

تأثیر تماس مزمن با سرب بر میزان DNA، پروتئین و تغییرات Ultrastructure

غدد تحت فکی موش صحرایی

دکتر محمد عبداللہی^۱، دکتر غلامرضا ابری^۲، دکتر محمد شریف زاده^۳، دکتر حسن مرزبان^۲، دکتر مهدی تراب جهرمی^۲

خلاصه

سابقه و هدف: سرب سبب تغییرات ساختمانی و بیوشیمیایی در سلولهای مختلف بدن می گردد ولی در مورد غدد اگزوکرین اطلاعات کافی در دست نیست. این مطالعه به اثرات سرب بر روی تغییرات ساختمانی غدد تحت فکی موش صحرایی پس از تجویز طولانی مدت (۲۴ روزه) دوزهای مختلف آن می پردازد.

مواد و روشها: حیوانات بوسیله آب حاوی دوزهای ۰/۰۱، ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد از سرب مسموم DNA گشتند. یک گروه از موشها به عنوان گروه کنترل، آب معمولی دریافت کردند. پس از اتمام دوره، مسمومیت ابتدا غدد تحت فکی در حالت بیهوشی از حیوانات جدا شدند، سپس میزان پروتئین، کلسیم داخل سلولی و سرب آنها اندازه گیری شد. همچنین غده ها پس از مراحل آماده سازی، میزان سرب آنها با میکروسکوپ الکترونی (EM) مورد بررسی قرار گرفت. ضمناً از حیوانات نمونه های خون تهیه شد و اندازه گیری گردید.

یافته ها: میزان پروتئین و DNA غدد در گروههایی که سرب ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد دریافت کرده بودند، کاهش محسوسی نشان داد. کلسیم غده در گروههای ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد کاهش داشت ولی سرب در این دو گروه افزایش نشان می داد که نشان دهنده تجمع سرب در غده است. مطالعات EM در گروههای ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد نشان دهنده آسیبهای متوسطی به اجزاء سلولی بود که شامل تورم و تغییر شکل و میتوکندری ها می شود. dilation متوسط شبکه اندوپلاسمی خشن (RER)، وجود وزیکولهای ریز در آن و دژنراسیون متوسط سلولی آثاری بودند که در دوزهای ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد سرب دیده شد.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که سرب با کاهش سطح انرژی داخل سلولی و آسیب به RER و نیز کاهش کلسیم که در روند اگزوسیتوز نقش مهمی دارد باعث کاهش این روند می گردد. در ضمن با کاهش cAMP در سنتز پروتئین اختلال ایجاد کرده که نوبه خود باعث کاهش DNA سلول می گردد.

واژه های کلیدی: سرب، تماس مزمن، غدد تحت فکی، DNA، پروتئین، تغییرات ساختمانی.

۱ - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - فارماکولوژیست و متخصص سم شناسی

۲ - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - متخصص علوم تشریح

۳ - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - فارماکولوژیست

مقدمه

گزارشات زیادی مبنی بر تغییرات ساختمانی و بیوشیمیایی، در سلولهای مختلف بدن به علت اثرات سرب وجود دارد اما مطالعات اندکی روی غدد بزاقی به عنوان ارگانهای اگزوکراین انجام شده است. ترشح در غدد اگزوکراین مراحل پیچیده‌ای دارد که فاکتورهای زیادی در آن درگیر هستند. ترشح بزاق بوسیله اعصاب اتونومیک کنترل می‌شود. بزاق شامل آب، الکترولیتها، پروتئین و آنزیم هاست که ترشح آب و الکترولیتها عمدتاً بوسیله رستپورهای آلفا-آدرنرژیک و کولینرژیک کنترل می‌شود و رستپورهای بتا - آدرنرژیک در ترشح پروتئین دخیل هستند (۱). دو مکانیسم داخل سلولی عمده برای ترشح وجود دارد که شامل تولید CAMP، و شکسته شدن پلی فسفواينوزيتول غشاء پلاسمایی است (۱). تولید CAMP، ترشح اگزوکراین پروتئین را رهبری می‌کند (۲) و هیدورلیز سریع فسفاتیدیل اینوزیتول بی فسفات (PIP2) با واسطه رستپورهای موسکارینی کولینرژیک در ترشح مایعات دخیل است (۳-۵).

برخی فاکتورهای داخل سلولی نقش مهمی در ترشح بزاق دارند، مانند کلسیم که گوانیلات سیکلاز را تحریک کرده و غلظت cGMP را افزایش می‌دهد (۳ و ۶). برخی از پروتئین‌های تنظیمی مثل کالمودولین و PKC (پروتئین کیناز C) نیز تحت تاثیر کلسیم هستند. ثابت شده است که سرب می‌تواند در چند مسیر تنظیمی جایگزین کلسیم شود (۷-۹). همچنین برخی گزارشها نشان داده‌اند که سرب می‌تواند سنتز کالمودولین و PKC را مهار کند (۱۰ و ۱۱). گزارشهایی هم موجود است که نشان می‌دهد فسفریلاسیون پروتئین وابسته به CAMP، بوسیله سرب مهار می‌شود (۱۲-۱۴). مطالعات قبلی آسیب و تخریب سلولهای آسینی غدد بزاقی را توسط سرب نشان داده است (۱۵). همچنین قبلاً گزارش شد که تجویز سرب، میزان پروتئین، کلسیم و آنزیم لیپوزیمی رادر غدد بزاقی تحت فکی را تغییر می‌دهد (۱۶). بر پایه این اطلاعات مطالعه حاضر برای توضیح مکانیسم تغییرات ناشی از سرب و نشان دادن تخریب سلولی حاصل از تجویز طولانی مدت سرب توسط اندازه‌گیری پروتئین و DNA و کلسیم داخل سلولی غدد تحت فکی طرح

ریزی شده است.

مواد و روشها

همه مواد مصرفی غیر از استات سرب (که از شرکت Merk تهیه شد) از شرکت سیگما فراهم شدند.

حیوانات: مطالعه با ۲۸ موش صحرایی بالغ نر از نژاد Sprague-Dawley به وزن میانگین بین ۲۵۰g-۲۰۰g انجام شد. پس از چند روز که از سازگاری با محیط جدید گذشت موشها بطور تصادفی به دو گروه کنترل و تحت تجربه تقسیم شدند. حیوانات به مقدار کافی و بدون محدودیت از آب و غذا بهره‌مند بوده و یک سیکل روشنایی - تاریکی ۱۴ به ۱۰ ساعت برای آنها در نظر گرفته شد.

روش مسموم کردن حیوانات: موشها طبق پروتوکول موجود (۱۶) آب معمولی حاوی مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد از سرب را به مدت ۲۴ روز دریافت کردند. گروه کنترل، آب حاوی استات سدیم دریافت نمودند.

جداسازی غده‌ها: تمامی حیوانات ابتدا بوسیله مقدار ۵۰mg/kg پنتوباریتال سدیم بطور داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از نیم ساعت، برای بیهوش ماندن حیوانات مجدداً مقدار ۳۰mg/kg پنتوباریتال به آنها تزریق شد (۱۷). این اعمال در ساعت ۸ صبح انجام شدند. سپس حیوانات بطور Supine روی شیشه تشریح فیکس شده و غده‌های راست و چپ آنها جدا و تمیز شدند. سپس بافت‌های پیوندی و سایر ضمائم آنها از بافت اصلی غده جدا گشته و وزن شدند. غده‌های سمت چپ برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی در نظر گرفته شده و غده‌های سمت راست برای اندازه‌گیری پروتئین، DNA کلسیم و سرب انتخاب شدند. پس از جدا کردن غده‌ها و در حالیکه حیوانات هنوز بیهوش بودند مقداری خون مستقیماً از قلب آنها گرفته شد و برای اندازه‌گیری سرب خون به آزمایشگاه مربوطه ارسال گردید.

آماده سازی نمونه‌ها برای EM: یک برش به ابعاد ۱mm² از بافت‌ها جدا گشته و در محلول ۲/۵٪ گلوتارالدئید و سپس محلول ۲٪ اسمیوم تتروکساید فیکس شد. سپس

شدند (۲۲). سپس میزان کلسیم و سرب آنها با استفاده از دستگاه اتمیک مدل Shimadzu AA-680 آنالیز شد (۲۴ و ۲۳). تمامی ظروف مورد استفاده برای اندازه گیری کلسیم و سرب کاملاً شسته شده و در اسید نیتریک ۱۰٪ غوطه ور شدند. آنالیز آماری: تمامی مقادیر بصورت Mean+SE گزارش شدند. مطالعات آماری با استفاده از نرم افزار PCS انجام شد.

یافته‌ها

اثرات دوزهای مختلف سرب بر غده تحت فکی در جدول ۱ خلاصه شده است. وزن بدن، میزان مصرف آب و غذا توسط حیوانات در طی دوره مسمومیت تغییری نشان ندادند. پروتئین تام و DNA بطور معنی داری ($p < 0.05$) در گروههای ۰/۰۴ و ۰/۰۵ درصد کاهش نشان داد. میزان کلسیم هم در گروههای ۰/۰۴ و ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار داشت. در ضمن سرب در غده‌ها تجمع نشان می‌داد. ultrastructural examination: میکروگرافهای غده‌های تحت فکی در گروههای کنترل سایر گروهها در شکل‌های ۱ و ۲ و ۳ نشان داده شده است. تغییرات ساختمانی مهمی

نمونه‌ها بطور سری در الکل آگیری شده و در رزین Epon 812 قالب‌گیری شدند. سپس با یک Ultramicrotome مدل LKB Mova برشهای بسیار نازکی از نمونه‌ها تهیه شد و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی Zeiss EM 10c نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند.

اندازه گیری پروتئین تام و DNA: غده‌های سمت راست حیوانات ابتدا در محلول تری کلرواستیک اسید ۵٪ قرار گرفته و سپس توسط یک هموژنیزه کننده شیشه‌ای یکنواخت شدند. DNA از محلول هموژنیزه بوسیله روش ice-cold perchloric precipitation استخراج شده (۱۸) و بوسیله متد بورتون میزان DNA بدست آمد (۲۰ و ۱۹). برای اندازه گیری پروتئین، پس از هموژنیزاسیون و استخراج چربیها و سانتیفریوژ میزان پروتئین بر اساس متد لوری بدست آمد (۲۱).

اندازه گیری کلسیم و سرب: ابتدا بافت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای 105°C برای بدست آمدن وزن خشک آنها قرار داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای 550°C خاکستر شده و به باقیمانده، ابتدا مقدار 0.1 ml 0.1 N KCL افزوده و سپس توسط 0.1 ml از سود 0.1 N خنثی

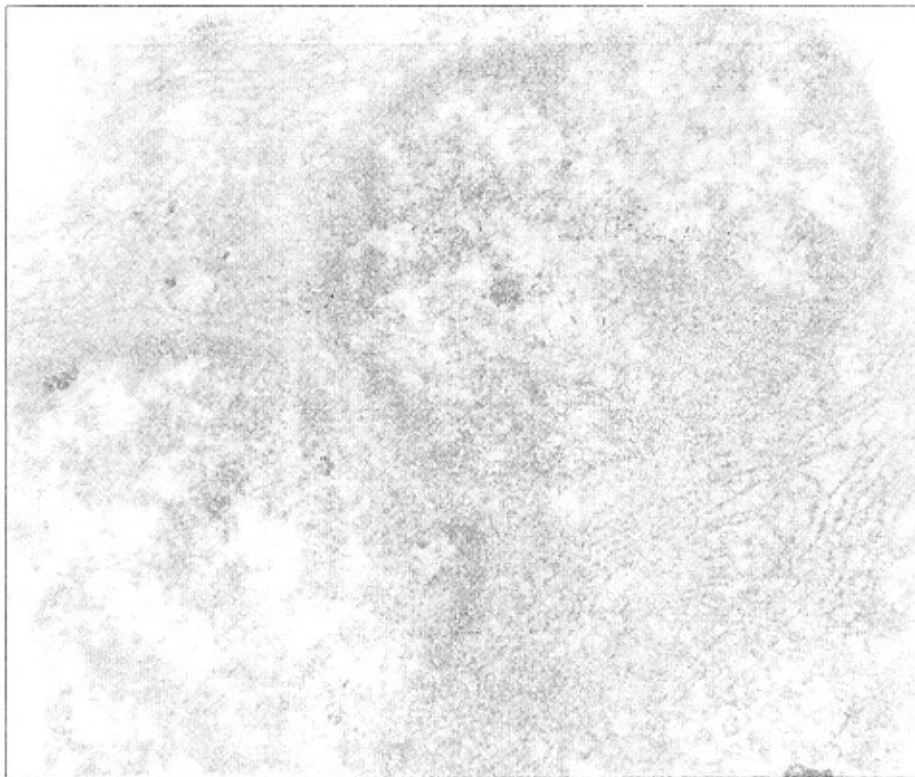
جدول ۱. اثرات سرب بر محتویات بزااق و غلظت سرب در خون و غده‌بزااقی موشهای صحرایی

یافته‌ها	گروه کنترل (نرمال سالین)	غلظت سرب (۰/۰۱)	غلظت سرب (۰/۰۴)	غلظت سرب (۰/۰۵)
وزن بدن (g)	$215 \pm 2/3$	$220 \pm 1/5$	$217 \pm 2/3$	220 ± 2
وزن غده (g)	$0/23 \pm 0/05$	$0/24 \pm 0/04$	$0/23 \pm 0/03$	$0/24 \pm 0/02$
پروتئین/غده (mg/g)	$51/13 \pm 0/4$	$48/37 \pm 1/1$	$40/2 \pm 0/8 *$	$39/19 \pm 0/3 *$
DNA/غده (mg/g)	$4046 \pm 15/1$	$3965/6 \pm 21/2$	$3707/4 \pm 18 *$	$3652/3 \pm 15 *$
غلظت سرب خون (mg/dl)	$383 \pm 8/9$	$422 \pm 10/3 **$	$493 \pm 12/3 **$	$549 \pm 16/8 **$
غلظت سرب غده (mg/g)	$4/3 \pm 0/3$	$11/6 \pm 0/7$	$16/7 \pm 0/8 *$	$19/2 \pm 0/93 *$
غلظت کلسیم غده (mEq/kg)	$9/3 \pm 0/6$	$8/6 \pm 0/7$	$6/2 \pm 0/2 *$	$5/9 \pm 0/2 *$

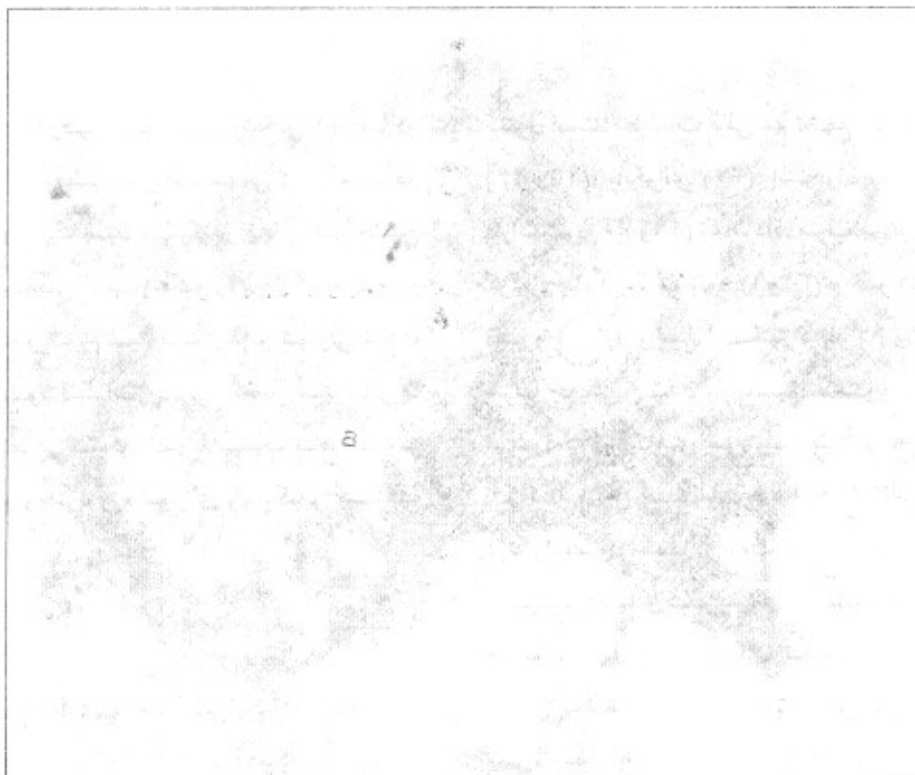
- همه یافته‌ها $\text{Mean} \pm \text{SE}$ رت می‌باشد. پروتئین و DNA میلی‌گرم بر گرم توده خشک غده بیان شده است.

- * تفاوت بین گروههای کنترل و درمان در حد $p < 0.05$ معنی دار است.

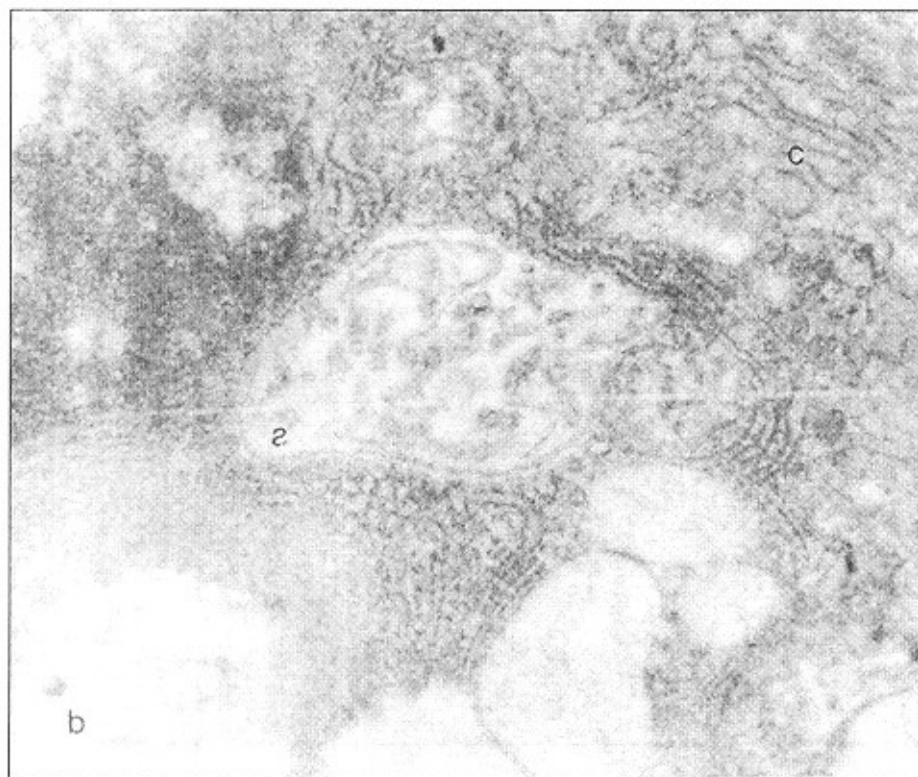
- ** تفاوت بین گروههای کنترل و درمان در حد $p < 0.001$ معنی دار است.



شکل ۱. میکروگراف غده تحت فکی در گروه ۱/۰ درصد با بزرگنمایی ۱۲۵۰۰.



شکل ۲. میکروگراف غده تحت فکی در گروه ۴/۰ درصد با بزرگنمایی ۱۹۰۰۰.



شکل ۳. میکروگراف غده تحت فکی در گروه ۵/۰۵ درصد با بزرگنمایی ۲۴۵۰۰.

کنترل است. مطالعات قبلی هم تجمع سرب را در غده پاروتید (۲۶ و ۲۵)، پانکراس (۲۷)، استخوان (۲۸) و سایر ارگانهای پارانشیمی (۲۹ و ۳۰) نشان داد. سرب می تواند با کلسیم رقابت کرده و جایگزین آن شود (۳۱ و ۹) و نیز هموستاز کلسیم و خروج آنرا از سلول تغییر دهد (۳۲ و ۳۳). احتمالاً سرب جایگزین شدن با کلسیم باعث میزان کلسیم سلول می شود که این کاهش می تواند بر ترشح پروتئین از غده اثر کند (۳۴). مطالعات ultrastructure نشاندهنده نوعی دژنراسیون سلولی است که تورم و اتساع و تخریب میتوکندریها و کریستای آنها دیده می شود. تورم میتوکندریها شاید باعث تغییرات ساختمانی در غشاء داخلی باعث از دست دادن توانایی در سنتز ATP ایجاد می شود. از طرفی کاهش ATP ممکن است به نارسایی پمپ سدیم وابسته به ATP در سطح غشاء پلاسمایی و نیز

در گروههای ۱/۰ درصد دیده نشد (شکل ۱)، اما در گروه ۴/۰ و ۵/۰ درصد تغییرات مهمی دیده شد. در گروه ۴/۰، تورم و بزرگ شدن میتوکندریها و هم چنین تغییر شکل آنها مشخص است (شکل ۲). در گروه ۵/۰ درصد، بزرگ شدن و تورم میتوکندریها و توبولی شدن کریستا و نیز وجود قطرات چربی داخل میتوکندریها بخوبی مشهود است. در شبکه اندوپلاسمیک ناصاف هم یک اتساع متوسط و وجود وزیکولهای ریز قابل مشاهده است (شکل ۳).

بحث

تجمع سرب در غده های تحت فکی یکی از یافته های مطالعه حاضر است. نتایج حاضر نشان می دهد که میزان سرب غده ها در گروههای ۴/۰ و ۵/۰ درصد ۴ و ۵ برابر گروه

References

1. Baum BJ. Neurotransmitter control of secretion. J Dental Res 1987; 66:628-632.
2. Butcher FR, Putney JW. Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotide and calcium. Adv Pharmac Exp Ther 1980; 264:757-761
3. Aub DL, Putney JW. Mobilization of intracellular calcium by methacholine and inositol 1,4,5-triphosphate in rat parotid acinar cells. J Dental Res 1987; 66:547-551.
4. Jahn R, Soling HD. Phosphorylation of some protein during amylase release evoked by B-adrenergic or cholinergic agonists in rat and mouse parotid glands. Proc. Natl. Acad. Sci, 1981; 78:6903-6906.
5. Putney JW. Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. Ann Rev Physiol 1986; 48:75-88.
6. Brown JH, Taylor P. Muscarinic receptors agonists and antagonists In: Goodman's & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, eds JG Hardman LE. Linbird 9 th edition. McGraw-Hill. 1996; 141-161.
7. Golstein GW. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. Neurotoxicol 1993; 14:97-101.
8. Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Inhibitory effect of lead on the release of tissue plasminogen activator from human vascular endothelial cells in culture. Toxicology 1992; 73:219-227.
9. Szyńska B, Andrezejewska A. Ultrastructural

پمپ کلسیم در میتوکندریها منجر شود. همچنین سرب یک مهار کننده قوی آنزیم‌های دارای گروه‌های سولفیدریل می‌باشد. بنابراین مهار آنزیم کلیدی تنفس یعنی سوکسینیک دهیدروژناز نیز اتفاق می‌افتد (۲۷). این حوادث ممکن است منجر به تخریب میتوکندریها و در نتیجه کمبود انرژی در سلول شود (۳۱). از آنجا که آگزیستوز یک روند وابسته به انرژی است، بنابراین کمبود انرژی باعث کاهش این روند می‌شود. همچنین آزمایش EM نشان‌دهنده یک اتساع در RER و وجود وزیکولهای ریز در سلول آن است. تورم RER در نتیجه نارسایی در انتقال محصولات سنتز شده در ریبوزوم به دستگاه گلژی است (۲۵). بطور خلاصه، کاهش کلسیم داخل سلولی، تخریب میتوکندریها و کمبود انرژی و نیز اختلال در انتقال احتمالاً علل اساسی کاهش روند آگزیستوز پروتئین و DAG و کلسیم ترشح شده در بزاق است که در مطالعه قبلی نیز ثابت شده است (۱۶). بخوبی پذیرفته شده است که سنتز پروتئین در غدد بزاقی بطور عمده توسط CAMP میانجیگری می‌شود و میزان کمی از مسیر بسته به فسفاتیدیل اینوزیتول است (۱). چون تولید CAMP وابسته به ATP است پس کاهش آن در سلول منجر به کاهش سطح CAMP و کاهش سنتز پروتئین می‌شود (۳۵). از طرف دیگر گزارش شده است که سنتز برخی از پروتئین‌های تنظیمی مثل PKC و کالمودولین بوسیله سرب مهار می‌شود (۱۰ و ۱۱) و نیز چون سنتز DNA به انرژی نیاز دارد، پس کمبود انرژی می‌توان منجر به کاهش سنتز DNA هم شود. مطالعات قبل آسیب به هسته سلول و حضور آنکلوژن را با سرب ۰/۵٪ به مدت ۲ ماه نشان داده است (۳۶ و ۳۷). اما در مطالعه حاضر وبا دوزهای بکار رفته تغییر خاصی در هسته دیده نشد. مطالعات بیشتر و دقیق‌تری برای توضیح علت تغییرات ایجاد شده در عملکرد و ساختمان غده‌های بزاقی لازم است.

- Shayganfar N, Abdollahi M, Dehpour AR. Lead determination in parotid and the rat submandibular gland. *Toxic Subs Mech* 1997; 17:121-131.
10. Georing PL. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology* 1993; 14:45-60.
11. Murakami K, Geng G, Chen SG. Inhibition of brain protein kinase C subtype by lead. *J Hum Pathol* 1993; 19: 223-235.
12. Boscolo P, Carmigani M. Neurohormonal blood pressure regulation in lead exposure. *Environ. Health Perspect* 1988; 78:101-106.
13. Fox DA, Srivastava D, Hurwitz RL. Lead induced alterations in rod-mediated visual functions and cGMP metabolism: new insights. *Neurotoxicology* 1994; 15:503 -512.
14. Sandhir R, Gill KD. Calmodulin and cAMP dependent synaptic vesicle protein phosphorylation in rat cortex following lead exposure. *Int J Biochem* 1994; 26: 1383-1389.
15. Andrzejewska A, Szynaka B, Stokowska W, Szynaka P. Dose lead acetate intoxication damage acinar cell nuclei in the rat pancreas? ultrastructural observations. *Mater.Med.* 1995; 27:43-46.
16. Abdollahi M, Dehpour AR, Fooladgar M. Alteration of rat submandibular gland secretion of protein, calcium and N-acetyl-D-glucosaminidase activity by lead. *Gen pharmacol* 1997; 29(1):675-680.
17. Abdollahi M, Dehpour AR, Baharnouri G. Effects of rubidium on the secretory function of changes in acinar cell mitochondria of colorimetric estimation of DNA. *Biochem J* 1996; 62:315-323.
18. Munro HM, Fleck A. The determination of nucleic acids. *Methods Biochem Anal* 1966; 14:113-176.
19. Burton K. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the rat pancreas in the course of lead intoxication. *Folia. Histochemica Cytobiologica* 1956; 34(1): 17-18.
20. Waterborg JN, Mattheus HR. The Burton assay for DNA, In: *Methods in molecular biology. Nucleic acids.* ed. J.M. Valke 1994; 2: 1-3.
21. Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randell RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
22. Jirakulsomchok D, Sheefz H, Schneyer CA. Effects of adriamycin on calcium concentration and morphology of mouse salivary glands. 1983; 12:491-501.
23. Abdollahi M, Shohrati M, Nikfar S, Jalali N. Monitoring of lead poisoning in bus drivers of Tehran. *Iran J Med Sci* 1995; 20:29-33.
24. Fernandez FJ, Kahn HL. Clinical methods for atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem Newsletter* 1971; 24:190-195.
25. Andrzejewska A, Szynaka B, Stokowska W. Ultrastructural evaluation of the rat parotid gland after six week intoxication with lead acetate mater. *Medica Pol* 1994; 27:43-46.
26. Ghazi-Khansari M, Mortazapour Z, submandibularsalivas and whole blood in rats.

- Toxic Subs Mech 1998; 16:327-335.
27. Sznaka B, Andrezejewska A. Ultrastructural changes in acinar cell mitochondria of the rat pancreas in the course of lead intoxication. *Folia Histochemical cytobiologica* 1996; 34(1):17-18.
28. Silbergeld EK, Swedo I, Cartwright I, Viega S, Custer EM. 1988. Lead arthritis and Cyclic lead poisoning following bullet wound, a clinicopathologic, ultrastructural and microanalysis study of two cases, *Nucleotide Res* 1998; 13:215-249.
29. Craan AG, Anvar-Malick M, P'an AYS. Segmental and intracellular distribution of lead in rat kidney and salivary glands. *Toxicology* 1986; 42:157-170.
30. Mobarak N, P'an AYS. Lead distribution in the saliva and blood fraction of rats after intraperitoneal injections. *Toxicology* 1984; 32:97-74.
- 31- Habermann E, Crowell K, Janicki P. Lead and other metals can substitute for Ca calmodulin. *Arch Toxicol* 1983; 54:61-70.
32. Bressler P, Goldstein GW. Mechanism of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmac* 1991; 41: 479-484.
33. Schanne FA, Gupter RK, Rosen JF. Lead inhibits 1,25 dihydroxy vitamin-D3 regulation of calcium metabolism in osteoblastic osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1180:187-194.
34. Kanagasuntheram P, Lim SC. Parallel secretion of secretory proteins and calcium by the rat parotid gland. *J Physiol* 1981; 312: 445-454.
35. Castle JD, Arvan P, Cameron R. Protein production and secretion in exocrine cells. *J Dent Res* 1987; 66:633-637.
36. Ghadially FN. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 4th ed. New York, Butterworth Heinemann inc. 1996; 1: 28-34.
37. petit TL, Leboutillier JC, Brooks WJ. Altered sensitivity to NMDA following developmental lead exposure in rats. *Pharmac Behav* 1992; 52:687-693.