به اندازه ۵۰ نانومتر برش زده شده و روی گرید قرار گرفت. سپس با استفاده از اورانیل استات و سترات سرب نمونه‌ها رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM تعداد لایه‌های میلین، آکسون‌های میلین‌دار و موقعیت سلول‌های شوان بررسی شد. برای بررسی چگالی آکسون‌ها پس از نصب صفحه مدرج روی لام سه ناحیه را به صورت تصادفی انتخاب نموده و در هر یک از این نواحی برای تعیین تراکم آکسون‌ها تعداد آکسون را به واحد سطح مورد نظر (میلی‌متر مربع) تقسیم نمودیم. برای آکسون‌های میلین‌دار از نمونه‌های نیمه‌نازک و برای آکسون‌های بدون میلین از نمونه‌های ۵۰ نانومتری میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. یافته‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های ANOVA و تی تجزیه و تحلیل آماری شدند. ضریب اطمینان مطالعه ۹۵ درصد ($\alpha=0/05$) تعیین شد.

یافته‌ها

با اندازه‌گیری ضخامت میلین در گروه‌های آزمایشی و کنترل مشاهده گردید که ضخامت غشای میلین در گروه استات سرب ۴ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته است ($P<0/05$). اگر چه ضخامت میلین در گروه استات سرب ۲ درصد و شم نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود (نمودار ۱).

چگالی آکسون‌ها در گروه استات سرب ۴ درصد و ۲ درصد به ترتیب $4/3 \pm 0/6$ و $5/7 \pm 0/4$ می‌باشد که در مقایسه

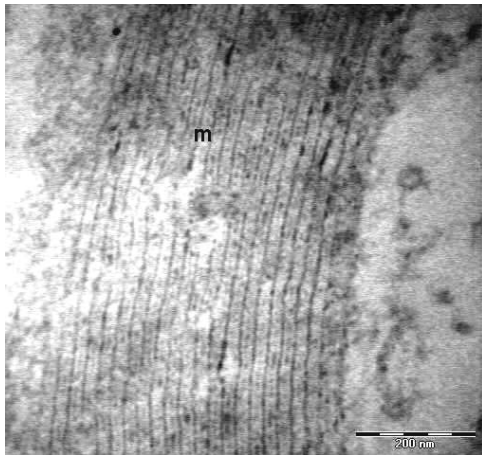
بیشتر سلول‌های شوان مرتبط با آکسون حرکتی نسبت به سلول‌های شوان مرتبط با آکسون حسی. همچنین گزارش‌های قبلی ضایعات سلول شوان را در حد میکروسکوپ نوری بررسی کرده بودند که در این تحقیق یکی از اهداف ما بررسی فراساختار سلول شوان است تا متوجه شویم آیا به دنبال مسمومیت با سرب سلول شوان هم متاثر می‌شود یا خیر؟

روش بررسی

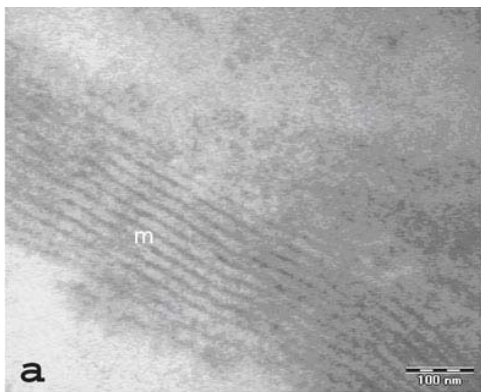
این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد sprague Dawely به وزن تقریبی ۱۸۰-۲۲۰ گرم در طی سال‌های ۱۳۸۲ الی ۱۳۸۳ در گروه آناتومی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. موش‌ها در محیط حیوان‌خانه با شرایط یکسان از نظر دما و رطوبت و روشنایی نگهداری شدند. براساس اهداف طرح موش‌ها به طور تصادفی به چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند. گروه تجربی ۱ (استات سرب ۴ درصد)، گروه تجربی ۲ (استات سرب ۲ درصد)، گروه شم (آب مقطر)، گروه کنترل (آب معمولی). از آنجایی که در تحقیقات قبلی به دنبال مصرف استات سرب ۴ درصد در رت نوروپاتی مشاهده شده است (۱۰)، به همین دلیل ما علاوه بر انتخاب این دوز ۲ درصد را نیز استفاده نمودیم تا ببینیم آیا با دوز کمتر هم این عوارض مشاهده می‌شود یا خیر؟ محلول استات سرب با غلظت ۲ درصد و ۴ درصد (حل شده در آب مقطر) به جای آب آشامیدنی به مدت یک‌ماه به حیوانات گروه‌های تجربی خوراندند. به منظور کاهش خطای آماری یک گروه از موش‌ها تحت عنوان گروه شم به جای آب معمولی حیوان‌خانه آب مقطر دریافت می‌کردند. به منظور جلوگیری از تبخیر آب و تغلیظ محلول، محلول‌ها به صورت روزانه تهیه می‌شدند. پس از یک‌ماه موش‌ها را با اتر بیهوش کرده و پس از باز کردن ناحیه خلف بازو عصب رادیال را از بین سرهای عضله سه‌سر بازویی خارج نموده و بلافاصله در محلول فیکساتیو قراردادیم. نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی را در فیکساتیو گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم. سپس نمونه‌ها را در طی دو مرحله ۱۵ دقیقه‌ای با PBS ۰/۱ مولار شستشو داده و هر نمونه را به قطعات یک میلی‌متری تقسیم کرده و مراحل تهیه بلوک انجام شد. سپس نمونه‌ها را در رزین Araldhite 502/812 به صورت عرضی قالب‌گیری نمودیم. برای پلیمریزه شدن رزین، قالب‌ها را ۱۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در oven

با گروه کنترل و شم (۳/۶±۰/۳) کمتر است، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی باشد.

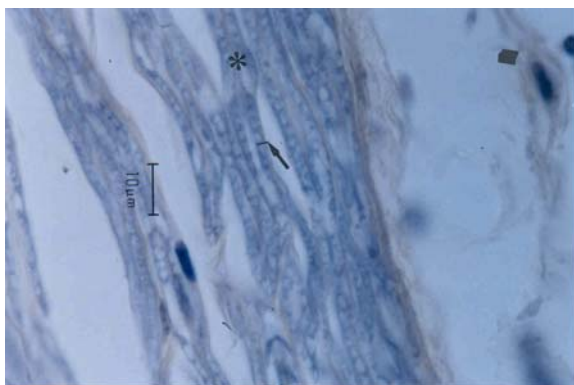
در مطالعه میکروسکوپ الکترونی، ادم و افزایش فضای ساب پری نورال مشاهده گردید. نامنظم بودن لایه های غشای میلین در تعدادی از آکسون های میلین دار مشاهده شد که این مورد در گروه استات سرب ۴ درصد نسبت به گروه ۲ درصد واضح تر بود (تصویر ۱). همچنین در گروه های تجربی هسته سلول شوان تراکم کمتری داشته و تعداد زیادی گرانول نیز در ماتریکس میتوکندری ها دیده شد (تصاویر ۵-۲).



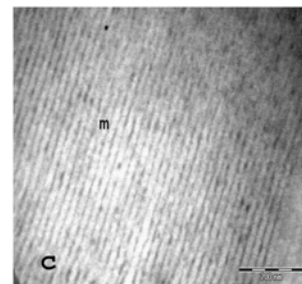
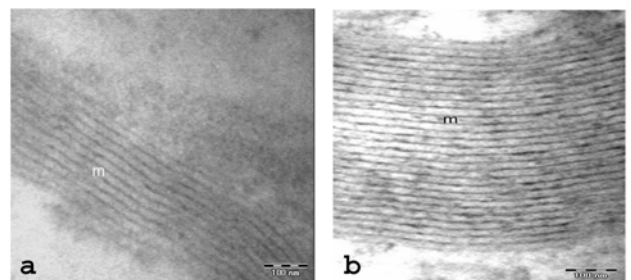
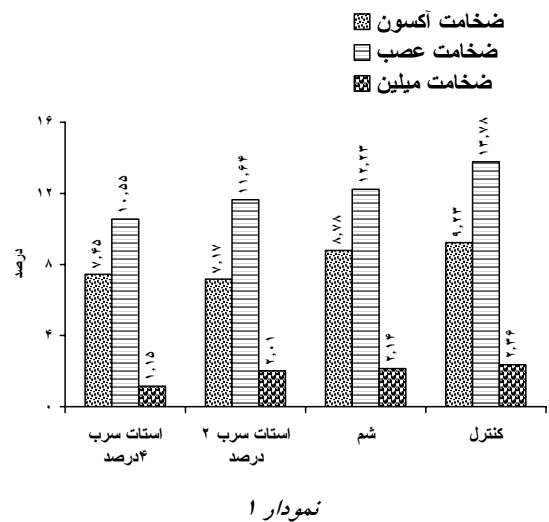
تصویر ۲: عکس میکروسکوپ الکترونی از غلاف میلین عصب در گروه کنترل (بزرگ نمایی ۶۰۰۰۰)



تصویر ۳: عکس میکروسکوپ الکترونی از غلاف میلین عصب در گروه استات سرب ۴ درصد (بزرگ نمایی ۶۰۰۰۰)



تصویر ۴: عکس میکروسکوپ نوری از غلاف میلین در گروه استات سرب ۴ درصد (رنگ آمیزی weill's، بزرگ نمایی ۱۰۰)
*: گره رانویه، نوک فلش: غلاف میلین



تصویر ۱: لایه های میلین (a: استات سرب ۴ درصد، b: استات سرب ۲ درصد و c نرمال - کنترل)

تعداد این فیبرها در عصب سیاتیک بیشتر است. از آنجایی که عصب سیاتیک به عنوان یک عصب مخلوط (حسی و حرکتی) سلول شوان بیشتری دارد، براساس این دو یافته ذکر شده در بالا آنها دمیلیناسیون را ناشی از آسیب به سلول شوان دانسته‌اند. در تحقیق حاضر ما با بررسی اولتراستراکچر سلول شوان وجود ضایعه در این سلول را به صورت هیپرتروفی هسته و سیتوپلاسم، ادم و حضور ماکروفاژهای فعال مشاهده نمودیم. وجود تعداد زیادی ماکروفاژ فعال با سیتوپلاسم غنی از واکوئل‌های حاوی چربی نشانه‌ای از هضم میلین (چربی) است. کاهش چگالی آکسون‌ها در گروه استات سرب نسبت به گروه کنترل را می‌توان ناشی از دژنراسیون آکسون دانست، چرا که در نتیجه این تحلیل فاصله بین آکسون‌ها کم شده و دانسیتهی کاهش می‌یابد (۱۳ و ۱۴).

همچنین در مطالعه‌ای که در ۱۹۹۱ توسط Monton انجام شده است اشاره گردیده که اولین نشانه نورو توکسیسیتهی سرب هیپرتروفی سلول شوان است که این هیپرتروفی هم در هسته و هم در سیتوپلاسم مشهود است (۱۰). در مطالعه حاضر نیز این هیپرتروفی دیده شده است. البته هیپرتروفی هسته به علت حضور انکلوژیون‌های داخل هسته‌ای است. این انکلوژیون‌ها علامت شروع دژنراسیون سلول شوان هستند. وجود این انکلوژیون‌ها در لوله‌های کلیوی رت مسموم شده با سرب نیز گزارش شده است (Duvenkamp 1984).

نتیجه‌گیری

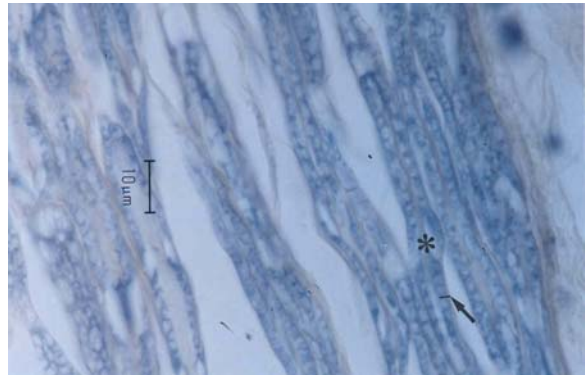
بنابر یافته‌های این مطالعه می‌توان احتمال داد که دمیلیناسیون عصب رادیال در نوروباتی سرب ناشی از آسیب دیدن سلول شوان است.

تشکر و قدردانی

تحقیق فوق طرح مصوب دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی بوده و با حمایت‌های مادی و معنوی این دانشگاه و گروه آناتومی و مرکز تحقیقات سلولی - ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

References

- 1) Bielarczyk H, Tomsig JL, Suszkiw JB. Perinatal low-level lead exposure and the septo-hippocampal cholinergic system: selective reduction of muscarinic receptors and cholineacetyltransferase in the rat septum. *Brain Res.* 1994; 643(1-2):211-7.
- 2) El-Sokkary GH, Kamel ES, Reiter RJ. Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell Mol Biol Lett.* 2003; 8(2):461-70.



تصویر ۵: عکس میکروسکوپ نوری از غلاف میلین در گروه کنترل (رنگ آمیزی weill's، بزرگنمایی ۱۰۰)
* : گره رانویه، نوک فلش: غلاف میلین

در گروه‌های آزمایشی تعدادی ماکروفاژ فعال مشاهده شد که در سیتوپلاسم این ماکروفاژها واکوئل‌هایی ناشی از هضم میلین وجود داشت. غشای سلولی ماکروفاژها نیز سطح نامنظمی داشتند که ناشی از افزایش فعالیت آنها بود. این ماکروفاژهای فعال در گروه کنترل دیده نشدند. در بررسی ضخامت اپی‌نوریوم اگرچه افزایش ضخامت در گروه استات سرب ۴ درصد و ۲ درصد نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود.

بحث

در این بررسی کاهش ضخامت غلاف میلین در گروه تجربی ۲ درصد و ۴ درصد مشاهده شد که این یافته‌ها مشابه مطالعات قبلی می‌باشد (۹). همچنین در تحقیق Bouldin که روی عصب سوراخ رت به دنبال مصرف استات سرب ۴ درصد انجام شده است، دمیلیناسیون سگمنتال بدون دژنراسیون آکسونی گزارش شده است. در این مقاله ذکر گردیده که به نظر می‌رسد این دمیلیناسیون بیشتر ناشی از آسیب به سلول شوان باشد تا این که منتج از آسیب آکسونی باشد. زیرا دمیلیناسیون به صورت پروگزیمو-دیستال نبوده و به شکل پراکنده در عصب دیده می‌شود. همچنین در مقایسه تعداد فیبرهای دمیلینیزه در عصب سیاتیک و سوراخ متوجه شدند که

- 3) Finkelstein Y, Markowitz ME, Rosen JF. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998; 27(2):168-76.
- 4) Hass U. Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett.* 2003; 140-141:155-9.
- 5) Marchetti C. Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotox Res.* 2003; 5(3):221-36.

- 6) Reuhl KR, Rice DC, Gilbert SG, Mallett J. Effects of chronic developmental lead exposure on monkey neuroanatomy: visual system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989; 99(3):501-9.
- 7) Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:87-110.
- 8) Kaji T. Cell biology of heavy metal toxicity in vascular tissue. *Yakugaku Zasshi.* 2004; 124(3):113-20.
- 9) Bouldin TW, Meighan ME, Gaynor JJ, Goines ND, Mushak P, Krigman MR. Differential vulnerability of mixed and cutaneous nerves in lead neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1985; 44(4):384-96.
- 10) Monton F, Coria F. Reversible Schwann cell hypertrophy in lead neuropathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1991; 17(3):231-6.
- 11) Sharifi AM, Baniasadi S, Jorjani M, Rahimi F, Bakhshayesh M. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci Lett.* 2002; 329(1):45-8.
- 12) Thanos PK, Okajima S, Terzis JK. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 1998; 14(6):423-36. Review.
- 13) Myers RR, Powell HC, Shapiro HM, Costello ML, Lampert PW. Changes in endoneurial fluid pressure, permeability, and peripheral nerve ultrastructure in experimental lead neuropathy. *Ann Neurol.* 1980; 8(4):392-401.
- 14) Lasley SM. Regulation of dopaminergic activity, but not tyrosine hydroxylase, is diminished after chronic inorganic lead exposure. *Neurotoxicology.* 1992; 13(3):625-35.
- 15) EL-Safty IA, Afifi AM, Shouman AE, EL-Sady AK. Effects of smoking and lead exposure on proximal tubular integrity among Egyptian industrial workers. *Arch Med Res.* 2004; 35(1):59-65.