

بررسی فراساختاری، مورفولوژیک و موفومتريک اثرات مزمن کلراید آلومینیوم بر روی بافت کبد خرگوش

امیر امنیت طلب^{۱*}، ایرج سهرابی حدوست^۲، فرخ قوام^۳، شهرام شهریار^۴

تاریخ دریافت: 1391/07/11 تاریخ پذیرش 1391/09/26

چکیده

پیش زمینه و هدف: آلومینیوم یک فلز پر مصرف است که باعث ایجاد اختلالات بسیاری در ارگان‌های مختلف بدن می‌شود. در این تحقیق اثرات کلراید آلومینیوم در طولانی مدت به صورت فراساختاری، مورفولوژیک و موفومتريک بر روی بافت کبد خرگوش مورد ارزیابی قرار گرفته است. **مواد و روش کار:** ۲۰ سر خرگوش در دو گروه کنترل و تحت مطالعه به تعداد مساوی قرار داده شدند. ۵.۱۲ mg/kg کلراید آلومینیوم به گروه تحت مطالعه و به همان مقدار آب دیونیزه در مدت ۷ هفته به صورت داخل صفاقی و در شرایط بیهوشی تزریق شد. مقاطع بافتی برای بررسی میکروسکوپ الکترونی و نوری با روش استاندارد تهیه شدند. مطالعه همزمان کمی و کیفی با بررسی تصاویر تهیه شده انجام شد و با استفاده از آنالیز آماری موفومتريکی شدند. **یافته‌ها:** از لحاظ مورفولوژیکی ارتشاح سلول‌های لمفوسیتی، تغییر چربی در پارانشیم کبد، افزایش بافت همبند رشته‌ای در پیرامون ورید چه مرکزی و از لحاظ فراساختاری واکوئوله شدن میتوکندری، دژنره شدن شبکه اندوپلاسمیک خشن و هتروکروماتیک شدن هسته هیپاتوسیت‌ها مشاهده شد. موفومتريکی نیز کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) نصف قطر لوپول‌ها و نسبت‌های حجمی ارگان‌های هیپاتوسیت‌ها در گروه تیمار نسبت به کنترل نشان داد. **بحث و نتیجه گیری:** تحقیقات پیشین نشان دهنده اثرات مختلف بافتی آلومینیوم از طرق متفاوت مثل پر اکسیداسیون لیپیدها، آسیب به غشای پایه سلولی و آسیب DNA می‌باشد. در تحقیق حاضر احتمالاً تولید رادیکال‌های آزاد، اختلال در متابولیسم گلیکوژن و پروتئین از مهم‌ترین علل آسیب توسط آلومینیوم باشد. **کلید واژه‌ها:** کلراید آلومینیوم، کبد خرگوش، آسیب شناسی فراساختاری، موفومتريکی، موفومتريکی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره هفتم، ص ۷۲۱-۷۱۳، ویژه‌نامه اسفند ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده دامپزشکی، صندوق پستی ۹۶۹ تلفن ۰۹۱۴۴۴۱۴۶۱۳

Email: a.amniattalab@iaurmia.ac.ir

مقدمه

سلول‌های خونی و نارسایی کلیوی می‌شوند و رسوب آن در پارانشیم کبد و مجاری کانالیکیول صفراوی منجر به ایجاد سنگ‌های داخل کبدی و کولستاز و نهایتاً التهاب مجاری صفراوی را به دنبال خواهد داشت (۴،۳). در موارد مسمومیت انسان بافت‌های کلیه، کبد، ریه، استخوان و سیستم اعصاب مرکزی آسیب می‌بینند. در حیوانات علاوه بر مبتلا کردن این ارگان‌ها، اثرات مربوط به رشد نیز ایجاد می‌کند. همچنین این فلز می‌تواند از راه باران اسیدی وارد آب تازه شده و باعث مرگ ماهی با صدمه رساندن به آبشش آن‌ها شود (۱). این فلز در محصولات غذایی یافت می‌شود. منبع آلومینیوم به ویژه غلات، پنیر زرد، نمک، گونه‌های گیاهان ادویه‌جات، چای، لوازم آرایشی، ظروف آلومینیومی و خاک و گرد و غبار موجود در هوا می‌باشد.

آلومینیوم یکی از مهم‌ترین فلزات است که به صورت فراگیر، فراوان‌ترین فلز و سومین عنصر فراوان پوسته زمین محسوب می‌شود (۱). این فلز و املاح آن در خاک کشاورزی به وفور یافت می‌شود و از این طریق وارد مواد غذایی و از آنجا وارد بدن می‌شود و یا به صورت املاح فلزی وارد آب‌های شرب می‌گردد (۲). بنابراین ورود بیش از حد این فلز و ترکیبات آن به بدن می‌تواند سلامت شخص را به خطر اندازد. به عنوان مثال در بیماری آلزایمر، انسفالوپاتی و آنمی در افرادی که مدت زیادی تحت همودیلیز بوده‌اند، افزایش بیش از حد آلومینیوم را در بدن عامل مهم در بروز آن‌ها می‌دانند. ثابت شده است که در معرض قرار گرفتن طولانی مدت با این فلز باعث تغییرات وسیع عروقی،

^۱ استادیار پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ استاد پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

^۳ استاد پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۴ استادیار پاتولوژی، گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج

مقدار 12.5 mg/kg آلومینیوم کلراید که به صورت پودر محلول در آب مقطر دو بار تقطیر بود هر روز و به مدت ۷ هفته به صورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه کنترل آب مقطر دیونیزه عیناً تزریق شد. بعد از انجام تزریقات، خرگوش‌ها به مدت ۱۲ ساعت گرسنه نگه داشته شدند و آن‌ها فقط اجازه داشتند آب بنوشند و سپس آن‌ها را با تزریق داخل عضلانی کتامین با دوز 50 mg/kg بیهوش شدند پس از کالبد گشایی نمونه برداری از مرکز کبد صورت گرفت و در محلول فیکساتیو ۲/۵ درصد گلو تارآلدئید (برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی) و در محلول فیکساتیو بافر فرمالین ۱۰ درصد برای مطالعه با میکروسکوپ نوری قرار داده شد.

برای مطالعه میکروسکوپ نوری بعد از تثبیت نمودن، با الکلی آبگیری و با زایلین شفاف سازی و سپس با پارافین قالب گیری و مقاطع ۵ میکرونی با رنگ آمیزی معمولی (H&E)، پریودیک اسید شیف (PAS) و آبی آلسین (Alcian blue) آماده شدند. برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی بعد از تثبیت نمودن، با استون آبگیری، با رزین آردایت (نوع Medium شرکت Prostech استرالیا) قالب گیری و مقاطع ۵۰ نانومتری با یورانیل استات و سیترات سرب رنگ آمیزی شدند و از مقاطع مورد نظر میکروگراف های نوری و الکترونی تهیه شد. تصاویر فراساختاری توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی Jeol ژاپنی مدل JEM – 200CX تهیه شده و در رایانه ذخیره شدند.

در این مرحله میکروگراف های تهیه شده بعد از اسکن و ذخیره در رایانه، بافت های مورد نظر از لحاظ تغییرات مورفولوژیک ظاهری نظیر وجود التهاب، افزایش نسوج ترمیمی، از بین رفتن نظم لبول های کبدی و بررسی فرا ساختاری نظیر کم شدن فضای دیسی، هتروکروماتین شدن هسته هپاتوسیت ها و سایر موارد مورد بررسی دقیق قرار گرفتند.

بررسی کمی Morphometry

الف) محاسبه نسبت حجمی Volume Fraction (Vv) از میکروگراف الکترونی و نوری اسکن به عمل آمد سپس با استفاده از صفحات شطرنجی خاص (Latic) نقاط برخورد ارگانل ها و کل سلول شمارش و محاسبه گردید. از آنجا که هدف مطالعه حاضر بررسی نسبت های حجمی است و هم با عنایت به اینکه حجم از رابطه $V=A \times h$ بدست می آید. در این فرمول حجم = V ، مساحت = A و ارتفاع = h می باشد. از آنجا که ضخامت برش های فوق نازک ۵۰ نانومتر بوده و این ضخامت برای تمام نمونه ها یکسان بوده است به راحتی با توجه به اینکه در مطالعه حاضر هدف محاسبه نسبت های حجمی بوده است یعنی

$$\frac{\text{حجم ارگانل}}{\text{حجم کل سلول}} = \frac{V_1}{V_2} = \frac{A_1 \times h_1}{A_2 \times h_2}$$

همچنین در داروها نیز این فلز یافت می شود و به آب آشامیدنی به منظور تصفیه و بهبود رنگ آن افزوده می شود (۵). آلومینیوم از سه راه خوراکی، استنشاقی و پوستی می تواند جذب شود. ولی از راه پوستی بسیار کم قابل جذب است. استنشاق ذرات آلومینیوم احتمال دارد مستقیماً آن‌ها را از طریق سیستم بویایی وارد بافت مغز می کند. جذب از طریق گوارش بستگی زیادی به pH و نیز وجود لیگاندهای کمپلکس خصوصاً اسیدهای کربوکسیلیک که قابل جذب باشند دارد. به عنوان مثال جذب روده ای وابسته به وجود سیترات است کمپلکس سیترات خودش قابل جذب نیست ولی آلومینیوم را برای انتقال از راه های دیگر در طول دستگاه معده ای روده ای قابل دسترس می کند. سیلیکون یک ممانعت کننده بالقوه برای جذب آن از دستگاه گوارش است و احتمالاً میزان ترشح ادراری را نیز بیشتر می کند (۱). آلومینیوم می تواند باعث جراحت مرگ سلولی در کبد شود. فرضیه ای بیان می کند که آلومینیوم به پروتئین های سیتواسکلتی که مربوط به غشای پلاسمایی هستند متصل می شود. اینکار باعث بهم خوردن عمل نفوذ پذیری سد غشای سلولی می شود و نهایتاً باعث مرگ هپاتوسیت ها می گردد (۶).

مکانیزم های جذب کبدی آلومینیوم به خوبی روشن نیست و این مسأله ناشناخته است که آیا آلومینیوم مستقیماً برای سلول های کبدی مسمومیتزا است و یا اگر مسمومیت اتفاق می افتد ناشی از اثر آن بر روی متابولیسم آهن کبدی است (۷). از آنجا که کبد اولین عضوی است که در مسیر دستگاه گوارش مسئول جذب و سم زدایی مواد مضر می باشد طبیعی است که مواد سمی به خصوص املاح فلزی نظیر آلومینیوم می توانند چه در کوتاه مدت و چه در بلند مدت اثرات سویی بر بافت های کبدی ایجاد کند. در بررسی حاضر اثرات هیستوپاتولوژیک کلراید آلومینیوم هم از دیدگاه میکروسکوپ نوری و هم میکروسکوپ الکترونی بر روی بافت های کبدی خرگوش به صورت توأم ارزیابی می شود. در ضمن با مورفومتری اجزا و ارگانل های بافتی کبد سعی شده که اثرات طولانی مدت تجویز کلراید آلومینیوم بر روی مقادیر کمی ارگانل ها مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد.

مواد و روش کار

خرگوش های نر سفید نیوزیلندی از انیستیتو پاستور تهران خریداری شد و به حیوان خانه انتقال یافتند. بعد از وزن کشی، خرگوش ها به دو گروه (هر گروه شامل ۱۰ سر) تقسیم شدند. خرگوش ها در شرایط آزمایشگاهی استاندارد نگهداری شدند (دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰٪ و دوره روشنایی آن ها همان ساعات روشن روز بود). به گروه تحت مطالعه

فضای پورت که تقریباً معادل نیمی از ضخامت اصلی کبد را شامل می‌شود در فتو میکروگراف‌های نوری مورد اندازه گیری مورفومتری قرار گرفتند. بزرگنمایی لنز میکروسکوپ نوری برای مورفومتری $X10$ و با مقیاس $scale\ bar = 100\ \mu m$ و برای میکروسکوپ الکترونی $scale\ bar = 1\ \mu m$ در نظر گرفته شد که توسط نرم افزار Image محاسبه و تهیه شد.

آنالیز آماری:

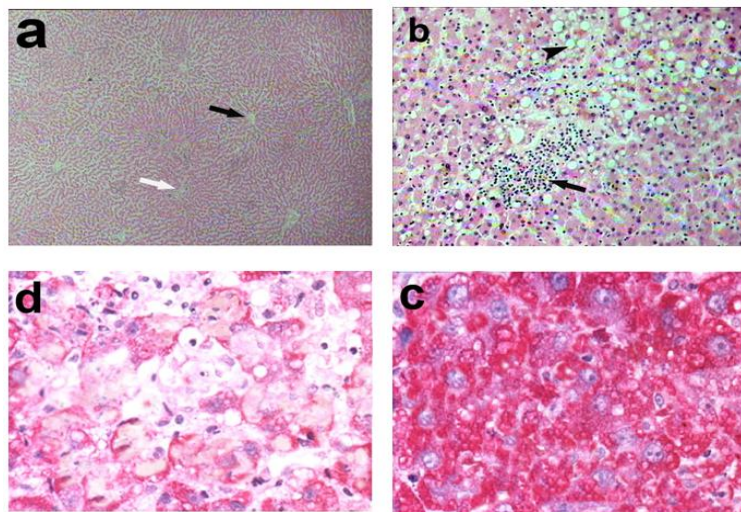
پس از مورفومتری تصاویر میانگین اجزای فوق و همچنین قطر لبول‌ها برای هر نمونه (در هر نمونه حدود ۱۰ میدان بافتی مورد اندازه گیری قرار گرفت) و سپس کل نمونه‌ها در گروه‌های کنترل و تحت مطالعه محاسبه شد و سپس با روش‌های آماری Student's T-Test و Two Way Analysis اجزای سلولی گروه‌های کنترل و تحت مطالعه مقایسه گردید و معنی‌دار بودن آن‌ها مورد کنکاش قرار گرفت.

نتایج

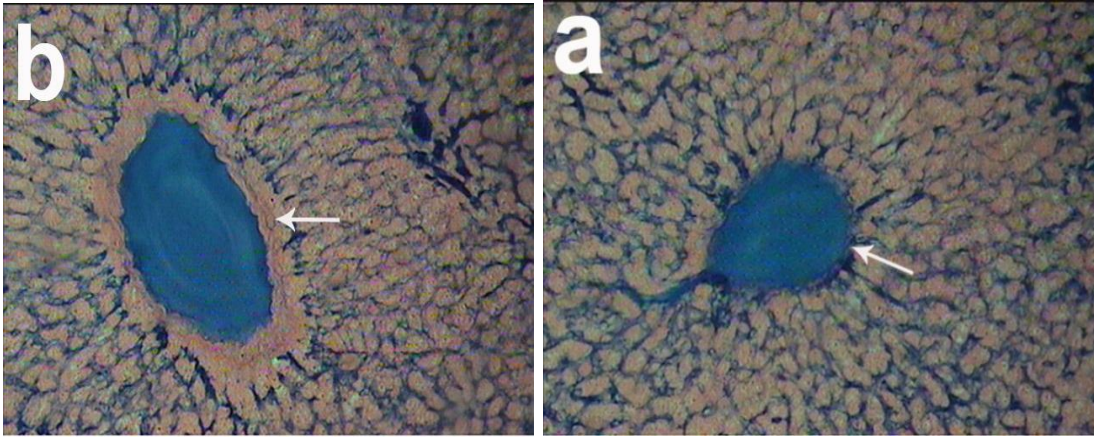
نتایج حاصل از این تحقیق از دو جهت مورفولوژیک (بررسی کیفی) و مورفومتری (بررسی کمی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مورفولوژیک (بررسی کیفی): با استفاده از فتومیکروگراف‌های بدست آمده تغییرات ظاهری ایجاد شده در بافت کبد ثبت شدند.

بنابراین کافی است که ما مساحت ارگانل‌ها و کل سلول را محاسبه کنیم. که این مساحت توسط نقاط برخورد، محاسبه گردید با تقسیم مساحت ارگانل به مساحت کل سلول حاصل تقسیم Vv جزء مورد نظر به سلول محسوب می‌شد. پارامترهای اندازه گیری شده برای ارزیابی تغییرات و فعالیت هپاتوسیت‌ها عبارت بودند از: Vv هسته به کل سلول، Vv یوکروماتینی هسته به کل هسته، Vv میتوکندری به سلول، Vv شبکه آندوپلاسمیک خشن به کل سلول و Vv گلیکوژن به کل سلول نیز مورفومتری شدند. همچنین محاسبه قطر لبول‌ها برای بررسی تغییرات کلی لبول‌های کلاسیک و محاسبه ابعاد هسته هپاتوسیت‌ها برای بررسی تغییرات اندازه و شکل هسته سلول‌های کبدی، قطر بزرگ هسته (a) و قطر کوچک هسته (b) و در مقطع میکروسکوپی که حاوی برش‌های رنگ شده H&E بودند انجام شد.

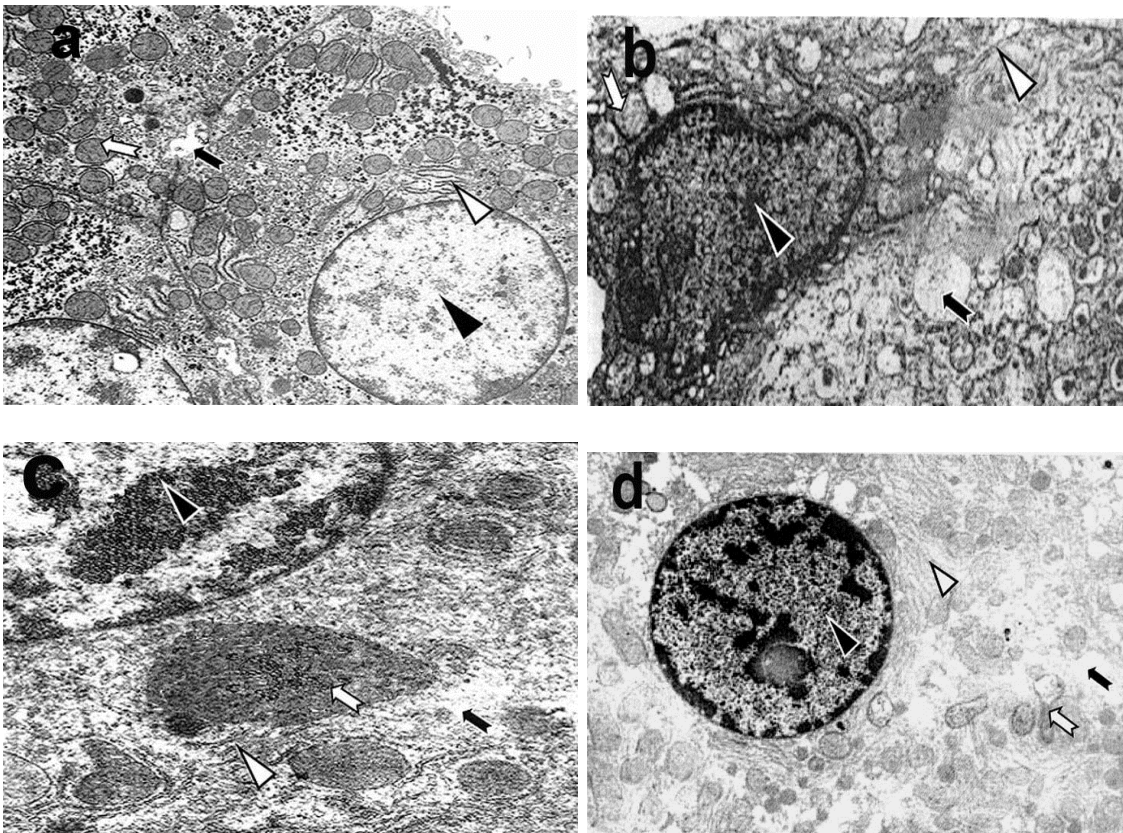
سپس فتو میکروگراف‌ها با استفاده از نرم افزار Image Tool مورفومتری شدند یعنی اقطار هسته‌ها محاسبه شدند و میانگین قطر هسته (mean diameter) از فرمول $d = \sqrt{a \times b}$ محاسبه گردید. نسبت قطرهای هسته (Axial Ratio) از طریق تقسیم a بر b محاسبه شد. اقطار حدود ۲۰۰ هسته از هر یک از بافت‌های مورد نظر اندازه گیری گردید. همچنین Vv رتیکولوم آندوپلاسمیک خشن به سلول و گلیکوژن به سلول مورفومتری شدند. محاسبه قطر لبول‌های کلاسیک: همچنین برای تغییرات کل بافت لبول‌های کلاسیک کبد از کنار ورید مرکزی تا کنار



شکل شماره ۱): (a) منظره میکروسکوپی از کبد نرمال در گروه کنترل. ورچه مرکزی (پیکان سیاه) و فضای باب (پیکان سفید); رنگ آمیزی (H&E) بزرگ نمای $X40$. **(b)** بافت کبد در گروه تحت مطالعه. تغییر چربی (سر پیکان) و ارتشاح سلول‌های لمفوسیتی (پیکان) در میان هپاتوسیت‌ها در پارانشیم کبد مشاهده می‌شوند؛ رنگ آمیزی (H&E) بزرگ نمای $X100$. **(c)** هپاتوسیت‌های دارای گلیکوژن با رنگ پذیری PAS مثبت در گروه کنترل **(d)** هپاتوسیت‌های دارای واکوئول‌های شفاف چربی به رنگ سفید و گلیکوژن کم با رنگ پذیری ضعیف PAS در گروه تحت مطالعه؛ رنگ آمیزی PAS بزرگ نمای $X40$.



شکل شماره (۲): (a) نسج بسيار ظريف رتيکولر (پيکان) در اطراف ورید چه مرکزی کبد در گروه کنترل (b) نسج همبندی ضخيم (فيبروز) در اطراف ورید چه مرکزی کبد (پيکان) در گروه تحت مطالعه؛ رنگ آمیزی Alcian blue بزرگ نمایی $\times 10$.



شکل شماره (۳): فتوميکروگراف های الکترونی از بافت کبد خرگوش (a) فرا ساختمان هپاتوسیتها در گروه کنترل. تمام بافت های موجود در این مقطع کاملاً نرمال بوده و هيچ ساختمان غير طبيعي خاصی ديده نمی شود. سلول های کبدی طبیعی، هسته یوکروماتیک و سيتوپلاسم حاوی مقدار فراوانی میتوکندری، گلیکوژن می باشد که همگی نرمال هستند. گلیکوژن (پيکان سیاه)، میتوکندری (پيکان سفید)، هسته (سر پيکان سیاه) و شبکه آندوپلاسمیک خشن (سر پيکان سفید) بزرگنمایی $\times 7200$ (b,c,d) فرا ساختمان هپاتوسیت هادر گروه تحت درمان. همانگونه که ملاحظه می شود نظم بافتی بهم خورده، هپاتوسیتها واکوتله شده میتوکندریها و شبکه آندوپلاسمیک خشن دژنره شده، هسته هتروکروماتیک شده است. گلیکوژن (پيکان سیاه)، میتوکندری (پيکان سفید)، هسته (سر پيکان سیاه) و شبکه آندوپلاسمیک خشن (سر پيکان سفید) بزرگنمایی (b و d) $\times 7200$ بزرگنمایی (c) $\times 12000$.

جدول شماره (۱): جدول مقایسه میانگین نیمی از طول متوسط لیول‌های کلاسیک و نسبت‌های حجمی ارگانل‌های سلولی (Vv) هیپاتوسیت‌ها در کنترل و تحت مطالعه در خرگوش‌های در معرض طولانی مدت کلراید آلومینیوم

ارزش P	گروه تحت مطالعه	گروه کنترل	گروه‌ها	
			بافت‌ها	
۰/۰۰	۲۴۳/۱۲ ± ۰/۰۴۰**	۲۶۰/۶۲ ± ۰/۰۳۳**	نصف قطر لیول کبدی	
۰/۰۰	۰/۳۵۰ ± ۰/۰۱۱	۰/۳۷۹ ± ۰/۰۶۱	نسبت حجمی هسته به کل سلول	
۰/۰۰	۰/۷۰۱ ± ۰/۰۴۷	۰/۹۲۰ ± ۰/۰۲۱	نسبت حجمی یوکروماتینی هسته به کل هسته	
۰/۰۰	۰/۳۴۴ ± ۰/۰۴۹	۰/۴۵۲ ± ۰/۰۶۵	نسبت حجمی میتوکندری به کل سلول	
۰/۰۰	۰/۰۷۶ ± ۰/۰۵۶	۰/۱۰۸ ± ۰/۰۶۳	نسبت حجمی گلیکوژن به کل سلول	
۰/۰۰	۰/۰۵۹ ± ۰/۰۴۹	۰/۰۸۸ ± ۰/۰۲۲	نسبت حجمی شبکه‌ی آندوپلاسمیک خشن به کل سلول	

** مقادیر یاد شده بر حسب میکرون می‌باشد.

ارقام فوق به صورت Mean±SE می‌باشد.

نتایج مورفولوژیک بدست آمده از فتومیکروگراف نوری شماره ۱ (a) و (c) نشان می‌دهد تمام بافت‌های موجود در این مقطع کاملاً نرمال بوده و هیچ ساختمان غیر طبیعی خاصی دیده نمی‌شود. سلول‌های کبدی طبیعی و کاملاً منظم و به شدت پاس مثبت می‌باشد و اشعه وار از ورید مرکزی تا فضای پورت کشیده شده است. در حالیکه بر اساس نتایج مورفولوژیک بدست آمده از فتومیکروگراف نوری شماره ۱ (b و d) نشان می‌دهد که در بافت‌های کبدی در گروه تحت مطالعه طی فاز مزمن از مقدار و شدت پاس به شدت کاسته شده است و در عوض واکوتول‌های چربی به صورت بی‌رنگ در هیپاتوسیت‌ها تجمع یافته‌اند.

یکی از آسیب‌های شایع کبد فیروز کبدی می‌باشد و فیبروتیک شدن آن معمولاً از همین ناحیه شروع می‌شود. بنابراین، در یک بررسی توجیهی اقدام به رنگ آمیزی اختصاصی آلیسان بلو نمودیم که وضعیت استرومای کبد را بهتر نشان دهد، به عبارت دیگر در این مقاطع هدف بررسی تغییرات احتمالی بافت همبندی رتیکولر ظریف در اطراف سینوزوئیدها، به خصوص ورید مرکزی است به علت اینکه معمولاً فیبروتیک شدن پارانشیم کبد از همین ناحیه شروع می‌شود. بر این اساس نتایج مورفولوژیک بدست آمده از فتومیکروگراف نوری شماره ۲ (a و b) نشان می‌دهد، که در گروه کنترل بافت همبندی رتیکولر ظریف در اطراف ورید مرکزی وجود دارد و واکنش تغییری خاصی دیده نمی‌شود. تمام بافت‌های موجود در این مقطع کاملاً نرمال بوده و هیچ ساختمان غیر طبیعی خاصی دیده نمی‌شود. سلول‌های کبدی طبیعی و کاملاً منظم و اشعه وار از ورید مرکزی تا فضای پورت کشیده شده‌اند. امادگروه تحت مطالعه همان‌گونه که ملاحظه می‌شود بافت همبندی رتیکولر

نتایج مورفومتریک (بررسی کمی): با استفاده از این ایده که اثرات سیتوتوکسیک فلزات سنگین باعث آسیب و آزار سلولی و در نتیجه باعث کاهش اجزای سلول می‌شود با استفاده از صفحات شطرنجی خاص (لاتیس) و شمارش نقاط برخورد اقدام به مورفومتری اندامک‌های سلولی در کبد نظیر: گلیکوژن، میتوکندری و هسته و شبکه‌ی آندوپلاسمیک خشن شد و همچنین بررسی وضعیت کلی لیول‌های کبدی با اندازه‌گیری اقطار آن‌ها با استفاده از نرم افزار Image tool و بر اساس کالیبره نمودن مقاطع با استفاده از (Scale bar) در مقیاس ۱۰۰ میکرونی انجام شد.

بحث و نتیجه گیری

متأسفانه اثرات فلزات سمی و خطر ناک از جمله آلومینیوم به تدریج و در طولانی مدت ظاهر می‌شود. و این بدان معنی است که آستانه تحمل بافت‌های مختلف نسبت به آن‌ها بالاست ولی وقتی که در یک بافت باعث مسمومیت و آسیب می‌شود عوارض و ضایعات جبران‌ناپذیری را ایجاد می‌کند.

از آنجا که یکی از عملکردهای مهم هیپاتوسیت‌ها ذخیره‌ی گلیکوژن می‌باشد بنابراین هر چقدر هیپاتوسیت‌ها ذخیره‌ی گلیکوژن بیشتری داشته باشند، نشان دهنده‌ی طبیعی بودن ساختمان سلولی آن می‌باشد (البته میزان گلیکوژن به رژیم غذایی حیوان هم بستگی دارد). در مطالعه‌ی حاضر هر دو گروه تحت مطالعه و کنترل رژیم غذایی به وفور و به صورت یکسان در اختیار آن‌ها قرار داده می‌شده است. از آنجا که گلیکوژن در طی پروسه‌ی آماده سازی توسط الکل و سایر حلال‌ها حل می‌شود. بنابراین در یک بررسی توجیهی اقدام به رنگ آمیزی اختصاصی PAS شد که وضعیت گلیکوژن را بهتر نشان دهد. بر این اساس

ظريف در اطراف ورید مرکزی تبدیل به یک بافت همبند رشته‌ای واضح شده است.

نمک‌های آلومینیم باعث مهار فعالیت آنزیم‌های مختلف از جمله آلکالین فسفاتاز، هگزوکیناز، فسفواکسیداز می‌شود به خصوص در معرض قرارگیری مزمن با آلومینیم باعث آسیب حاد کبدی و در نتیجه افزایش لیپیدپراکسیداسیون همراه با کاهش گلوتاسیون پراکسیداز و فعالیت کاتالاز و کاهش فعالیت پمپ سدیم پتاسیم می‌شود (۸).

همچنین با دقت در شکل شماره ۱ (a) که فتومیکروگراف‌های نوری دیگری از لوبول‌های کلاسیک بافت‌های کبدی گروه تحت مطالعه طی فاز مزمن را نشان می‌دهد مشخص می‌شود که بعضاً اثرات سیتوتوکسیکی آلومینیم کلراید طی فاز مزمن به صورت واکوئوله شدن هیاتوسیت‌ها و مقداری ارتشاح لنفوسیتی در بین سلول‌های کبدی مشاهده می‌شود. یافته‌های حاصل از این بررسی با یافته‌های سایر محققین مطابقت دارد (۹، ۱۰).

اما بررسی فراساختمانی بافت‌های کبدی در گروه تحت مطالعه طی فاز مزمن بر اساس نتایج مورفولوژیک بدست آمده از فتومیکروگراف الکترونی شماره ۳ (b و c و d) نشان می‌دهد که طی فاز مزمن نظم بافتی بهم خورده، هیاتوسیت‌ها واکوئوله شده (پیکان سیاه) میتوکندریها، شبکه آندوپلاسمیک خشن دژنره شده و هسته هتروکروماتیک شده است. این یافته‌ها مشخص می‌کند در صورتیکه بافت‌های کبدی در مدت طولانی‌تر در معرض آلومینیم قرار گیرند باعث تغییرات شدید فراساختمانی می‌شود. یافته‌های حاصل از این بررسی با سایر یافته‌های محققین مطابقت دارد (۱۱).

نتایج یک بررسی نشان داد افزایش آلومینیم با افزایش لیپوفوکسین در گلبول‌های قرمز و سلول‌های کبدی مرتبط می‌باشد که در اثر آن طول عمر سلول‌ها خصوصاً گلبول‌های قرمز و هیاتوسیت‌ها کاهش می‌یابد (۱۲). تحقیقات نشان داده است که لاکتات آلومینیم در موش‌های صحرایی که ۴ روز پس از تولد هیاتکتومی نسبی (۶۵٪) شده بودند باعث آسیب کبدی و بدتر شدن فعالیت‌های کلیوی شد. آلومینیم و هیاتکتومی نسبی سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش گلوتاتیون (GSH) و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) می‌شود (۱۳). نتایج تحقیقی نشان می‌دهد تزریق داخل صفاقی آلومینیم سبب ضایعات در تمامی قسمت‌های بافت کبدی موش‌های صحرایی می‌شود. لذا می‌توان گفت آلومینیم به تمامی ساختارهای کبد رسیده است و تعدادی از ذرات آلومینیم از سد ماکرو فاگوسیت‌ها عبور کرده‌اند (۱۴).

همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد رسوب آلومینیم، آهن و نیز بیان گیرنده ترانسفرین به صورت معنی‌دار در کبد موش‌های بالغ متعاقب قرار گرفتن در معرض آلومینیم تغییر یافت. در موش‌های پیر درمان شده با آلومینیم ضخامت اندوتلیالی افزایش و منافذ آن مثل آکتین اطراف سینوزوئیدی کاهش یافت. بنابراین آلومینیم رسوب کلاژن و لامینین را تحریک کرده و در نتیجه دریافت طولانی مدت سولفات آلومینیم روند پیری را در کبد موش‌های سوری بالغ تسریع می‌کند (۱۵). در تحقیق حاضر نیز کلراید آلومینیم در مدت طولانی سبب ایجاد بافت همبند رشته‌ای در اطراف ورید چه مرکزی گروه تحت مطالعه شد. بررسی‌ها نشان می‌دهند نیترو تری استات آلومینیم بر روی کبد، کلیه و سیستم اعصاب مرکزی موش‌های صحرایی اثرات سمی داشته است و باعث ایجاد ضایعات کبدی و کلیوی شامل نکروز انعقادی میدزونات منتشر سلول‌های کبدی و نکروز حاد توبول‌های پیچیده نزدیک کلیه و آتروفی سلول‌های عصبی مغز و دمیلسیون ساقه مغز شده است (۱۶). در بررسی دیگری اثر تجویز خوراکی سترات آلومینیم بر روی خرگوش ارزیابی شده است. وجود نداشتن تغییرات کبدی به نظر می‌رسد به علت کم بودن میزان جذب آلومینیم از دستگاه گوارش نرمال بالغ و کلیه‌های با عملکرد نرمال باشد. همچنین پس از تجویز داخل وریدی آلومینیم مقادیر بالای آن در بافت کبد یافت شد که با وجود سلول‌های غول پیکر کبدی دارای آلومینیم مشخص گردید (۱۷). در یک بررسی که برای ارزیابی اثرات احتمالی آلومینیم کلراید بر روی بافت شناسی کبد انجام شد در ۵ گروه و هر گروه ۱۰ موش صحرایی آلومینیم کلراید به صورت خوراکی در ۴ دوز ۴۷۵ و ۹۵۰ و ۱۴۲۵ و ۱۹۰۰ mg/kg در مدت ۸ هفته با در نظر گرفتن یک گروه کنترل تجویز شد. بررسی مقاطع هیستوپاتولوژی بافت کبد نشان داد آلومینیم کلراید سبب تغییراتی مثل پرخونی وریدچه مرکزی و تغییر شکل سینوزوئیدهای کبد شده است (۱۸).

در تحقیق دیگری مقادیر متفاوت ۰.۱ و ۱ و ۵ درصد آلومینیم کلراید که به صورت خوراکی با آب آشامیدنی به موش‌های سوری تجویز شد و تیروئید موش‌ها از لحاظ هیستوپاتولوژی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد آلومینیم با توجه به دوز مورد استفاده باعث دژنراسیون ساختار بافتی و آسیب سلولی فولیکول‌های تیروئید می‌شود (۱۹).

در تحقیقی بر روی تغییرات هیستوپاتولوژی کبد و کلیه پس از ایجاد مسمومیت تحت مزمن با آلومینیم کلراید در موش صحرایی به گروه آزمایشی در مدت ۵ هفته به صورت داخل صفاقی آلومینیم کلراید تزریق شد. رسوبات سفید متشکل از

می‌تواند اختلال جدی در فعالیت خون، کبد و کلیه ایجاد کند (۲۳).

در یک بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی در کبد موش صحرایی متعاقب تزریق داخل صفاقی آلومینیوم در یک دوز بالا ارزیابی شد. تجمعات شبه کریستالی آلومینیوم در کپسول، زیر کپسول و فضای باب بافت کبد در موش‌های در معرض آلومینیوم یافت شد. نفوذ قطرات ریز چربی در بافت کبد (تغییر چربی) وجود داشت. صفاق و کپسول گلیسون کبد نفوذ شدید ماکروفاژها و یک واکنش شبیه به جسم خارجی همراه با ماکروفاژهای متعدد حاوی تجمعات شبه کریستالی آلومینیوم نشان دادند. گرچه این واکنش یک حالت دفاعی در برابر فلز بود مقداری از آلومینیوم از این سد عبور کرده و وارد بافت کبد شد و اثرات سمی را در مجاری صفراوی و هپاتوسیت‌ها نشان دادند (۱۴).

تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که مکانیسم اثر ترکیبات آلومینیوم در بافت‌های مختلف تا حدودی متفاوت است. در بافت کبد لیزوزوم، غشای پایه و غشای سلولی تحت تاثیر ترکیبات آلومینیوم قرار می‌گیرند (۳۲). نتایج تحقیق حاضر تغییرات ناشی از تجویز طولانی مدت آلومینیوم در میتوکندری، شبکه اندوپلاسمیک خشن، گلیکوژن و هسته هپاتوسیت‌ها را تایید نمود. با توجه به کاهش حجم گلیکوژن در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل و با توجه به وقوع تغییر چربی در گروه تیمار می‌توان پیشنهاد کرد آلومینیوم احتمالاً با ایجاد نقص در متابولیسم چربی‌ها باعث تجمع چربی و در عوض کاهش تجمع و حجم گلیکوژن در هپاتوسیت‌ها شده است. از سوی دیگر تغییرات ایجاد شده در میتوکندری‌ها ممکن است در نتیجه افزایش سیتوکروم میکروزومی P450 باشد که باعث بوجود آمدن استرس اکسیداتیو و ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و پر اکسیداسیون و سیکل متابولیسم چربی دچار نقص نشده و تغییر چربی ایجاد خواهد کرد. از سوی دیگر نتایج مورفومتریک مطالعه حاضر نیز با نتایج مورفولوژیک و فراساختاری مطابقت دارد به این مفهوم که کلراید آلومینیوم در مدت طولانی می‌تواند از لحاظ کیفی و کمی باعث تغییرات در سلول‌های کبدی و ارگان‌های آن‌ها شود.

تشکر و قدردانی

از مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز کمال تشکر می‌شود.

بقایای سلولی بر روی سطح کبد و کلیه و روده بند در اثر درمان با آلومینیوم ظاهر شد. چسبندگی کپسول گلیسون کبد به دیافراگم و همچنین کانون‌های کوچک پراکنده از هپاتوسیت‌های نکروتیک و گرانولوم‌های کوچک التهاب خفیف در فضای باب در گروه آزمایشی ایجاد شد. همچنین در گرانولوم‌ها و ماکروفاژهای کبد گروه آزمایشی رسوبات آلومینیوم یافت شد. رسوب آهن نیز در هپاتوسیت‌های اطراف ورید چه مرکزی گروه آزمایشی و در گرانولوم‌ها و فضاهای باب تمام گروه‌ها یافت شد. از لحاظ فراساختاری در حیوانات گروه آزمایش هپاتوسیت‌ها دارای هیالینه شدن میتوکندری و از هم پاشیدگی شبکه اندوپلاسمیک و خوشه‌ای شدن ریبوزوم‌ها مشاهده شد. فاگولیزوزوم‌ها بزرگ‌تر بوده و اغلب در هر دو هپاتوسیت‌ها و سلول‌های کوپفر حیوانات گروه آزمایش مشاهده شدند (۲۰).

نتایج بررسی دیگری بر روی اثرات مسمومیت با سولفات آلومینیوم در بزهای نژاد اتیوپیایی نشان داده است که تجویز خوراکی ۱ و ۲۰ درصد سولفات آلومینیوم با آب آشامیدنی باعث تغییرات آسیب شناسی مثلنکروز هپاتوسیت‌ها و پرخونی در تمام اعضای گروه آزمایش شده است (۲۱). نتایج تحقیقی که اثر قرار گرفتن موش‌های صحرایی در معرض آلومینیوم بر روی بررسی ظرفیت‌های سوپر اکسید و پر اکسید توسط کبد و بیضه و کلیه و بخش قشری مغز انجام شده است نشان می‌دهد تغییرات القایی ناشی از آلومینیوم در ظرفیت اکسید کنندگی می‌تواند باعث استرس اکسیداتیو در بافت‌های نورونی و غیر نورونی شود (۲۲).

در یک تحقیق اثرات سمی ژنی و کبدی و کلیوی و خونی و نیز هیستوپاتولوژی متعاقب مسمومیت مزمن با آلومینیوم در موش‌های صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت. موش‌ها در گروه آزمایش به مدت ۱۰ هفته و با دوز $mg/kg\ 5$ کلراید آلومینیوم به صورت داخل صفاقی تیمار شدند. تغییرات هیستولوژیکی در نمونه‌های کبد و کلیه مورد تحقیق قرار گرفت. پس از قرار گرفتن در معرض آلومینیوم فعالیت‌های آنزیمی ALT، ALP، AST و LDH و نیز مقدار اوره به شکل معنی‌دار افزایش یافتند. همچنین مقادیر RBC، WBC، PLT، Hb و Ht به صورت معنی‌داری در گروه آزمایش نسبت به کنترل کاهش نشان داد. علاوه بر این تغییرات آسیب شناسی شدید در کبد و کلیه تایید شد. نتایج نشان داد قرار گرفتن تحت مزمن در معرض دوزهای کم آلومینیوم

References:

- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd Ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. P. 982-98.
- Moshtagie AA. Aluminum distribution in rat liver sub cellular fractions in relation to Neurological disease in hemodialyzed patients. *J Islam Acad Sci* 1994; 7: 215-20.
- Wahl M, Gadzije EM, Wahl J, Ravnik D, Pecar J, Pleskovic A. An experimental model of reproducible liver trauma injury. *Toxicology* 2005; 36: 963-9.
- Osinsaka E, Kanoniuk D, Kusiak A. Aluminum hem toxicity mechanisms. *Toxicology* 2004; 59: 411-16.
- Yousef MI. Aluminum -induced changes in hemato – biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 2004; 199: 47-57.
- Snyder JW, Serroni A, Savory J, Farberg L. The absence of extra cellular calcium potentiates the killing of cultured hepatocytes by aluminum maltolate. *Arch Biophys* 1995; 316: 434-442.
- Abero K, Jangala J, Jain SK, Sella M, Glass J. Aluminum uptake and toxicity in Cultured mouse hepatocytes. *J Am Soc Nephrol* 1991;1: 1299-1304.
- Kaizer RR, Correa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Goncalves JF, et al. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem* 2005; 99: 1865-70.
- Cannata- Andia JB, Fernandez-Martin JL. The clinical impact of aluminum overloaded in renal failure. *Nephrol Dial Transpl* 2002; 17: 9-12.
- Mahieu S, Millen N, Gonzalez M, Contini Mdel C, Elias MM. Alteration of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminum during the initial phase of hepatic regeneration. *J Inorg Biochem* 2005; 99: 1858-64.
- Turgut S, Aban G, Oguz EO. Amelioration of aluminium-induced liver damage by vitamin E. *Saudi Med J* 2007; 28: 197-200.
- Vanholder R, Cornelis R, Dhondt A, Lameire N. The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transpl* 2002; 17: 2-8.
- Plachot JJ, Witmer CG, Halpern S, Mendes V, Bourdeau A, Fritsch J, et al. Bone ultrastructure and x-ray microanalysis of aluminum-intoxicated hemodialyzed patients. *Kidney Int* 1984; 25: 796-803.
- Bogdanovic M, Janeva BA, Bulat P. Histological changes in rat liver after a single high dose of aluminium. *Arh Hig Rada Toksikol* 2008; 59: 97-101.
- Stacchiotti A, Lavazza A, Ferroni M, Sberveglieri G, Bianchi R, Rezzani R, et al. Effects of aluminium sulphate in the mouse liver: similarities to the aging process. *Exp Gerontol* 2008; 43: 330-8.
- Ebina Y, Okada S, Hamazaki S, Midorikawa O. Liver, kidney, and central nervous system toxicity of aluminum given intraperitoneally to rats: a multiple-dose subchronic study using aluminum nitrilotriacetate. *Toxicol Appl Pharm* 1984; 75: 211-18.
- Wills MR, Hewitt CD, Sturgill BC, Savory J, Herman MM. Long-term oral or intravenous aluminum administration in rabbits. I. renal and hepatic changes. *Ann Clin Lab Sci* 1993; 23: 1-16.
- Buraimoh AA, Ojo SA, Hambolu JO, Adebisi SS. Effects of aluminum chloride on the histology of the liver of adult wistar rats. *IOSR J Pharm* 2012; 2: 525- 33.
- Aktac T, Bakar E. The histological changes in the mouse thyroid depending on the aluminum. *J Cell Mol Biol* 2002;1: 69-72.

20. Garrosa M, Llanes F, Gayoso MJ. Histopathological changes in gerbil liver and kidney after aluminum subchronic intoxication. *Histol Histopathol* 2011;26: 883-92.
21. Medani AB, El Badwi SMA, Amin AE. Toxicity of aluminum sulphate (alum) to Nubian goats. *J Tox Env Heal Sci* 2011;3: 198-203.
22. Chaitanya TV, Mallipeddi K, Bondili JS, Nayak P. Effect of aluminum exposure on superoxide and peroxide handling capacities by liver, kidney, testis and temporal cortex in rat. *Indian J BiochemBio* 2012;49: 395-8.
23. Geyikoglu F, Turkez H, Bakir TO, Cicek M. The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminum chronic intoxication. *Toxicol Ind Health* 2012; 36: 51-3.
24. Shahriary SH, Sohrabi Haghdoost I, Amniattalab A, Ghavam F. A study of aluminum chloride chronic effects on glomerular basement membrane ultrastructure, morphology and morphometry of rabbit renal tissues. *Urmia Med J* 2012; 23: 32-40. (Persian)