مقاله تحقیقی

بررسی اثرات مصرف آب آشامیدنی آلوده به سرب بر هیستوژنز قلب جنین رت نژاد Sprague Dawley

کیمیا کریمی *[1]، مهناز آذرنیا [2]، سید محمد حسین نوری موگهی [3]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی، تهران، ایران

***مسؤول مکاتبات:** کیمیا کریمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست شناسی، تهران، ایران، تلفن: ۹۸۲۱۶۶۴۶۷۴۷۲، پست الکترونیکی: karimikimiacod@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۴

چکیده

آلودگی زیست محیطی سرب، به طور بی‌رویه در حال افزایش است و به طرق مختلف، حیات موجودات زنده را تهدید می‌کند. به نظر می‌رسد که دوره جنینی و کودکی، حساس‌ترین دوران تأثیرپذیری در برابر اثرات سمی ماده مذکور باشد. از طرفی، بیماری‌های قلبی- عروقی، از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جهان هستند و عوامل مختلفی در بروز آن‌ها تأثیر دارند. مطالعه حاضر به بررسی اثر آب آشامیدنی آلوده به سرب روی قلب جنین رت می‌پردازد تا بدین‌وسیله، تأثیر این ماده سمی به عنوان یک عامل مهم در افزایش شیوع بیماری‌های قلبی- عروقی بررسی گردد. در این مطالعه، ۴۰ سر رت ماده از نژاد Sprague Dawley و ۲۰ سر رت نر بالغ از همین نژاد جهت تولیدمثل، به طریق تصادفی انتخاب گردیدند. سپس رت‌های ماده باردار شده، در دو گروه تجربی و کنترل قرار گرفتند و در طول مدت حاملگی، به ترتیب توسط محلول ۰/۱۳ درصد استات سرب در آب مقطر و آب شهر مشروب گردیدند. نوزادان حاصل از این رت‌ها پس از تولد و انجام مراحل تهیه لام، توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده شامل رنگ پریدگی پراکنده سیتوپلاسم کاردیوسیت‌ها، هیپرتروفی کاردیوسیت‌ها، پیدا شدن دانه‌های متراکم و تیره نزدیک هسته سلول‌ها، مشاهده نشدن صفحات بینابینی، نامنظم قرار گرفتن کاردیوسیت‌ها و پرخونی مویرگ‌های بافت بینابینی قلب بود. یافته‌ها از اثر مخرب سرب بر بافت قلب و نیز وجود ارتباط بین آلودگی محیط زیست توسط سرب با افزایش شیوع بیماری‌های قلبی حکایت دارد.

واژه‌های کلیدی: استات سرب، قلب، رت

مقدمه

آلودگی محیط زیست، تأثیر بر کل اکوسیستم دارد، ولی از آنجایی که این تأثیرات، آنی و مشهود نیست، کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد و شاید جزو مسائل حاد برنامه‌ریزی قلمداد نشود. یکی از عوامل مهم آلوده کننده محیط زیست، سرب است که امروزه به دلیل گسترش صنعت و استفاده روز افزون

و بی‌رویه از این ماده به صورت ترکیبات مختلف موجود در فرآورده‌های صنعتی و شیمیایی، محیط زیست ما به مقدار زیادی با این ماده سمی آلوده شده است. در نتیجه مصرف بی‌رویه این ماده، حیات انسان و سایر موجودات زنده در معرض خطر جدی قرار گرفته است. آب در ازدیاد میزان سرب خون و ایجاد مسمومیت در مناطق دارای آب آلوده به سرب، بیش از هوا سهم دارد.

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد قرارگیری در معرض آلودگی هوا و استنشاق آلاینده‌های هوا، با پیشرفت بیماری آترواسکلروز، بیماری های قلبی عروقی و حتی مرگ همراه است (۱). آزمایش‌های تجربی بعدی که به بررسی پاسخ‌دهی قلب ایزوله به کاتکول‌آمین‌ها در موش صحرایی پرداخت، نشان داد که تماس با غلظت‌های پایین سرب، اثرات کرونوتروپیکی و ایمنوتروپیکی مثبت β-آدرنرژیک‌ها را تقویت می‌کند (۲). همچنین، بررسی اثرات سیتوتوکسیک استات سرب روی بافت قلب خرگوش نشان می‌دهد که استات سرب طی فاز مزمن باعث تغییرات واضحی بر بافت قلب می‌گردد (۳).

تحقیقات گذشته دانشمندان در مورد بیوپسی-های انجام گرفته از بافت قلب موش‌های صحرایی نشان داده است که یون کلسیم، از طریق کانال‌های کلسیم موجود درسارکولماها، سبب انقباض عضلات قلبی و باند شدن سرب با سولفید هیدروژن شده و به این ترتیب سبب کاهش فعالیت میوزین می‌شود. مرگ سلول‌های میوسیت نیز می‌تواند به دلیل عوامل مختلف رخ دهد و سبب نقص در عملکرد عضلات بطن چپ و کاردیومیوپاتی اتساعی و افزایش فشارخون گردد (۴).

در پژوهشی دیگر مشخص شد سرب می‌تواند منجر به تغییر قدرت انقباضی قلب و عروق و همچنین باعث افزایش فعالیت رنین- آنژیوتانسین شود (۵).

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، قلب، کلیه‌ها و سایر عضلات توزیع می‌شود. بر اساس بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکی و آزمایشگاهی، سرب می‌تواند خطر بیماری‌های سیستم قلب و عروق را افزایش دهد (۲). بنابراین، به دلیل تأثیرات مخرب سرب بر موجودات زنده و شایع بودن بیماری‌های قلبی-عروقی و حساسیت دوران جنینی و کودکی و تأثیرپذیری این دوران در برابر ماده مذکور، هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثرات آب آشامیدنی آلوده به سرب بر هیستوژنز قلب جنین رت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جذب گوارشی و توزیع سرب در حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش صحرایی آزمایشگاهی (رت) شبیه انسان بوده و بررسی تأثیر سرب با دوزهای بالا بر سلامتی انسان محدودیت اخلاقی دارد، لذا در این مطالعه تجربی- توصیفی، از ۴۰ رت ماده از نژاد Sprague Dawley با وزن متوسط ۲۳۵-۱۶۰ گرم و نیز ۲۰ رت نر بالغ از همین نژاد با وزن متوسط ۲۳۰-۱۷۰ گرم با سن متوسط سه ماه از طریق نمونه‌برداری تصادفی استفاده گردید. رت‌ها به دسته‌های پنج‌تایی در قفس‌هایی مشبک به ابعاد ۵۰×۲۵×۲۰ سانتی‌متر و در نور کافی در دمای ۲۸-۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. رت‌های باردار در میان آن‌ها شناسایی و از مطالعه خارج گردیدند. پس از ۲۰ روز سازش حیوان با محیط جدید، رت‌های نر جهت جفت‌گیری به قفس‌های رت‌های ماده انتقال یافتند. صبح هر روز، رت‌های ماده از نظر وجود پلاک واژینال، مورد بررسی قرار می‌گرفتند. رت‌های حامله (۳۰ عدد) به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم گردیدند. از نخستین روز بارداری، گروه تجربی از محلول ۰/۱۳ درصد استات سرب در آب مقطر (طبق تحقیق I.H. Bukhari) و گروه کنترل، آب مقطر به عنوان آب مصرفی استفاده نمودند. نوزادان بلافاصله پس از تولد، با کلروفرم بیهوش، در محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۷ روز قرار داده شدند. پس از این مدت، نمونه‌ها به مدت یک ساعت با آب جاری شستشو گردیدند. سپس، بافت‌ها به قطعات کوچک‌تر و منظم بریده شدند. در دستگاه مخصوص اعمال آب‌گیری، الکل‌گیری یا شفاف کردن و آغشته نمودن با پارافین انجام گرفت.

بعد از قالب‌گیری، توسط دستگاه میکروتوم Rotary مقاطع ۳ میکرونی تهیه شد. سپس برش‌ها روی لام قرار داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این تحقیق، از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) استفاده گردید. در این روش، هسته سلول‌ها آبی و سیتوپلاسم و رشته‌های همبند، درجات متفاوتی از رنگ صورتی را به خود می‌گیرند.

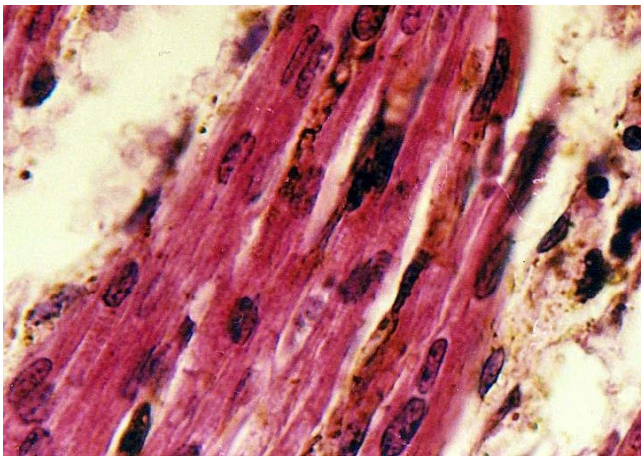
نتایج

در لام‌های به دست آمده از گروه تجربی، انشعابات سلولی زیادی مشاهده می‌گردد که در بین آن‌ها بافت همبند اندوکاردیوم وجود دارد و نشان دهنده از بین رفتن نظم ساختاری بافت قلب و عدم بلوغ سلول‌ها است (تصویر ۱)، ولی برخلاف این گروه، در گروه کنترل، زواید و انشعابات مشاهده نمی‌شود (تصویر ۲).

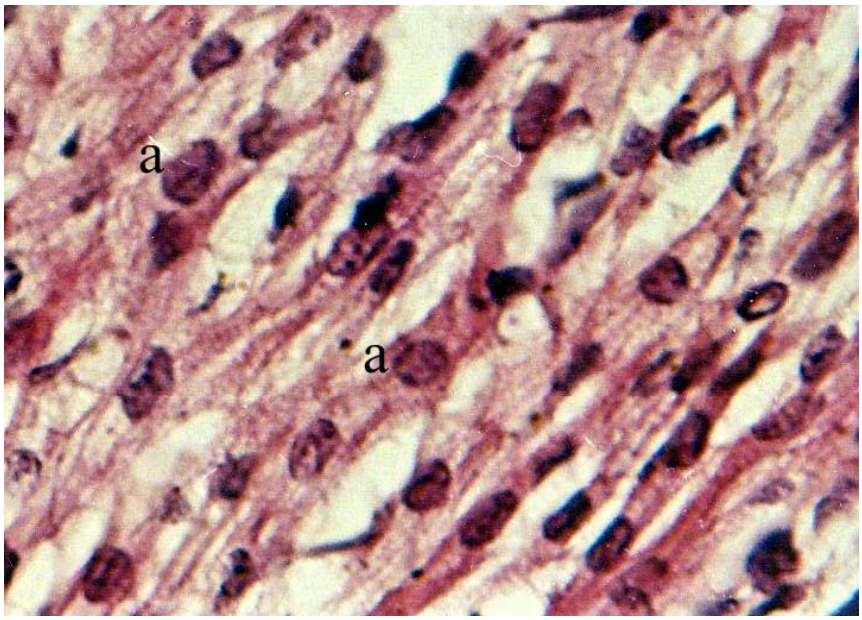
هسته‌ها در گروه تجربی، درشت‌تر، روشن و واضح‌تر از گروه کنترل است (تصویر ۳).

ولی در گروه کنترل، هسته‌ها کشیده و دوکی است (تصویر ۴).

تصویر ۱- بافت قلب گروه تجربی. عدم وجود بافت همبند اندوکاردیوم (*) از بین رفتن نظم ساختاری بافت قلب و عدم بلوغ سلول‌ها (⟶) (رنگ‌آمیزی H&E و بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).



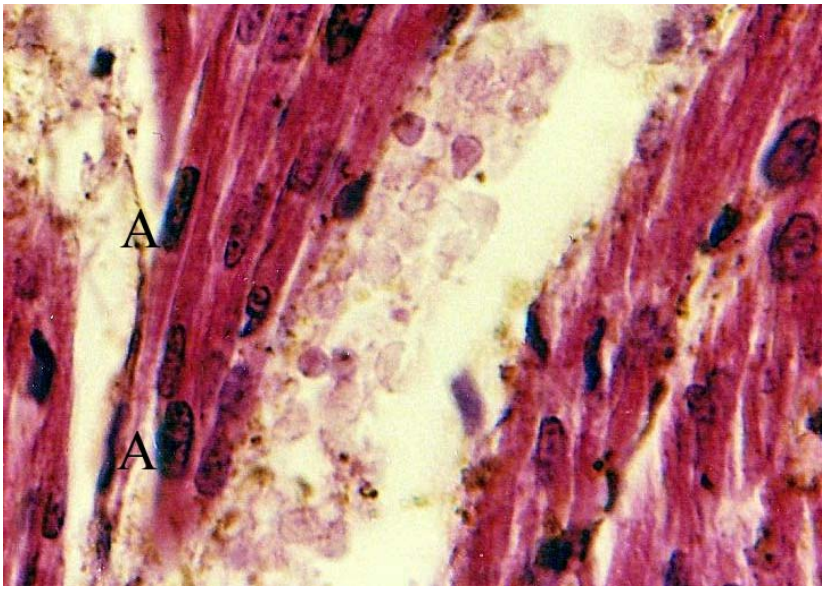
تصویر ۲- بافت قلب گروه کنترل. عدم وجود زواید و انشعابات و مشاهده انسجام سلولی بافت قلب در گروه کنترل (رنگ-آمیزی H&E و بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).



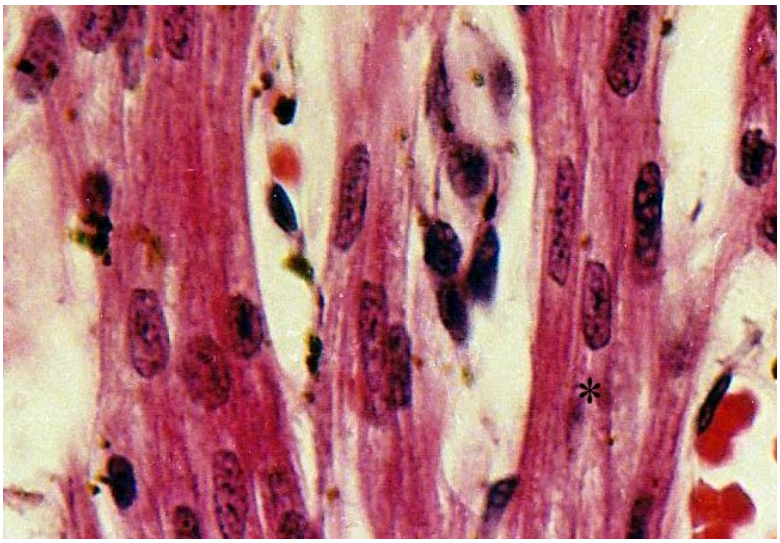
تصویر ۳- بافت قلب گروه تجربی، هسته‌ها در گروه تجربی، درشت‌تر، روشن و واضح‌تر از گروه کنترل است (a) (رنگ-آمیزی H&E و بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).

در گروه تجربی، خطوط تیره و روشن دیده نمی‌شود. همچنین در محل اتصال بعضی از سلول‌های قلبی در گروه کنترل صفحات بینابینی، مشاهده می‌گردد که در تصاویر گروه تجربی دیده نمی‌شود.

در لام‌های گروه تجربی، هیپرتروفی دیده می‌شود، ولی در هیچ یک از لام‌های گروه کنترل، هیپرتروفی مشاهده نمی‌شود (تصویر ۵).

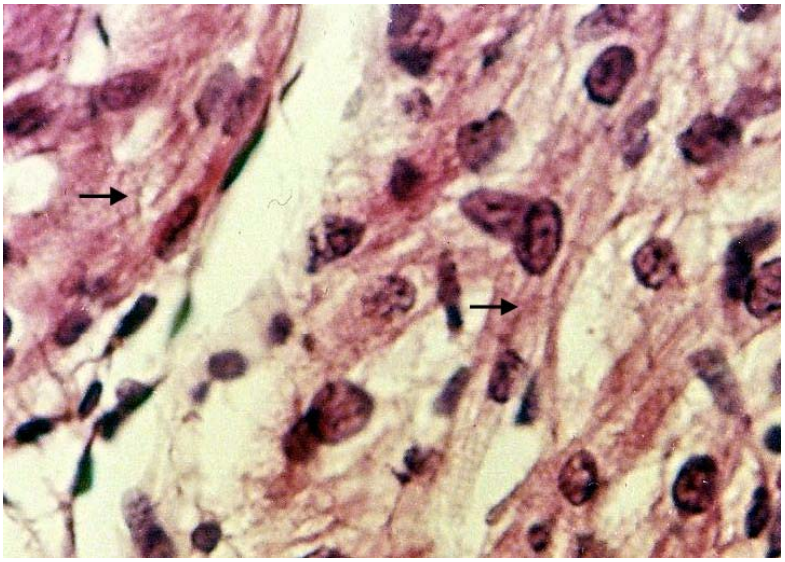


تصویر ۴ - بافت قلب گروه کنترل، هسته‌ها کشیده و دوکی هستند (A) (رنگ‌آمیزی H&E و بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).



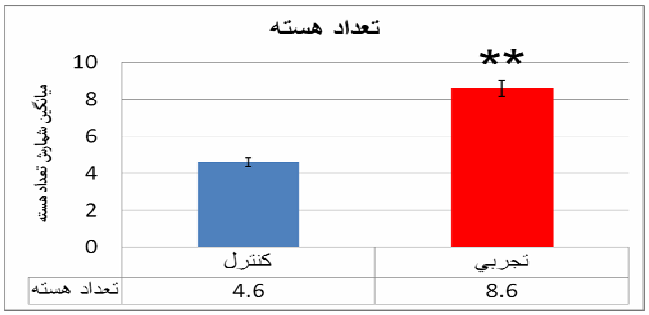
تصویر ۵- بافت قلب گروه تجربی، هیپرتروفی (*)، (رنگ‌آمیزی H&E و بزرگ‌نمایی ۴۰۰×).

سیتوپلاسم اسیدوفیل در گروه تجربی، شفاف و در بعضی قسمت‌ها به صورت کم‌رنگ و پررنگ دیده می‌شود (تصویر۶)، ولی در گروه کنترل، سیتوپلاسم اسیدوفیل به صورت پررنگ دیده می‌شود (تصاویر۲و۴).

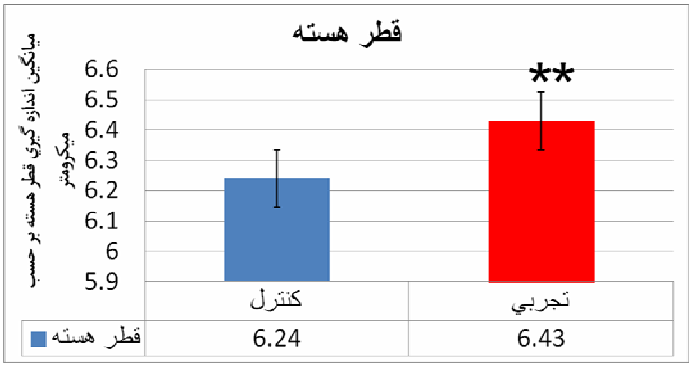


تصویر ۶- بافت قلب گروه تجربی، سیتوپلاسم اسیدوفیل شفاف و در بعضی قسمت‌ها به صورت کم‌رنگ و پررنگ (⟶)
(رنگ‌آمیزی H&E و بزرگ‌نمایی۴۰۰×).

همچنین در بعضی از لام‌های گروه تجربی، در بین سلول‌ها هموراژی نیز مشاهده شد که در گروه کنترل این وضعیت دیده نشده است. در بعضی از تصاویر گروه تجربی در مرکز سلول نزدیک به هسته، دانه‌های متراکم و تیره‌ای مشاهده شد، این دانه‌ها در واقع نشان دهنده قطرات چربی هستند که بر اثر تغییراتی که اصطلاحاً آن را Fatty Change می‌گویند به وجود آمده‌اند.



نمودار ۱- مقایسه تعداد هسته در نمونه‌های تجربی با کنترل (**P<0.01).



نمودار ۲- مقایسه قطر هسته در نمونه‌های تجربی با کنترل (**P<0.01).

بحث و نتیجه‌گیری

سرب در جهان اطراف ما هنوز فاکتوری مهم علیه سلامت انسان‌ها و حیوانات به شمار می‌رود؛ به‌طوری که تقریباً هیچ انسانی در هیچ سنی، از عوارض ناشی از استات سرب در امان نیست. کودکان و نوزادان به علت تحمل کمتر نسبت به عوامل تراتوژن، بیشتر در معرض خطر این عامل قرار دارند (۶). منبع اصلی آلودگی در شهرهای بزرگ صنعتی، سوخت بنزین است، به طوری که بسیاری از املاح فلزی به همراه سرب، همه روزه از طریق استنشاق هوای آلوده، وارد دستگاه تنفس انسان‌ها شده و از این راه، جذب خون می‌شوند. در مطالعه حاضر، این فرضیه بررسی شده است که آب آشامیدنی آلوده به سرب می‌تواند بر هیستوژنز قلب جنین رت مؤثر باشد. نتایج مشخص می‌کند که مصرف آب آلوده به سرب، موجب رنگ‌پریدگی پراکنده سیتوپلاسم کاردیوسیت‌ها، از بین بردن صفحات بینابینی، هیپرتروفی کاردیوسیت‌ها، واضح‌تر شدن و درشت‌تر شدن هسته‌ها می‌گردد.

در مطالعه‌ای، اثرات سیتوتوکسیک استات سرب روی بافت قلب خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نظم بافتی به شدت به‌هم خورده است؛ به طوری که هسته سلول‌های عضلانی، پلئومورف شده، سیتوپلاسم، نامشخص و از بین رفته است که این نتایج، با یافته‌های ما مطابقت دارد (۳).

در پژوهشی دیگر که با دوزهای پایین‌تر از استات سرب نسبت به مطالعه حاضر صورت گرفت (۷)، پس از ۲۵ هفته از مصرف آب آلوده به سرب، نتایجی مشابه با نتایج حاصل از این تحقیق به دست آمد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد اثرات سمی سرب ممکن است از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی باعث اختلال در عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن از جمله دستگاه قلبی عروقی شود (۸، ۹). هیپرتروفی قلب، یک یافته گزارش شده در افزایش فشار خون است (۲). این بررسی نیز یافته‌های موجود در مورد اثرات فشار خون بر هیستولوژی قلب را تأیید می‌نماید.

در بررسی دیگری که به مدت ۳ ماه از غلظت‌های بالاتر استات سرب روی رت‌های بالغ

انجام گرفت، تنها ۱ درصد از مصرف کنندگان استات سرب دچار هموراژی شدند. شاید این تناقض، به دلیل اختلاف سنی این رت‌ها و رت‌های مورد مطالعه ما بوده است (۱۰).

به دلیل محدود بودن زمان استفاده از مکان آزمایشگاه در این پژوهش، بررسی تأثیر تجویز استات سرب از طریق جذب پوستی و تنفس روی قلب جنین رت امکان‌پذیر نبود و همچنین امید است مقایسه این اثرات با مطالعه حاضر را نفرات بعدی انجام دهند.

به طور خلاصه، نتایج حاضر ثابت می‌کند که سرب، بر روی هیستوژنز قلب جنین رت مؤثر است و می‌تواند باعث اختلال عملکرد و ساختار قلب و در نهایت، مرگ به خصوص در افراد نابالغ گردد. بنابراین، توصیه می‌شود خانم‌های باردار، بیشتر مراقب این ماده سمی، بی‌بو و بی‌رنگ باشند.

تقدیر تشکر

از جناب آقای دکتر صدر که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

1. Simkhovich, B. Z., Kleinman, M. T., Kloner, R. A., 2008. Air Pollution and Cardiovascular Injury. Epidemiology, Toxicology, and Mechanisms. J Am Coll Cardiol 52: 719-726.
2. Badalzadeh, R., Norouzzadeh, A., Asgari, A., Khoshbaten, A., 2008. Effects of low level of lead exposure on blood pressure and responsiveness of the rat isolated heart to adrenergics. Tehran University Medical Journal 65: 17-22.
3. Gholamhosseini, B., Khaki, A., Khaki, A. A, Kachabi, H., Radsaeed, F., 2009**.** Ultra structure study of lead acetate cytotoxic effects on heart tissue in rabbit. Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal 15: 5-13
4. Vassallo, D. V., Lebarch, E. C., Moreira, C. M., Wiggers, G. A., Stefanon, I., 2008. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. Braz J Med Biol Res 41: 789-795.
5. Sharifi, A.M., Darabi, R., Akbarloo, N., Larijani, B., Khoshbaten, A., 2004. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. Toxicol Lett 153: 233-238.
6. Heydari, A., Khoshbaten, A., Asgari, A. R., Noroozzadeh, A., Ghasemi, A., Najafi, S., Badalzadeh, R., 2006. Effects of short term subchronic lead poisoning on nitrice oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. Toxicological Letters 166: 88-94.
7. Bukhari, I. H., Hassan, M. N., Haleem, A., Maqbool, M., 2005. Role of metals (Cadmium and lead) in patients of hypertension and their relationship with Ischemic Heart Disease. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 1: 190-194.
8. Ademuyiwa, O., Agarwal, R., Chandra, R., Behari, J. R., 2009. Lead-induced phospholipidosis and cholesterolgenesis in rat tissues. Chem Biol Interact 179: 314–320.
9. Gurer, H., Ercal, N., 2000. Can antioxidants be beneficial in treatment of lead poisoning? Free Radic Biol Med 29: 927–945.
10. Badalzadeh, R., Norouzzadeh, A., Mohammadi, M., Asgari, A., Khoshbaten, A., 2009. Cardiac responsiveness to beta-adrenergics in rats with leadinduced Hypertension. Biology and Medicine 1: 75-81.