Archive of SID

بررسی الکترون میکروسکوپی اثر سرب بر تغییرات مرفولوژیک سلولهای اندوتلیال شریانهای آئورت، کرونری و مغزی میانی در خرگوش

دکتر غلامرضا دشتی*، دکتر مهدی نعمت‌بخش**، دکتر محمد مردانی*، جواد حامی*، دکتر سیدمجتبی صابرعلی*

چکیده مقاله

مقدمه. اندوتلیوم دستگاه عروقی را بطور کامل می‌پوشاند که اختلال در عمل آن در بسیاری از بیماریهای قلبی- عروقی از جمله آترواسکلروز نقش دارد. سرب از جمله موادی است که احتمالاً سبب اختلال عمل اندوتلیوم می‌گردد. این مطالعه با هدف بررسی اثر سرب بر تغییرات مرفولوژیک اندوتلیوم به عنوان یکی از نشانه‌های اندوتلیال دیس‌فانکشن انجام گرفت.

روشها. ۲۰ خرگوش نر سفید تهیه شد که پس از توزین بطور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه A (n=11) تغذیه معمولی با آب آشامیدنی سرب دار حاوی ۵۴۷ ppm سرب و گروه B (n=9) تغذیه معمولی با آب آشامیدنی بدون سرب به مدت ۴۰ روز دریافت نمودند. خرگوشها مجدداً توزین و با تزریق دوز بالای پنتوباربیتال قربانی شدند و آئورت، شریان کرونر چپ و مغزی میانی آنها تشریح شد و تغییرات مرفولوژیک سلولهای آندوتلیال با Scanning electron microscope (SEM) بررسی گردید.

نتایج. در میکروگرافهای الکترونی آئورت تغییرات مرفولوژیک نشان داد که شامل: ایجاد شکاف بین سلولها، عریان شدن ناحیه از سلولهای اندوتلیال و در معرض قرار گرفتن بافت ساب اندوتلیال و تجمع سلولهای خونی بر روی آن می‌باشد. در شریان کرونر چپ و مغزی میانی نیز سلولهای اندوتلیال دارای شکل غیر طبیعی و بهم ریخته‌اند.

بحث. اختلاف وزن خرگوشها ناشی از اثر سرب بر متابولیسم می‌باشد. تغییرات مرفولوژیک آئورت نیز کاملاً مشخص کننده تأثیر سرب در اندوتلیال دیس‌فانکشن بود. در شرایین کرونر و عروق مغزی تغییرات در حد بهم ریختگی سلولهای اندوتلیال مشاهده شد. تغییر شکل و تخریب اندوتلیوم در پاتوژنز بسیاری از بیماریهای سیستم قلبی - عروقی از جمله آترواسکلروز نقش دارد.

واژه‌های کلیدی. سرب، Scanning electron microscope، اندوتلیوم، شریان آئورت، شریان کرونری، شریان مغزی میانی

مقدمه

تماس با سرب مشکل بهداشتی عمده بخصوص در مراکز شهری ایالات متحده و کشورهای جهان سوم می‌باشد (۱). سرب از جمله فلزات موجود در محیط است که در غلظتهای مختلف در هوا، خاک، صخره، آب و مواد بیولوژیکی قرار دارد. به علاوه در اثر فعالیت صنعتی بشر بطور گسترده و روز افزون در طبیعت منتشر شده است (۲).

اندوتلیوم بزرگترین ارگان اتوکرین، پاراکرین و اندوکرینی بدن انسان به حساب می‌آید که سطحی در حدود ۷۰۰ متر مربع را پوشانده و یک کیلوگرم وزن دارد (۳). از نظر بافت‌شناسی اندوتلیوم سدی است نیمه تراوا که نقل و انتقال مولکولهای ریز و درشت را کنترل می‌نماید (۴). در گذشته اندوتلیوم را تنها سدی در برابر انتشار ماکرومولکولها می‌دانستند ولی تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که اندوتلیوم دارای عملکردهای چندگانه و خصوصیات متابولیک و سنتتیک فراوان می‌باشد که از این میان می‌توان به تنظیم عمل ترومبوزیس و ترومبولیزیس، چسبیدن پلاکت‌ها، دخالت در تنظیم تون عروق و جریان خون، تنظیم پاسخهای التهابی و ایمنی بوسیله کنترل عملکرد متقابل لکوسیت‌ها، منوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها با دیواره عروق اشاره کرد (۳).

هرگونه آسیب یا فعال شدن اندوتلیوم عمل تنظیمی آنرا تغییر داده و درنتیجه عملشان را غیر طبیعی می‌سازد این اختلاف عمل اندوتلیوم با آسیب‌شناسی، پیشرفت و پیش آگهی طیف وسیعی از بیماریهای قلبی – عروقی مرتبط می‌باشد (۵). مشخص گردیده است که تماس با سرب در مقادیر پایین (نه بالا) باعث افزایش فشار خون در انسانها و حیوانات می‌گردد (۶) در حیوانات در معرض سرب، سطح پلاسمایی و ادراری نیتریک اکسید (NO) تغییر قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد (۷) در حالی که سطح آنزیم نیتریک اکسید سینتاز اندوتلیالی (ENOS) افزایش یافته است (۸).

همچنین نشان داده شده است که تماس با سرب سبب تولید مولکولهای حاوی رادیکالهای اکسیژن آزاد (Reactive Oxygen Species=ROS) و تغییر در سیستمهای دفاعی آنتی‌اکسیدان می‌شود (۷). رادیکالهای آزاد سبب اکسیداسیون و غیر فعال نمودن (NO) شده و می‌تواند در اندوتلیال دیس‌فانکشن و فشار خون دخیل باشد (۷).

* گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
** گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

سد خونی- مغزی از یک لایه سلول اندوتلیال پوشاننده عروق مغزی ساخته می‌شود و جریان ماکرومولکولها و مولکولهای قطبی کوچک بین خون و مایع بین بافتی مغز را محدود می‌نماید (۹). در آنسفالوپاتی سربی نفوذپذیری مویرگهای مغزی افزایش می‌یابد(۱۰). سرب می‌تواند از سد خونی- مغزی گذشته و به میزان زیاد جانشین یون کلسیم گردد که ظاهراً بسیاری از اثرات نوروتوکسیک سرب با توانایی این فلز در تقلید و یا در بعضی موارد مهار عمل کلسیم به عنوان یک تنظیم کننده عملکرد سلول ارتباط دارد (۱۱).

سرب سبب کاهش بازسازی سلولهای اندوتلیالی در نواحی آسیب دیده می‌گردد که این تأخیر در ترمیم سلولهای اندوتلیال سبب تحریک تجمع پلاکتی می‌گردد (۱۲). با توجه به اینکه تغییر در شکل سلولهای اندوتلیال عملکرد سدی اندتلیوم را مختل کرده و یکی از نشانه‌های عدم کارآیی اندوتلیال است. هدف ما از این مطالعه بررسی اثر سرب بر تغییرات مرفولوژیک سلولهای اندوتلیال آئورت، شرایین کرونر و مغزی میانی بوسیله میکروسکوپ الکترونی است.

روشها

این بررسی یک تحقیق آینده نگر بوده که در سال ۱۳۸۲ در گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید. جهت اجرا ۲۰ عدد خرگوش نر سفید از انستیتوپاستور ایران تهیه و یک ماه جهت تطابق با محیط و غذا در لانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان نگهداری شدند. پس از این مدت حیوانات بطور تصادفی به دو گروه تقسیم گردیدند. سپس به مدت ۴۰ روز تحت رژیم غذایی خاص قرار گرفتند.

گروه ۱: (n=11) رژیم معمولی + آب آشامیدنی سرب دار

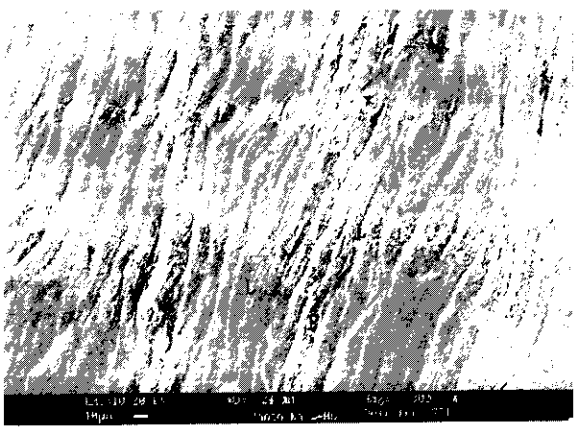
گروه ۲: (n=9) رژیم معمولی + آب آشامیدنی بدون سرب

برای تهیه آب آشامیدنی سرب دار با غلظت سرب ۲۰:۵۴۷ppm گرم استات سرب (CH3COO)2Pb.3H2O)، ۸ سی‌سی اسید کلرید ریک ۳۷٪ را در ۲۰ لیتر آب حل نمودیم و گلوکز نیز برای بهبود طعم آب اضافه شد (۱۳، ۱۴). برای تهیه آب آشامیدنی بدون سرب مثل مخلوط فوق ولی بدون استات سرب تهیه گردید.

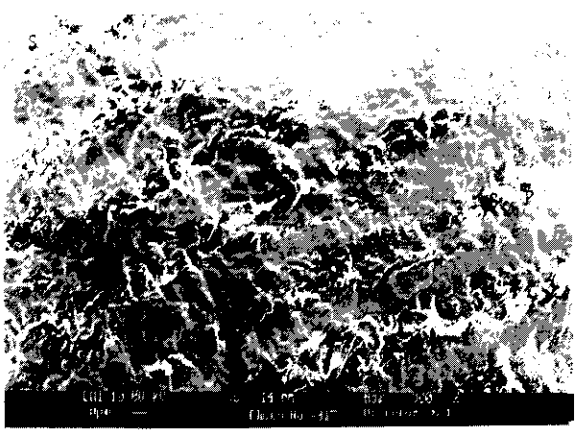
پس از پایان روز چهلم با تزریق دوز بالای پنتوباربیتال (بیش از ۵۰mg/kg) از طریق ورید گوش خارجی خرگوشها قربانی شدند. سپس با تشریح حیوانات آئورت، شرایین کرونر چپ و مغزی میانی آنها سریعاً خارج و در محلول سالین ۰/۹٪ شستشو گردید. برای ثابت نمودن نمونه‌ها جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی ابتدا نمونه‌ها در گلوتار آلدئید ۲/۵٪ قرار گرفتند و در مرحله بعد به مدت ۳ ساعت داخل تتراکسید اسمیوم ۱٪ قرار داده شدند. در مرحله آبگیری نمونه‌ها به ترتیب در الکل اتیلیک صعودی در زمان مشخص قرار دادیم. برای خشک کردن نمونه‌ها از دستگاه Critical Point Drier استفاده شد. پس از چسباندن نمونه‌ها بر روی استاب، نمونه‌ها با طلا پوشانده شدند که پس از پوشش، نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ اسکن شده و تصویربرداری انجام گردید.

نتایج

عروق آئورت، شریان کرونر چپ و مغزی میانی بوسیله میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید که سرب سبب تغییرات مرفولوژیک سلولهای اندوتلیال در هر سه شریان شده است. در میکروگرافهای الکترونی مربوط به سلولهای اندوتلیال در حیواناتی که سرب دریافت ننموده‌اند سلولهای اندوتلیال به صورت ممتد، دست نخورده و موازی هم مشاهده گردیدند (شکل ۱). در حالی که در تصاویر مربوط به آئورت حیوانات در معرض سرب ایجاد شکاف و باز شدن سلولهای اندوتلیال، برهنه شدن یک ناحیه از سلولهای اندوتلیال و در معرض قرارگیری بافت ساب اندوتلیال و تجمع سلولهای خونی بر روی آن مشاهده شد (شکل ۲) که این تغییرات در شریان کرونر چپ و مغزی میانی تنها به شکل بهم ریختگی و تورم سلولهای اندوتلیال می‌باشد.



شکل ۱. میکروگراف الکترونی از اندوتلیوم آئورت خرگوش سالم. تعداد اندکی لکوسیت (L) و پلاکت (P) به سطح اندوتلیوم چسبیده‌اند (بزرگنمای ۳۰۰ برابر)



شکل ۲. میکروگراف‌الکترونی از اندوتلیوم‌آئورت خرگوش دریافت کننده سرب.سلولهای اندوتلیول در بعضی مناطق تخریب‌شده‌اند و بافت زیر اندوتلیال (S) در معرض قرار گرفته است.تعدادی لکوسیت (L) و پلاکت (P) به سطح چسبیده‌اند (بزرگنمایی ۳۰۰ برابر)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

هدف ما از این مطالعه بررسی تغییرات مرفولوژیک سلولهای آندوتلیال آئورت، شرایین کرونر چپ و مغزی میانی در خرگوش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی است که در اثر سرب به وجود می‌آید. بدون شک می‌توان گفت که تغییرات ریختی سلولهای اندوتلیال سبب افزایش نفوذپذیری اندوتلیوم می‌گردد که این افزایش از نشانه‌های اندوتلیال دیس‌فانکشن است. تغییر در شکل سلولهای اندوتلیال منجر به تجمع تعداد بسیار زیاد ماکروفاژهای پر از چربی بنام سلولهای کف آلود در اینتیمای عروق می‌گردد (۱۵). اندوتلیوم در شریان سالم دارای سلولهای دوکی با الگوی منظم می‌باشد که هسته‌های آن بطور موازی هم چیده شده‌اند (۱۶).

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده در این مطالعه از آئورت، شرائین کرونری و مغزی میانی حیوانات سالم، سلولها به شکل ممتد، دست نخورده و موازی هم دیده می‌شوند (شکل ۱). این فنوتیپ کاملاً با الگوی طبیعی سلولهای اندوتلیال که در مطالعات قبلی گزارش شده است هماهنگی دارد (۱۶).

در این مطالعه از آئورت حیوانات در معرض سرب گرفته شده است یک ناحیه از سلولهای اندوتلیال عریان شده و در معرض قرارگیری بافت زیر اندوتلیال دیده شد و در بعضی از میکروگرافها نیز تخریب سلولهای اندوتلیال به همراه ایجاد شکاف بین سلولهای اندوتلیوم بچشم می‌خورد (شکل ۲). این مشخصه یعنی ایجاد شکاف بین سلولهای اندوتلیوم و تخریب آن در تصاویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از اندوتلیوم پوشاننده و سطح پلاکهای آترواسکلروز در مطالعات قبلی مشاهده شده است (۱۷).

در عکسهای که از اندوتلیال شریان کرونر چپ و مغزی میانی حیوانات این مطالعه که در معرض سرب گرفته شده است سلولهای اندوتلیال برآمدگی بیشتری به داخل رگ داشته و بهم ریخته و عمق فاصله بین سلولها افزایش یافته بود و در مطالعات قبلی از اندوتلیال شریان کرونر چپ و مغزی میانی حیوانات در معرض سرب مشاهده نشده است.

برآمدگی سلولهای اندوتلیال می‌تواند مشخصه سلولهای اندوتلیال فعال شده باشد مدارک فراوان این فرضیه را که برآمدگی سلولهای اندوتلیال نشان‌دهنده فنوتیپ پیش التهابی و پروترومبوتیک اندوتلیوم است را تأیید می‌کند و می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغییرات هیپرتروفیک سلولهای اندوتلیال می‌تواند یک پاسخ سازگاری سلول اندوتلیال تحریک شده در اثر آسیب به این سلولها باشد (۱۷).

با توجه به نتایج حاصله این مطالعه افزایش سطح سرمی سرب در افرادی که در معرض غلظتهای بالای آن قرار دارند سبب تغییرات مرفولوژیک در سلولهای اندوتلیال آنها شده که باعث ایجاد اندوتلیال دیس‌فانکشن می‌گردد.

منابع

1. Tong S, von Schirdnding YE, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. Bull World Health Organ78(2000): 1068-77.

۲. صاحبقدم لطفی ع. سرب و موجودات زنده. در: صاحبقدم لطفی ع. متابولیسم سرب و مسمومیت ناشی از آن. از مرکز انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۶۱: ۳۴-۱۰۴.

3. Sumpio BE, Riley JT, Darik A. Cells in focus: endothelial cell. Int Journal Bioch Cell Biol 34(2002): 1508-1512.

4. Pugsley MK, The vascular system, an overview of structure and function. J Pharmacol Toxicol Method 44(2000): 333-340.

5. Fenster BE, Tsao PS, Rockson SG. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. Am Heart J 146 (2003) : 218-26.

6. Staessen JA, Roles H, Fagard R. Hypertension and lead exposure. JAMA 276 (1996): 1037.

7. Gonick HC, Ding Y, Bondy SC. Lead-induced hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. Hypertens 30(1997): 1487-1492.

8. Vaziri ND, Ding Y. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells. Hypertens 37 (2001): 223.

9. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. Brain Res Rev 42 (2003): 221-242.

10. Gebhart AM, Goldstein GW. Use of an in vitro system, the effects of lead on asterocyte-ednothelial cell interaction a model for studying toxic injury to the blood brain barrier. Toxicol Appl Pharmacol 94(1988) : 191-206.

11. Bressler J, Kim KA, Chakraborti T, Goldstein G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. Neurochem Res 24(1999): 595-600.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Tujieara Y, Kaji T, Sakurai S, Sakamoto M, Kozuka H. Inhibitory effect of lead on the repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells. Toxicol 117 (1997): 193-198.

13. Ennever FK, Metals in , Hayes AW. Principles and method of toxicology. Raven Press. New York. USA, (1994): 417-446.

۱۴. نعمت‌بخش م، رجبی پ، ثمریان س‌ح، صباحی ع، شیردوانی س، مرادی ا. اثر سرب بر نفوذپذیری اندوتلیال آئورت. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران: سال هشتم - شماره ۲۳ - بهار ۱۳۸۰: ۸۳-۷۶

15. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362(1993) 6423: 801-809.

16. Gimbrone MA. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. Thromb Haemost 82(1999): 722-726.

17. Walski M, Chlopicki S, Celary - Walska R, Frontczak-Baniewicz. Ultrastructural alteration of endothelium covering advanced atherosclerotic plaque in human carotid artery visualized by scanning electron microscope. J Physiol Pharmacol 53(2002) 4: 713-723.

www.SID.ir