

بررسی اثر سرب بر سلولهای پارانشیم کبد جنین رت (RAT) از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی

دکتر محمدحسن کریم فر - رزیدنت علوم تشریحی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر سیدمحمدحسین نوری - استادیار بافت‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر باقر مینایی - استادیار بافت‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر محمد پریرستانی - استادیار آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Study of Lead Effect on Liver Parenchymal Cell of Fetal Rats by Electron Microscope

ABSTRACT

To study the lead effect, we selected 14 female rats in which we had observed vaginal plague after mating, and divided them into a group of 8 female rats as the case group and 6 females as the control group. As drinking water the case group was given 0.13% lead acetate solution and the control group pure distilled water. Immediately after parturition the pups were killed and their livers removed. A small part of the liver was fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide in order to be studied with transmission electron microscope. The fixated parts were dehydrated and embed in Epon 812. Using ultramicrotome, we prepared semithin sections of the tissues, stained them with toluidine blue, and studied them under light microscope. Further more we prepared thin sections of the tissue to be placed on grids coated with formvar. These sections were stained by uranyl acetate and lead citrate. Electron microscopic study was performed on them.

Results: T.E.M. Study showed the swelling and blebbing of nuclear envelope and endoplasmic reticulum and mitochondria of hepatocytes.

مقدمه

مسأله آلودگی محیط زیست، یکی از معضلات بزرگ شهرها و جوامع مختلف است. یکی از آلوده‌کننده‌های مهم، سرب می‌باشد و از میان منابع سرب، از همه فاجعه‌بارتر سرب حاصل از سوختن بنزین اتومبیل‌هاست (۲۵) که هم اکنون با ازدیاد روزافزون و بیش از حد خودروها در سطح شهرهای بزرگ، مقادیر زیادی از این ماده خطرناک در هوا پراکنده می‌شود. علاوه بر سرب حاصل از سوختن بنزین، منابع بیشماری در محیط اطراف ما وجود دارند که عبارتند از: رنگهای ساختمانی، رنگ مو، خاک و غبار، ماشین‌های چاپ، لوله‌های سربی آب، سیم‌های سرب‌دار، گلوله‌های سربی، حروف چاپ، عکاسی‌ها، باتریهای اتومبیل، روزنامه و ... یکی دیگر از آلوده‌کننده‌های سرب‌دار، دود سیگار و تنباکو است. سرب می‌تواند وارد آب، خاک و گیاهان شده و از طریق آنها جذب بدن انسان

چکیده

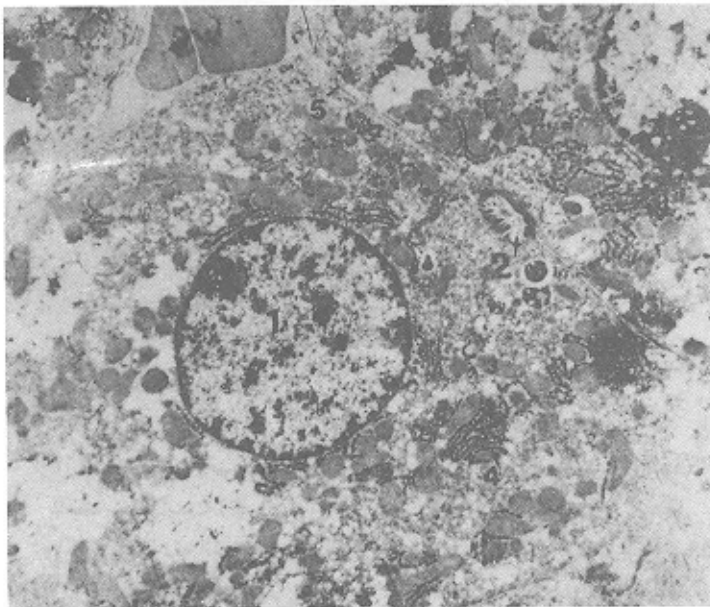
در این تحقیق، خصوصیات فراساختمانی هیاتوسیت‌های جنین رت (موش صحرائی آزمایشگاهی) که مادران آنها در طی دوره بارداری از محلول ۰/۱۳ درصد استات سرب به عنوان آب مصرفی استفاده نموده‌اند، به وسیله میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (T.E.M.) مورد مطالعه قرار گرفته و نتیجه‌گیری شد که سرب، به عنوان یک عامل آزاررسان، باعث گشاد شدن فضای حفاصل بین دو لایه غشاء هسته هیاتوسیت شده (Blebbing) و همچنین سبب متورم شدن میتوکندری‌ها، شبکه آندوپلاسمی صاف (S.E.R) و شبکه آندوپلاسمی خشن (R.E.R) گردیده است. این عامل همچنین باعث پیدایش اجسام میلیتی در سیتوپلاسم هیاتوسیت‌ها شده است.

لغات کلیدی: سرب، جنین، پارانشیم کبد

۱٪ مولار فسفات سدیم (۸) دوبار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده و در فیکساتیو ثانویه تتراکسید اسمیوم قرار داده شد و پس از چند ساعت با بافر ۱٪ مولار فسفات سدیم شستشو و آبگیری با اتانول صعودی انجام گردید. بعد از آن قالب‌گیری با اپوکسی رزین صورت گرفت. سپس مقاطع نیمه نازک (Semithin Section) یک میکرونی تهیه و با تولوئیدین بلو یک درصد رنگ‌آمیزی گردید.

تصویر ۱- هیاتوسیت طبیعی با بزرگنمایی $\times 2500$ که توسط T.E.M

تهیه شده است



۱) هسته هیاتوسیت، ۲) کانالیکول صفراوی، ۳) میتوکندری، ۴) شبکه اندوپلاسمی خشن، ۱۵ مرز بین دو هیاتوسیت

پس از بررسی این مقاطع، با کمک اولترامیکروتوم، مقاطع نازک به ضخامت ۹۰ نانومتر، تحت عنوان مقاطع نازک (Thin Section) تهیه گردید. مقاطع نازک، روی گریدهای پوشش داده شده با فرمور، (Formvar) (۸) منتقل گشته و رنگ‌آمیزی دوگانه با اورانیل استات و سیرات سرب انجام و بررسی با T.E.M صورت پذیرفت.

نتایج

در گروه شاهد، هیاتوسیت نرمال دیده می‌شود که هسته مدور از با یوکروماتین شفاف و هتروکروماتین، در وسط سلول قرار گرفته و در سیتوپلاسم سرتاسر سلول، اندامک‌های سیتوپلاسمی دیده می‌شوند (تصویر ۱). در گروه آزمایشی در بررسی هیاتوسیت و ارگانل‌های آن دیده می‌شود که از تعداد میتوکندری در هیاتوسیت‌ها،

گردد (۲۵).

سرب موجود در محیط اطراف می‌تواند از سه طریق جذب بدن شده، وارد گردش خون گردد و اثرات سمی و زیانبار خود را بر اعضای مختلف کودکان و بالغین اعمال کند. این سه طریق عبارتند از: دستگاه گوارش، دستگاه تنفس و پوست.

بنابه گفته محققان (۵)، سرب یک تبهکار مخفی است که بدون سر و صدا گام بر می‌دارد و مقادیر ناچیز آن کم‌کم تجمع یافته تا به حد معینی برسد (۵) و باعث اختلال در سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی، ادراری، گوارشی، قلب و عروق، تنفس و تولید مثل گردد (۲۵).

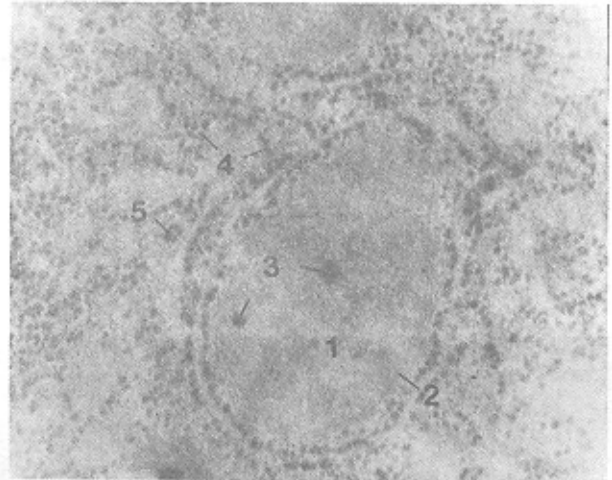
با توجه به اینکه سرب یکی از فاجعه‌بارترین آلوده‌کننده‌های محیط زیست است و با علم به اینکه، این عنصر به راحتی از جفت عبور می‌کند (۱۶، ۱۳، ۱) و با توجه به ملاحظات اخلاقی کاربرد روی انسان، با انجام این تحقیق، اثرات سرب از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن بر هیاتوسیت‌های جنین رت‌هایی که مادران آنها در طی دوره بارداری تحت تأثیر سرب بوده‌اند، مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش و مواد

۲۰ رأس رت ماده از نژاد Sprague - dawley rats را که قبلاً تحت هیچ نوع آزمایش قرار نگرفته بودند در فصل بهار سال ۱۳۷۵، در گروه آموزشی فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، در محیط مناسب حیوانخانه، با درجه حرارت ۱۸ تا ۲۸ درجه سانتیگراد و روشنایی و تاریکی طبیعی نگهداری نموده و پس از گذشت ۲۰ روز، جفت‌گیری با رت‌های نر از همان نژاد انجام و پس از مشاهده پلاک واژینال به دو گروه ده‌تایی شاهد و آزمایش تقسیم شدند. از ابتدای مشاهده پلاک واژینال، که علامت جفت‌گیری موفق است، به گروه آزمایش محلول استات سرب ۱۳٪ در صد و به گروه شاهد آب مقطر به عنوان آب مصرفی داده شد. از گروه آزمایش ۸ رت و از گروه شاهد ۶ رت باردار گشته و زایمان نمودند. بلافاصله در پی زایمان، نوزادان را تشریح نموده و کبد آنها از حفره شکم خارج گردید. سپس به منظور مطالعات میکروسکوپ الکترونی یک قطعه $1 \times 1 \times 1$ میلی‌متری از کبد را جدا نموده و برای ثبوت اولیه در فیکساتیو ترومپ (Trumpes 4f, IG fixative) (۸) قرار داده شد. این محلول، ترکیبی از گلو تارآلدهاید ۱ درصد و فورمالدهاید ۴ درصد در فسفات بافریک بازی با pH ۷/۲ و اسمولاریته ۱۷۶ می‌باشد. سپس نمونه‌ها با بافر

کاسته شده و این اندامک، متورم است (تصویر ۲).

تصویر ۲- تصویر میتوکندری از گروه آزمایش با بزرگنمایی $50000 \times$ که توسط T.E.M تهیه شده است



(۱) میتوکندری، (۲) پوشش دولایه میتوکندری، (۳) گرانول ماتریکسی، (۴) شبکه اندوپلاسمی، (۵) پلی زوم

شبکه اندوپلاسمی خشن و صاف متورم گشته و از میزان آنها کاسته شده است (تصویر ۳). تورم این شبکه سبب بوجود آمدن واکوئل هایی به اندازه ها و اشکال گوناگون شده است (تصاویر ۳ و ۴). پیدایش اجسام میلینی، در سیتوپلاسم هپاتوسیت ها، یکی دیگر از یافته ها می باشد (تصویر ۳).

غشاء هسته این سلولها، متورم بنظر رسیده و بین دو لایه پوشش غشاء هسته، فاصله ایجاد شده که باعث پیدایش حالت حباب مانتندی (Blebbling) در غشاء هسته شده است (تصویر ۳ و ۴).

بحث

اثر زیانبار سرب بر جنین و نوزادان، از جنبه های مختلف با بالغین متفاوت می باشد. مثلاً گزارش شده است که جذب سرب از طریق روده و معده، در نوزادان جوانان، بیشتر از نوع بالغ آن است و کلاً در ایام شیرخوارگی، سرب بیشتری در مغز و استخوان نسبت به افراد بالغ ذخیره می گردد (۷). در این تحقیق، اثر سرب بر هپاتوسیت های جنین های رتی که مادران آنها در دوران بارداری، از طریق دستگاه گوارش سرب دریافت نموده اند، از دیدگاه میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن، مورد مطالعه قرار گرفته است. مشاهده گردیده که در گروه آزمایش، میتوکندری ها متورم گشته، در صورتی که در گروه شاهد، این حالت دیده نمی شود.

همچنین از تعداد میتوکندری ها، در گروه آزمایش کاسته شده است. از آنجا که میتوکندری در اکسیداسیون اسیدهای چرب و فسفریلاسیون اکسیداتیو نقش مهمی دارد (۱۹)، در این اعمال اختلال ایجاد می گردد.

Barltrop و همکارانش (۱۹۷۱) گزارش نموده اند که سرب به آهستگی از سایر بخشهای سلول برداشته شده و بطور اختصاصی و محکم به میتوکندری ها اتصال یافته و باعث آزار آنها می شود (۲). Goyer و Rhyne (۱۹۷۳) بیان داشته اند که سرب موجود در حیوانات - حاصل از مسمومیت با سرب - اختلال عمل تنفسی و فسفوریلاتیو را در میتوکندری های هپاتوسیت ها سبب می شود (۱۳).

Mahaffey و همکارانش در سال (۱۹۸۱) و Cory در سال ۱۹۹۴ بیان داشته اند که در اثر مسمومیت با سرب، میتوکندری ها متورم گشته و لیزوزوم های اتوفازی در سیتوپلاسم مشاهده می شود (۱۹).

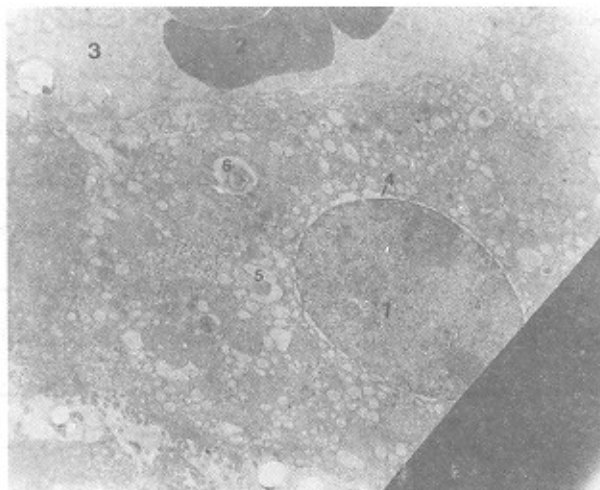
در گروه آزمایش شبکه اندوپلاسمی خشن و صاف متورم گشته و سبب بوجود آمدن واکوئل هایی به اندازه گوناگون، در سیتوپلاسم سلول شده است. یافته فوق، مطابق با نظرات Hilderbrand و همکارانش در سال (۱۹۷۳) مبنی بر تورم شبکه اندوپلاسمی در پی مسمومیت با سرب می باشد (۱۶).

پیدایش اجسام میلینی از یافته های دیگر در سیتوپلاسم هپاتوسیت های گروه آزمایش است. Cotran (۱۹۹۴) بیان داشته است که اجسام میلینی دلیل یک نوع آزار سلولی برگشت پذیر می باشد (۵).

غشاء دولایه هسته، حالت حبابدار به خود گرفته و دو لایه آن در نقاطی از هم دور شده اند. این امر نیز ناشی از اثر سرب بوده و در گروه شاهد مشاهده نمی شود.

تصویر ۳- هپاتوسیت گروه آزمایشی با بزرگنمایی $4000 \times$ که توسط

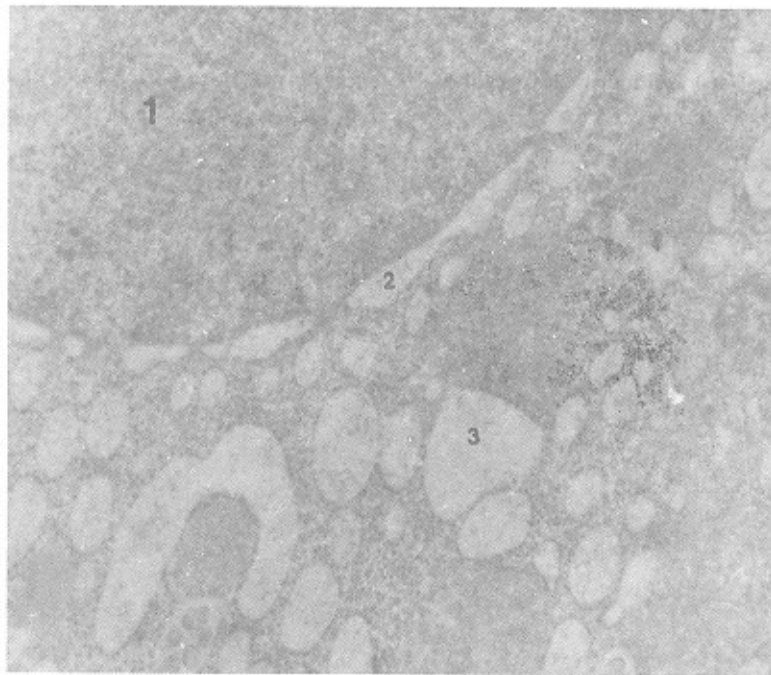
T.E.M تهیه شده است



(۱) هسته هپاتوسیت، (۲) گلبول قرمز (۳) سبوزوئید، (۴) غشاء متورم هسته (۵) شبکه

اندوپلاسمی متورم، (۶) اجسام میلینی

تصویر ۴- یک هپاتوسیت گروه آزمایش که با
بزرگنمایی $\times 12500$ توسط T.E.M تهیه شده است



۱) هسته هپاتوسیت، ۲) غشاء در لایه متورم هسته، ۳) شبکه اندوپلاسمی متورم

منابع

- 1- Angell, N.F. and Lavery, G.P.: The relationship of blood lead levels to obstetric outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142, 40-46 (1982).
- 2- Bartrop, D. et al: Clinical and experimental subcellular distribution of lead in the rat. *Journal of Laboratory and clinical medicine* 77.5, 705-7121 (1971).
- 3- Bolonowska, W. et al: The kinetics of distribution and excretion of lead (Pb 210) in rats. *Int. Cong. Occ. Health*, 2-240-245 (1963).
- 4- Cory - Slechta, D.A. et al: Lead induced crop dysfunction in the pigeon. *Toxiol. and appl. pharmaco* 52, 402-467 (1994).
- 5- Cotran, R.S. et al: Robbins pathological basis of disease. 2th ed. W.B. Saunder's comp (1994).
- 6- Demichelen J.S: Nutrition of lead. *comp. Biochem. Physiol* 78 A(3), 401-408 (1984).
- 7- Donald, J. et al: Lead in Laboratory mouse, influence of pregnancy upon absorption retention and tissue distribution of radiolabeled lead. *Environ - Research*, 4, 420-431 (1986).
- 8- Dykstra, M. J.: A manual of applied techniques for biological electron microscopy. Plenum press New York and London (1993).
- 9- Elisa, H., Pauley, J.E.: Amenta textbook and human microanatomy 6th ed. Piccin (1991).
- 10- Eriksen, N.L.: Lead intoxication. The effects of lead on the in vitro biosynthesis of heme and free erythrocyte porphyrins. *Scand J. Clin lab Invest.* 7, 80-85 (1995).
- 11- Fawcett, D. W. Bloom and Fawcett: A textbook of histology 11 th ed. W.B. Saunders company (1993).
- 12- Goldberg, A. et al: Studies on the biosynthesis of heme in vitro avian erythrocytes *Blood* 11, 821-833 (1956).
- 13- Goyer, R.A. and Rhvne, B.C.: Pathological effects of lead. *Int. Rev. Exp. Pathol* 12, 1-77 (1973).
- 14- Grant, L. D. et al: Chronic low - level lead toxicity in the rats. *Toxicoll. Appl. Pharmacol.* 56, 42-58 (1980).
- 15- Hackett, P.L., et al: Effects of dose level and pregnancy on the distribution and toxicity of intravenous lead in rats. 7. *Toxicol. Environ. Health* 9, 1007-1020 (1982).
- 16- Hilderbrand et al: Effects of lead acetate on reproduction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 15, 1058-1064 (1973).
- 17- Keller, C.A. Doherty, R.A: Distribution and excretion of lead in young and adult female mice. *Environ Res.* 21, 217-228 (1980).
- 18- Kelman, B.J. Walter, B.K.: Transplacental movements of inorganic lead from mother to fetus. *Proc. Soc. exp Biol. Med.* 163 728-282 (1980).
- 19- Mahaffey, K.S. et al: The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat. *J.lab. Clin. Med.* 79, 128-136 (1972).
- 20- Rhodin, J.A. G.: Histology : A text and atlas of electron

microscopy. Oxford university press (1974).

21- Rowett, H.G.Q. Biol. M. J.: Dissection guides, III the rat, with notes on mouse (1990).

22- Schwartz, J. et al: Relationship between childhood blood lead levels and structure. Pediatrics 77, 281-288 (1986).

23- Stow, H.D. et al: Experimental oral lead toxicity in young dogs. Arch Pathol 95 106-116 (1973).

۲۲. خادم حقیقت، محمدرضا: توزیع سرب در برگهای چنار نسبت به مرکز نرده خودرزهها.

در مناطق مختلف تهران (۱۳۶۴).

۲۵. صاحبقدم لطفی، عباس: متابولیسم سرب و مسمومیت‌های ناشی از آن، دانشگاه تربیت مدرس (۱۳۶۸).

۲۶. صدوقی، مهرانگیر: کارهای عملی در بیولوژی جانوری، ترجمه نشر پرسش اصفهان (۱۳۶۸).

۲۷. نشریه محیط زیست، سرب و اثرات مرگبار آن بر محیط، شماره دهم (۱۳۶۳).

۲۸. وهابی، عبدالرضا: پراکنش سرب در گیاه و خاک باغستانهای مختلف چای لاهیجان نسبت به جاده، انتشارات جهاد دانشگاهی (۱۳۶۴).