

Histopathologic Changes in the Substantia Nigra Resulted by Paraquat Intoxication in Rat

Atefeh Sabbagh¹, Abbas Tavasoly^{1*}, Jamileh Salar Amoli², Seyed Hossein Mardjanmehr¹

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Article Info:

Received: 29 May 2016

Accepted: 28 Jun 2016

ABSTRACT

Introduction: Widespread agricultural use as well as increasing number of suicidal or accidental ingestion of paraquat in the last few years enhance the necessity to evaluate the mechanism of action and the complications, especially neuronal side-effects, of this herbicide. The aim of this study was to evaluate the histopathological alterations of the substantia nigra after paraquat intoxication in rats. **Materials and Methods:** 28 adult Wistar rats were randomly divided into three experimental and one control groups. Paraquat at different doses (10, 15 and 20 mg/kg) were injected intraperitoneally once a week for three consecutive weeks to experimental groups; normal saline was injected to control group. After 28 days, the brains were removed and sections from the compact part of the substantia nigra were stained by toluidine blue. **Results:** A significant enhancement of the number of dark neurons in the substantia nigra was observed in rats receiving 15 and 25 mg/kg of paraquat compared to control group. **Conclusion:** Our findings point to the harmful effects of paraquat on neurons of the substantia nigra. This suggests paraquat toxicity as a risk factor for neurological disorders, such as Parkinson's disease.

Key words:

1. Paraquat
2. Substantia Nigra
3. Pathology

*Corresponding Author: Abbas Tavasoly

E-mail: atavasoli@ut.ac.ir

doi: 10.18869/acadpub.shefa.4.4.41

تغییرات هیستوپاتولوژیک جسم سیاه در نتیجه مسمومیت پاراکوات در موش صحرایی

عاطفه صباح^۱، عباس توسلی^{۱*}، جمیله سالار آملی^۲، سید حسین مرجانمهر^۱

گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۸ تیر ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۹ خرداد ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: استفاده کشاورزی وسیع به علاوه افزایش تعداد مصرف اتفاقی یا به قصد خودکشی از پاراکوات در چند سال گذشته، ضرورت بررسی عمل و عوارض به خصوص اثرات جانبی عصبی، این علوفه را بالا برده است. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک جسم سیاه پس از مسمومیت پاراکوات در موش‌های صحرایی بود. **مواد و روش‌ها:** ۲۸ موش بالغ ویستار به طور تصادفی به سه گروه آزمایشی و یک گروه کنترل تقسیم شدند. پاراکوات در دوزهای مختلف (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم/کیلو گرم) به صورت داخل صفاقی یک بار در هفته برای سه هفتۀ متوالی به گروه‌های آزمایشی تزریق شد؛ نرمال سالین به گروه کنترل تزریق شد. بعد از ۲۸ روز مغزها برداشته شدند و برش‌هایی از قسمت متراکم جسم سیاه با تولوئیدن بلورنگ‌آمیزی شدند. **یافته‌ها:** افزایش قابل توجهی از تعداد نورون‌های تیره در جسم سیاه گروه موش‌های صحرایی دریافت کننده ۱۵ و ۲۵ میلی گرم/کیلو گرم پاراکوات مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های ما به اثرات مضر پاراکوات بر نورون‌های جسم سیاه اشاره می‌کند. این پیشنهاد می‌کند، سمية پاراکوات به عنوان یک عامل خطر برای اختلالات عصبی مانند بیماری پارکینسون می‌باشد.

کلید واژه‌ها:

۱. پاراکوات
۲. جسم سیاه
۳. پاتولوژی

* نویسنده مسئول: عباس توسلی

آدرس الکترونیکی: atavasoli@ut.ac.ir

مقدمه

بیشتر در معرض خطر ابتلاء به بیماری پارکینسون قرار دارند این افراد شامل کشاورزان و کارگرانی هستند که در بخش کشاورزی یا در کارخانه تولید سم کار می‌کنند (۱۲، ۱۳). همچنین آشکار شده است افرادی که در حوالی مناطقی زندگی می‌کنند که در معرض آفت‌کش‌ها قرار دارند احتمال بروز بیماری پارکینسون در آن‌ها بیشتر است (۱۴، ۱۵).

بیماری پارکینسون، شایع‌ترین بیماری تحلیل برنده عصبی^۷ بعد از آزالیمر می‌باشد (۱۶) که در نتیجه تحلیل^۸ نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم^۹ جسم سیاه^{۱۰} واقع در مغز میانی و به دنبال آن نقص در آزادسازی دوپامین در ناحیه استریاتوم^{۱۱} به وجود می‌آید (۱۷). به نحوی که اگر٪۸۰ سلول‌های ترشح کننده دوپامین از بین بروند، علایم بیماری پارکینسون پدیدار می‌شوند که این علایم شامل لرزش، سختی عضلات، ناتوانی در حفظ تعادل و انجام حرکات طبیعی می‌باشد. سبب‌شناختی^{۱۲} این بیماری کاملاً شناخته نشده است ولی استرس اکسیدانتو، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش سطح گلوتاتیون، تخریب DNA و تجمع آهن به عنوان مهم‌ترین عوامل در ایجاد تحلیل نورون‌های دوپامینرژیک و متعاقباً پارکینسون هستند (۱۸).

مطالعات انجام شده تاکنون برخی اثرات پاراکوآت از جمله تغییرات هیستوتیپاتولوژیک در بافت ریه به صورت خونریزی، فیبروز و ادم، بافت معده به صورت زخم مخاطی، آتروفی لایه عضلانی و ادم در استروم، بافت روده به صورت زخم مخاطی، نکروز ساختار غددی و آتروفی ویلی‌ها و در بافت بیضه به صورت دئزرسانس بافت منی‌ساز، فیبروز مرکزی، نکروز، از هم گسیختگی ساختار توبولی، الیگواسپرمی و فقدان میتوز نشان داده است (۱۹)؛ بنابراین با توجه به اثرات زیانبار پاراکوآت بر بافت‌های مذکور و نیز استفاده وسیع از این علف‌کش در سال‌های اخیر در کشورمان نیاز به مطالعه در مورد مکانیسم‌های مولکولی ایجاد سمتی و تغییرات هیستوتیپاتولوژیک پاراکوآت در بافت‌های دیگر از جمله دستگاه عصبی را بیشتر کرده است. از این رو در مطالعه حاضر بر آن شدیم که سمتی عصبی پاراکوآت بر جسم سیاه مغزی را به روش هیستوتیپاتولوژیک در موش صحرایی بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه بر روی ۲۸ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی)

مسومومیت با علف‌کش‌ها^۱ و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی یکی از مشکلات بزرگ سیستم سلامت در تمام جهان است (۱-۲). سالانه حدود ۲ میلیون مسومومیت منجر به بستری و ۲۰۰۰۰ مرگ در اثر سموم کشاورزی در دنیا گزارش می‌شود (۳). گروهی از علف‌کش‌ها دارای حلقة بای پیریدیلیوم^۲ می‌باشند و به طور وسیعی در صنعت کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این دسته از علف‌کش‌ها شامل پاراکوآت^۳، دی‌کوآت^۴ و مورفام‌کوآت^۵ هستند که مهم‌ترین علف‌کش موجود در این دسته، پاراکوآت می‌باشد. پاراکوآت با نام تجاری گراماکسون از علف‌کش‌های دسته بای پیریدیلیوم می‌باشد که از سال ۱۹۶۲ به طور گسترده برای کنترل علف‌های هرز به کار می‌رود. فرمول شیمیایی این علف‌کش تاماسی و غیر انتخابی^۶ و ۱ دی‌تی‌یل ۴-۴ بای پیریدیلیوم دی‌کلراید است (۵).

راه اصلی ورود این سم به بدن از طریق دهان و دستگاه گوارش به صورت عمده یا تصادفی می‌باشد. هر چند از طریق پوست و استنشاق نیز به کرات گزارش شده است (۶). در جذب از راه پوست و ریه معمولاً مسومومیت سیستمیک اتفاق نمی‌افتد اما ورود آن از طریق دهان باعث سمتیت سیستمیک شده و علاوه بر آسیب گوارشی، سایر اعضاء را نیز درگیر می‌کند (۷). مسومومیت شدید با نارسایی چند ارگانی مشخص می‌شود که عمدتاً به ریه، کلیه و کبد آسیب می‌رساند (۸). احتمال می‌دهند که پاراکوآت یک محرك قوی در تشکیل آبیون‌های سوپراکسید باشد (۹). این رادیکال‌ها بسیار سمتی بوده و بهشت با ماکرومولکول‌ها ترکیب می‌شوند و باعث ایجاد آسیب‌های جدی در اندام‌های مختلف می‌گردند (۱۰).

برای مدت‌های زیادی مطالعات تجربی صورت گرفته، عمدتاً به بررسی اثرات سمتی پاراکوآت بر روی کبد، کلیه و ریه به دلیل مرگ ناشی از نارسایی در عملکرد این ارگان‌ها متمنکز بود. گرایش به مطالعه در خصوص پتانسیل سمتی عصبی پاراکوآت از آجایی آغاز شد که دانشمندان متوجه شbahat ساختاری پاراکوآت به متابولیت فعل MPTP^{۱۰} شدند. MPTP نورو توکسینی است که باعث القاء پارکینسون در جوندگان، پریمات‌ها و انسان می‌شود (۱۱). تحقیقات نشان داده است که کاربرد برخی از انواع آفت‌کش‌ها از جمله پاراکوآت در مزارع کشاورزی باعث اختلالات عصبی از جمله پارکینسون یا لرزش غیر ارادی اندام‌های بدن می‌شود. افرادی که در تماس مستقیم با این مواد شیمیایی قرار می‌گیرند

⁷ Neurodegenerative⁸ Degeneration⁹ Compact part¹⁰ Substantia nigra¹¹ Striatum¹² Etiology¹ Herbicides² Bipyridylum³ Paraquat⁴ Diquat⁵ Morfam quat⁶ 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

پاکسینوس واتسون تهیه گردید (۲۰).

با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری از بلوکهای مذکور مقاطع عرضی^{۱۳} و سریالی با ضخامت ۸ میکرون و فاصله ۵۰ میکرون نسبت به یکدیگر روی لام ژلاتینه تهیه شد. سپس ۱۰ برش از هر گروه از سمت قدامی^{۱۴} ناحیه جسم سیاه به سمت خلفی^{۱۵} انتخاب شد، به صورتی که تمام محدوده این ناحیه را شامل شود. اسلامیدهای مذکور بعد از مرحله دپارافینه با گزیلول جهت آبدهی در غلظت‌های نزولی اتانول قرار گرفتند، پس از مرحله آبدهی و شستشو با آب، توسط رنگ تولوئیدن بلو (خریداری شده از شرکت سیگما) رنگ‌آمیزی گردیدند و در نهایت اسلامیدها با چسب انتالن و لامل پوشانده شدند. لامهای رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری WI Tokyo, Japan, Olympus, BX51 مورد عکسبرداری قرار گرفتند. تعداد ۴۰X و X ۱۰۰ در عکس‌های تیره^{۱۶} در عکس‌های تهیه شده از بزرگنمایی ۴۰X در ناحیه متراکم جسم سیاه دو نیمکره از سمت میانی تا بخش جانبی در برش کرونال توسط نرم‌افزار J Image شمارش شد و نسبت به نورون‌های سالم به صورت درصد محاسبه گردید و اعداد به دست آمده توسط آزمون آماری آنالیز شدند (تصویر ۱).

برای این منظور چروکیدگی سلول، از دست رفتن یکنواختی اجسام نیسل، تراکم سیتوپلاسم و هسته و پیکنوزه شدن هسته نورون‌ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. تعداد سلول‌های گلیال با در نظر گرفتن ریخت‌شناسی^{۱۷} سلول با نرم‌افزار J Image در عکس‌های گرفته شده با بزرگنمایی ۴۰X در ناحیه متراکم جسم سیاه دو نیمکره از سمت میانی تا بخش جانبی در برش عرضی شمارش گردید و به صورت درصد محاسبه شد. جهت اندازه‌گیری حجم سلول‌های گلیال و نورونی ده مقطع بافتی تهیه شده از ناحیه جسم سیاه به صورت سریالی پس از رنگ‌آمیزی با بزرگنمایی ۱۰۰X توسط میکروسکوپ نوری مورد عکسبرداری قرار گرفتند. از هر برش حداقل ده تصویر به صورت تصادفی انتخاب گردید. با استفاده از نرم‌افزار cell count و به روش استریولوژی حجم سلول‌های گلیال و نورون در هر عکس به صورت تصادفی و در زاویه‌های مختلف در واحد میکرومتر مکعب اندازه‌گیری شد و به صورت میانگین حجم در گروه‌های تزریقی و گروه شاهد محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه نتایج حاصل به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شده است. بهمنظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش، از روش آنالیز

با وزن حدود ۲۵۰-۳۰۰ گرم طی دی ماه ۹۳ تا شهریور ماه ۹۴ انجام شد. قبل از انجام آزمایش، حیوانات با محیط حیوان‌خانه به مدت یک هفته سازگار گردیدند. حیوانات به صورت انفرادی در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات در مرکز نگهداری حیوانات دانشکده دامپزشکی تهران تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای محیطی ۲۵ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۵٪ نگهداری شدند. در طی مدت نگهداری، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد (به صورت پلت ساخت شرکت به پرور) داشتند. حیوانات پس از طی کردن دوره سازگاری به صورت تصادفی در ۴ گروه ۷ تایی گروه‌بندی شدند که این گروه‌ها به شرح زیر می‌باشد: به گروه شاهد طی سه هفته متوالی هر هفته نرمال سالین به صورت درون صفاقی تزریق گردید. پاراکوات به گروه تجربی اول، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، گروه دوم ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه سوم ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی سه هفته متوالی هر هفته به صورت درون صفاقی تزریق شد. پاراکوات به کار رفته در این مطالعه از شرکت دارویی سیگما خریداری گردید و نرمال سالین ۰/۹ درصد به عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت.

تمامی تزریقات با سرنگ انسولینی یکبار مصرف انجام شد و در طول مدت آزمایش، شرایط پرورش (درجه حرارت، نور و تغذیه) برای تمام گروه‌ها یکسان بود. موش‌های صحرایی در ابتدا و طول دوره آزمون با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند تا میزان سم مصرفی با تغییرات در زمان اجرای آزمایش مطابقت داشته باشد. در مراحل مختلف کار ضمن رعایت مسائل اخلاقی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه تهران سعی شد از هرگونه آزار جسمی و روش غیرضروری اجتناب گردد. پس از انجام آخرین تزریق همه حیوانات یک هفته دوره ریکاوری را گذراندند. سپس حیوانات هر گروه توسط تزریق داخل صفاقی کتمانی ۱۰٪ (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۰/۲٪ (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ساخت شرکت آلفاسان هلند تحت بیوهشی عمیق قرار گرفتند و بعد از پرفیوژن با ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد و در ادامه ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو شامل پارافرمالدئید ۴ درصد در فسفات بافر ۱/۰ مولار با pH=۷/۴، مغز آن‌ها خارج گردید و برای ثابت شدن داخل محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۴۸ ساعت و سپس در پارافرمالدئید ۱ درصد به مدت یک هفته قرار داده شد. پس از اطمینان از ثبوت بافتی، پاساژ بافت مطابق روش معمول بافت‌شناسی صورت گرفت و بلوک‌هایی از مغز میانی با در نظر گرفتن مختصات ناحیه جسم سیاه مغزی طبق اطلس

¹⁶ Dark neurons

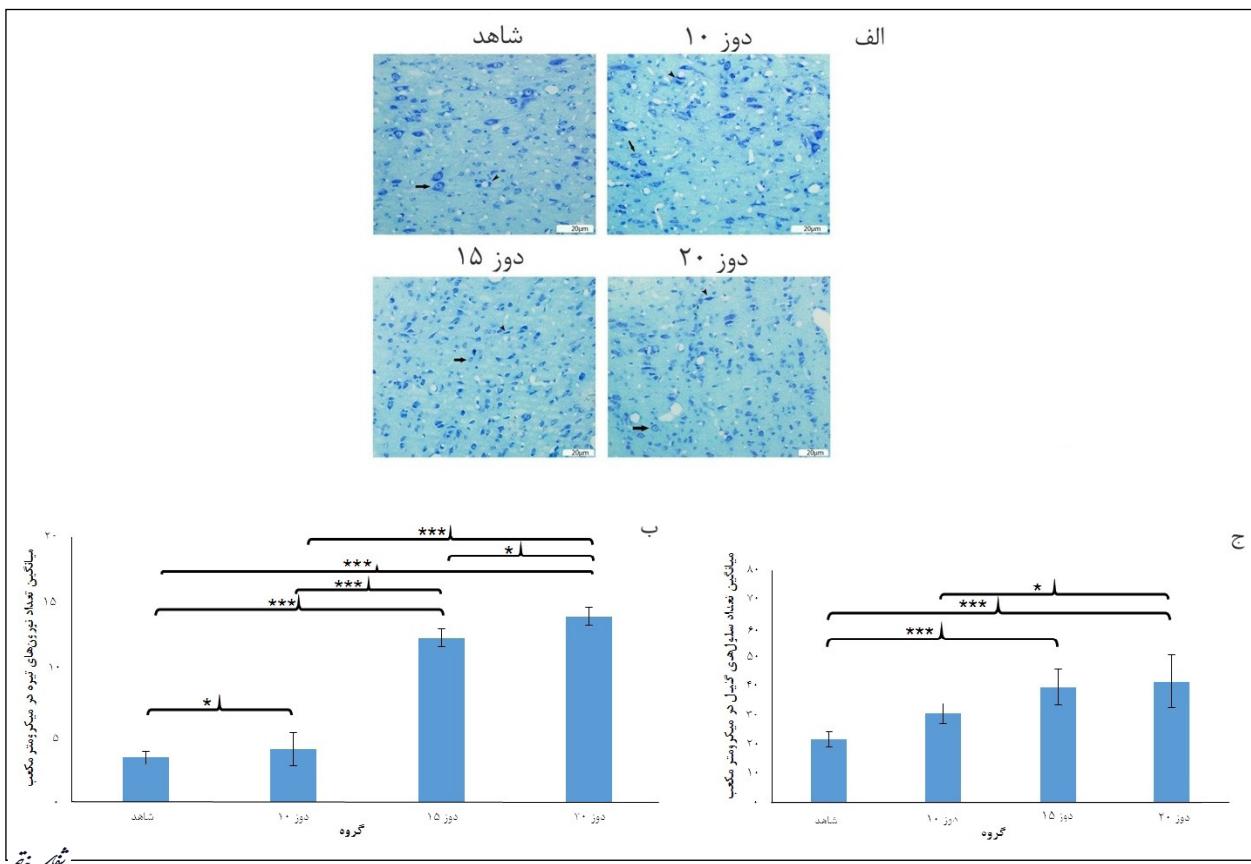
¹⁷ Morphology

معنی داری نسبت به هم داشتند. همچنین میانگین و انحراف معیار تعداد نورون های تیره شمارش شده در گروه تجربی با دوز ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن در مقایسه با گروه تجربی با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن و گروه شاهد با دوز $P<0.001$ اختلاف معنی دار نشان داد. در مقایسه گروه تجربی با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن با گروه شاهد نیز با $P<0.05$ اختلاف معنی داری از لحاظ تعداد نورون های تیره گزارش شد (تصویر ۱-ب). میانگین تعداد گلیال در میکرومتر مکعب در دوز تزریقی ۲۰ برابر با ۹ ± ۴.۲ و دوز تزریقی ۱۵ برابر با ۶.۲ ± ۴.۰ و دوز تزریقی ۱۰ برابر با ۳.۴ ± ۲.۱ و گروه شاهد برابر با ۲.۶ بود. در مقایسه میانگین و انحراف معیار گروه دوز تزریقی ۲۰ و گروه دوز تزریقی ۱۵ نسبت به گروه شاهد تزریقی $10, 1, 10, 1, 10, 1$ و مقایسه گروه دوز تزریقی ۲۰ نسبت به دوز تزریقی $15, 1, 15, 1, 15, 1$ اختلاف معنی دار مشاهده شد. در مقایسه بین گروهی بقیه دوزها اختلاف معنی دار مشاهده نگردید (تصویر ۱-ج).

واریانس یک طرفه^{۱۸} و آزمون تعقیبی توکی^{۱۹} استفاده شد. اختلاف در سطح $P<0.05$ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۱۹ استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی بافتی در ناحیه متراکم جسم سیاه دو نیمکره از سمت میانی تا بخش جانبی در برش عرضی پس از تزریق در گروه های تجربی و شاهد حاکی از آن بود که میانگین و انحراف معیار تعداد نورون های تیره شمارش شده در میکرومتر مکعب در گروه تجربی با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن با میانگین ۰.۷ ± ۰.۹ در مقایسه با گروه تجربی با دوز ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن با میانگین ۰.۸ ± ۰.۳ و نسبت به گروه تجربی با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن با میانگین ۰.۷ ± ۰.۴ و گروه شاهد با میانگین ۰.۶ ± ۰.۲ و نسبت به گروه تجربی با دوز ۳/۳۶ (۰.۰۴) (تصویر ۱-ج) اختلاف آماری



تصویر ۱- اثر تزریق دوزهای ۱۰، ۱۵، ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم از پاراکوآت و گروه شاهد بر تعداد نورون های تیره و تعداد سلول های گلیال در ناحیه متراکم جسم سیاه دو نیمکره از سمت میانی تا بخش جانبی در برش عرضی الف: نمای میکروسکوبی نوری (با بزرگنمایی $\times 40$) از مقطع عرضی مغز موش در گروه شاهد و گروه های تزریقی پاراکوآت با رنگ آمیزی تولوئیدن بلون. نوک بیکان نشان دهنده نورون تیره و پیکان نشان دهنده نورون سالم. ب: نمودار مقایسه میانگین تعداد نورون های تیره بین گروه های تزریقی پاراکوآت و گروه شاهد در میکرومتر مکعب. ج: نمودار مقایسه میانگین تعداد سلول های گلیال بین گروه های تزریقی پاراکوآت و گروه شاهد در میکرومتر مکعب. * و ** *** ترتیب نشانه معنی داری $P<0.05$ و $P<0.001$ می باشد.

¹⁸ One way ANOVA

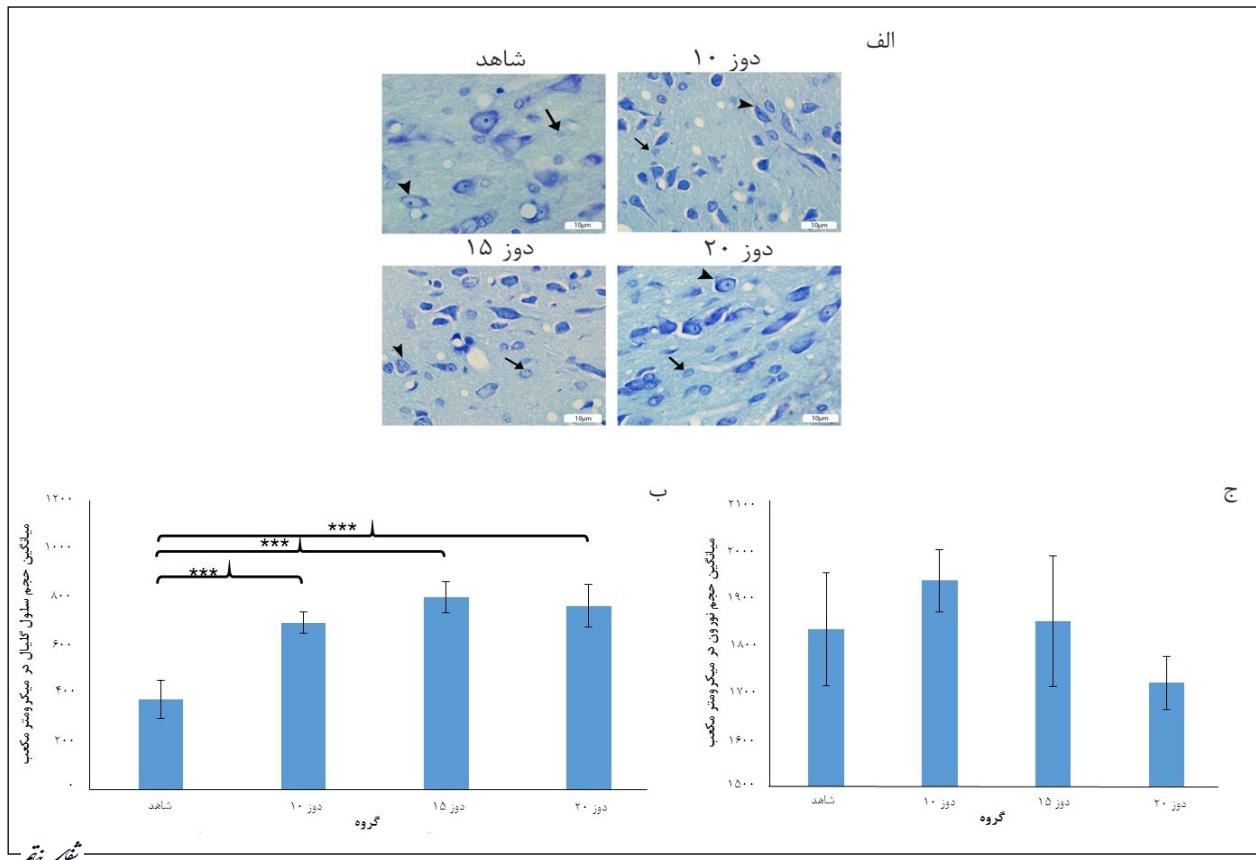
¹⁹ Tukey

حجم نورون‌های سالم

در مقایسه درون گروهی بین میانگین و انحراف معیار حجم نورون‌های سالم در میکرومتر مکعب در دوز تزریقی ۲۰ (میانگین $۱۷۱۸ \pm ۵۵/۵۵$)، دوز تزریقی ۱۵ (میانگین ۲۰) (میانگین $۱۷۱۸ \pm ۵۵/۵۵$)، دوز تزریقی ۱۰ (میانگین $۱۹۳۳ \pm ۶۵/۱$) (میانگین $۱۸۴۸ \pm ۱۳۷/۱$) دوز تزریقی ۱۰ (میانگین $۱۱۹/۴۷ \pm ۱۱۹/۴۷$) و گروه شاهد (میانگین $۱۸۳۱ \pm ۰/۰۶$) (F(۲۱،۳)=۴/۲-ج). (F(۲۱،۳)=۴/۲-ج).

حجم گلیال

در نتیجه مقایسه میانگین و انحراف معیار حجم گلیال در میکرومتر مکعب در دوزهای ۲۰ با میانگین $۷۶۳ \pm ۸۸/۹۵$ دوز تزریقی ۱۵ با میانگین $۶۴ \pm ۸۰/۰$ دوز تزریقی ۱۰ با میانگین $۶۹۳ \pm ۴۴/۷۶$ نسبت به گروه شاهد با میانگین ۳۷۴ ± ۴۴ (F(۳،۲۱)=۴۴، P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. در مقایسه بین گروهی دوزهای تزریقی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (تصویر ۲-ب).



تصویر ۲- اثر تزریق دوزهای ۱۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از پاراکوآت و گروه شاهد بر حجم سلول‌های گلیال و نورون‌ها در ناحیه متراکم جسم سیاه دو نیمکره از سمت میانی تا بخش جانبی در برش عرضی. الف: نمای میکروسکوپ نوری (با بزرگنمایی ۱۰۰X) از مقطع عرضی مغز موش در گروه شاهد و گروه‌های تزریقی پاراکوآت با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو. پیکان نشان دهنده سلول گلیال و نوک پیکان نشان دهنده نورون می‌باشد. ب: نمودار مقایسه حجم گلیال در میکرومتر مکعب در بین گروه‌های تزریقی پاراکوآت و شاهد. ج: نمودار مقایسه حجم نورون در میکرومتر مکعب بین گروه‌های تزریقی پاراکوآت و شاهد. *** نشانه معنی‌داری P<۰/۰۰۱ می‌باشد.

تولوئیدن بلو می‌توانند این نورون‌ها را به تصویر بکشند (۲۴). مغز به دلیل دارا بودن مقادیر بالای لیپیدهای غیر اشباع در غشاهای سلولی و نیز سطح پایین آنزیمهای آنتی اکسیدانی، ارگانی حساس نسبت به مواد توکسیک می‌باشد (۲۵).

Calo همکاران نشان دادند میکروانفوزیون^{۲۰} پاراکوآت به داخل بخش متراکم ناحیه جسم سیاه و یا ناحیه تگمنتوم شکمی^{۲۱} مغز موش‌های صحرایی باعث تغییرات نوروپاتولوژیک و از بین رفتن نورون‌های ناحیه CA3 هیپوكامپ می‌گردد و نتیجه آسیب حاصل از پاراکوآت مختص نورون‌های دوپامینرژیک نمی‌باشد (۲۶).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد میانگین تعداد نورون‌های تیره در ناحیه جسم سیاه مغزی در موش‌هایی که پاراکوآت را به روش داخل صفاقی به مدت سه هفته یکبار دریافت کرده بودند به صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد. نورون‌های تیره بازوفیل می‌باشند و سیتوپلاسمی چروکیده دارند و به عنوان شاخصی از آسیب نورونی محسوب می‌شوند و تحت شرایط پاتولوژیک مثل ایسکمی، استرس، صرع و یا هایپوگلایسمی ایجاد می‌شوند (۲۱-۲۳). رنگ‌آمیزی‌های مختلفی از جمله هماتوکسیلین، کریزل ویولت، نقره و

²⁰ Microinfusion

²¹ Ventral tegmentum area

مواجهه با سم، راه ورود، سن مواجهه و میزان سم دارد. در مطالعه حاضر تعداد نورون‌های تیره در گروه‌هایی که ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم پاراکوآت به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت می‌کردند که در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. لذا می‌توان گفت پاراکوآت به صورت واپسی به دوز موجب افزایش تعداد نورون‌های تیره در بخش متراکم جسم سیاه مغزی می‌گردد که شاخصی برای آسیب نورونی محسوب می‌شود و با یافته‌هایی Mc Cormak با بررسی ایمونوھیستوشیمی نشانگر^{۲۷} پراکسیداسیون لیپیدی نشان دادند تزریق سیستمیک پاراکوآت در موش سوری به طریق اکسیداتیو موجب دژنرسانس نورون‌های دوپامین‌ساز جسم سیاه می‌گردد و حساسیت این نورون‌ها را به بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نظری پارکینسون افزایش می‌دهد (۳۲).

اگرچه مکانیسم‌های مولکولی و سلولی سمتیت پاراکوآت هنوز به طور کامل شناخته نشده است ولی مطالعات حیوانی، محققان را قادر ساخت تا برخی از مکانیسم‌های دخیل در آسیب نورونی را تعیین کنند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مطرح شده برای سمتیت پاراکوآت، استرس اکسیداتیو می‌باشد. پاراکوآت در بدن به رادیکالی کاتیونی تبدیل می‌شود که از طریق ایجاد فرایند احیای تک الکترونی واپسی به NADPH^{۲۸} منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود و این رادیکال‌های آزاد در برخورد با مولکول‌های اکسیژن، تولید آنیون‌های سوپراکسید می‌کنند، رادیکال‌های آزاد اکسیژن از یکسو سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غیر اشبع و از سوی دیگر موجب آسیب به میتوکندری و خروج فاکتورهای پروآپوتوتیک از آن می‌شوند که منجر به مرگ سلولی از طریق آپوپتوز و در نهایت آسیب بافتی می‌شود (۳۳).

بنابراین پاراکوآت با مکانیسم استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث القای آسیب نورونی از طریق آپوپتوز گردد که با نتایج اولیه مطالعه حاضر همخوانی دارد. سلول‌های نوروگلیال از جمله آستروسیت‌ها نقش مهمی در تعیین فعالیت نورون‌ها از جمله رهاسازی و متابولیسم ناقلیین عصبی^{۲۹}، سمزدایی یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق گلوتاتیون، تنظیم جریان خون بافت شکل‌گیری سیناپس‌ها، تنظیم میانجی‌های عصبی و محافظت نورونی و حتی پاسخ‌های ایمنی دارد (۳۴). اثرات متقابل بین نورون‌ها و آستروسیت‌ها همواره نقش اساسی در تعیین فعالیت بافت عصبی دارد به نحوی که به دنبال اکثر ضایعات عصبی از جمله دژنرسانس نورونی، التهاب و ایسکمی آستروسیت‌ها به فرم واکنشی

²² Apomorphine

²³ Amino acid transporters

²⁴ Tyrosine hydroxylase

²⁵ Caudate putamen

Liou و همکاران نشان دادند تزریق یکطرفه پاراکوآت به داخل جسم سیاه مغزی باعث کاهش دوپامین در استریاتوم به صورت واپسی به دوز می‌شود. از لحاظ رفتارشناسی نیز باعث بروز رفتار چرخشی به سمت مقابل ناحیه آسیب‌دیده به دنبال تزریق آپومورفین^{۲۲} شد. از لحاظ ریخت‌شناسی نیز دژنرسانس نورونی، از بین رفتن قابل توجه اجسام نیسل در نورون‌های مربوطه و افزایش سلول‌های گلیال در جسم سیاه دیده شد (۲۷) که با نتایج مطالعه حاضر از لحاظ ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی همخوانی دارد و احتمال عبور پاراکوآت را از سد خونی -مغزی طی تزریق سیستمیک تقویت می‌کند. دژنرسانس نورونی ناشی از پاراکوآت از ویژگی‌های کلیدی نوروپاتولوژیک بیماری پارکینسون محسوب می‌گردد (۲۸) که در مطالعه حاضر با افزایش تراکم نورون‌های تیره مشخص شده است.

همچنین Shimizu و همکاران نشان دادند که پاراکوآت می‌تواند به صورت واپسی به دوز از سد خونی -مغزی طی روش میکرودیالیز مغزی عبور کند و وارد نورون‌های ناحیه استریاتوم گردد و در این میان آمینواسید ترانسپورترها^{۲۹} به عنوان ناقل اختصاصی عمل می‌کنند (۲۹).

Ossowska و همکاران نشان دادند تزریق طولانی‌مدت پاراکوآت به صورت داخل صفاقی باعث کاهش مقادیر قابل توجه تایروزین هیدروکسیلаз^{۲۴} به روش وسترن بلات و نیز دوپامین و متابولیت‌های آن در هسته دم‌دار^{۲۵} در مقایسه با گروه کنترل پس از ۲۴ هفتۀ می‌گردد که این کاهش آزادسازی دوپامین در ناحیه استریاتوم و هسته دم‌دار از آسیب نورون‌های دوپامینزیک جسم سیاه ناشی می‌شود و مسئول بروز علایم بالینی پارکینسون می‌باشد (۳۰).

Kuter و همکاران نشان دادند تزریق زیر جلدی پاراکوآت به مدت ۵ روز، روزانه ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش میزان دوپامین و متابولیت‌های آن به صورت واپسی به دوز در هسته دم‌دار، جسم سیاه و پیش‌بیشانی قشری^{۲۶} می‌گردد (۳۱). با کنار هم قرار دادن نتایج حاصل از مطالعه Ossowska، Kuter و مطالعه حاضر می‌توان به این نتیجه رسید که تزریق سیستمیک پاراکوآت در موش صحرایی با آسیب به نورون‌ها و پایانه‌های آن‌ها در مسیر نیکرواستریاتال منجر به تغییرات پاتولوژیک و نوروشیمیایی در نواحی مربوطه می‌گردد.

با توجه به اینکه میزان آسیب نورونی در بخش متراکم جسم سیاه مغزی در مطالعات متعدد با یافته‌های متنوعی گزارش شده است گمان می‌رود که میزان آسیب نورون‌های این ناحیه واپسی‌گرایی فراوانی به طول مدت

²⁶ Prefrontal cortex

²⁷ Marker

²⁸ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

²⁹ Neurotransmitter

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به شماره ۷۵۰۲۰۱۲/۶/۱۱ ۷۵۰۲۰۱۲/۶/۱۱ با حمایت مالی آن واحد انجام شد. از کارشناسان محترم آزمایشگاه آسیب‌شناسی و سمشناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و نیز مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفاء به پاس همکاری و زحمات بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

در می‌آیند که با تغییرات ظاهری از جمله هایپرتروفی و افزایش بیان فیلامان بینابینی گلیال فیبریلار اسیدیک پروتئین (GFAP)^{۳۰} همراه است (۳۵). با توجه به افزایش حجم و تعداد سلول‌های گلیال به دنبال آسیب نورونی ناشی از القای مسمومیت با پاراکوآت، توصیه می‌شود در مطالعات آتی به بررسی نقش سلول‌های گلیال به‌ویژه آستروسیت‌های واکنشی و میکروگلیاهای در حفاظت نورونی با کمک روش‌های ایمونوهیستوشیمی پرداخته شود.

منابع

- Wilks MF, Fernando R, Ariyananda PL, Eddleston M, Berry DJ, Tomenson JA, et al. Improvement in survival after paraquat ingestion following introduction of a new formulation in Sri Lanka. *PLoS Med.* 2008; 5(2): e49. doi: 10.1371/journal.pmed.0050049.
- Bertolote JM, Fleischmann A, Eddleston M, Gunnell D. Deaths from pesticide poisoning: a global response. *Br J Psychiatry.* 2006; 189: 201-3.
- Jeyaratnam J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat Q.* 1990; 43(3): 139-44.
- Reigart JR. Recognition and management of pesticide poisonings. DIANE Publishing; 2009. p. 11-7.
- Roberts TR, Dyson JS, Lane MC. Deactivation of the biological activity of paraquat in the soil environment: a review of long-term environmental fate. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(13): 3623-31.
- Sittipunt C. Paraquat poisoning. *Respir Care.* 2005; 50(3): 383-5.
- Izadi MN, Gheshlaghi F, Sharafi SE. Fatal poisoning cases admitted to the emergency department of poisoning, noor hospital. *J Clin Forensic Med.* 2003; 9(13): 122-6.
- Bullivant CM. Accidental poisoning by paraquat: Report of two cases in man. *BMJ.* 1966; 1(5498): 1272.
- Trush MA, Mimnaugh EG, Ginsburg E, Gram TE. In vitro stimulation by paraquat of reactive oxygen-mediated lipid peroxidation in rat lung microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981; 60(2): 279-86.
- Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology.* 2002; 180(1): 65-77.
- Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci.* 2005; 88(1): 193-201.
- Lawrence WS. Geographic variations in the prevalence rates of Parkinson's disease in Alberta. *Can J Neurol Sci.* 1993; 20(4): 307-11.
- Ben-Shlomo Y, Finnane F, Allwright S, Davey SG. The epidemiology of Parkinson's disease in the Republic of Ireland: observations from routine data sources. *Journal of the Irish Medical Association.* 1992; 86(6): 190.1
- Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet.* 1998; 352(9137): 1344-6.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurol.* 1998; 50(5): 1346-50.
- Gibrat C, Saint-Pierre M, Bousquet M, Lévesque D, Rouillard C, Cicchetti F. Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and α -synuclein inclusions. *J Neurochem.* 2009; 109(5): 1469-82.
- Choi WS, Palmiter RD, Xia Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J Cell Biol.* 2011; 192(5): 873-82.
- Gazewood JD, Richards DR, Clebak K. Parkinson disease: an update. *Am Fam Physician.* 2013; 87(4): 267-73.
- Uchenna NK, Nweze KG, Charles II. Effects of the methanolic extract of abeloschus esculentus (L) moench (Okro) fruit on the testes and sperm characteristics of male albino wistar rats. *Int J Adv Biol Biom Res.* 2014;

^{۳۰} Glial fibrillary acidic protein

- 2(10): 2686-90.
20. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego. Academic Press. 1986; p. 15-8.
21. Kherani ZS, Auer RN. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 2008; 116(4): 447-52.
22. Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol.* 1985; 67(1-2): 13-24.
23. Baracskay P, Szepesi Z, Orbán G, Juhász G, Czurkó A. Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Res.* 2008; 1228: 217-28.
24. Ishida K, Shimizu H, Hida H, Urakawa S, Ida K, Nishino H. Argyrophilic dark neurons represent various states of neuronal damage in brain insults: some come to die and others survive. *Neuroscience.* 2004; 125(3): 633-44.
25. Marttila RJ, Röyttä M, Lorentz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain. *J Neural Transm.* 1988; 74(2): 87-95.
26. Calò M, Iannone M, Passafaro MM, Nistico G. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurones after microinfusion of paraquat into the rat substantia nigra or into the ventral tegmental area. *J Comp Pathol.* 1990; 103(1): 73-8.
27. Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. Effects of paraquat on the substantia nigra of the Wistar rats: neurochemical, histological, and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 137(1): 34-41.
28. Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Monte DA. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Neurobiol Dis.* 2007; 25(2): 392-400.
29. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 2001; 906(1): 135-42.
30. Ossowska K, Wardas J, Śmiałowska M, Kuter K, Lenda T, Wierońska JM, et al. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci.* 2005; 22(6): 1294-304.
31. Kuter K, Śmiałowska M, Wierońska J, Zięba B, Wardas J, Pietraszek M, et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res.* 2007; 1155: 196-207.
32. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol. Dis.* 2002; 10(2): 119-27.
33. Ramachandiran S, Hansen JM, Jones DP, Richardson JR, Miller GW. Divergent mechanisms of paraquat, MPP⁺, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol Sci.* 2007; 95(1): 163-71.
34. Seth P, Koul N. Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci.* 2008; 33(3): 405-21.
35. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2006; 2(12): 679-89.