

***Evaluation of Lead Acetate Side Effects on Rat Hippocampus
and the Effects of Vitamin C on These***

Kermanian F., M.Sc., Mehdizadeh M., Ph.D.* , Mahmoudian A.R., Ph.D.,

Markazi moghadam N., M.D., Kermanian M., M.Sc.

** Anatomy Department, Medical Sciences Iran university, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: To investigate the effect of ascorbic acid against lead-induced neurotoxicity in the rat hippocampus

Materials and Methods: The heads of 40 male Sprague–Dawley rats were divided into 4 groups: normal, control, lead-treated and lead plus ascorbic acid-treated. Lead acetate (20mg/kg) was administered intraperitoneally to rats for 7days in third and fourth groups. During this period, rats in the fourth group received 500 mg ascorbic acid, in drinking water daily. At the end of the treatment, all rats were sacrificed and their hippocamps were excluded. Using TEM the samples were examined in terms of natural and apoptotic cells.

Results: Histopathological evaluation showed that apoptosis was attenuated significantly in the ascorbic acid group but not in the lead group. Simultaneous administration of ascorbic acid and lead increased the level of Bcl-2 and decreased Bax protein compared with lead-treated only.

Conclusion: It seems that ascorbic acid may reduce the lead-induced toxicity in central nervous system.

Keywords: Hippocampus, Cell Death, Lead, Rat

بررسی عوارض مواجهه با سرب در هیپوکامپ موش صحرایی و تأثیر ویتامین ث بر این عوارض

فاطمه کرمانیان M.Sc.*، مهدی مهدیزاده Ph.D.**، علیرضا محمودیان Ph.D.**، نادر مرکزی مقدم M.D.***
معصومه کرمانیان M.Sc.****

* گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
*** معاونت آموزش و پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارتش
**** گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۷

چکیده

هدف: سرب یک ماده سمی برای سیستم عصبی است که مکانیسم دقیق عمل آن هنوز مشخص نشده است. در این تحقیق آثار تجویز ویتامین ث بر عوارض حاصل از مسمومیت با سرب در هیپوکامپ موش صحرایی بررسی شده است.
مواد و روشها: ۴۰ سر رت نر بالغ به ۴ گروه تقسیم شد. گروه اول به عنوان گروه نرمال و گروه دوم گروه کنترل بودند. به گروه سوم و چهارم روزانه ۲۰ mg/kg استات سرب داخل پریتون به مدت ۷ روز تزریق شده و طی این مدت گروه چهارم روزانه ۵۰۰ میلی گرم ویتامین ث حل شده در آب آشامیدنی را نیز دریافت کردند. پس از کشتن موشها و خارج نمودن هیپوکامپ نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) از نظر سلول‌های سالم و آپوپتوتیک بررسی شدند. علاوه بر آن با آزمایش وسترن بلاتینگ، میزان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 و به وسیله اسپکتروفتومتری اتمی سطح خونی سرب اندازه‌گیری شد.
یافته‌ها: افزایش آپوپتوز در گروه سرب و کاهش آن در گروه ویتامین ث مشاهده شد. تجویز ویتامین ث موجب افزایش بیان Bcl-2 و کاهش Bax در مقایسه با گروه سرب شد.
نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ویتامین ث می‌تواند سمیت سرب در سیستم عصبی مرکزی را کاهش دهد.

کلید واژه‌ها: هیپوکامپ، مرگ سلولی، سرب، رت

مقدمه

۱۶۲۰ درجه سانتی گراد جزء فلزات سنگین قلمداد می‌شود [۱].
راه اصلی جذب سرب از طریق دستگاه گوارش و سیستم

سرب با عدد اتمی ۸۲ و وزن اتمی ۲۰۷/۲ و نقطه جوش

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

E-mail: maranao@iums.ac.ir

استرس اکسیداتیو است که این امر موجب ضایعه به پروتئینها و چربی های غشا و اسیدهای نوکلئیک می شود [۲]. اسید اسکوربیک یک فاکتور کمکی برای آنزیمهایی است که در سنتز کلاژن و کارنی تین نقش دارند. اگر چه مکانیسم عمل ویتامین ث در حمایت نوروئی هنوز مشخص نیست ولی مشاهده شده که اسید اسکوربیک در ممانعت از آثار تخریبی استرس اکسیداتیو بر سلول نقش دارد [۱۰ و ۱۱]. مطالعات *in vivo* نشان داده که اسید اسکوربیک ضایعات سلولی ناشی از سرب را کاهش می دهد. گزارش شده که ویتامین ث یک *chelator* سرب بوده و اثر آن در حد $EDTA^1$ است. *Chelator*ها موادی هستند که یون فلزی را مانند حلقه ای در بر می گیرند و آثار این یون را در محیط کاهش می دهند [۲]. هدف از این مطالعه بررسی اثر حمایتی ویتامین ث بر عوارض ناشی از سرب در هیپوکامپ موش صحرایی است.

مواد و روشها

الف- مدل حیوانی

۴۰ سررت نر بالغ از نژاد Sprague Dawley با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم انتخاب و به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه نرمال به هیچ وجه دستکاری نشدند. گروه دوم یا گروه کنترل روزانه ۰/۵ سی سی آب مقطر را به صورت داخل پریتون دریافت کردند. به گروه سوم روزانه 20 mg/kg استات سرب داخل پریتون به مدت ۷ روز تزریق شد. به گروه چهارم روزانه 20 mg/kg استات سرب داخل پریتون به مدت ۷ روز تزریق شده و طی این مدت روزانه ۵۰۰ میلی گرم ویتامین ث حل شده در آب آشامیدنی را نیز دریافت کردند. موشها در شرایط یکسان در محیط حیوانخانه نگهداری شده و روز هشتم هیپوکامپ موشها خارج شد.

تنفسی است. در زمینه عوارض سمی سرب بیش از یکصد سال است که تحقیقات وسیعی انجام می شود. این تحقیقات آثاری چون کاهش قدرت یاد گیری و حافظه، ضایعات کلیوی و کبدی [۲]، کاهش انتقال پیام عصبی [۱]، تخریب غشای میلین و سلول شوان در اعصاب محیطی [۳] و ... را ذکر نموده اند. سرب از سد خونی مغزی عبور کرده و در مغز تجمع می یابد. مکانیسم های سمیت عصبی سرب پیچیده بوده و هنوز کاملاً شناخته شده نیستند ولی یافته های جدید نشان داده اند که رسپتورهای نوروترانسسمیترها هدف حمله سرب هستند. سرب روی N-متیل D-آسپارات که نوعی رسپتور گلوتامات است اثر گذاشته و سیستم یادگیری و شناخت را درگیر می کند [۲].

مکانیسم های متعددی برای نوروتوکسیسیتی سرب بیان شده است. بعضی مطالعات معتقدند که تخریب حاد نوروئی که در مسمومیت با سرب دیده می شود ممکن است در ارتباط با آپوپتوز باشد [۵ و ۴]. آپوپتوز یک پدیده تحت کنترل ژن است که از نظر مرفولوژیک با تراکم کروماتین، مچاله شدن هسته، چین خوردگی غشا و قطعه قطعه شدن DNA مشخص میشود [۶ و ۷]. یکی از ژنهای وابسته به روند آپوپتوز خانواده Bcl-2 است. پروتئین Bcl-2 موجب بقای سلول و Bax موجب تسریع مرگ سلول می شود [۸]. نسبت این دو پروتئین به یکدیگر در طول دوران حیات دایم در تغییر است. به عنوان مثال در تومورهای سرطانی افزایش Bcl-2 و کاهش Bax مشاهده می شود در حالی که به دنبال انفارکتوس یا ایسکمی میزان Bax شدیداً افزایش می یابد [۹]. جدیدترین تئوری نحوه اثر توکسیک سرب را از طریق به هم زدن تعادل پرواکسیدان به آنتی اکسیدان مطرح میکند. مطالعات *in vitro* افزایش تولید ROS (Reactive oxygen species) را به دنبال مصرف سرب نشان داده اند. ROS یا رادیکال آزاد، هر مولکولی است که دارای یک یا چند الکترون غیر مزدوج باشد. بخشی از تولید این رادیکالها در زنجیره تنفسی و در میتوکندری صورت می گیرد. تولید ROS به شکل پاتولوژیک در بافت، به دنبال

1. Ethilen Diamin Tetra Acetic acid

ب- مطالعه میکروسکوپی

در هر گروه نیمی از نمونه ها برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی استفاده شدند. این موشها با تزریق داخل پریتوان مخلوطی از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و گزیلازین (mg/kg) (۱۰) بیهوش شده سپس با ۱۰۰ میلی لیتر سالین و پس از آن گلو تار آلدئید ۲ درصد و فرمالدئید ۲ درصد در فسفات بافر ۰/۱ مولار پرفیوژن شدند. پس از درآوردن هیپوکامپ، نمونه ها با تتراسید اسمیوم ۱ درصد تثبیت شده و پس از آگیری با اپوکسی رزین قالب گیری شدند. نمونه های نیمه نازک با تولوئیدن بلو ۱ درصد و نمونه های نازک با سترات سرب و استات اورانیل رنگ آمیزی شدند. از هر نمونه ۳ برش انتخاب شد که به صورت رندوم در هر برش در ۱۰ فیلد میکروسکوپی تعداد سلولهای سالم و آپتوزی شمارش شد. چین خوردگی غشای هسته، تراکم کروماتین، ظهور اجسام آپتوتیک و مجاله شدن هسته از علایم آپتوز در نمای میکروسکوپی است. بررسی با میکروسکوپ الکترونی TEM توسط فردی ناآگاه از نوع مطالعه انجام شد.

شد. با روش Bio-Rad میزان پروتئین اندازه گیری شده و ۱۵ میکروگرم پروتئین از هر نمونه به ژل پلی آکریل آمید SDS اضافه شده و پس از الکتروفورز به غشای پلی وینیلیدن دی فلوراید (PVDF) انتقال یافت. سپس غشا با آنتی بادی اولیه بر علیه Bax و Bcl-2 (Sigma-Aldrich, 1:200, 1:250) و آنتی بادی ثانویه (Anti- mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase, 1:1000) انکوبه شد.

د- غلظت سرب در خون

پس از بیهوشی حیوانات نمونه خون از آئورت شکمی گرفته شده و برای اندازه گیری سطح خونی سرب با اسپکتروفتومتری اتمی، در لوله های هپارینه به سازمان انرژی اتمی فرستاده شد.

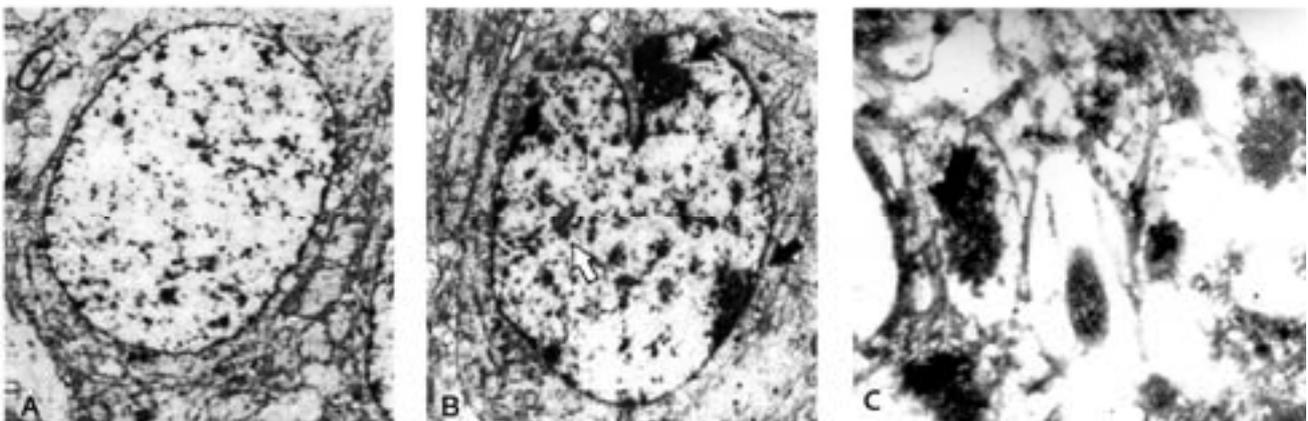
یافته های به دست آمده با آمارهای میانگین \pm انحراف معیار برای ۱۰ رت در هر گروه آنالیز شده سپس با استفاده از نرم افزار SPSS متغیرهای کیفی با آزمون کای دو و متغیرهای کمی با آزمون t مستقل بررسی شدند.

یافته‌ها

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که میزان آپتوز در گروه سرب به طور معنی داری بیشتر از گروههای کنترل و نرمال و در گروه سرب + ویتامین ث کمتر از گروه سرب بود (شکل ۱).

ج- اندازه گیری Bax و Bcl-2

برای آزمایش وسترن بلات، مغز مابقی نمونه ها بلافاصله از مجامه خارج و روی قالب یخ هیپوکامپ ها جدا شدند. پس از قراردادن در لیزیس بافر و انجام سانتریفوژ، مایع رویی جدا



شکل ۱. میکروسکوپ الکترونی از هیپوکامپ (A) گروه کنترل (B) گروه سرب (C) گروه سرب + ویتامین ث. در گروه B علایم آپتوز از جمله تراکم کروماتین (پیکان سفید) مهاجرت هستک به محیط (پیکان سیاه) و چین خوردگی های غشای هسته مشاهده می شود. (بزرگنمایی $\times 10000$: A, B- $\times 30000$)

گروه سرب بود ولی این اختلاف از نظر اماری معنی دار نبود ($p > 0.05$) (جدول ۱). بین گروههای کنترل و نرمال تفاوت معنی داری وجود نداشت به همین دلیل در جدول و شکلها فقط گروه کنترل ذکر شده است.

بحث

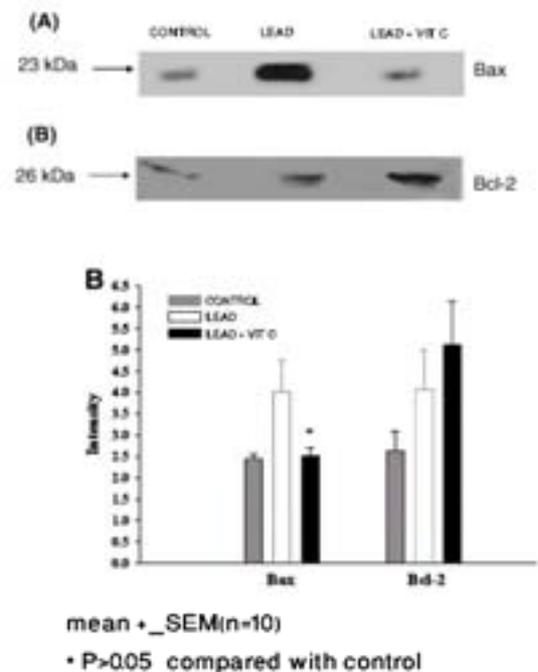
علیرغم آلودگی جوامع صنعتی با سرب، هنوز مکانیسم عمل سرب در سیستم عصبی مرکزی مشخص نیست [۳]. بررسیهای انجام شده کاهش استیل کولین در هیپوکامپ نوزاد رت [۱۲]، کاهش تراکم نورونی در کورتکس بینایی میمون [۱۳] و ایجاد ضایعه در آستروسیتها و سلولهای سد مغزی خونی [۱۴] را گزارش نموده اند.

مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر بسیار کم سرب می تواند موجب مرگ نورونها شود. این یافته با مطالعات قبلی مشابهت دارد [۵ و ۲]. تحقیقات متعددی مکانیسم عمل سرب را ناشی از استرس اکسیداتیو می دانند [۲، ۹ و ۱۵]. سرب با کاهش سلنیوم سلول، سلول را به استرس اکسیداتیو حساس می کند. در رت تجویز سلنیوم قبل از مجاورت با سرب اثر پروفیلاکتیک برای استرس اکسیداتیو دارد [۲].

ویتامین ث (اسید اسکوربیک) آنتی اکسیدانی با وزن ملکولی پایین است که ROS مایع را از طریق انتقال خیلی سریع الکترون هضم کرده و از پراکسیداسیون چربی جلوگیری می کند [۱۶]. در این مطالعه به دنبال تجویز ویتامین ث میزان آپوپتوز کاهش یافت که این امر می تواند ناشی از نقش آنتی اکسیدانی ویتامین ث باشد. پترز (Perez) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که ویتامین ث می تواند میزان آپوپتوز در منوسیتها را کاهش دهد [۱۷].

در این مطالعه بالا بودن میزان پروتئین Bax که پروآپتوتیک است نسبت به Bcl-2 که یک پروتئین آنتی آپوپتوتیک است در گروه های تجربی نشان دهنده ایجاد آپوپتوز توسط سرب

بیان Bax و Bcl-2 در گروه سرب افزایش معنی داری نسبت به گروههای کنترل و نرمال داشت ($P < 0.05$). در گروه سرب + ویتامین ث بطور معنی داری میزان Bax کمتر و Bcl-2 بیشتر از گروه سرب بود ($p < 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر سرب و ویتامین ث بر بیان پروتئین های Bax و Bcl-2 در هیپوکامپ موش صحرائی با استفاده از آزمایش western blotting

جدول ۱. سطح خونی سرب در رتهای در معرض سرب و ویتامین ث ۱

گروه کنترل	$0.16 \pm 0.04 \mu\text{g/dl}$
گروه سرب	$11.7 \pm 0.01 \mu\text{g/dl}^*$
گروه سرب + ویتامین ث	$10.5 \pm 0.03 \mu\text{g/dl}^{**}$

۱: نتایج میانگین \pm انحراف معیار ($n=10$)

*: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل $p < 0.01$

** : تفاوت بی معنی در مقایسه با گروه سرب $p > 0.01$

سطح خونی سرب در موشهایی که سرب دریافت کرده بودند با اختلاف معنی داری بیشتر از گروههای کنترل و نرمال بود. در گروه سرب + ویتامین ث سطح خونی سرب کمتر از

دهنده سطح خونی سرب نمی‌دانند. در کارگران معادن سرب با سطح خونی $28/9$ تا $76/4 \mu\text{g/dl}$ ، تجویز ویتامین ث و روی، سطح خونی سرب را کاهش نداد (lauwerys1983). همچنین در رت با سطح خونی سرب به میزان $36 \mu\text{g/dl}$ تجویز ویتامین ث سطح خونی و اسپرمی سرب را کاهش نداد [۱۹]. به نظر می‌رسد این مسئله ناشی از تغییرات متفاوت در جذب و دفع سرب باشد.

در این مطالعه ویتامین ث سلولهای هیپوکامپ را از مرگ ناشی از سرب حمایت نمود. مکانیسم‌های عمل سرب کاملاً شناخته شده نیستند و این امر نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

تقدیر و تشکر

این پروژه طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی ارتش بوده و با همکاری مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

است. کاهش میزان Bax در گروه سرب+ویتامین ث و کاهش تعداد سلولهای آپوپتوتیک در این گروه نشانه اثر حمایتی ویتامین ث در مقابل استرس اکسیداتیو است. سوزوکی (Suzuki) و همکاران در ۱۹۷۹ مشاهده نمودند که با اضافه کردن آهن و ویتامین ث به رژیم غذایی رتهای مسموم شده با سرب، تاخیر رشد و کم خونی ناشی از مصرف سرب کاهش یافت همچنین در این موشها غلظت سرب در کلیه و تیبا کمتر از موشهای محروم از آهن و ویتامین ث بود. آنها نتیجه گیری کردند که آهن مانع از جذب سرب می‌شود [۱۸].

در مطالعه حاضر سطح خونی سرب در دو گروه تجربی تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت. در مطالعات قبلی نیز یافته‌های متفاوتی در این مورد گزارش شده است. تجویز هم‌زمان ویتامین ث و مینرال به زنان آمریکای جنوبی باعث کاهش سطح خونی سرب از $5/1$ به $1/1 \mu\text{g/dl}$ شد که این کاهش ارتباط معکوسی با سطح سرمی ویتامین C و E داشت (west et al 1994) ولی مطالعات دیگری ویتامین ث را کاهش

References

1. **Hsu P, Liu M, Hsu C, Chen L, Guo YL.** Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-relayed lead toxicity in the rat sperm. *Toxicology* 1998; 128: 169-79.
2. **Marchetti C.** Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotox Res* 2003; 5(3): 221-36.
3. **Mehdizadeh M, Kermanian F, Farjah G.** Schwann cell injuries of radial nerve after lead (Pb) exposure in rats. *Pathophysiol.* 2008; 15(1): 13-7.
4. **Garza A, Vega R, Soto E.** Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit* 2006; 12(3): 57-65.
5. **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: 45-8.
6. **Kuan CY, Roth KA, Flavell RA.** Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 2000; 23: 291-97.
7. **Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
8. **Reed JC.** Bcl-2 family proteins and the control of cell life and death in normalcy and neoplasia. *Vitam. Horm* 1997; 53: 99-138.
9. **Maulik N, Engelman RM, Rousouj A, Flack JE, Deaton D.** Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating Anti-Death gene Bcl-2. *Circulation* 1999; 100: 369-75.
10. **Pande M, Flora SJS.** Lead-induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rat. *Toxicology* 2002; 177: 187-96.
11. **Balz F.** Reactive oxygen species and antioxidant

- vitamins. 1997. Available at:<http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html>. Accessed Nov./1997.
12. **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.
 13. **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.
 14. **Kaji T.** Cell biology of heavy metal toxicity in vascular tissue. *Yakugaku Zasshi* 2004; 124(3): 113-20.
 15. **Basha MR, Wei W, Brydie M, Razmiafshari M, Zawia NH.** Lead-induced developmental perturbations in hippocampal DNA-binding are prevented by zinc supplementation. *Int J Dev Neurosci* 2003; 21(1): 1-12.
 16. **Flora SJS, Tandon SK.** Prevention and therapeutic effects of thiamin, ascorbic acid and their combination in lead intoxication. *Acta Pharm Toxicol* 1986; 58: 374-8.
 17. **Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW.** Vitamin C inhibit FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 2003; 102: 336-43.
 18. **Suzuki T, Yoshida A.** Effect of dietary supplementation of iron and ascorbic acid on lead toxicity in rats. *J Nutr* 1979; 109(6): 983-8.
 19. **Hsu P, Guo YL.** Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 33-44.