ررسی اثرات نوروتوکسیسیته هگزاکلرو ۱، ۳- بوتادی ان بر روی موش صحرایی جوان و نر

*محمد طاهر بروشکی،** پاول گراسو، پیتر گلدفارب

*بخش فارماکولوژی بیمارستان قائم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**بخش سم شناسی مولکولی، دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه ساری، گیلفورد، انگلستان

خلاصه

هگزاکلرو ۱،۳- بوتادی ان (hexachloro 1, 3-butadiene, HCBD) یك فراورده جانبی در طی مراحل سنتز پرکلرواتیلن و تتراکلرواتیلن و یك آلوده کننده محیط می باشد که یکی از نفروتوکسیك ترین ترکیبات هیدروکربن هالوژنه در جوندگان است. سمیت این دارو ناشی از نوع متابولیسم آن است که شامل کونژوگاسیون با گلوتاتیون و تولید پنتا کلرو بوتادی انیل گلوتاتیون، و سرانجام تبدیل آن به پنتا کلرو بوتادی انیل سیستئین و برداشت توسط کلیه ها و تجزیه آنزیمی آن توسط آنزیم سیستئین کونژوگیت بتا-لیاز (Cysteine Conjugate - β-lyase) و تولید یك متابولیت سمی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نوروتوکسیسیته HCBD با اثر ویژه بر روی سیستم عصبی رت می باشد.

در این تحقیق از موش صحرایی جوان ۲۸ روزه استفاده شده است. گروههای مختلفی از این حیوان، HCBD را به صورت دوز روزانه و با مقادیر mg/kg ۲۵ به مدت ۲، ۳، ۴ و ۷ روز و mg/kg ۱۰۰ به مدت یك و دو روز به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. به گروه کنترل روغن ذرت به مقدار ml/kg ۱ تزریق گردید. تمام حیوانات کشته شده و مغز آنها خارج و به دو قسمت تقسیم گردید. یك قسمت جهت مطالعات بافت شناسی در فرمالین فیکس شده و قسمت دیگر جهت اندازه گیری فعالیت آنزیمی ابتدا در محلول ایزوپنتان سرد شده با یخ خشك فریز شده و در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد. برشهای ۵ میکرونی از بافت فیکس شده در فرمالین تهیه و با محلول هماتوکسیلن و ائوزین رنگ آمیزی گردیدند. بررسیهای میکروسکوپی این بافتها بیانگر وجود آسیب شدید و خونریزی گسترده در شبکه کوروئید موجود در بطنهای جانبی و سوم مغز در حیوانات دریافت کننده دوز بالای HCBD بود. در گروههایی که دوز پائین دریافت نموده بودند خونریزی خفیف در بطنهای مغزی و سلولهای پیکنوتیك و میتوتیك در سلولهای کوروئیدال مشاهده گردید. در حیوانات تزریق شده با دوز پائین HCBD گرچه فعالیت آنزیم گلوتامین - ترانس آمیناز K (GTK) بیشتر از گروه کنترل نشان می داد ولی از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود نداشت. در گروه درمان شده با دوز بالا فعالیت آنزیم کمتر از گروه کنترل بود. در این بررسی نشان داده شده است که شبکه کوروئید موجود در بطنهای جانبی و سوم مغز حساس ترین قسمت نسبت به اثرات سمی HCBD می باشد.

کلمات کلیدی: هگزاکلروبوتادی ان، شبکه کوروئید، سمیت عصبی.

مقدمه

هگزاکلرو ۱، ۳- بوتادی ان (HCBD)، با اسامی مترادف هگزاکلروبوتادی ان، پرکلروبوتادی ان و اسامی تجارتی C46 و Dolon-par، یك مایع بی رنگ با بوی ترپنوئیدی بوده که در آب و الکل نامحلول می باشد. HCBD در کشاورزی و صنعت کاربردهای مختلفی دارد. به عنوان علف کش، حشره کش و باکتریسید به کار رفته و در روسیه، فرانسه، ایتالیا، یونان، اسپانیا و آرژانتین به عنوان بخار دهنده (fumigant) در باغهای انگور کاربرد دارد. این ماده به

Archive of SID

www.SID.ir

مقدار زیادی در طبیعت به عنوان آلوده کننده محیط وجود داشته (۱، ۱۸) و در بافتهای بدن انواع مختلفی از جانوران همانند گوسفند، چلچله دریایی، ماهی و همچنین انسان ردیابی شده است (۱۱). HCBD یك ماده نفروتوکسیك پر قدرت می باشد (۱۲) که موجب بروز پدیده دژنراسیون، نکروز و رژنراسیون در سلولهای اپی تلیال لوله های پروکسیمال کلیه ها می شود (۱، ۶، ۹، ۱۰، ۱۷، ۱۹). سمیت کلیوی HCBD ناشی از نوع متابولیسم آن است. این ماده ابتدا توسط آنزیم گلوتاتیون–S–ترانسفراز با گلوتاتیون کونژوگه شده و سرانجام به مشتق سیستئین کونژوگه، پنتا کلرو بوتا دی انیل سیستئین (PCBC) مربوطه تبدیل گردیده سپس به صورت فعال توسط کلیه ها برداشت شده و در سلولهای اپی تلیال لوله های پروکسیمال، که غنی از آنزیم بتا لیاز (β-lyase) می باشند، تبدیل به یك تیول فعال و سمی می شود که قادر به ایجاد پیوند کووالانت با ماکرومولکولها است.

HCBD و مشتق سیستئین کونژوگه آن(PCBC) ترکیبات لیپوفیلی هستند که قادر به عبور از غشاهای بیولوژیکی از جمله سد خونی–مغزی می باشند. شواهد متعددی دال بـر وجـود آنزیم بتا لیاز در مغز می باشد (۸، ۱۳، ۱۵). در سال ۱۹۹۳، Cooper و همکاران وجود آنزیم GTK در مغز، به ویژه با بیشترین فعالیت (۶–۵ برابر بیشتر از مغز کامل) در شبکه کوروئید (choroid plexus) را گزارش کردند (۳). لذا قدرت متابولیسم سیستئین کونژوگیت ترکیبات هالوژنه در مغز وجود دارد. با توجه به این مسئله عقیده مولفین بر این بود که PCBC یك واکنش حذف از روی کـــربن بتا توسط آنزیم GTK/KAT/β-lyase را در مغز متحمل شـــده و تولید نوعی تیول سمـی می نماید. این فرضیه با مطالعات سایر محققین مبنی بر اینکه HCBD دارای اثرات متعدد در CNS می باشد، نیز تقویت می شد. در مطالعات متعددی گزارش شده است که تجویز روزانه ppm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ روز به موش صحرایی موجب بروز تعدادی علائم بالینی از جمله لتارژی، حالت قوز در آوردن، راست شدن موها، حساسیت به نور، دمیلینه و قطعه قطعه شدن رشته های عصبی فمورال و فقدان تعادل در هنگام راه رفتن می شود (۱۹،۷،۵،۴،۱). در یك مطالعه دیگر در سال ۱۹۹۷، Reichert و همکاران اثرات نوروتوکسیسیته دی کلرو استیلن (DCA) را در خرگوش نشان دادند (۱۴). آنها علائمی مانند قطعه قطعه شدن اجسام نیسل (Nissl bodies)، کروماتولیز و چروکیده شدن سلولها را در پایه مغز در نواحی حسی کورتکس و به ویژه در هسته‌های اعصاب حسی جمجمه‌ای مشاهده و گزارش نمودند که اثرات سمی DCA مربوط به واکنش آن با گلوتاتیون، برداشت توسط مغز و سرانجام تولید نوعی متابولیت سمی (DCA -derived S-conjugate) است. در مطالعه حاضر نشان داده شده است که از منظر بافت شناسی، شبکه کوروئید در بطنهای جانبی و سوم مغز حساس ترین قسمت مغز می باشد که تحت تاثیر اثرات سمی HCBD قرار می گیرد.

مواد و روش کار

HCBD، سرم آلبومین گاوی، فولین، L–فنیل آلانین و αKMB از (شرکت سیگما)، سولفات مس آبدار و کربنات سدیم از شرکت Fischer Scientific, UK و سدیم، پتاسیم تارترات از BDH Chem Ltd, UK خریداری گردیدند.

روش کار: در این مطالعه تمام بررسیها بر روی موش صحرایی ۲۸ روزه، نژاد (Bantam & Kingman, W/A Yorkshire, UK)و با وزن ۱۰۰–۸۰ گرم صورت گرفته است. تمام حیوانات در طول بررسی در اتاق دارای تهویه مناسب، رطوبت ۵۰ درصد، دمای ۲۰ درجه و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش پس از مانوس شدن با محیط به طور تصادفی در گروههای مختلف (هر گروه حاوی ۶ موش) قرار گرفتند. تمام تزریقات به صورت داخل صفاقی بوده است:

گروه ۱: روغن ذرت به مقدار ml/kg ۱

گروه ۲: HCBD با دوز mg/kg ۲۵ به مدت دو روز

Archive of SID

www.SID.ir

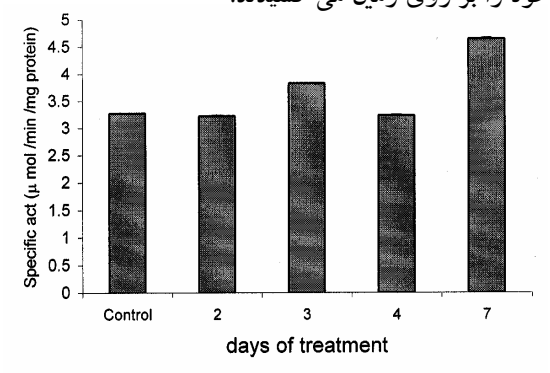
گروه ۳: HCBD با دوز mg/kg ۲۵ به مدت سه روز
گروه ۴: HCBD با دوز mg/kg ۲۵ به مدت چهار روز
گروه ۵: HCBD با دوز mg/kg ۲۵ به مدت هفت روز
گروه ۶: HCBD با دوز mg/kg ۱۰۰ به مدت یك روز
گروه ۷: HCBD با دوز mg/kg ۱۰۰ به مدت دو روز

حیوانات از نظر اثرات HCBD بر روی ظاهر و رفتارشان در طول مدت تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. تمام گروهها یك روز پس از آخرین دوز ابتدا توسط پنتوباربیتون (محلول ذخیره mg/ml ۶۰ با دوز ۰/۱ml/۱۰۰g وزن بدن به صورت داخل صفاقی) و نخاعی کردن بیهوش و کشته شدند. سپس مغز آنها خارج و به دوقسمت تقسیم شد. یك قسمت جهت مطالعات بافت شناسی در فرمالین فیکس شده و قسمت دیگر جهت اندازه گیری فعالیت آنزیمGTK ، ابتدا در محلول ایزوپنتان سرد شده با یخ خشك فریز گردیده و در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد. برشهای ۵ میکرونی از بافت فیکس شده در فرمالین، تهیه و با محلول هماتوکسیلن و ائوزین رنگ آمیزی گردیدند.

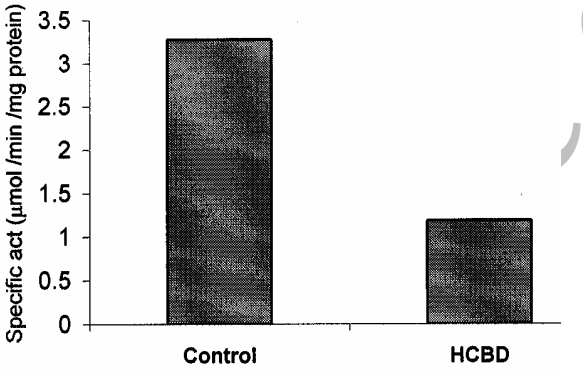
فعالیت آنزیم GTK نیز بر روی محلول هموژنیزه شده مغز و بر اساس روش Cooper and Meister مورد بررسی قرار گرفت (۲). این روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بر اساس واکنش انتقال آمین بین L- فنیل آلانین به عنوان سوبسترا و آلفا-کتو متیول بوتیریك اسید (α-KMB) به عنوان دریافت کننده آمین (amino acceptor) و تولید فنیل پیروات و L-متیونین و اندازه گیری در طول موج ۳۲۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر می باشد.

نتایج

یافته ها نشان دادند که HCBD پس از ۳ روز تجویز با دوز پائین، موجب بروز یك سری علائم در ظاهر و رفتار حیوانات گردیده که عبارتند بودند از: راه رفتن بر روی پنجه، حالت قوز داشتن، راست شدن موها و عدم تعادل در هنگام راه رفتن (lack of co-ordination). در روز ششم مطالعه، تمامی حیوانات هنگام راه رفتن قسمت انتهایی بدن خود را بر روی زمین می کشیدند.



شکل ۱: فعالیت اختصاصی آنزیم GTK در گروههای مختلف حیوانات درمان شده. اختلاف معنی داری بین گروه درمان شده با مقدار کم HCBD و گروه کنترل وجود ندارد. مقادیر به صورت میانگین ± SEM بیان شده اند.

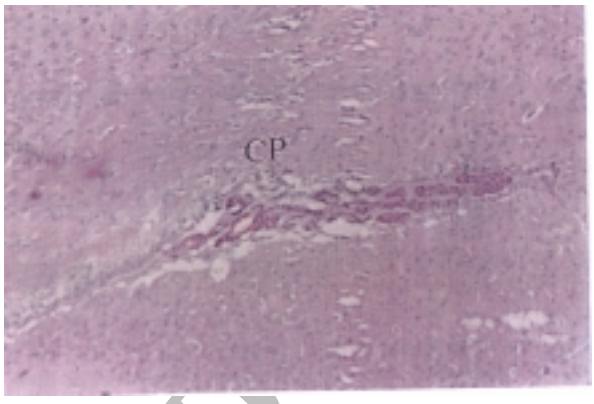


شکل ۲: فعالیت اختصاصی آنزیم GTK در گروه درمان شده با مقدار بالای HCBD، اختلاف معنی داری (۰/۰۱ >p) بین گروه درمان شده با HCBD و گروه کنترل وجود دارد.

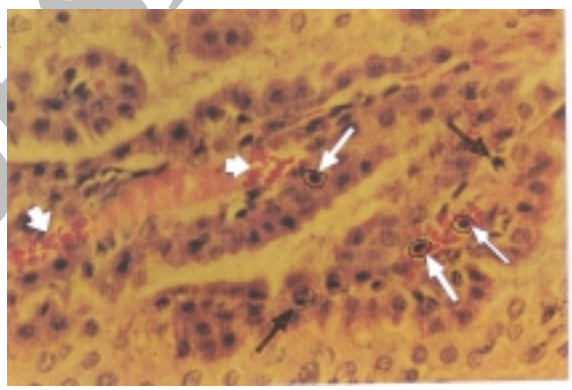
جدول ۱: اندازه مغز در گروههای مختلف موشهای مورد آزمایش.

گروههای مورد آزمایش	قطر (میلی متر)
کنترل	۱۵
HCBD 25 mg/kg, 3-day	۱۳
HCBD 25 mg/kg, 4-day	۱۳
HCBD 25 mg/kg, 7-day	۱۵
HCBD 100mg/kg, 1-day	۱۸
HCBD 100 mg/kg, 2-day	۲۲

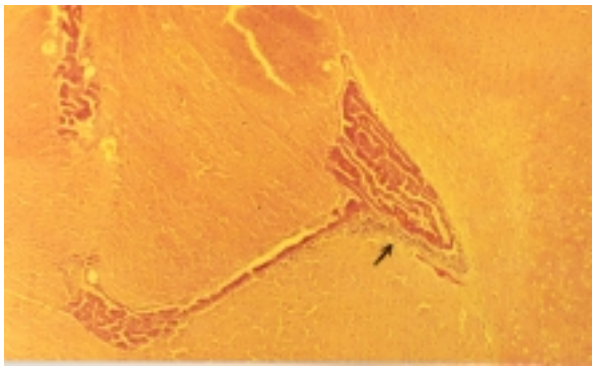
www.SID.ir



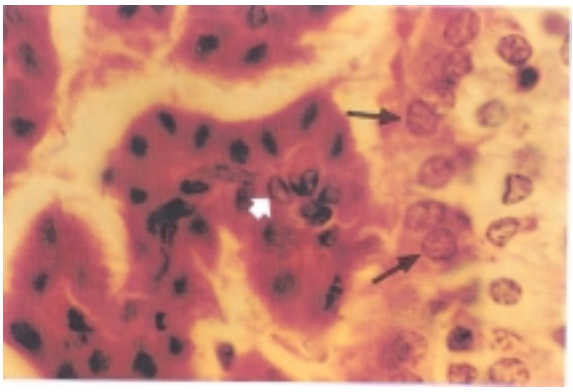
شکل۳: شبکه کوروئید در بطن جانبی مغز در حالت طبیعی. اندازه و ظاهر این بافت در این حالت مهم می باشد (بزرگنمایی ۱۰×).



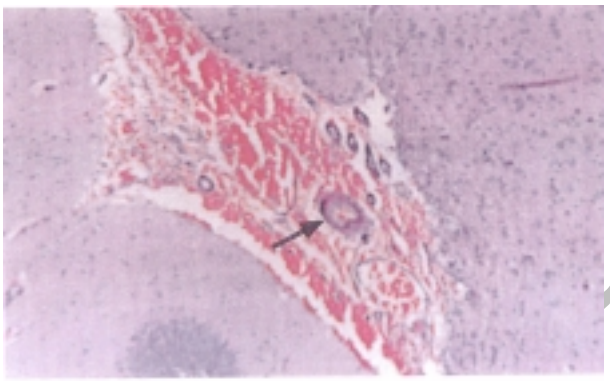
شکل ۴: شبکه کوروئید در گروه درمان شده با مقدار کم HCBD، در این تصویر نمایی از یک سلول پیکنوتیک (پیکانهای سفید). میتوتیک (پیکانهای سیاه) و خونریزی جزئی (پیکانهای کوتاه) در شبکه کوروئید مشاهده می گردد (بزرگنمایی ۲۰×).



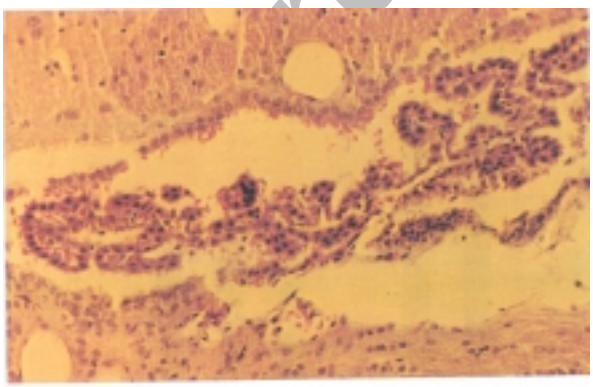
شکل۵: انفیلتراسیون سلولهای التهابی (سر پیکان) در گروه درمان شده با مقدار کم HCBD. مجموعه ای از سلولهای هتروژن شامل ماکروفاژها، پلی مرفها و لنفوسیتها، که در حالت طبیعی نبایستی در اطراف شبکه کوروئید باشند (بزرگنمایی ۴×).



شکل٦: شبکه کوروئید در گروه درمان شده با مقدار کم HCBD. یک سلول آپوپتوتیک (پیکان سفید) با واکوئله شدن قسمت مرکزی و تجمع کروماتین در اطراف سلول. در این تصویر سلولهای اپندیمال (پیکانهای سیاه) نیز در بیش از یک لایه، مشاهده می شوند(بزرگنمایی ۱۰۰×).



شکل ۷: اتساع بطن جانبی همراه با خونریزی وسیع و تخریت شدید شبکه کوروئید در گروه درمان شده با مدار بالای HCBD. این تصویر بیانگر این است که شبکه کوروئید و لایه اپندیمال به طور کامل تخریب شده اند. پیکان مقطعی از یک رگ خونی را نشان می دهد (بزرگنمایی ۱۰۰×).



شکل ۸: در این تصویر لایه اپندیمال بدلیل خونریزی از محل اتصال خود جدا شده و نمای طبیعی شبکه کوروئید نیز بهم خورده است (بزرگنمایی ۲۰×).

www.SID.ir

علاوه بر این علائم، در گروه پنجم حالت هیپراکتیو در حیوانات مشاهده گردید که مجموع علائم فوق بیانگر تاثیر این ماده بر روی CNS می باشد. در این مطالعه تغییرات رفتاری حیوانات درمان شده با دوز بالای HCBD ثبت نگردیدند.

گرچه فعالیت اختصاصی آنزیم GTK در گروههای درمان شده با دوز پائین HCBD بیشتر از گروه کنترل نشان می داد ولی از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت (تصویر۱). درحالی که فعالیت این آنزیم در گروه درمان شده با دوز بالای HCBD (گروه هفتم)، کمتر از گروه کنترل بوده و اختلاف معنی داری با آن نشان می داد ($p<0/01$) (تصویر۲). همچنین اختلاف معنی داری در فعالیت آنزیم GTK بین گروههای درمان شده با دوز پائین و دوز بالای HCBD وجود داشت ($p<0/01$).

در طی روند تهیه برشهای ۵ میکرونی از بافت مغز مشاهده گردید که اندازه مغز در حیوانات درمان شده با دوز بالای HCBD بزرگتر و دانسیته بافت کمتر از گروههای دیگر می باشد که با خط کش قطر برش مغزی در هر گروه اندازه گیری گردید (جدول۱). با بررسیهای میکروسکوپی که از برشهای تهیه شده و رنگ آمیزی شده بافت مغز در گروههای کنترل (تصویر۳) و درمان شده با دوز پائین HCBD (گروههای۳، ۴ و ۵) به عمل آمد، در گروههای درمان شده خونریزی خفیف در بطنهای جانبی مغز و همچنین سلولهای میتوتیك و پیکنوتیك در سلولهای کوروئیدال (تصویر۴)، انفیلتراسیون سلولهای التهابی در اطراف بطنها (تصویر۵)، واکوئله شدن قسمت مرکزی سلولهای کوروئیدال و متراکم شدن (condensation) کروماتین در اطراف هسته این سلولها (سلولهای آپوپتوتیك؟) (تصویر۶) مشاهده گردید. علاوه بر اینها، سلولهای کوروئیدال در بطنها حالت هیپرتروفی داشته و از نظر اندازه بزرگتر از گروه کنترل بوده و همچنین در بیش از دو لایه وجود داشتند (در حالت طبیعی بایستی حداکثر در دو لایه باشند). در حیوانات درمان شده با دوز بالای HCBD تغییرات شدیدتری در بطنها مشاهده گردید که عبارتند از:

۱- اتساع (dilatation) بطنهای جانبی و سوم همراه با خونریزی شدید و تخریب وسیع شبکه کوروئید در بطنها (تصویر۷).

۲- کنده شدن لایه اپندیمال (لایه پوشش دهنده سطح داخلی بطنها) ناشی از خونریزی و همچنین واکوئله شدن سلولهای اپندیمال (تصویر۸).

بحث

تغییرات رفتاری مشاهده شده در گروههای درمان شده با دوز پائین HCBD مانند راه رفتن بر روی پنجه، حالت قوز، راست شدن موها و عدم تعادل در هنگام راه رفتن (گروههای ۳ و۴) و هیپراکتیو بودن حیوانات (گروه ۵) بیانگر اینست که HCBD قادر است از سد خونی-مغزی عبور کرده و یك سری علائم و تغییراتی را در رفتار و ظاهر حیوانات به وجود آورد که ناشی از اثر این ماده بر روی CNS است. لذا بهتر است از تستهای فارماکولوژیکی مانند تست شنا و روتارود (rotarod) جهت ارزیابی عدم تعادل در راه رفتن و هیپراکتیو بودن حیوانات استفاده به عمل آید. این تغییرات رفتاری در گروههای درمان شده با دوز بالا بررسی نگردیدند. اینکه تغییرات رفتاری ایجاد شده مربوط به تخریب شبکه کوروئید بوده و یا ناشی از اثر HCBD بر روی سایر قسمتهای مغز می باشد نیاز به مطالعه بیشتر دارد. همانطور که قبلا ذکر شد شواهدی مبنی بر وجود آنزیم بتا لیاز در مغز، با بیشترین فعالیت در شبکه کوروئید وجود دارد(۳). لذا مغزتوانایی متابولیسم سیستئین کونژوگیت ترکیبات هالوژنه را دارا می باشد. گرچه فعالیت آنزیم در گروههای درمان شده با دوز پائین بیشتر از گروه کنترل را نشان می دهد ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود ندارد که امری قابل پیش بینی بوده زیرا میزان آسیب وارده به شبکه کوروئید خفیف می باشد. در دوز بالا HCBD موجب کاهش معنی دار فعالیت این آنزیم شده است که ممکن

Archive of SID

www.SID.ir

است ناشی از تخریب وسیع شبکه کوروئید در بطنهای مغز باشد ($p< ۰/۰۱$). نتایج نشان می دهند که ظاهراً اثر HCBD بر روی شبکه کوروئید نیز وابسته به دوز می‌باشد. به طوری که در دوز پائین تغییرات خفیفی در بطنها مشاهده گردید که شامل خونریزی خفیف در بطنها، وجود سلولهای پیکنوتیک و میتوتیک در سلولهای کوروئیدال، انفیلتراسیون سلولهای التهابی در اطراف بطنها، کنده شدن لایه اپندیمال، واکوئله شدن قسمت مرکزی سلولهای کوروئیدال و متراکم شدن کروماتین در اطراف هسته بوده ولی در دوز بالا شدت تغییرات ایجاد شده بیشتر بوده به طوریکه موجب تخریب کامل شبکه کوروئید و خونریزی وسیع در بطنها گردیده است. وجود سلولهای التهابی در اطراف بطنها می تواند موجب بروز ادم مغزی شود و احتمالاً این مسئله دلیل مناسبی جهت توجیه علت بزرگ بودن مغز و کاهش دانسیته آن در حیوانات درمان شده با HCBD خواهد بود.

به طور خلاصه، HCBD یك نوروتوکسین بوده و شبکه کوروئید در بطنهای جانبی و سوم مغز اصلی ترین قسمت آسیب دیده می باشد. این اثر سمی HCBD بر روی مغز وابسته به دوز است.

References

1. Berndt W. O., Mehendale H. M., 1979, Effects of HCBD on renal function and renal organ ion transport in the rat, Toxicology, 14: 55-65.
2. Cooper A. J. L., Meister A., 1985, Isolation and properties of a new glutamine transaminase from rat kidney, J. Biol. Chem., 249(8): 2554-61.
3. Cooper A. J. L., Abraham D. G., Gelbard A. S., Lai J. C. K., Petito C. K., 1993, High activity of GTK (DCVC β-lyase) and ω-amidase in the choroid plexus of rat brain, J. Neurochem., 61: 1731-1741.
4. Gradinski D., Duprat P., Fayein E., 1975, E'tude toxicologique experimental de I' HCBD, European J. Toxicology, 8(3): 180-87.
5. Harleman J. H., Seinen W., 1979, Short-term toxicity and reproduction studies in rats with HCBD, Toxicol. Appl. Pharmacol., 47: 1-14.
6. Ishmael J., Pratt I., Lock E. A., 1984, Hexachloro-1:3-butadiene-induced renal tubular necrosis in the mouse, J. Pathol., 142(3): 195-203.
7. Jaffe D. R., Hassall C. D., Berndt K., Gandolfi A. J., 1983, In vivo and in vitro nephrotoxicity of the cysteine conjugate of HCBD, J. Toxicol. Environ. Health, 11: 857- 67.
8. Kapoor R., Okuno E., Kodo R., Kapoor V., 1997, Immunolocalisation of KAT in the rat medulla and spinal cord, Neuroreport, 8(16): 3619-23.
9. Kirby G. M., Bach P. H., 1995, Enhanced HCBD nephrotoxicity in rats with a preexisting Adriamycin-induced nephritic syndrome, Toxicol. Pathol., 23(3): 303-12.
10. Kociba R. J., Keyes D. G., Jersey G. C., Quast J. F., Schwetz B. A., 1977, Results of two years chronic toxicity study with HCBD in rats, Am. Indust. Hygie. Asso. Journal, 38: 589-602.
11. Laska A. L., Bartell C. K., Laseter J. L., 1976, Distribution of hexachlorobenzene and HCBD in water, soil and selected aquatic organisms along the lower Mississippi river, Louisiana, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15(5): 533-42.
12. Lock E. A., Ishmael J., 1979, The acute toxic effects of HCBD on rat kidney, Arch. Toxicol., 43: 47-57.
13. Okuno E., Nakamura M., Schwarcz R., 1991, Two kynurenine aminotransferases in human brain, Brain Res., 542: 307-312.
14. Reichert D., Liebaldt G., henschler D., 1976, Neurotoxic effects of dichloroacetylene, Arch. Toxicol., 23-38.
15. Roberts R. C., McCarthy K. E., Okuno E., Schwarcz R., 1992, Immunohistochemical localisation of KAT in rat striatum. A light and electron microscopic study, J. Comp. Neurology., 326: 82-90.
16. Schrenk D., Dekant W., 1989, Covalent binding of hexachlorobutadiene metabolites to renal and hepatic mitochondrial DNA, Carcinogenesis, 10(6):1139-41.
17. Schwetz B. A., Smith F. A., Humiston C. G., and Kociba R. J., 1977, Results of a reproduction study in rats fed diets containing HCBD, Toxicol. Appl. Pharmacol., 42: 387-98.
18. Yang R. S. H., 1988, Toxicology, metabolism and mechanisms of toxicity, Rev. Environ. Conta. Toxicol., 101: 121-37.
19. Yang R. S. H., Abdo K. M., Elwell M. R., 1989, Subchronic toxicology studies of HCBD in B6C3F mice by dietary incorporation, J. Enviro. Pathol. Toxicol. Oncol., 9(4): 323-332.

Archive of SID

www.SID.ir