مطالعه هیستوپاتولوژیک اثر دزهای مختلف ماده شیمیایی آکریل آمید بر تالاموس موش صحرائی

دکتر کیوان جمشیدی*[۱]، دکتر تقی الطریحی[۲]، دکتر ایرج سهرابی حقدوست[۳]

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین اثرات نوروتوکسیک دزهای مختلف آکریل آمید (۰/۵، ۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز × ۱۱ روز تزریق داخل صفاتی) بر هسته‌ها و نواحی مختلف تالاموس در رت به مرحله اجرا در آمده است. بدین منظور در CNS، رنگ آمیزی نقره به روش دی المس (de Olmos amino-cupric silver stain) بکار گرفته شد تا خصوصیات فضایی دژنرسانس آکسونی و پایانه ای در تالاموس قابل تشخیص و مشاهده باشد. به این منظور تعداد ۵۵ رت نر و بالغ (سویه ویستار و وزن تقریبی ۲۵۰ گرم) انتخاب و به صورت تصادفی در ۵ گروه تیمار، هر یک شامل ۱۰ رت (A وB وC وD وE) و یک گروه کنترل (F) شامل ۵ رت تقسیم بندی شدند. گروه های تیمار به ترتیب در معرض دزهای ۰/۵ ، ۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز × ۱۱ روز (i.p.) قرار گرفتند. به رتهای گروه کنترل روزانه ۳ میلی گرم/ کیلو گرم وزن بدن در روز به مدت ۱۱ روز محلول ۰/۹٪ سالین به صورت i.p. تزریق می‌شد. اندازه گیری وزن بدن، نحوه راه رفتن (Gait Scor) و فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن به عنوان معیارهایی برای ارزیابی پیشرفت نوروتوکسیسیتی بکار گرفته شدند.

هر حیوان هر روز پیش از انجام تزریقات وزن کشی می‌شد. در ارزیابی gs ، مشاهده نحوه حرکت آزادانه در محوطه باز (شامل آتاکسی، لنگش و دور نگه داشتن پاهای عقب) و فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن، ٤ بار در طول مطالعه (روزهای ۳، ۵، ۸ ، ۱۱) به عنوان معیار های تشخیصی بکار گرفته و از ۱تا٤ طبقه بندی شد. پس از ۱۱ روز تزریقات، ۲ رت از هر گروه برای مطالعه میکروسکپ نوری(رنگ آمیزی نقره به روش دی المس)، به صورت تصادفی انتخاب، تشریح و نمونه های مناسب از مخ برداشته شد. در نتایج بدست آمده تغییرات نورولوژیک رفتاری قابل ملاحظه‌ای در رتهای گروهA وB وF مشاهده نشد، در حالیکه نوروتوکسیسیتی شدید در رتهای گروه C مشاهده شد. رتهای گروه D و E ظرف ۲-۱ ساعت پس از تزریق به دلیل توکسمی شدید تلف شده و از مطالعه خارج شدند. در مطالعات هیستوپاتولوژیک بر اساس روش دی المس، آکسون‌ها و زوائد آرژیروفیلیک در مقاطع بافتی بدست آمده از CNS رتهای گروه AوB و F مشاهده نشد، در حالیکه تغییرات آرژیروفیلیک متوسط تا شدیدی در هسته‌ها و نواحی مختلف مقاطع بافتی بدست آمده از CNS رتهای گروه C مشاهده شد.

واژگان کلیدی *: آکریل آمید، نوروپاتی، نوروتوکسیسیتی، رنگ آمیزی نقره*

۱- دانش آموخته گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، ایران

۲- گروه پاتولوژی و علوم تشریحی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران ، ایران

۳- گروه پاتولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات ، تهران ، ایران

Light microscopy study of the effect of different doses of Acrylamide on thalamus of rat

Jamshidi. K[1], Tiraihi. T[2] , Sohrabi Haghdoost. I[3]

1-Graduated of pathology, Faculty of Specialised Veterinary Sciences , Islamic Azad University, Science & Research Branch. Tehran, Iran.

2-Department of Pathology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

3-Department of Pathology, Faculty of Specialised Veterinary Sciences , Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran.

This study was conducted to determine the neurotoxic effects of different doses of ACR on CNS of rat. To evaluate this hypothesis in CNS, the amino cupric – silver stain method of de Olmos was used to define the spatial characteristic of nerve somal, dendritic, axonal and terminal degeneration in thalamus nuclei and regions. For this purpose 55 adult male rats (Wistar, approximately 250 g) were selected. Rats were housed in polycarbonate boxes as two per each. Randomly assigned groups of rats (10 rats per exposure group, total 5 exposure groups as A,B,C,D,E,) were exposed to 0.5 , 5, 50 ,100 and 500 mg/kg per day × 11days i.p. respectively. The remaining 5 rats were housed in group F, as control group. Control rats received daily i.p. injections of 0.9% saline (3ml/kg).As indices of developing neurotoxicity, weight gain, gait scores and landing hindlimb foot splay were determined. Weight gain were measured daily prior to injection. Gait scoring involved observation of spontaneous open field locomotion, which included evaluations of ataxia, hopping, rearing and hindfoot placement, and hindlimb foot splay were determined 3-4 times per week. Gait score was assigned from 1-4.After 11 days, two rats for silver stain, were randomly selected, dissected and proper samples were collected from thalamus.Results did show no neuropathological behavior in groups A, B and F, whereas sever neurotoxicity was observed in group C [decreased weight gain of 19.90% and (± SEM) gait score = 3.77±0.14] . Rats in groups D and E died within 1-2 hours due to sever toxemia.In histopathological studies based on de Olmos amino-cupric silver staining technique no argyrophilic neurons or processes were observed in stained sections obtained from thalamus of rats belong to groups A, B and F, while moderate to severe argyrophilic changes were observed in different nuclei and regions of stained sections obtained from CNS of rats belong to group C.

Key words: *Acrylamide (ACR), Neuropathy, Neurotoxicit , Silver stain*

مقدمه

آکریل آمید یک ماده کریستالی بی بو و سفیدرنگ است که در دمای اطاق بحالت جامد می باشد . فرمول مولکولی آن $C_3 H_5 NO$ و وزن مولکولی آن ۷۱/۰۸ است. آکریل آمید دارای نقطه جوش ^{oC} ۱۲۵ (۲۵میلی مترجیوه) و نقطه ذوب ^{oC} ۸٤/۵ و تراکم ۱/۲۷ گرم/ لیتر(^{oC} ۲۵) می‌باشد. این ماده براحتی در آب (۲۱۵۵ گرم/ لیتر در ^{oC} ۲۵) حل شده و در دیگر حلالهای قطبی از قبیل استون، متانول و اتانول نیز حل می‌شود. در حلالهای غیر قطبی از قبیل تتراکلرید کربن تقریبا حل نشدنی است (٤،۸،۲۱).

آکریل آمید یک مولکول آلی کوچک با قابلیت حل پذیری بالا در آب است . این مولکول دارای یک گروه وینیل الکتروفیلیک است که ممکن است توسط نوکلئوفیلها مورد حمله قرار گیرد. این خصوصیت، که برای ساخت پلیمرهای مختلف بکار می‌رود، علت کاربرد وسیع این ماده می‌باشد. از طرف دیگر، همین خصوصیت باعث می‌شود که آکریل آمید با مولکول های بیولوژیک نیز واکنش نشان دهد. کاربرد اولیه آکریل آمید در تولید پلیمرها و کوپلیمرها است .آکریل آمید در ساخت پلاستیک، از قبیل برخی مواد پلاستیکی برای بسته بندی مواد غذایی ودر تولید لاستیک سنتتیک و همچنین برخی کوپلیمرها بکار می‌رود. بزرگترین بازار مصرف پلی آکریل آمید استفاده از آن به عنوان ماده منعقد کننده در طرح‌های تصفیهٔ فاضلاب و آبهای زائد است . این ماده همچنین به عنوان یک مادهٔ منعقد کننده برای تصفیه آب شرب بکار می‌رود . این ماده وقتی به آب اضافه شود، منعقد شده مواد جامد معلق را به دام می‌اندازد و سپس بآسانی طی پروسه‌های تصفیه آب آشامیدنی از آن جدا می‌گردد. آکریل آمیدی که منعقد نشود بصورت یک آلوده کننده در آب باقی می‌ماند که بر اساس مقررات آژانس حفظ محیط زیست آمریکا مقدار آن در آب نباید بیشتراز ppm ۰/۵باشد. در تحقیقات آزمایشگاهی ژل‌های پلی آکریل آمید به شکل وسیعی در ژل کروماتوگرافی و الکتروفورز بکارمی رود.آکریل آمید یک مادهٔ شیمیایی صنعتی و مهم با تولید بیش از ۲۰۰ میلیون کیلو گرم در سال می‌باشد. کشف اخیر مبنی براینکه آکریل آمید طی پخت غذاهای نشاسته ای شکل می‌گیرد، گرایش جهانی در زمینهٔ مطالعه روی توانایی این ماده در ایجاد توکسیسیتی برای انسان را بر انگیخته است. اولین مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته روی انسان و تحقیقات بعمل آمده روی حیوانات آزمایشگاهی نشان دادند که قرار گرفتن انسان در معرض آکریل آمید ایجاد ضعف عضلات اسکلتی و آتاکسی کرده است(۱۵،۲٦). ادامه تحقیبات چنین نشان دادند که این نوروتوکسیسیتی رفتاری پی آمد آسیب عصبی بوده و تحت عنوان آکسونوپاتی مرکزی- محیطی طبقه بندی شده است(۲۷). دژنرسانس آکسونی که بصورت تورم‌های پارانودال چند کانونی در قسمتهای پیش انتهایی رشته‌های دیستال آغاز می‌گردد، به عنوان مشخصه مرفولوژیک این آکسونوپاتی قلمداد شده است(۱،۲٤،۲۸،۲٦).

نوروتوکسیسیتی ناشی ازآکریل آمید به شکل وسیعی، با توجه به گونه‌های پستانداران مثل : رت، موش، میمون، خوکچه هندی، سگ ،گربه و مقادیر دز روزانه(۰/۵ تا ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۵،۱۷،۱۸،۱۹). علائم شایع نوروتوکسیسیتی در تمام گونه‌ها یکسان است. در مدلهای آزمایشگاهی که بخوبی توصیف شده و روی جوندگان بعمل آمده نشان داده است که مسمومیت با آکریل آمید به مقدار(۵۰ -۰/۵ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) نواقص نورولوژیک سه گانه ای را بوجود آورده که عبارتند از: دور نگه داشتن پاهای عقب آتاکسی (آنومالیهای توام با گامهای باز) و ضعف عضله اسکلتی (کاهش قدرت چنگ زنی ونگهداری در پاهای عقب و جلو (۳،۵،۷،۱۸،۲۵،۲۹) همچنین مسمومیت تجربی با آکریل آمید با دیسفونکسیون اوتونومیک نوروژنیک، مثل : احتباس ادرار، دیسفونکسیون بارورسپتور ، اختلال در کنترل

وازوموتور همراه بوده است(۲۳،۲٤) بررسی فونکسیونال نورولوژیک طی یک دوره ۹۰ روزه قرار گرفتن در معرض دزهای پایین تر آکریل آمید(۰/۰ ۵ تا ٦/۷ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز) علامتی از نوروتوکسیسیتی را نشان نداد(۳،۵). از این شواهد چنین نتیجه گرفته شد که این دزها غیرنوروتوکسیک هستند. بنابر این، عدم توانایی مطالعات قبلی در پیدا کردن نوروتوکسیسیتی در مقدار دز پایین تر از ۱۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن، ممکن است بدلیل بکارگیری یک برنامه کوتاه مدت نامتناسب (یعنی دوره مشاهدهٔ ۹۰ روزه) بوده باشد. اکثریت مطالعات صورت گرفته در مورد حیوانات تا به امروز شامل تجویز تحت مزمن آکریل آمید (کمتر از ۹۰ روز) در دزهای روزانه نسبتاً بالا (میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) از راه تزریق داخل صفاقی یا خوراکی (گاواژ و آب آشامیدنی) بوده است (۲۰). لذا این تحقیق به منظور مطالعه اثرات نورولوژیک و بررسی الگوی گسترش فضایی آرژیروفیلیک بدنبال تزریقات داخل صفاقی دز های مختلف ماده شیمیایی آکریل آمید بر سوما، آکسون‌ها و دندریتهای سلول های عصبی در برخی هسته‌ها و نواحی تالاموس در مغز رت به مرحله اجرا در آمده است.

مواد وروش کار

در این مطالعه ماده شیمیایی مورد آزمایش، یعنی مونومر آکریل آمید (Merk) دارای غلظت ۹۹/۷٪ در تمام طول دوره مطالعه در دمای اتاق نگهداری و ماده حلال، سالین۰/۹٪ استریل، نیز در دمای اتاق نگهداری شد. دزهای تیمار بکار گرفته شده به ترتیب عبارت بودند از ۰/۵، ۵ ، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میلی گرم بازای کیلوگرم وزن بدن در روز، که از نظر اکی والان تقریبا به ترتیب برابر بودند با ۰/٦۱ ،۱/٦٦ ،٦۱/٦٦ ،۳۳/۳۳ و ٦٦۱/٦٦ میلی گرم بازای میلی لیتر حلال با حجم دزی ۳ میلی لیتر بازای کیلوگرم وزن بدن. دز تزریقی روزانه بطور تازه تهیه و بکار گرفته می‌شد.

در این مطالعه تعداد ۵۵ رت(انستیتو پاستور) نر بالغ و هم سن (۱۰ هفته، نژاد ویستار: Wistarو وزن تقریبی ۲۵۰ گرم) که بطورتتصادفی در ٦ گروه شامل ۵ گروه تیمار هر یک حاوی ده رت و یک گروه کنترل حاوی ۵ رت تقسیم شدند، مورد استفاده قرار گرفت. رتها به صورت دو تائی در قفسهای پلی کربنه با در پوش سیمی ضد زنگ نگهداری و آب وخوراک به صورت آزاد (ad libitum) در اختیار آنها قرار داده شد. ابعاد قفس" ۸ × "۱۹ × "۱۰/۵ بود که در تمام طول دوره مطالعه از آنها استفاده شد. آب آشامیدنی حیوانات از طریق بطری‌های شیشه ای با سر پستانک لوله ای از جنس استیل ضد زنگ در اختیار آنها قرار می‌گرفت. خوراک نیز بصورت پلتهای آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار داده می‌شد. شرایط اتاق حیوانات، در تمام طول دوره مطالعه، در دمای تقریباً ^{oC} ۲۵- ۲۲ و رطوبت نسبی ۵۰٪ و سیکل روشنائی/ تاریکی ۱۲ ساعته در شبانه روز حفظ شد. طول دوره مطالعه ۱۱ روز بود و هر حیوان بطور مجزا از همان روز اول تا آخرین روز مطالعه هر روز وزن کشی می‌شدند و رتهای گروه‌های تیمار(۵ گروه ده تائی) بر اساس وزن بدن روزانه و گروه تیمار مربوطه، تحت تزریق درون صفاقی با آکریل آمید به ترتیب با دز ۰/۵ ، ۵ ، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن و رتهای گروه کنترل (۱ گروه) نیز به همین روش پس از وزن کشی روزانه فقط ۳ میلی لیتر/کیلوگرم وزن بدن سالین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می‌کردند .

مبناء حجم مایع تزریقی را ۳ میلی لیتر بازای کیلوگرم وزن بدن قرارداده که بر همین اساس برای گروه‌های تیمار به ترتیب ۰/۵، ۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم آکریل آمید را در ۳ میلی لیتر سالین حل کرده و محلول آماده روزانه بصورت ۳ میلی لیتر/ کیلوگرم وزن بدن داخل صفاقی تزریق می‌شد. در رتهای گروه کنترل نیز مبنای حجم سالین تزریقی همان ۳ میلی لیتر/ کیلوگرم وزن بدن بود که بر اساس وزن بدن بطور روزانه انجام می‌گرفت.

ارزیابی پارامترهای نورولوژیک

پارامترهای نورولوژیک حیوانات در طول دوره مطالعه با استفاده از معیارهای مختلف شامل: وزن بدن، نحوه راه رفتن در محوطه باز، دور نگه داشتن پاهای عقب از هم و دور نگه داشتن پاهای عقب در موقع فرود آمدن روی سطح صاف مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. از یک شاهد آموزش دیده، ولی نا آگاه از نوع تیمار و دزهای تزریقی در هر گروه، خواسته شد تا مشاهدات خود از رفتارهای هرحیوان را بطور جداگانه جهت ارزیابی‌های نورولوژیک انجام داده و امتیاز بندی کند.

ارزیابی رفتارهای حرکتی

برای ارزیابی رفتارهای حرکتی حیوانات در محوطه باز، هر سه روز یک بار هر یک از رتها در یک جعبه پلکسی گلاس تمیز به ابعاد ۹۰×۹۰×۹۰ سانتی متر قرار داده می‌شد، رفتارهای حرکتی و نحوه راه رفتن هر یک به مدت ۳ دقیقه مورد مشاهده دقیق قرار می‌گرفت. مشاهدات به ارزشهای عددی از ۱تا ٤ تبدیل می‌شدند. امتیازهای در نظر گرفته شده برای این ماده نوروتوکسیکان به ترتیب عبارت بودند از:

۱- راه رفتن نرمال

۲- راه رفتن آنرمال ملایم (آتاکسی ملایم، گام برداشتن به صورت لنگان و تا حدی دور نگه داشتن پاها از هم)

۳- راه رفتن آنرمال متوسط (آتاکسی قابل مشاهده، دور نگه داشتن قابل مشاهده پاها از هم)

٤- راه رفتن آنرمال شدید (عدم توانائی در تحمل وزن بدن و باز نگه داشتن پاها از هم)

ارزیابی فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن

برای ارزیابی این رفتار ابتدا حیوان را با دست چپ مقید و کف پاهای عقب حیوان را با جوهر رنگ کرده، حیوان را طوری با دست چپ نگه می‌داریم که در یک وضعیت افقی، موازی با سطح زمین و با فاصله حدود ۳۵ سانتی متر از سطح یک میز که از قبل روی آن را بایک کاغذ سفید پوشانده ایم، قرار گیرد. سپس حیوان را در همین حالت یک مرتبه رها کرده، به محض فرود در اثر برخورد کف پاهای عقب حیوان با سطح کاغذ سفید، اثر رنگ روی کاغذ باقی می‌ماند. فاصله مراکز هر دو کف پا را روی کاغذ با استفاده از یک کولیس به طور دقیق اندازه گرفته و این آزمایش در مورد هر حیوان بطور مجزا و در هر روز آزمایش سه مرتبه انجام می‌گرفت و متوسط مقادیر بدست آمده به طور جداگانه برای هر حیوان محاسبه و ثبت می‌گردید. این آزمایش در مورد تمام حیوانات تحت آزمایش اعم از گروه‌های تیمار و گروه شاهد در روزهای ۳ ، ۵ ، ۸، ۱۱ به مرحله اجرا در آمد.

نمونه برداری

پس از ۱۱ روز تزریقات، در روز ۱۲ از هر گروه ۲ حیوان برای مطالعات میکروسکپ نوری (شامل رنگ آمیزی نقره به روش دی المس) بصورت تصادفی انتخاب شد. هر یک از حیوانات پس از قرار گرفتن در درون محفظه شیشه ای درب دار حاوی پنبه آغشته به اتر تحت شرایط بیهوشی عمیق و اطمینان از بیهوشی کامل با اجرای آزمایشات رفلکس پس کشیدن کف پا(pedal reflex) نیشگون گرفتن دم(tail squeezing) از طریق پرفیوژن داخل قلبی کشته شدند. به این ترتیب فیکساتیو از طریق جریان خون در تمام بدن جریان یافته همه بافتهای بدن از جمله مغز و نخاع را ثابت می‌کند. برای پرفیوژن هر رت بالغ به طور متوسط ۲۰۰ میلی لیتر مایع فیکساتیو در عرض ۲۰ دقیقه وارد بدن حیوان می‌شد، که در نتیجه بافتهای بدن سخت و سفید می‌گردید.

رنگ آمیزی دی المس (٦)

مغز به طور کامل برای رنگ‌آمیزی نقره انتخاب و مطابق روش دیُ المس وهمکاران (۱۹۹٤) عملیات مقطع‌گیری و

رنگ‌آمیزی انجام می‌گرفت. هرمغز ابتدا برای فیکساسیون ثانویه در فیکساتیو سرد حاوی ۳۰٪ ساکروز قرار داده می‌شد تا زمانی که مغز به ته ظرف فیکساتیو غرق شود. سپس هر مغز با استفاده از دستگاه کرایواستات در جهت قدامی، خلفی و ساجیتال به مقاطع ٤٠ میکرونی برش داده می‌شد. مناطق مختلف مخ شامل هسته‌ها و نواحی تالاموس با استفاده از کتاب اطلس استرئوتاکسی رت (۲۲) شناسایی و انتخاب می‌شدند. مقاطع بدست آمده بصورت سریالی در ظرفهای پلاستیکی حاوی همان نوع فیکساتیو استفاده شده در پرفیوژن جمع‌آوری و تا مرحله رنگ آمیزی نگهداری می‌شدند.

روش رنگ آمیزی دی الموس

الف- مرحله پیش آغشته سازی:

این محلول شامل نیترات نقره، آب مقطر، دی ال- آلفا- آمینو-ان- بوتیریک اسید، دی ال- آلانین، نیترات مس ۰/۵٪، نیترات کادمیوم ۰/۵٪، نیترات لانتانیوم ۰/۵٪، نوترال رد۰/۵٪، پیریدین، تری اتانول آمین ایزوپزوپانول می‌بود. مقاطع قبل از پیش آغشته سازی به مدت ۲۰- ۱۵ ثانیه در آب دو بار تقطیر شستشو می‌شدند. از آنجایی که هر نوع آلودگی می‌تواند منجربه رسوب آرتی فکت گردد، لذا از ظروف شیشه ای شسته شده در اسید نیتریک استفاده می‌شد.

پیش از استفاده از محلول ، آن را در یک مایکروویو ۷۰۰ واتی که از ٦٠٪ توان ماکزیموم آن استفاده میشد تحت اشعه قرار دادیم تا دمای آن به $50^{o}C$ ($115^{o}F$) برسد. سپس محلول به مدت یک ساعت در بیرون مایکروویو نگهداری می‌شد تا دمای آن به دمای اتاق ($25-22^{o}C$) برسد. پس از این مدت محلول به رنگ نارنجی خاکستری در آمده که بعد از فیلتر کردن رنگ نارنجی ترانسپارنت و روشنی به خود می‌گرفت.

ب- تهیه مقاطع در محلول پیش آغشته سازی

مقاطع در یک آون آزمایشگاهی معمولی در دمای $50^{o}C$ به مدت ۵۰-٤۵ دقیقه درون محلول پیش غوطه ورسازی نگهداری شدند. پس از آنکوباسیون در این دما، مقاطع را در حالیکه هنوز درون محلول قرار داشتند، به مدت ۳-۲ ساعت در خارج از آون قرار دادیم تا دمای آن به دمای اتاق ($25-22^{o}C$) برسد .پس از اتمام این مرحله، مقاطع رنگ قهوه ای- خاکستری تا قهوه ای از خود نشان دادند .

ج- آغشته سازی در محلول نقره

مقاطع از دو مرحله استون هر کدام تقریباً به مدت ۳۰ ثانیه و در مجموع ٦٠ ثانیه، در حالیکه مرتب به هم زده می‌شد، عبور داده می‌شدند. سپس از آنجا مستقیما بدرون محلول نقره- دی آمین شامل نیترات نقره، آب مقطر، اتانول، استون، هیدروکسید لیتیوم ۰/٤٪ و هیدروکسید آمونیوم، که از قبل درون ظرف در پوش دار نگهداری شده تا از تبخیر آمونیاک که فاکتور تعیین کننده رنگ آمیزی است جلوگیری کند، انتقال داده شد. مقاطع به مدت حد اکثر ۵۰ دقیقه در محلول نقره-دی آمین در دمای اتاق و در شرایط هم زدن مداوم روی یک rotating platform، نگهداری می‌شدند. محلول فوق باید برای هر گروه از مقاطع، تقریباً ۱۰ میلی لیتر برای هر ۱۵ مقطع، به طور تازه تهیه شود .در مجموع در هیچ یک از مراحل رنگ آمیزی نباید از ظرفهای پلاستیکی یا میله‌های هم زن پلاستیکی استفاده شود.

د - احیاء

مقاطع را مستقیماً بدون شستن و با کمک یک میله شیشه ای وارد محلول احیاء شامل فرمالین ۱۰٪ ، اسید سیتریک مونوهیدرات۱٪،اتانول ۱۰۰٪ و آب مقطر، در دمای $32^{o}C$ کرده و در این محلول به مدت ۲۵ دقیقه نگه می‌داشتیم .طی ۲-۱ دقیقه اول محلول به آرامی هم زده می‌شد و سپس هر ۵ دقیقه یک بار این عمل تکرار می‌گردید.

تقریباً ۵۰ میلی لیتر برای هر ۱۵ مقطع استفاده شد. پس از آنکه مقاطع به مدت ۵ دقیقه در محلول احیاء وتحت هم زدن مداوم قرار داشتند، به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از محلول احیاء جمعا ۱/۲ میلی لیتر از همان محلول نقره - دی آمین که برای غوطه ور سازی نقره مقاطع بکار گرفته شده بود به

صورت تقسیم شده در چهار نمونه ۰/۳ میلی لیتری و هر نمونه پس از هر ۵ دقیقه به محلول احیاء اضافه می‌شد. سپس مقاطع در آب مقطر شستشو و به منظور توقف احیاء بیشتر فوراً به محلول ۰/۵ ٪ اسید استیک گلاسیال منتقل می‌گردید و به مدت حداکثر ۲ دقیقه در آن نگهداری می‌شد. پس از این مرحله مقاطع در دو مرحله آب مقطربه ترتیب ۱۵ و ٤٥ دقیقه، جمعاً به مدت یک ساعت، شستشو و سپس به مدت یک شب در آب مقطر نگهداری می‌شدند .

هـ- بلیچینگ

عمل بلیچینگ در دو مرحله انجام می‌شد. در مرحله اول مقاطع در یک محلول فری سیانید اسیدی در دمای اتاق بلیچ شده تا اینکه نسبتاً ترانسپارنت شوند. سپس مقاطع در آب مقطر شستشو و به محلول دوم بلیچینگ که از پرمنگنات اسیدی تهیه شده بود، انتقال داده می‌شدند. در این مرحله مقاطع پس از مدت کوتاهی ظاهر زرد، صورتی و تا حدی مات به خود می‌گرفتند. عمل بلیچینگ با انتقال مقاطع به آب مقطر خاتمه می‌یافت. مقاطع حد اقل در دو مرحله آب مقطر در دمای اتاق و به مدت حداکثر ۵ دقیقه تا رسیدن به مرحله بعدی، یعنی تثبیت، شستشو داده می‌شدند.

و- تثبیت

۱- مقاطع به محلول آبی سدیم تیوسولفات ۲٪ منتقل و ضمن هم زدن مداوم حداکثر ۳ دقیه در آن نگهداری شده و مجدداً حداکثر ۵ دقیقه در آب مقطر شستشو داده می‌شدند.

۲- سپس مقاطع به محلول تثبیت کننده سریع (با فرمولاسیون شرکت کداک) انتقال داده می‌شدند. مقاطع پس از گذشت تقریبا یک دقیقه ترانسپارنت می‌شدند. در خاتمه مقاطع به طور کامل در آب مقطر شسته می‌شدند.

ز- مونته کردن و رنگ آمیزی تمایزی

پیش از آبگیری هر مقطع به طور جداگانه و با کمک محلول متشکل از دو قسمت مساوی از محلول ۰/۵٪ ژلاتین و ۸۰٪ الکل به روی لام شیشه ای مونته می‌شد. سپس مقاطع مونته شده روی لام در محلول ۰/۵٪ نوترال رد در آب به مدت حداکثر ۲۰ دقیقه آبدهی و رنگ آمیزی تمایزی صورت می‌گرفت، پس از آن، دو بار به طور مختصر در آب مقطرشستشو و در الکلهای ۵۰٪ ، ۷۰٪ ، ۹۵٪ و ۱۰۰٪ هر کدام ۱۵ الی ۲۰ ثانیه آبگیری می‌شد. عمل تمایز و شفاف سازی ابتدا در دو محلول الکل- گزیلن (اولی به نسبت ۱:۱ و دومی به نسبت ۱:٦) و پس از آن دو مرحله گزیلن خالص صورت می‌گرفت. پس از آن مقاطع رنگ شده روی لام با لامل و به کمک DPX پوشانده می‌شدند.

نتایج

۱- نتایج ارزیابی رفتارهای نورولوژیک:

الف- گروه A : ۰/ ۵ میلی گرم/ کیلوگرم× ۱۱ روز / وزن

در رتهای این گروه ، متوسط (± SEM) وزن بدن در ابتدای شروع مطالعه ۲۰/۱۳± ۲۵۵/۹٦ گرم بود ، که تا پایان دوره مطالعه (روز ۱۱) بطور مرتب افزایش پیدا کرد و به ۲۰/۱٤ ± ۲۷۱/۰۹ گرم رسید. متوسط وزن بدن در طی این دوره ۵/۹۱ ٪ افزایش پیدا کرد.

ارزیابی رفتارهای حرکتی

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای۳، ۵، ۸ و ۱۱) مورد بررسی قرار گرفت و در تمام این مراحل تا آخرین روز مطالعه، هیچ گونه آنومالی حرکتی در آنها مشاهده نشد و اندازه gait score برای تمام رتهای این گروه در تمام طول دوره مطالعه برابر ۱ بود.

ارزیابی فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای ۳، ۵، ۸ و ۱۱) مورد بررسی قرار گرفت در این گروه متوسط فاصله پاهای عقب در اولین روز بررسی یعنی روز سوم ، ۳۸ /۰ ± ۷/۷۷ بود و در آخرین روز یعنی روز ۱۱، ۸/۳۹±۰/۵۷ .

ب- گروه B: ۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم/ روز×۱۱روز / وزن

در رتهای این گروه ، متوسط (± SEM) وزن بدن در ابتدای شروع مطالعه ۳/۹۵ ± ۲۳٦/٦۸ گرم بود، که تا پایان دوره مطالعه (روز ۱۱) یک افزایش تدریجی را نشان داده و به ٤/٦۳ ±٦۰ /۲٤۱ افزایش پیدا کرد. متوسط وزن بدن در طول این دوره ۲/۰۷٪ افزایش پیدا کرد.

ارزیابی رفتارهای حرکتی

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای ۳، ۵، ۸ و ۱۱) مورد بررسی قرار گرفت و در تمام این مراحل تا آخرین روز مطالعه، هیچ گونه آنومالی حرکتی در آنها مشاهده نشد و اندازه gait score برای تمام رتهای این گروه در تمام طول دوره مطالعه برابر ۱ بود.

ارزیابی فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای ۳، ۵، ۸ و ۱۱) مورد بررسی قرار گرفت.در این گروه متوسط فاصله پاهای عقب در اولین روز بررسی یعنی روز سوم ، ۰/۳۰±۰/۵۵ /۷ بود و در آخرین روز یعنی روز ۱۱، ۰/٤۹ ± ۱٦ / ۷.

ج- گروهC: ۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم/روز×۱۱ روز / وزن

در رتهای این گروه ، متوسط (± SEM) وزن بدن در ابتدای شروع مطالعه ٦/۱۰ ± ۲۵۸/۱۲ گرم بود ، که تا پایان دوره مطالعه (روز ۱۱) بتدریج کاهش پیدا کرده و در پایان مطالعه (روز ۱۱) به ۱۱/۸۰ ±۷۷ /۲۰٦ نزول کرد. در این گروه متوسط وزن بدن در پایان دوره نسبت به متوسط وزن بدن در شروع دوره ۱۹/۹۰٪ کاهش داشت.

ارزیابی رفتارهای حرکتی

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای ۳، ۵، ۸ و ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت و افزایش پیشرونده و فزاینده ای درgait score مشاهده شد. بدین معنی که متوسط (± SEM) gait score در روز ۱۱، ۰/۱٤ ± ۳/۷۷ بود که نشان دهنده آنومالی حرکتی شدید می‌باشد.

ارزیابی فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای ۳، ۵، ۸ و ۱۱) مورد بررسی قرار گرفت. در این گروه متوسط فاصله پاهای عقب در اولین روز بررسی یعنی روز سوم، ۰/۳۲±۰/۲۵ /۷ بود و در آخرین روز (یعنی روز ۱۱)، به ۰/۷۰ ± ۲۰ / ۱۱ افزایش یافت.

د- گروهF شاهد:

وزن

در رتهای این گروه ، متوسط (± SEM) وزن بدن در ابتدای شروع مطالعه ۱۰/٦ ± ۲۱۷/۷٦ گرم بود ، که تا پایان دوره مطالعه (روز ۱۱) بتدریج افزایش پیدا کرده و در پایان مطالعه (روز ۱۱) به۲٤۹/۰٤ رسید. در این گروه متوسط وزن بدن در پایان دوره نسبت به متوسط وزن بدن در شروع دوره۱٤/۲۸٪ افزایش داشت.

ارزیابی رفتارهای حرکتی

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای۳، ۵، ۸ و ۱۱) مورد بررسی قرار گرفت و در تمام این مراحل تا آخرین روز مطالعه، هیچ گونه آنومالی حرکتی در آنها مشاهده نشد و اندازهgait score برای تمام رتهای این گروه در تمام طول دوره مطالعه برابر ۱ بود.

ارزیابی فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن

در این گروه رفتارهای حرکتی طی ٤ مرحله (روزهای۳، ۵، ۸ و۱۱) مورد بررسی قرار گرفت. در این گروه متوسط فاصله پاهای عقب در اولین روز بررسی یعنی روز سوم، ٦/۳۸±۰/۳۳ بود و در آخرین روز(یعنی روز۱۱) ، ۰/٤۹± ٦/۸٤ بود.

۲- نتایج مطالعه میکروسکپ نوری(رنگ‌آمیزی دی‌المس)

رنگ‌آمیزی نقره به روش دی‌المس امکان آغشته‌سازی اختصاصی پریکاریونها، دندریتها، آکسونها و انشعابات انتهایی نورونی دژنره شده را بوجود می‌آورد. بعلاوه این که

این روش می‌تواند تغییرات دژنراتیو اولیه و پیشرفته را در جسم سلولی و زوائد نورونی شناسایی کند. در مطالعه میکروسکپی مقاطع رنگ آمیزی شده به روش دی المس، نورونهای دژنره و/ یا زوائد آنها که با نقره آغشته سازی شده‌اند به رنگ سیاه در مقابل یک زمینه صورتی رنگ مشاهده می‌شوند.

گروه A_ : ۰/۵ میلی گرم/ کیلوگرم/ روز × ۱۱ روز

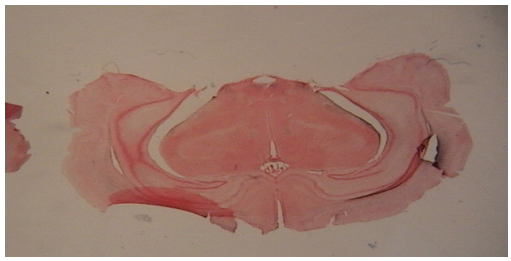
در بررسی مقاطع بافتی بدست آمده از مخ (تالاموس) رتهای مسموم شده در این گروه (دز ۰/۵میلی گرم/ کیلوگرم/ روز× ۱۱ روز) هیچ‌گونه تغییرات آرژیروفیلیک در هسته‌ها و نواحی بخشهای ذکر شده پس از ۱۱ روز تزریقات مشاهده نشد (نگاره: ۱).

گروه B: ۵ میلی گرم/ کیلوگرم/ روز × ۱۱ روز

در بررسی مقاطع بافتی بدست آمده از مخ(تالاموس) رتهای مسموم شده در این گروه (دز ۵ میلیگرم/ کیلوگرم/ روز × ۱۱ روز) هیچ گونه تغییرات آرژیروفیلیک در هسته‌ها و نواحی بخشهای ذکر شده پس از ۱۱ روز تزریقات مشاهده نشد(نگاره:۲).

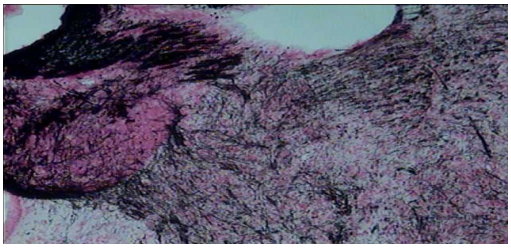
گروه C :۵۰ میلی گرم/ کیلوگرم/ روز × ۱۱ روز

بررسی توزیع فضایی دژنرسانس پایانه های عصبی در مغز پیشین ومیانی در رتهای مسموم شده با آکریل آمید (دز ۵۰ میلی گرم/ کیلوگرم/ روز×۱۱ روز) ، نشان داد که پایانه های عصبی آرژیروفیلیک درتمام هسته‌ها و نواحی آزرده از تراکم بالایی برخوردار است. از بین نواحی در گیر در مغز میانی، تالاموس از همه واضحتر دچار آزردگی شده بود. دژنرسانس پایانه‌ای متوسط تا شدید در برخی هسته های تالاموس(مثل:SM ; stria medularis thalami و medial habenuular nucleus; HM و nucleus centralis;NCL و lateral nucleus;LT و parafascicular nucleus ; PF) قابل رویت است (نگاره های :۷-۳).

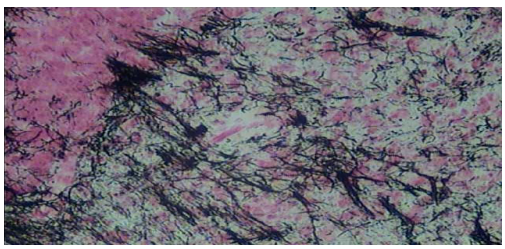


نگاره۱ : مقطع عرضی مخ رت گروه A هسته ها و نواحی تالاموس فاقد تغییرات آرژیروفیلیک می باشند

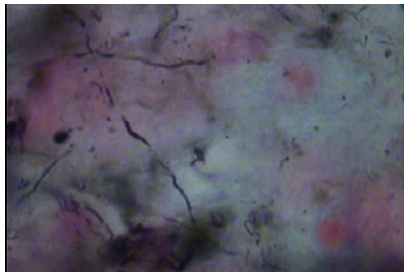
نگاره۲ : مقطع عرضی مخ رت گروه B هسته ها و نواحی نالاموس فاقد تغییرات آرژیروفیلیک می باشند



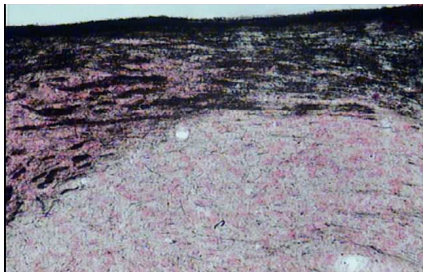
نگاره ۳ : تراکم رشته ها و پایانه های آرژیروفیلیک در هسته های تالاموس (stria medularis SM thalami)و (HM (medial habenular nucleus و HL(lateral habenular nucleus 4×



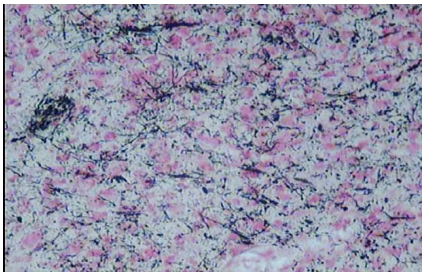
نگاره ٤ : تراکم رشته ها و پایانه های آرژیروفلیک در ه سته های تتلاموس SM (stria medularis thalami و HM (medial habenular nucleus) و HL(lateral habenular × 10 nucleus)



نگاره۵ : رشته‌ها و پایانه‌های آرژیروفلیک در هسته‌های تالاموس(stria medularis thalami) SM و lateral)HL habenular nucleus) و medial habenular)HM (nucleus×100) آکسونهای دژنره شده به صورت تورم‌های مولتی فوکال با ظاهر خطی قطعه قطعه و سیاه‌رنگ در مقاطع بافتی قابل رویت و تشخیص می‌باشند



نگاره ٦ : تراکم رشته‌ها و پایانه‌های آرژیروفلیک در هسته‌های تالاموس (lateral nucleus of thalamus) LT و (nucleus centralis laterlis thalami) NCL ×4



نگاره۷ : تالاموس،رشته‌ها و پایانه‌های آرژیروفلیک در هسته PF(parafascicular nucleus of the thalamus) ×4

بحث

نوروتوکسیسیتی ناشی ازآکریل آمید به شکل وسیعی، با توجه به گونه‌های پستانداران مثل : رت، موش، میمون، خوکچه هندی، سگ، گربه و مقادیر دز روزانه(۰/۵ تا۵۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۵،۱۷،۱۸،۱۹). علائم شایع نوروتوکسیسیتی در تمام گونه‌ها یکسان است. در مدلهای آزمایشگاهی که بخوبی توصیف شده و روی جوندگان بعمل آمده نشان داده است که مسمومیت با آکریل آمید به مقدار(۵۰ -۰/۵ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن) نواقص نورولوژیک سه گانه ای را بوجود آورده که عبارتند از: دور نگه داشتن پاهای عقب، آتاکسی (آنومالیهای توام با گامهای باز) و ضعف عضله اسکلتی (کاهش قدرت چنگ زنی ونگهداری درپاهای عقب و جلو (۳،۵،۷،۱۸،۲۶) همچنین مسمومیت تجربی با آکریل آمید با دیسفونکسیون اوتونومیک نوروژنیک، مثل: احتباس ادرا، دیسفونکسیون بارورسپتو، اختلال در کنترل وازوموتور همراه بوده است(۲٤،۲٤) بررسی فونکسیونال نورولوژیک طی یک دوره ۹۰ روزه قرار گرفتن در معرض دزهای پایین تر آکریل آمید (۵ ۰/۰ تا ٦/۷ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز) علامتی از نوروتوکسیسیتی را نشان نداد(۳،۵).

از این شواهد چنین نتیجه گرفته شد که این دزها غیر نوروتوکسیک هستند. در این مطالعه رتهای گروه C ،۱۹/۹۰٪ (S.E.M) وزن اولیه را طی یک دوره تجویز ۱۱ روزه از دست دادند. همچنین ارزیابی فاصله پاهای عقب در هنگام فرود آمدن در همین گروه نیز تغییرات قابل توجهی را نشان می‌دهد، بطوری که این فاصله از ۰/۳۲ ± ۷/۲۵ در اولین روز مشاهده به ۰/۷۰ ±۱۱/۲۰ در آخرین روز مشاهده افزایش یافت. تغییرات مشاهده شده در رفتارهای حرکتی در محوطه باز (gs) نیز در این گروه تغییر قابل توجهی را نشان داد بطوریکه از gs=۱ در روز اول مشاهده به gs =۳/۷۷±۰/۱٤ در روز ۱۱ که نشان دهنده آنومالی حرکتی شدید می‌باشد افزایش پیدا کرد. در حالیکه در همین دوره مطالعاتی در سایر گروه‌ها (گروه A ، گروه B و گروه F) تغییرات قابل توجهی از نظر وزن، فاصله پاهای عقب هنگام فرود آمدن و رفتارهای حرکتی حیوان در محوطه باز مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر، همانطور که در نتایج نیز به آن اشاره شد، علاوه بر عدم وقوع تغییرات نورولوژیک در پارامترهای رفتاری، هیچ گونه تغیرات آرژیروفیلیک در هسته های تالاموس رتهایی که در معرض دزهای ۰/۵ و ۵ میلی گرم/ کیلوگرم در روز به مدت ۱۱ روز قرار گرفته بودند مشاهده نشد. این موضوع را می‌توان با توجه به غلظت خیلی کم (

دز بسیار پایین) و مدت زمان کوتاه بکار گرفته شده در این گروه از رتها، به ماهیت تجمع پذیر و دز نوروتوکسیک آستانه تجمع پذیری آکریل آمید نسبت داده و چنین استنباط کرد که بر اساس قانون هبر این مدت زمان کوتاه، یعنی ۱۱ روز، مدت زمان کافی و مناسب برای بیان اثر آکریل آمید در پایانه های عصبی و ایجاد اختلال در انتقال عصبی در این پایانه‌ها نبوده است .بروز تغییرات قابل مشاهده در وزن و علائم کلاسیک نوروتوکسیسیتی رفتاری با منشاء آکریل آمید در این مطالعه با یافته های باربر و همکاران (۲۰۰۱) و سایر محققین مطابقت داشت. باربر و همکاران (۲۰۰۱) نیز در مطالعات خود نشان دادند که رتهای قرار گرفته شده در معرض مسمومیت با آکریل آمید به صورت خوراکی یا تزریق داخل صفاقی(.i.p) تغییراتی را در وزن بدن و علائم کلاسیک نوروتوکسیسیتی رفتاری با منشاء آکریل آمید نشان دادند. قرار گرفتن در معرض آکریل آمید از طریق آب آشامیدنی سبب کاهش وزن گیری در مقایسه با رتهای کنترل شد، یعنی طی یک دوره آزمایش ٤٧ روزه رتهای مورد آزمایش فقط ٨ ± ١٣ درصد وزن شروع آزمایش را بدست آوردند در حالیکه رتهای کنترل هم سن ٣ ± ٢٦ درصد وزن شروع آزمایش را در طول همان دورهٔ آزمایش کسب کردند. در مقابل رتهای مسموم شده با آکریل آمید از طریق تزریق داخل صفاقی ٩ ± ٢٤ درصد وزن اولیه را طی یک دوره تجویز ١١ روزه از دست دادند، در حالیکه رتهای کنترل هم سن ٢ ± ١٧ درصد وزن اولیه را طی همان دوره آزمایش بدست آوردند.

به همراه تغییرات وزنی، آکریل آمید نواقص پیشرونده ای در رفتار عصبی بوجود آورد. رتهایی که به شکل خوراکی مسموم شدند آنومالیهای ملایمی را در راه رفتن ٠/٤± ١/٩ پس از ٢٢ روزقرار گرفتن در معرض آکریل آمید را نشان دادند. با تداوم قرار گرفتن در معرض آکریل آمید، آتاکسی، لنگش و ضعف عضلات اسکلتی اندام حرکتی خلفی بیشتر شد، یعنی در روز ٣٤ سطح متوسطی از نوروتوکسیسیتی بوجود آمد (g.s = ٣/٠ ±٠/٢) و تا روز ٤٩ به میزان ٠/١± ٣/٤ پیشرفت کرد. رتهایی که آکریل آمید را بصورت تزریقات روزانه داخل صفاقی دریافت داشتند، الگوی زمانی متفاوتی را نشان دادند یعنی تغییرات کمی در راه رفتن (٠/٥ ± ١/٨ = gs) در روز ٥ مشاهده شد که پس از ١١ روز به سمپتوم‌های متوسطی تبدیل شد (٠/٣± ٣/٤=gs.) (١٠،١٦).

تحقیقات ارائه شده دیگر نشان دادند که این پدیده تجمع پذیری در مورد مقادیر دزی که بطرز قابل توجهی پایین تر از دزهای استفاده شده در مطالعات قبلی هستند (یعنی ١٠ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن در روز)، نیز بکار گرفته می‌شود(٥،٧،٢٦).

ارتباط مقدار دز روزانه آکریل آمید با تولید نوروتوکسیسیتی بظاهر از قانون هبر پیروی میکند: بدین معنی که مقادیر مساوی از c) t c x به معنی مقدار دز و t به معنی طول مدت قرار گرفتن در معرض ماده توکسیک میباشد) اثرات مسمومیت مشابه بوجود میاورند انحراف از مسیر خطی می‌تواند فونکسیون مکانیزم‌های جبرانی از قبیل القای متابولیک یا پروسه‌های ترمیمی باشد(٥). ماهیت وابسته به زمان نوروتوکسیسیتی با منشاء آکریل آمید (یعنی : مقدار دز زمان وقوع اثر نورولوژیک را تعیین می‌کند) مسمومیت تجمع پذیر و دز نوروتوکسیک آستانه تجمع پذیری را توجیه می‌کن (٩). بنابراین، عدم توانایی مطالعات قبلی در پیدا کردن نوروتوکسیسیتی در مقدار دز پایین تر از ١٠ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن، ممکن است بدلیل بکارگیری یک برنامه کوتاه مدت نامتناسب (عنی دوره مشاهدهٔ ٩٠ روزه) بوده باشد. اکثر مطالعات صورت گرفته در مورد حیوانات تا به امروز شامل تجویز تحت مزمن آکریل آمید (کمتر از ٩٠ روز) در دزهای روزانه نسبتاً بالا (میلیگرم/ کیلوگرم وزن بدن) از راه تزریق داخل صفاقی یا خوراکی (گاواژ و آب آشامیدنی) بوده است. در مقابل، مقدار روزانه مسمومیت با آکریل آمید در انسان بسیار کمتر(نانو گرم تامیکرو گرم/

کیلوگرم وزن بدن در روز)، همـراه بـا تنـوع از نظـر دوره (تقریباً تمام طول زندگی) و نحوه قرار گرفتن در معـرض آن استنشاق، پوست، خوراکی) بوده است . قرار گـرفتن انـسان در معرض مقدار کمتر ضرورتاً نشان دهنده پتانسیل مخاطره آمیز کم آن نیست چرا که شواهد نشان داده است که آکریـل آمید تولید نوروتوکسیسیتی تجمع پذیر می‌کند(۲۰)

همانطور که کروفتون و همکاران (۱۹۹٦) اعلام داشتند ارتباط مقدار دز روزانه آکریل آمید با تولید نوروتوکسیسیتی از قانون هبر پیروی می‌کند، بدین معنی که مقادیر مساوی از c×t اثرات توکسیکولوژیک مشابه بوجود می‌آورند.کوپر مان (۱۹۵۸) نیز چنین بیان داشته است، که ماهیت وابسته به زمان نوروتوکسیسیتی با منشاء آکریل آمید، مسمومیت تجمع پذیر و دز آستانه تجمع پذیری این ماده را توجیه می‌کند.با توجه به اینکه اکثر مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته پیش از این بر اساس دزهای روزانه نسباتا" بالا بوده است، لذا لوپاچین (۲۰۰٤) عدم مشاهده نوروتوکسیستی در مقادیر دزهای پایین تر از ۱۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن را ناشی از بکارگیری یک برنامه کوتاه مدت می‌داند. این فقدان بروز تغییرات نوروپاتولوژیک بدنبال قرار گرفتن در معرض مقادیر پایین دزهای آکریل آمید ضرورتاً نشان دهنده پتانسیل مخاطره آمیز کم این ماده نیست چرا که شواهد نشان داده است که آکریل آمید تولید نوروتوکسیسیتی تجمع پذیر می‌کند(۲۰).

مشاهده تغییرات آرژیروفیلیک در مقاطع بافتی بدست آمده از رتهایی که در معرض دز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم در روز×۱۱ روز با مشاهدات لهنینگ وهمکاران (۱۲،۱۳،۱٤) و لوپاچین و همکاران (۲۰۰۳) و سایر محققین مطابقت دارد. علت مرگ سریع رتهایی که در معرض دزهای بسیار بالای آکریل آمید(۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) قرار گرفتند را می‌توان به سمیت فوق حاد این ماده در این مقادیر دزها و تأثیر آن بر فونکسیون سیستم های اوتونومیک با منشاء نوروژنیک نسبت داد. ضمناً از آنجایی که از رنگ آمیزی نقره به روش دی المس برای شناسایی و تشخیص نورون‌ها و زوائد دژنره شده آنها برای اولین بار در سطح کشور در مطالعه حاضر استفاده شده است، لذا کاربرد عملی این مطالعه برای سایر محققین هیستوپاتولوژیست در استفاده از این تکنیک رنگ آمیزی حساس، دقیق و تکرارپذیر می‌تواند واجد اهمیت باشد.

با وجود بیش از چهار دهه تحقیق و مطالعه در سطوح مختلف مطالعات آزمایشگاهی و اپیدمیولوژیک و یافته های بسیار با ارزشی که تاکنون محققین در زمینه اثرات نورولوژیک و هیستوپاتولوژیک آکریل آمید به آن دست یافته‌اند، همچنان اسرار و ناشناخته‌های بسیاری در خصوص توکسیسیتی و مکانیزم های مربوط به آن وجود دارد که تحقیقات وسیع تر و حضور محققین فعالی را می‌طلبد.

فهرست منابع

1. Angner, R.T., Kelly,R.M. Wiley,R.G., Walsh, T.J. and Reuhl, K.R.,2000. Prefferential destruction of cerebellar Purkinjie cells by OX7- saporin. Neuro Toxicology 21, pp.395-404.
2. Barber D, Hunt JR, Erich M, Lehning EJ, LoPachin RM. 2001. Metabolism, toxicokinetics and haemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing . NeuroToxicology . 22:341-353.
3. Burek JD, Albee RR, Beyer JE, Bell TJ, Carreon RM, Mordoen DC, Wade CE, Herman EA, Gorzinski SJ.1980. Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in drinking water followed by up to 144 days of recovery. J Environ Pathol Toxicol 4:157-182.
4. Carpenter. EL., and H.S Davis (1957) Acrylamide, its preparation and properties. J.Appl. Chem.,7,671-676.
5. Crofton KM, Padilla S, Tilson HA, Anthony DC, Raymer JH, MacPHail RC. 1996.The impact of dose rate on the

6. neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. Toxicol Appl PHarmacol;139:163-76.
7. de Olmos, J.D., Beltramino, C.A., de Olmos-de Lorenzo, S.,1994.. Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and PHysical trauma. Neurotoxicol. Teratol. 16,454-561.
8. Edwards PM, parker VH. 1977. A simple , sensitive and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats . Toxicol Appl PHarmacol . 40:589-91.
9. Hawley, G.G. Ed (1981) The Condenced Chemical Dictionary, 10th Edn .,Van Nostrand Reinhold . New York , p .16.
10. Kuperman AS. 1958. Effects of acrylamide on the central nervouse system of the cat . J PHarmacol Exp Ther .123:180-92
11. Lehning EJ, Persaud A, Dyer KR, JortnerBS, LoPachin RM. 1998.Biochemical and morPHologic characterization of acrylamide periPHeral neuropathy.Toxicol Appl PHarmacol. 151:211-21.
12. Lehning EJ, Ross JF, Fix AS, LoPachin RM. 2001. Subacute acrylamide exposure causes wide spread synaptic terminal and cerebellar Purkinjie cell degeneration in rat brain. Toxicologist 2001 in press.
13. Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM. 2002a Acrylamide neuropathy. I. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in rat cerebellum. Neuro Toxicology. 23:397-414.
14. Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM. 2002b . Acrylamide neuropathy. II. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in rat brain stem and spinal cord. NeuroToxicology. 23:415-429
15. Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM.2003. Acrylamide neuropathy. III. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in rat forebrain. Neuro Toxicology. 24:125-136.
16. LoPachin RM, Lehning EJ. 1994. Acrylamide-induced distal axon degeneration : a proposed mechanism of action. NeuroToxicology.15:247-60.
17. LoPachin RM, Castiglia CM, Saubermann AJ. 1992. Acrylamide disrupts elemental composition and water content of rat tibial nerve . I. Myelinated axons . Toxicol Appl PHarmacol .15:21-34.
18. LoPachin RM, Lehning EJ, Opanashuk LA, Jortner BS. 2000. Rate of neurotoxicant exposure determines morPHologic manifestations of distal axonopathy. Toxicol Appl PHarmacol. 167:75-86.
19. LoPachin RM, Ross JF, Reid ML, Dasgupta S, Mansukhani S, Lehning EJ. 2002b. Neurological evaluation of chemically – induced neuropathies: acrylamide and 2,5-hexanedione. NeuroToxicology. 23:95-110.
20. LoPachin RM, Balaban C.D., Ross, J.F., 2003. Acrylamide axonopathy revisited. Toxicol Appl PHarmacol .188,135-153.
21. LoPachin RM. 2004. The changing view of Acrylamide neurotoxicity.Neurotoxicol.in press.
22. MacWilliam, D.C. (1978) Acrylamide in: M. Gravson et al.(Eds). Kirk-Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology 2ndEdn ., Vol.1. Whey New York .908. 11.
23. Paxinos, G., Watson, C., The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. New York: Academic Press; 1998.
24. Post EJ, McLeod JG. 1977a. Acrylamide autonomic neuropathy in cat. Part I. NeuroPHysiological and histological studies. J Neurol Sci. 33:353-74.
25. Post EJ, McLeod JG. 1977b. Acrylamide autonomic neuropathy in cat. Part 2. Effects on mesenteric vascular control. J Neurol Sci. 33:375-85.
26. Prineas J. 1969. The pathogenesis of dying back polyneuropathies. Part II. An ultrastructural study of experimental acrylamide intoxication in the cat. J Neurooathol Exp Neurol. 28:598-621.
27. Shel, L., Rozum, M., Jortner, B.S. and

Ehrich, M., 1992. Neurotoxicity of acrylamide and 2,5-hexandione in rats evaluated using a functional observational battery and pathological examination. Neurotoxicol. Teratol. 14.pp. 273-283.

28. Spencer PS, Shaumburg HH. 1974b. A review of acrylamide neurotoxicity. Part II. Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanism. Can J Neurol Sci. 1:170-92.

29. Spencer PS, Shaumburg HH. 1977a. Ultrastructural tudies of dying back process. III. The evolution of experimental periPHeral giant axonal degeneration. J Neuropathol Exp Neurol; 36:276-99.

30. Takahashi, A., M. Mizutani., B. Agr, and C. Itakura. 1994. Acrylamide–induced neurotoxicity in the central nervouse system of Japanese quails: 1981. Comparative studies of normal and neurofilamentou quails. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:276-283.

31. Tilson HA. The neurotoxicity of acrylamide: an overview. Neurobehav Toxicol Teratol;3: 445-61.