مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۴ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۱ صفحات ۷۹- ۷۴

مطالعه نقش ویتامین E در کاهش سمیت آرسنیک بر اساس یافته‌های هیستوپاتولوژیک کبدی، هموگرام و گلوتاتیون پراکسیداز در موش صحرائی

آناهیتا رضائی: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: rezaie20a@yahoo.com
مرضیه حیدری: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
محمد راضی‌جلالی: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
مهدی پورمهدی بروجنی: گروه بهداشت و صنایع غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
حسین نجف‌زادهورزی: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
بابک محمدیان: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
علیرضا راکی: دستیار تخصصی رشته کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۹۰/۱۲/۱۰ **پذیرش**: ۹۱/۳/۱۷

چکیده

زمینه و اهداف: آرسنیک یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیطی است که مسمومیت با آن سبب ایجاد ضایعات مختلفی می‌گردد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی نقش محافظتی ویتامین E در مسمومیت کبدی حاصل از آرسنیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: جهت انجام این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرائی نژاد ویستار (۱۵ سر نابالغ و ۱۵سر بالغ) استفاده شد و هر گروه به سه زیرگروه پنج-تایی تقسیم گردید. زیر گروه اول از هر گروه به عنوان شاهد، فقط سرم فیزیولوژی، زیر گروه‌های۲ و۳ از هر گروه نیز، آرسنیک را روزانه به میزان ۳mg/kg به صورت زیر جلدی و زیر گروه ۳ علاوه بر آرسنیک روزانه ۴۰۰mg/kg ویتامین E به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۰روز دریافت نمودند. در پایان ۱۰ روز خونگیری و پس از کالبدگشایی، از کبد نمونه گرفته شد.

یافته‌ها: در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک تورم‌سلولی، تغییرچربی و نکروز هپاتوسیت‌ها، مهم‌ترین مشخصات میکروسکوپی کبد موش‌های صحرائی گروه ۲ بوده که این ضایعات با شدت کمتر در گروه ۳ نیز رویت گردید. لکوسیتوز به دنبال سمیت آرسنیک نیز مشاهده گردید، که در گروه ۳ از شدت کمتری برخوردار بود. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه آرسنیک کاهش معنی‌داری داشته، درحالی‌که تجویز ویتامین E اثر معنی‌داری بر تغییرات فعالیت این آنزیم نداشته است.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق حاکی است که ویتامین E بعضی جوانب سمیت ناشی از آرسنیک را برطرف نموده و از شدت تغییرات ناشی از آن تا حدودی می‌کاهد. بدیهی است انجام مطالعات تکمیلی با دوز بالاتر و یا دوره درمانی طولانی‌تر، ممکن است اثرات حمایتی بیشتری را القا نماید.

کلید واژه ها: ویتامین E، آرسنیک، موش صحرائی، گلوتاتیون پراکسیداز، پاتولوژی

مقدمه

آرسنیک از زمان‌های قدیم به عنوان یک سم شناخته شده است که اشکال آلی و معدنی آن به طور طبیعی در محیط وجود دارند. فرم معدنی آن (As_2O_3، آرسنیت) ۶۰ بار سمی‌تر از فرم آلی (As_2O_5،آرسنات) می‌باشد. مواجهه انسان با فرم غیرآلی عمدتا از طریق آب آشامیدنی آلوده صورت می‌گیرد. در قاره‌ی آسیا مسمومیت مزمن با آرسنیک در حال تبدیل شدن به یک اپیدمی جدی است، به گونه‌ای که بیش از ۱۰۰میلیون نفر در خطر مواجهه با آب‌های زیرزمینی آلوده با غلظت بالای آرسنیک می‌باشند (۱). آرسنیک در کبد دستخوش تغییرات بیومتیلاسیون شده و مونومتیل‌آرسنیک اسید و دی متیل آرسنیک، حاصل آمده که

سمیت آن را کاهش داده اما کاملا از بین نمی‌رود. حدود ۵۰ درصد از آرسنیک خورده شده می‌تواند در طی مدت ۳ الی ۵ روز از طریق ادرار دفع گردد. دی متیل آرسنیک در مقایسه با مونومتیل آرسنیک اسید، متابولیت غالب ادراری است. مقدار اندکی از آرسنیک معدنی نیز بدون تغییر دفع می‌شود. پس از مسمومیت حاد با این عنصر، مطالعات جذب اتمی نشان داد که بیشترین غلظت آرسنیک در کبد و کلیه‌ها وجود دارد. در مسمومیت مزمن، آرسنیک در کبد، کلیه، قلب و ریه و مقدار اندکی در عضلات، سیستم عصبی، دستگاه گوارش و طحال انباشته می‌شود. با وجود این‌که بیشترین میزان آرسنیک از این نواحی پاک می‌گردد، مقداری در بافت‌های غنی از کراتین از جمله ناخن، مو و پوست باقی می‌ماند (۲). ترکیبات آرسنیک اثرات سمی خود را به چند طریق اعمال می‌کنند. تداخل با عملکرد آنزیمی ممکن است در نتیجه‌ی اتصال آرسنیک سه ظرفیتی با گروه سولفیدریل موجود در آنزیم‌ها ایجاد گردد. همچنین آرسنیک معدنی یا متابولیت‌های آن ممکن است سبب القای استرس اکسیداتیو، تغییر بیان ژن و اختلال در تبادل سیگنال سلولی شوند (۳). نقش استرس اکسیداتیو در ضایعات ایجاد شده به دنبال مسمومیت با آرسنیک، موجب شده است که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها جهت اخذ نتایج بهتر درمانی در سمیت حاصل از آرسنیک مورد توجه قرار گیرد (۴). اثرات بهبود دهنده‌ی ویتامین E همواره مد نظر محققان مختلف بوده و تحقیقات متعددی در رابطه با آن انجام گرفته است. این ویتامین در حالت طبیعی به هشت فرم مختلف آلفا، بتا، گاما و سیگما توکوفرول و آلفا، بتا، گاما و سیگما توکوترینول وجود دارد. همه‌ی این موارد دارای پتانسیل نسبی فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند، اما آلفا توکوفرول دارای بیشترین تاثیر در جلوگیری از علائم کمبود این ویتامین است (۵). بنابراین هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین E در مسمومیت کبدی حاصل از آرسنیک در موش صحرائی می‌باشد. بدین منظور ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک و هماتولوژیک صورت گرفت. همچنین به‌منظور ارزیابی میزان دفاع آنتی‌اکسیدانی فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز گلبول‌های قرمز (GPX) نیز اندازه‌گیری گردید.

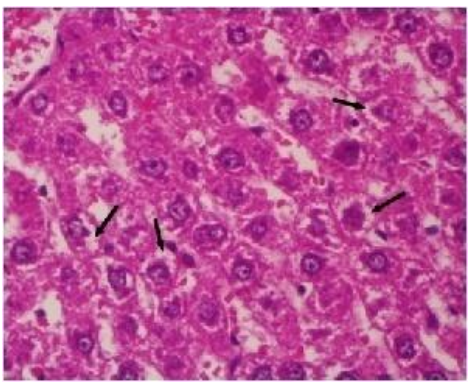
مواد و روش‌ها

تهیه موش‌های صحرائی و شرایط نگهداری: جهت انجام این مطالعه تعداد ۳۰ سر موش صحرائی نژاد ویستار از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه گردید. تعداد ۱۵ سر از موش‌های صحرائی نابالغ (با سن حدود ۷ هفته) و تعداد ۱۵ سر بالغ (با سن حدود ۱۰ هفته) بوده و هر گروه به طور تصادفی به سه زیرگروه پنج‌تایی تقسیم گردید. شرایط تغذیه و نگهداری برای همه‌ی موش‌های صحرائی یکسان در نظر گرفته شد. موش‌های صحرائی در قفس‌های مخصوص و در بستری از پوشال و در دمای ۲۳-۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی نگهداری شدند. در طول آزمایش، موش‌ها توسط جو و غذای آماده به فرم پلیت و آب آشامیدنی شهر اهواز تغذیه شدند. یک هفته پس از خریداری آنها به منظور عادت کردن به وضعیت جدید، مطالعه آغاز گردید. **تیمار گروه‌ها به ترتیب عبارت بودند از:** زیرگروه یک از هر گروه به عنوان گروه شاهد، روزانه ۵ mg/kg سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۰ روز دریافت نمودند. به زیرگروه دوم و سوم از هر گروه روزانه ۳mg/kg سدیم آرسنیت به صورت زیر جلدی به مدت ۱۰ روز تجویز شد (۶). زیرگروه سوم، ویتامین E را ۳۰ دقیقه پس از دریافت آرسنیک، به میزان ۴۰۰mg/kg به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۰روز دریافت کردند. بعد از گذشت ۲۴ساعت از تزریق آخرین دوز، یعنی در روز یازدهم مطالعه، حیوانات ابتدا توزین شده و پس از یک بیهوشی خفیف توسط کلروفرم، خونگیری از قلب توسط سرنگ آغشته به ماده‌ی ضد انعقاد هپارین صورت گرفت. **ارزیابی هیستوپاتولوژیک:** پس از انجام عمل لاپاراتومی، کبد را از محوطه‌ی بطنی بیرون آورده و جهت انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک، در محلول فرمالین بافر۱۰٪ قرار گرفتند. پس از طی مراحل پاساژ بافتی، بلوک‌های پارافینی تهیه شده و از آنها برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر بر روی لام قرار گرفته وسپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد. بعد از مونت کردن لام‌ها، بررسی‌های میکروسکوپیک انجام گرفت. **ارزیابی هماتولوژیک:** شمارش کامل خونی (CBC) نمونه‌های خون اخذ شده با شمارش و اندازه‌گیری شاخص‌های خونی شامل تعداد تام گلبول‌های سفید (WBC) و شمارش مطلق و درصد تفکیکی هر یک از گروه‌های گرانولوسیت (GRAN)، مونوسیت (MONO) و لنفوسیت (LYMPH)، شمار گلبول‌های قرمز (RBC)، پراکندگی حجم گلبول‌های قرمز (RDW)، میزان هموگلوبین (HGB)، هماتوکریت (HCT)، میانگین هموگلوبین گلبولی (MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC)، میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، شمارپلاکت‌ها (PLT)، میانگین حجم پلاکتی (MPV)، حجم توده پلاکتی (MCT) و پراکندگی حجم پلاکت‌ها (PDW) توسط دستگاه شمارشگر خودکار سلول‌های خونی ویژه دامپزشکی مدل BC-2800Vet (Mindray, China) انجام گردید. **اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX):** فعالیت GPX نمونه های خونی هپارینه بر مبنای روش Paglia و Valentine (۱۹۶۷) (منبع شماره ۲۱) و به وسیله کیت تجاری (RANSEL kit, Randox Com, UK) اندازه گیری شد. به طور خلاصه، آنزیم GPX فرآیند اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) به وسیله کومن هیدرو پراکسید را کاتالیز می نماید. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH، گلوتاتیون اکسید شده و در قبال تبدیل NADPH به $NADP^+$، مجدداً به فرم احیا تبدیل می شود و کاهش جذب نوری محلول در طی زمان محدود و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود. آنالیز آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به‌طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. به‌منظور

تحلیل داده‌های مربوط به وزن بدن، از آنالیز کوواریانس و داده‌های مربوط به فاکتورهای خونی و فعالیت گلوتاتیون‌پراکسیداز، از آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه استفاده گردید و P<۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید.

یافته‌ها

در جدول شماره ۱ میانگین و خطای معیار وزن موش‌ها به تفکیک گروه و روز آزمایش ارائه شده است. در بررسی آماری وزن، آنالیز کوواریانس نشان داد که گروه (P<۰/۰۱) و وضعیت بلوغ (P<۰/۰۵) اثر معنی‌داری روی وزن در روز ۱۰ آزمایش دارد، اما اثر متقابل گروه و وضعیت بلوغ روی وزن در روز ۱۰ معنی‌دار نمی‌باشد (P>۰/۰۵). گروه کنترل با گروه آرسنیک (P<۰/۰۰۱) و آرسنیک- ویتامین E (P<۰/۰۵) و گروه آرسنیک با آرسنیک- ویتامین E (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌داری دارد. مقایسه گروه ها در موش‌های نابالغ نیز نشان داد، گروه کنترل با آرسنیک تفاوت معنی‌داری دارد (P<۰/۰۱) اما گروه کنترل با گروه آرسنیک- ویتامین E تفاوت معنی‌داری ندارد (P>۰/۰۵). ضمنا گروه آرسنیک با گروه آرسنیک- ویتامین E تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۱). در موش‌های صحرائی بالغ گروه آرسنیک و گروه آرسنیک-ویتامین E تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۱) اما بین گروه کنترل با آرسنیک و آرسنیک-ویتامین E تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵). در بررسی پاتولوژیک نمونه‌های کبد ضایعات متعددی در گروه دریافت‌کننده آرسنیک مشاهده گردید. تورم سلولی (وجود فضاهای متعدد در سیتوپلاسم و عدم مشاهده یکپارچگی در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها) (تصویر ۱)، تغییر چربی (وزیکول‌های با اندازه‌های مختلف در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها) و نکروز (هپاتوسیت‌ها با سیتوپلاسم پررنگ‌تر و وجود هسته‌های پیکنوز شده که البته در برخی موارد کاملا از بین رفته‌اند) و کلانژیوهپاتیت (تجمع سلول‌های التهابی در فضای باب و لابلای هپاتوسیت‌ها) رویت گردیدند. در گروه سوم ضایعات شدت کمتری را نسبت به زیر گروه دریافت‌کننده آرسنیک نشان دادند.



تصویر ۱: گروه دریافت کننده آرسنیک، به فضاهای خالی مشاهده شده در درون هپاتوسیت‌ها (→) توجه شود (رنگ‌آمیزی H&E، ۴۰×).

جدول شماره ۱: توزیع مقادیر میانگین و خطای معیار وزن در موش‌های نابالغ و بالغ به تفکیک گروه

زمان	روز صفر	روز ۱۰*
گروه	میانگین± خطای معیار	میانگین± خطای معیار
کنترل (نابالغ)	۹۲±۴/۹	۱۱۴/۶±۳[a]
آرسنیک (نابالغ)	۷۰±۱۰	۸۲±۵/۸[b]
آرسنیک – ویتامین E (نابالغ)	۹۰±۱۰	۱۱۶/۶±۵/۸[a]
کنترل (بالغ)	۱۶۸±۳/۷	۱۸۸/۲±۴
آرسنیک (بالغ)	۱۷۶±۹/۸	۱۶۸±۹/۷[b]
آرسنیک-ویتامین E (بالغ)	۲۰۵±۵	۲۳۴/۵±۱۲/۲[a]

زمان‌هایی که در گروه‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند، با علامت (*) مشخص شده‌اند

حروف کوچک متفاوت در هر ستون، نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار می باشد

نتایج مربوط به پارامترهای هماتولوژیک در جدول شماره ۲ بیان شده است. آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که گروه، وضعیت بلوغ و اثر متقابل گروه و وضعیت بلوغ تاثیر معنی‌داری روی تغییرات شمارش تام گلبول‌های سفید، تعداد مطلق و درصد تفکیکی گرانولوسیت‌ها ندارد (P>۰/۰۵). تعداد تام گلبول‌های سفید در گروه آرسنیک نسبت به گروه شاهد، افزایش یافته اما این افزایش معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در مورد درصد لنفوسیت‌ها نیز، گروه اثر معنی‌داری داشت (P>۰/۰۱) اما وضعیت بلوغ و اثر متقابل گروه و وضعیت بلوغ تاثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). آنالیز واریانس دوطرفه سایر شاخص‌های هموگرام نشان داد که گروه، تاثیر معنی‌داری روی پارامترهای RBC، HGB، هماتوکریت، MCH، MCHC، PLT و PCT دارد (P>۰/۰۵). وضعیت بلوغ نیز بر روی پارامترهای RBC، HGB، MCV، RDW، MPV و PDW دارای تاثیر معنی‌داری می‌باشد (P>۰/۰۵). اما اثر متقابل گروه و وضعیت بلوغ روی پارامترهای تحت بررسی تاثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). اطلاعات مربوط به میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در جدول شماره ۳ ذکر شده است.

جدول شماره ۳: توزیع مقادیر میانگین و خطای معیار فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز (U/L) در موش‌های نابالغ و بالغ به تفکیک گروه

گروه	میانگین± خطای معیار
کنترل (نابالغ)	۷۱۶۵±۵۳۷/۸[a]
آرسنیک (نابالغ)	۴۸۴۱±۶۸۰/۵[b]
آرسنیک-ویتامین E (نابالغ)	۵۲۱۲±۴۸۷[b]
کنترل (بالغ)	۶۰۵۲/۹±۱۶۸[a]
آرسنیک (بالغ)	۴۸۹۷/۵±۳۶۹[b]
آرسنیک-ویتامین E (بالغ)	۴۱۱۷±۴۳۳[b]

آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که گروه، بر خلاف وضعیت بلوغ و اثر متقابل گروه و وضعیت بلوغ، تاثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز دارد (P<۰/۰۰۱). مقادیر گلوتاتیون-پراکسیداز گروه شاهد با گروه آرسنیک و آرسنیک - ویتامین E تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱).

جدول شماره۲: توزیع مقادیر میانگین و خطای معیار پارامترهای هماتولوژیک در موش‌های نابالغ و بالغ به تفکیک گروه

گروه پارامتر	کنترل (نابالغ)	کنترل (بالغ)	آرسنیک (نابالغ)	آرسنیک (بالغ)	آرسنیک-ویتامین E (نابالغ)	آرسنیک-ویتامین E (بالغ)
WBC (K/µl)*	۶۳۷۷/۸±۷۷۱/۳^{b}	۷۶۲۵±۴۰۱/۶	۹۲۰۰±۸۸۶^{a}	۷۰۵۰±۴۴۳/۳	۷۳۲۵±۱۱۱۹/۸^{a}	۷۹۲۵±۱۱۵۸/۲
Lymph (K/µl)	۴۵۷۲±۵۳۴	۵۳۵۱±۲۹۰	۶۲۷۰±۵۱۳	۴۸۶۵±۴۲۹	۴۸۹۰/۸±۸۸۷/۱	۴۶۸۳±۵۵۵
Lymph %*	۷۲/۲±۱/۵^{a}	۷۰/۴±۱/۸^{a}	۶۳/۶±۱/۲	۶۸/۸±۲/۳^{a}	۶۵/۵±۵^{b}	۶۰/۲±۳^{b}
Mono (K/µl)*	۲۲۴/۵±۳۴^{b}	۲۷۵±۲۸/۶	۴۱۷/۵±۵۵/۴^{a}	۲۸۳/۶±۲۹/۲	۲۷۴/۷±۴۸/۵^{a}	۴۰۶/۵±۶۷/۲
Mono (%)	۳/۷±۰/۴	۳/۶±۰/۳^{b}	۴/۷±۰/۳	۴±۰/۳	۳/۶±۰/۳	۵/۶±۰/۸^{a}
Gran (K/µl)*	۱۵۸۱/۳±۲۲۹/۷^{b}	۱۹۹۹±۲۰۷/۲	۲۵۱۲/۵±۳۲۵/۶^{a}	۱۹۱۷/۶±۹۱/۱	۲۱۵۹/۵±۳۸۳^{a}	۲۸۳۵/۵±۵۷۸/۸
Gran (%)	۲۴/۳±۱/۱	۲۶±۱/۵^{b}	۲۷±۱	۲۷/۴±۲/۲^{b}	۳۰/۵±۴/۷	۳۴/۷±۳/۳^{a}
RBC (M/µl)*	۷/۲۹±۰/۲ ^{a}	۶۹۴۰۰۰۰±۱۱۶۱۰۰^{a}	۷/۶۵±۰/۴^{a}	۶۷۹۰۰۰۰±۱۵۴۲۰۰^{a}	۵/۴۵±۰/۲ ^{b}	۴۶۱۰۰۰۰±۴۶۵۲۰۰^{b}
HGB (g/dl)*	۱۲±۰/۴^{a}	۱۱/۶±۰/۳^{a}	۱۲/۲±۰/۸^{a}	۱۰/۸±۰/۲^{a}	۹/۲±۰/۵^{b}	۸/۲±۰/۸^{b}
HCT (%)*	۳۸/۳±۱/۴^{a}	۳۷/۳±۰/۶^{a}	۴۰/۱±۲/۶^{a}	۳۶±۰/۶^{a}	۲۹±۱/۵^{b}	۲۵/۸±۲/۱^{b}
MCV(fL)	۵۲/۶±۰/۶	۵۳/۸±۰/۵	۵۲/۴±۱/۱	۵۳/۲±۰/۷	۵۳/۲±۱/۱	۵۸/۳±۱/۲
MCH (pg)*	۱۶/۵±۰/۲	۱۶/۷±۰/۳^{b}	۱۶±۰/۳	۱۶±۰/۱^{b}	۱۷±۰/۴	۱۸±۰/۳^{a}
MCHC (g/dL)*	۳۱/۴±۰/۳^{a}	۳۱/۱±۰/۴^{a}	۳۰/۵±۰/۲^{b}	۳۰±۰/۲^{b}	۳۱/۸±۰/۲^{a}	۳۱/۹±۰/۳^{a}
RDW(%)	۱۴/۵±۰/۴	۱۳±۰/۵	۱۴/۸±۰/۲	۱۴/۳±۰/۶	۱۵/۸±۰/۸	۱۲/۳±۰/۸
PLT (K/µl)*	۳۳۸۰۰۰±۱۴۶۱۰^{b}	۳۳۳۹۰۰۰۰±۳۷۱۳۰^{b}	۳۶۱۰۰۰±۱۳۳۴۰^{a}	۴۱۸۰۰۰±۵۱۵۶۰	۴۱۲۰۰۰±۳۹۷۵۰^{a}	۴۷۶۰۰۰±۱۳۴۳۰^{a}
MPV(fL)	۵/۷۲±۰/۱	۵/۹±۰/۲	۵/۷۲±۰/۱	۵/۸±۰/۰۳	۵/۷±۰/۱	۵/۸±۰/۱
PDW(%)	۱۴/۶۹±۰/۱	۱۴/۹±۰/۱	۱۴/۶±۰/۱	۱۴/۴±۰/۱	۱۴/۷۶±۰/۱	۱۴/۹±۰/۱
PCT(%)*	۰/۲±۰/۰۰۸ ^{b}	۰/۲±۰/۰۲^{b}	۰/۲۱±/۰۰۸^{a}	۰/۲±۰/۰۳	۰/۲۴±۰/۰۲۵ ^{a}	۰/۳±۰/۰۰۹^{a}

بحث

مسمومیت با آرسنیک از جمله بیماری‌های قابل توجه در پزشکی و دامپزشکی محسوب می‌گردد. این عنصر سمی بر ارگان-های مختلف بدن اثر گذاشته و کبد یکی از بافت‌های هدف آن می‌باشد. در این مطالعه اثر آرسنیک به تنهایی و نیز همراه با مصرف ویتامین E بر تغییرات وزن، آسیب‌شناسی بافت کبد، پارامترهای هماتولوژیک و میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بررسی شد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر در ارتباط با تغییر وزن، نشان داد که گروه آرسنیک، کمترین میزان افزایش وزن را داشته است، به گونه‌ای که موش‌های بالغ این گروه پس از پایان روز یازدهم در مقایسه با روز نخست آزمایش، کاهش وزن داشتند که البته این کاهش وزن نسبت به روز اول در همین گروه معنی‌دار نبود. در آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری از نظر وزن در روز ۱۰ آزمایش بین موش‌های صحرائی نابالغ گروه کنترل و آرسنیک و گروه آرسنیک با گروه آرسنیک–ویتامینE وجود دارد (P<۰/۰۱). اختلاف وزن در موش-های صحرائی بالغ نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر وزن در روز ۱۰ آزمایش بین گروه آرسنیک و گروه آرسنیک ویتامین E وجود دارد (P<۰/۰۵). کومار و همکاران در مطالعه‌ای با افزودن سدیم آرسنیت در آب آشامیدنی موش‌های صحرایی، نشان دادند که وزن گروه تیمار شده با آرسنیک در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌داری کاهش یافته است (۷) که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. آرتیل و همکاران نیز گزارش نمودند که در معرض قرارگیری با آرسنیک با دوز۴۹ppm به مدت ۷ ماه، باعث کاهش معنی‌دار وزن در موش‌ها شده به طوری که این کاهش وزن در روز پایانی آزمایش معادل ۱۳٪ بود (۸). همچنین ایسلام و همکاران نشان دادند که مسمومیت تجربی با آرسنیک در موش‌ها به طور معنی‌داری سبب کاهش وزن بدن گردید (۹). شارما و همکاران نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که وزن گروه دریافت‌کننده آرسنیک در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (۱۰). نتایج بررسی‌های فوق با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق هم‌خوانی دارد.

ضایعات هیستوپاتولوژیک کبد مشاهده شده در تحقیق حاضر، در گروه دریافت‌کننده آرسنیک شامل تورم سلولی، تغییر چربی (لیپیدوز)، کلانژیوهپاتیت و نکروز کانونی می‌باشد. مانا و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که تزریق داخل صفاقی سدیم آرسنیت با دوز ۱۰mg/kg به مدت دو روز، منجر به نکروز گسترده‌ای در طول ورید مرکزی کبد در موش سوری می‌شود. بر اساس نتایج آن‌ها نکروز به صورت مرکز لوبولی بوده و تمام لوب‌های کبد را درگیر کرده بود (۱۱). علت گستردگی نکروز در مطالعه فوق و تفاوت آن با تحقیق حاضر را می‌توان به دوز بالای سدیم آرسنیت مورد استفاده نسبت داد.

نایر و همکاران نیز طی بررسی هیستوپاتولوژیک کبد متعاقب تجویز آرسنیک در موش صحرایی، نشان دادند که تری‌اکسید آرسنیک باعث به‌هم ریختگی ساختار سلول‌های کبدی، نکروز کانونی سلول‌ها به همراه پیکنوزه شدن هسته و نیز نفوذ لکوسیت‌ها می‌گردد (۱۲). نایر و همکاران در مطالعه‌ای با ایجاد مسمومیت تحت حاد توسط افزودن دوزهای متعدد آرسنیت در آب آشامیدنی موش‌های صحرائی نژاد ویستار، تغییرات پاتولوژیک کبد را بررسی کرده و واکوئله شدن سلول‌های کبدی با الگوی پری‌آسینار را که نمایانگر دژنراسیون چربی می‌باشد در گروه‌های دریافت‌کننده آرسنیک گزارش نمودند. ایشان همچنین اشاره کردند شدت این ضایعه با افزایش دوز آرسنیک رابطه‌ی مستقیم داشته است (۱۳). تغییرات پاتولوژیک مطالعه فوق با تحقیق حاضر هم‌سو می‌باشد.

در مطالعه‌ی دیگر که توسط سانترا و همکاران صورت گرفته نیز دژنراسیون چربی، التهاب و نکروز سلول‌های کبدی به دنبال تجویز دوزهای مختلف آرسنیت در موش سوری گزارش شده است (۶). کومار و همکاران نیز در مطالعه‌ای آرسنیت سدیم را به میزان ۱۰۰ppm به آب آشامیدنی موش‌های صحرائی اضافه کرده و تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد را بررسی کردند. نتایج حاصل از تحقیق آنها شامل به‌هم ریختگی الگوی ساختمانی سلول‌های کبدی، نکروز شدید، واکوئله شدن سلول‌های کبدی و حضور تعداد زیادی لنفوسیت در فضای باب بود. همچنین آنها حضور کانون‌هایی از آماس در لوبول‌های کبدی به همراه لایه‌ای از لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها در اطراف این کانون‌ها را گزارش کرده و آن‌ها را گرانولوما نامیدند (۷). تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد که در تحقیق حاضر مشاهده گردید، با بخش عمده‌ای از ضایعات مشاهده شده در مطالعات فوق هم‌خوانی دارد و اختلافات مشاهده شده را می‌توان به تفاوت در دوز، روش و مدت تجویز و همچنین نوع نمک آرسنیک نسبت داد.

تغییرات شمارش تام گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در گروه آرسنیک در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان نداد. در گروه آرسنیک– ویتامین E اگرچه شمار متغیرهای فوق‌الذکر افزایش یافته است، اما میزان این افزایش‌ها در مقایسه با گروه آرسنیک کمتر بود. مسمومیت مزمن آرسنیک می‌تواند بر روی سیستم خونساز اثر گذاشته و سبب دپرسیون برگشت‌پذیر مغز استخوان به همراه پان‌سیتوپنی شوند. آنمی و لوکوپنی به طور معمول در مسمومیت مزمن آرسنیک رخ داده و اغلب با ترومبوسیتوپنی و ائوزینوفیلی ملایم همراه هستند. آنمی ممکن است نورموسیتیک یا ماکروسیتیک بوده و بازوفیلی دانه دانه ممکن است در حاشیه‌ی گسترش خونی مشاهده شود (۲). فلورا و همکاران در تحقیقی که بر روی استرس اکسیداتیو حاصل از آرسنیک انجام دادند کاهش قابل توجهی را در میزان گلوبول‌های سفید، گلوبول‌های قرمز و اندیکس‌های هموگلوبین گزارش نمودند که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد (۱۴). این امر ممکن است به علت طول دوره آزمایش باشد. ایشان در تحقیق فوق ۱۰ هفته آرسنیک را تجویز نمودند و تاثیرات آن به صورت مسمومیت مزمن نمایان گشته است. جین و همکاران نیز طی مطالعه‌ای بر روی مسمومیت کبدی حاصل از آرسنیک و تاثیرات حفاظتی سیلیمارین، کاهش معنی‌داری در میزان لکوسیت‌ها گزارش نمودند که برخلاف نتیجه بدست آمده از این تحقیق می‌باشد. ایشان نیز طول دوره درمان طولانی (۸ ماه) داشته‌اند (۱۵). گوپتا و همکاران تاثیرات حمایتی دانه *Moringa oleifera* را به مدت ۶ هفته بر روی استرس اکسیداتیو حاصل از آرسنیک بررسی نموده و ایشان لکوسیتوز را در گروه دریافت کننده آرسنیک مشاهده نمودند که با یافته تحقیق حاضر همخوانی دارد. بر اساس سایر گزارشات آرسنیک در مسمومیت حاد موجب لکوسیتوزو نوتروفیلی می‌گردد (۱۶).

طبق مطالعات محققین، مکانیسم پیشنهادی آسیب کبدی حاصل از مسمومیت با آرسنیک شامل، اختلال در تنظیم متابولیسم لیپیدها که منجر به استئاتوز می‌گردد، استرس اکسیداتیو و تغییر در سطوح متیلاسیون سلولی می‌باشد (۱۷و۸). تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن توسط آرسنیک، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌ها می‌گردد (۱۸). در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه آرسنیک در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. در استرس‌های اکسیداتیو سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر-اکسید دیسموتاز در گلبول‌های قرمز خون کاهش می‌یابد که این امر به علت مقابله با عوامل اکسیدان می‌باشد. شی و همکاران نشان دادند که به دنبال مسمومیت با آرسنیک، تولید رادیکال‌های اکسیژن افزایش می‌یابد، آسیب به DNA سلولی و تغییر فعالیت سلولی به سمت توموری شدن تشدید می‌گردد. ایشان گزارش نمودند که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها نه تنها از آسیب مستقیم سلولی توسط آرسنیک جلوگیری کرده و باعث افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز می‌شود، بلکه مکانیسم‌های منجر به توموری‌شدن سلول را می‌کاهد (۱۹). با این وجود مصرف ویتامین E در این مطالعه نتوانست کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز را به طور معنی‌دار جبران نماید، هر چند که میزان فعالیت این آنزیم در گروه آرسنیک–ویتامین E در هر دو گروه بالغ و نابالغ بیش از میزان آن در گروه آرسنیک بود. به عبارت دیگر در ارتباط با تغییرات در میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز استفاده از این مقدار ویتامین E با روش و دوز مورد استفاده نتوانست از کاهش فعالیت این آنزیم به دنبال مسمومیت با آرسنیک جلوگیری نماید. احمدی-زاده و باغ‌پا نیز در بررسی اثرات حمایتی ویتامین E در مسمومیت کبدی و کلیوی حاصل از کادمیوم گزارش نمودند که ویتامین E اثر قابل ملاحظه‌ای بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و همچنین بافت-های کبد و کلیه نداشته که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هم-خوانی دارد (۲۱–۲۰).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج آزمایشات هماتولوژیک و یافته‌های هیستوپاتولوژیک، می‌توان نتیجه گرفت که کبد از جمله ارگان‌های هدف در مسمومیت با آرسنیک بوده و تغییرات متعددی از جمله تورم سلولی، تغییر چربی، نکروز کانونی سلول‌های کبدی و کلانژیوهپاتیت به دنبال این مسمومیت در کبد ایجاد می‌گردد. همچنین میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز نیز به‌صورت معنی‌دار کاهش می‌یابد. هرچند ویتامین E دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می-باشد، اما در مطالعه حاضر تاثیر قابل توجهی در کاهش سمیت کبدی آرسنیک نداشته ولی به طور معنی‌دار باعث جلوگیری از کاهش وزن در گروه تحت درمان شد. با این وجود رژیم حاوی

ترکیبات آنتی‌اکسیدان بویژه ویتامین E به طور مستمر بدن را در برابر آثار نامطلوب آلاینده‌های شیمیایی محافظت می‌کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت حمایت مالی این طرح تحقیقاتی ابراز می‌دارند. همچنین از جناب آقای بهداروند و سرکار خانم بهداروند که در آزمایشگاه پاتولوژی کمال همکاری را داشتند تشکر می‌نمایند.

References

1. Chen H, Li S, Liu J, Diwan BA, Barrett. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypo methylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 1779-1786.
2. Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Medicine Journal* 2003; **79**: 391-396.
3. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. 11th ed. McGraw-Hill Medical, USA, 2009; PP: 1219-1221.
4. Flora SJS. Arsenic- induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2, 3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 1999; **26**: 865-869.
5. Mirmomeni MH, Amini A, Hosseinzade KA, Omidi F. [Effects of vitamin E on cell and sinusoidal changes of male rat livers, induced by aflatoxin B1]. *Journal of Babol University of Medical Sciences 2006;* **4**: 13-21.
6. Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; **22**: 146-155.
7. Kumar A, Malhotra A, Nair P, Garg ML, Dhawan DK. Protective role of zinc in ameliorating arsenic-induced oxidative stress and histological changes in rat liver. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2010; **29**: 91-100.
8. Arteel GE, Guo L, Schlierf T, Beier JI, Kaiser JP, Chen TS. Sub hepatotoxic exposure to arsenic enhances lipopolysaccharide- induced liver injury in mice. Toxicology and applied pharmacology 2008; **226**: 128-139.
9. Islam AKMS, Awal MA, Ban ASM, Rahman MM, Begum S. Effects of experimentally induced toxicities with arsenic trioxide on body weight in different organs in mice. *Bangladesh Veterinary Medicine Journal* 2001; **35**: 151-153.
10. Sharma A, Sharma MK. Protective effect of Mentha piperita against arsenic-induced toxicity in liver of swiss albino mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Journal* 2006; **100**: 249-257.
11. Mana P, Sinha M. Protection of arsenic-induced hepatic disorder by arjunolic acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Journal 2007*; **101**: 333-338.
12. Nair SB, Jhala DD, Chinoy NJ. Beneficial effects of certain antidotes in mitigating fluoride and/or arsenic induced hepatotoxicity in mice. Fluoride 2004; **37**: 60-70.
13. Nain S, Smits JEG. Pathological, immunological and biochemical markers of sub chronic arsenic toxicity in rats. *Environmental Toxicology* 2010; **101**: 333.
14. Flora SJS, Bhadauria S, Pant SC, Dhaked RK. Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its response to some thiol chelators in rats. *Life Sciences* 2005; **77**: 2324-2337.
15. Jain A, Yadav A, Bozhkov AI, Padalko VI, Flora SJS. Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic- induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010; **75**: 607-614.
16. Gupta R, Dubey DK, Kannan GM. Concomitant administration of Moringa oleifera seed powder in the remediation of arsenic- induced oxidative stress in mouse. *Cell biology International* 2007; **31**: 44-56.
17. Chen H, Li S, Liu J, Diwan BA, Barrett JC. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypo methylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 1779-1786.
18. Rana SVS. Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of trace elements in medicine and biology* 2008; **22**: 262-284.
19. Shi H, Shi X. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry* 2004; **255**: 67-78.
20. Ahmadizade M. [Effects of vitaminE inpreventingthe adverseeffects of cadmiumchlorideinratliverandkidney]. *Medical Science Journal* 2007; **6**: 413.
21. Paglia DE. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 1967; **70**: 158–169.