

ارزیابی میزان آسیب‌های بافتی و تغییرات آنزیمی کبد متعاقب مسمومیت مزمن سرب در دوران جنینی و طول زندگی موش صحرایی

روناک محمدی^{۱*}، فرح فرخی^۲، وحید نجاتی^۲، سیامک عصری رضایی^۳

چکیده

زمینه و هدف: به منظور ارزیابی تغییرات عملکردی کبد متعاقب مسمومیت با سرب، فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و تغییرات پاتولوژیک کبد در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: موش‌های نر و ماده نژاد آلبینو (مجموعاً ۴۰ سر)، از ابتدای زندگی جنینی تا هفته شانزدهم زندگی در ۵ گروه ۸ تایی در معرض استات سرب با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۴۰ mg محلول در یک لیتر آب آشامیدنی قرار گرفتند. پس از ۱۶ هفته، حیوانات به وسیله کلروفرم بیهوش شده و خونگیری از قلب انجام شد. پس از جداسازی سرم جهت آنالیزهای بیوشیمیایی، کبد خارج و در فرمالین ۱۵٪ جهت مطالعات بافتی تثبیت شد. فعالیت آنزیم‌های ALT, AST, ALP و غلظت سرب نمونه‌های سرم به ترتیب به روش اسپکتروفتومتری و جذب اتمی (کوزه گرافیتی)، اندازه‌گیری شد. مقاطع بافتی پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، ائوزین تحت میکروسکوپ نوری، مورد مطالعه بافتی قرار گرفتند. نتایج با استفاده از روش واریانس و آزمون توکی آنالیز شد و مقادیر $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های کبدی با غلظت سرب سرم رابطه مستقیم داشت، و در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. تغییرات بافتی به صورت آماس، ارتشاح لمفوسیت‌ها به بافت کبد و نکروز سلول‌های کبدی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، قرارگیری در معرض سرب به مدت طولانی منجر به آسیب کبدی وابسته به دوز و زمان می‌شود.

کلیدواژه‌ها: استات سرب؛ کبد؛ کبد - پاتولوژی.

^۱ دانشجوی ارشد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۲ استادیار بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
^۳ دانشیار پاتولوژی بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
روناک محمدی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
ronak.mohamadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Mohamadi R, Farokhi F, Najati V, Asri Rezaei S. Assessment of the Amount of Hepatohistopathological and Enzymatic Changes after Chronic Lead Intoxication In Utero and Throughout Life in Rat. Qom Univ Med Sci J 2013;7(2):27-34. [Full Text in Persian]

مقدمه

اثرات سرب بر سلامت توسط آژانس ترکیبات سمی و بیماری‌های مربوط به آن (ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)، مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (Centers for Disease Control and Prevention)، CDC مؤسسه بین‌المللی سلامت و بهداشت حرفه‌ای (National Institute for Occupational Safety and Health)، NIOSH به‌صورت گسترده‌ای اعلام شده است (۱-۳). هزاران مقاله علمی پیرامون اثرات زیانبار سرب در کودکان و بزرگسالان موجود است. سرب یک فلز خاکستری مایل به آبی است که به دلیل خواص سودمند آن از قبیل: نقطه ذوب پایین، انعطاف‌پذیری، مقاومت در برابر فرسایش و پوسیدگی؛ از زمانهای قدیم مورد استفاده و توجه بوده است. اثرات سمی سرب برای نخستین بار توسط روم باستان و مصریان کشف شد. سرب در خانه‌های قدیمی، رنگ‌های ساختمانی، گازوئیل و صنعت به‌صورت گسترده‌ای استفاده می‌شود. انسان از طریق استنشاق گرد و غبار، بخار سرب و یا ورود آن از راه خوراکی و تماس با البسه آلوده به سرب در معرض آن قرار می‌گیرد (۴). سمی بودن سرب بر روی سیستم‌هایی مانند سیستم خونساز، سیستم ایمنی، کلیه‌ها، کبد و سیستم عصبی تأثیری چندگانه دارد. سرب از طریق دستگاه گوارش، سیستم تنفسی و پوست وارد خون می‌شود، و سپس در خون ۹۹٪ آن با اریتروسیت‌ها پیوند یافته و تنها ۱٪ در پلاسما جهت انتقال به سایر اندام‌ها باقی می‌ماند (۵). سرب می‌تواند به سرعت جذب شده و به مقادیر قابل توجه و مؤثری در خون برسد. اعتقاد بر این است که این عنصر پیوند محکمی را با ماکرومولکول‌های اجزای درون سلولی تشکیل می‌دهد. برای اثبات این ادعا، محققین پروتئین‌های پیوندیافته با سرب را از کلیه‌ها، کبد، خون و مغز جدا کرده و مورد بررسی قرار دادند (۶). سرب با سنتز کلاژن تداخل یافته و بر ارتجاع عروقی اثر می‌گذارد (۷). کودکان به دلایل مختلف زیر گروه مناسب‌تری برای مسمومیت با سرب هستند:

(الف) در کودکان خطر جذب سرب از طریق خوراکی بیشتر است (۸).

(ب) شدت صدمات گوارشی در کودکان و نوزادان بیشتر از بزرگسالان است (۹).

(ج) تکوین سیستم عصبی در کودکان آسیب‌پذیرتر از بزرگسالان است (۱۰). قرارگیری در معرض سطوح پایین و مزمن سرب در این دوران زندگی، سطوح ضریب هوشی را به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد، که متأسفانه اثرات عصبی رفتاری آن غیرقابل بازگشت است (۱۱-۱۲). سرب جذب‌شده چه از طریق گوارشی و یا تنفسی در بافت‌های نرم تجمع می‌یابد. مطالعات در افرادی که در زمان حیات خود به مدت طولانی در معرض سرب بوده‌اند نشان می‌دهد پس از مرگ، بیشترین مقدار سرب (۳۳٪) در میان بافت‌های نرم بدن مانند قشر و مرکز کلیه در بافت کبد تجمع می‌کند (۱۳). کبد و ورید باب اولین اندام دریافت‌کننده مواد غذایی جذب‌شده و سایر مواد خارجی هستند. کبد اندامی فعال از نظر متابولیسمی است که دارای اجزایی با فعالیت پادزهری فاز I و II بوده، و سایر اندام‌های بدن را نیز در مواجهه با مواد سمی محافظت می‌کند. از این‌رو فعالیت طبیعی این ارگان تأثیر بسیاری بر سلامت سایر اندام‌ها دارد (۱۴). جهت ارزیابی آسیب و درگیری کبد، آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) سنجیده می‌شود. استفاده از آنزیم‌های ALT, AST, ALP و بررسی افزایش همزمان آنها، بیماری کبدی را مطرح می‌سازد. بنابراین، استفاده از این آنزیم‌ها جهت تأیید و تشخیص آسیب‌های کبدی در کنار مطالعات بافتی حایز اهمیت است (۱۵). در این پژوهش برخلاف سایر مطالعات ذکرشده، تیمار از روز اول جنینی شروع شد و در غلظت‌های مختلف نیز سعی گردید تا بین آسیب ایجادشده با سرب در بافت کبد و غلظت سرب خون و میزان دریافت آن، رابطه‌ای منطقی برقرار شود. همان‌طور که قبلاً ذکر شد مطالعات متعددی در دوره محدودی از زندگی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، اما در این مطالعه برای اولین بار دوران رویانی و بلوغ حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش حاضر از اولین روز زندگی جنینی، تیمار با غلظت‌های بسیار کم به‌صورت محلول در آب آشامیدنی اعمال شد تا اثرات وابسته به دوز و زمان به‌خوبی ظاهر شود. از آنجا که منابع پنهان سرب به‌صورت مزمن در محیط زندگی، به‌خصوص در ترکیبات بهداشتی - آرایشی به فراوانی یافت می‌شوند، لذا تعیین حد مجاز غلظت خونی سرب بسیار مفید خواهد بود تا در مطالعات جامع‌تری نیز به بررسی اثرات

آنتی‌اکسیدان‌ها در پایین آوردن غلظت سرمی سرب و یا از بین بردن اثرات سمی سرب پرداخته شود.

روش بررسی

ده سر موش بالغ ماده ۸ هفته‌ای با وزن تقریبی 200 ± 10 g از حیوانخانه دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه به‌منظور جفت‌گیری، در مجاورت ۵ سر موش نر بالغ (هر موش نر به همراه ۲ موش ماده در یک قفس) تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی، دمای مناسب، تهویه مطلوب و رژیم غذایی حیوانات آزمایشگاهی قرار گرفتند (۱۶). استات سرب از شرکت مرک (Merck) خریداری شد. پس از ۱۵ روز براساس وجود پلاک واژنی، از وقوع جفت‌گیری اطمینان حاصل شده و موش‌های نر برداشته شدند، و هر موش ماده در قفس جداگانه قرار داده شد، این تاریخ به‌عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. از اواسط دوران بارداری موش‌ها به ۵ گروه ۲ تایی تقسیم شده و ۴ گروه تحت تیمار استات سرب محلول در آب آشامیدنی با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۴۰ mg/l قرار گرفتند و یک گروه هم به‌عنوان شاهد، آب خالص دریافت کردند. این تیمار تا پایان شیرخوارگی توله‌ها در موش‌های ماده انجام شد، سپس تا پایان هفته شانزدهم زندگی در زاده‌ها ادامه یافت (۱۶). در این بررسی زاده‌های نر و ماده از هم تفکیک نشدند و در ۵ گروه و در هر گروه ۸ حیوان قرار گرفت. در مجموع، ۴۰ سر موش صحرایی بررسی شد. حیوان‌ها در مدت تیمار در دریافت آب و غذا محدودیتی نداشتند. در پایان هفته شانزدهم، موش‌ها با کلروفرم بیهوش شده و خونگیری از قلب به‌وسیله سرنگ هیپارینه انجام گرفت. به‌منظور جداسازی سرم، خون با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ و تا زمان انجام سنجش آنزیم در فریزر 80°C نگهداری شد. در ادامه، کبد بلافاصله خارج و تشریح شد، و جهت مطالعات بافت‌شناسی

در فرمالین بافر ۱۵٪ تثبیت گردید (۱۷). فعالیت آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) تحت شرایط دمایی 37°C به‌وسیله کیت‌های تشخیصی زیست‌شیمی به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۵ nm اندازه‌گیری و پس از اعمال ضرایب و بردن روی نمودار براساس IU/L گزارش شد. غلظت سرب در نمونه‌های سرم ($0/1\text{ ml}$) به‌طور مستقیم از طریق روش جذب اتمی کوره گرافیتی، پس از اضافه کردن ماتریکس با ترکیب $[20\text{Xg/L (NH}_4)_2\text{HPO}_4, 2\% \text{ TritonX-100}]$ تعیین شد (۱۸).

اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه (ZEEnit 700-Analytik-Jena) ساخت کشور آلمان، و جذب نوری تحت طول موج ۲۸۳ nm با استفاده از لامپ کاتد سرب انجام گرفت، سپس براساس منحنی استاندارد رسم شده از طریق محلول استوک، غلظت برحسب $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ خون بیان شد. بافت کبد تثبیت شده در فرمالین، پس از ۱۵ روز در سریال الکل آبگیری، در گزیرلول شفاف‌سازی و در پارافین قالب‌گیری شد. مقاطع بافتی با ضخامت $5\text{ }\mu\text{m}$ برش داده شد. در ادامه، به‌وسیله هماتوکسیلین، ائوزین رنگ شده و جهت بررسی با میکروسکوپ نوری آماده شد (۱۹). داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت $(\text{Mean} \pm \text{SD})$ گزارش شد و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (۲۰).

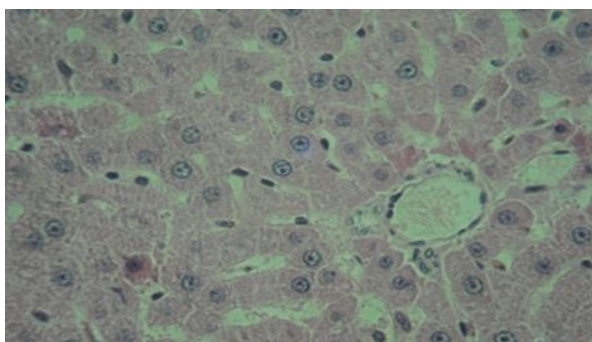
یافته‌ها

بررسی فاکتورهای فعالیت آنزیم کبدی پس از ۱۶ هفته تیمار با استات سرب، نشان داد اثرات سرب می‌تواند وابسته به دوز و زمان باشد. به این نکته باید توجه نمود که این اثرات به‌صورت تجمعی بروز می‌کنند (جدول).

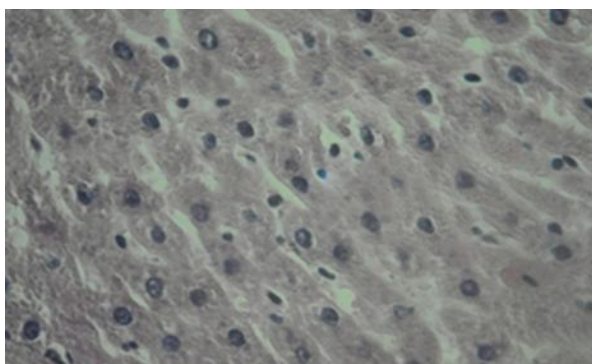
جدول: اندازه‌گیری مقادیر آنزیم‌های کبدی در گروه‌های تیمار، کنترل و غلظت سرب در نمونه‌های مقادیر به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ در ۵ گروه ۸ تایی

گروه	کنترل	۴۰ mg	۱۵ mg	۱۰ mg	۵ mg
آنزیم‌های کبدی					
ALT(GOT)IU/L	$50/06 \pm 7/17$	$125/37 \pm 7/58^*$	$118/75 \pm 5/42^*$	$105/50 \pm 16/43^*$	$106/25 \pm 8/54^*$
AST(GPT)IU/L	$30/54 \pm 2/54$	$86/62 \pm 3/46^*$	$60/17 \pm 1/94^*$	$50/34 \pm 2/88^*$	$47/08 \pm 2/74^*$
ALP IU/L	$67/54 \pm 10/74$	$138/28 \pm 37/35^*$	$126/14 \pm 37/87^*$	$114/26 \pm 17/28$	$67/53 \pm 10/74$
Pb $\mu\text{g/dl}$	$1/96 \pm 0/53$	$37/05 \pm 5/28^*$	$27/09 \pm 4/01^*$	$19/17 \pm 3/55^*$	$5/50 \pm 0/95^*$

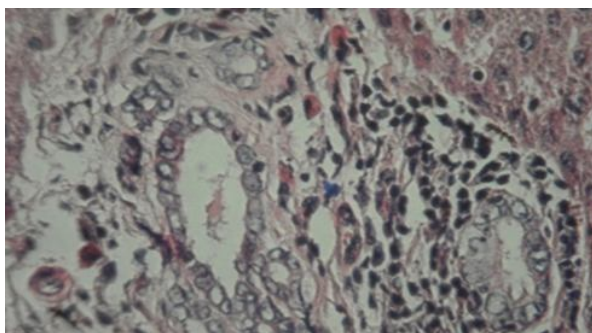
$p < 0/05$ از نظر آماری با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد.



شکل الف): تصویر میکروسکوپی کبد در گروه شاهد، نشان‌دهنده ورید مرکزی و نمای عادی هپاتوسیت‌ها است.



شکل ب): تصویر میکروسکوپی کبد در گروه تیمار ۴۰mg، نشان‌دهنده تخریب هپاتوسیت‌ها با هسته‌های پیگنوزه می‌باشد، که نمای نکروز است.



شکل ج): تصویر مقطع کبد در گروه تیمار شده با غلظت ۴۰mg که هیالینیزه شدن و ضخیم‌شدگی لایه مدیای شریانچه کبدی در فضای پورت به همراه آماس و ارتشاح لکوسیت‌ها دیده می‌شود. تمامی تصاویر با بزرگنمایی 40 X و رنگ آمیزی H & E تهیه شده‌اند.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد قرارگیری در معرض دوز مزمن و طولانی مدت سرب از طریق آب آشامیدنی منجر به بروز اثرات سمی وابسته به دوز و زمان در موش صحرایی می‌شود، و در دوزهای بالا، مسمومیت به صورت تغییرات فاکتورهای خونی و

آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد ($p=0$). در بین گروه‌های تیمار شده با غلظت ۴۰mg با ۱۵، آنزیم ALT تفاوت معنی‌داری نداشت ($p=0/358$)، اما بین گروه‌های ۱۵ با ۵ ($p=0/497$)، و ۱۰ با ۵ نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/314$). آنزیم آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) در تمام گروه‌های تیمار در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=0$)، اما در بین گروه‌های ۱۰ با ۵ تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p=0/237$). آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه ۴۰mg در مقایسه با گروه کنترل و ۵mg افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=0/001$)، اما بین گروه‌های ۵ و ۱۰mg در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/088$). همچنین بین گروه‌های ۱۰ و ۱۵mg اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p=0/945$)، اما بین گروه‌های ۱۵mg با گروه کنترل و ۵mg اختلاف معنی‌دار بود ($p=0/027$). لازم به ذکر است نتایج بررسی میان نر و ماده تفاوت معنی‌دار نداشته است، لذا مقادیر براساس ۸ نمونه در هر گروه گزارش شده است.

بررسی آسیب‌شناسی بافتی

برای اثبات تغییرات بیوشیمیایی آنزیم‌های کبدی، بررسی هیستوپاتولوژیک کبد در گروه تیمار و شاهد به عمل آمد. کبد در گروه کنترل نمای طبیعی بدون شواهدی از ناهنجاری میکروسکوپی نشان داد (شکل الف). در گروه تیمار شده با غلظت‌های ۵mg و ۱۰mg نسبت به گروه کنترل تغییرات چشمگیری مشاهده نشد. در گروه ۱۵mg و ۴۰mg، واسکولیت عروق خونی، انبساط سینوزوئیدها، آماس دور عروقی و ارتشاح لمفوسیت‌ها در مقایسه با گروه کنترل دیده شد (شکل ب). همچنین ضخیم‌شدگی و هیالینیزه شدن آرتریول‌های کبدی قابل رؤیت بود. در نواحی از کبد نکروز گسترده هپاتوسیت‌ها، به‌خصوص در گروه تیمار ۴۰mg به همراه مهاجرت لکوسیت‌ها و ماکروفاژها به این نواحی مشهود بود (شکل ج). با توجه به افزایش آنزیم‌های کبدی به صورت وابسته به دوز، بیماری هپاتوسلولار مطرح می‌شود که وجود نکروز و آماس نیز در بافت کبد این نتیجه را تصدیق می‌کند.

تخریب ساختمان اندام حیاتی بروز می‌کند، اما فاکتورهای بالینی سرم نشان‌دهنده تخریب و اختلال در عملکرد کبد است و شواهد آسیب‌شناسی بافتی اثر مسمومیت را تأیید می‌کند. اثرات هپاتوتوکسیکسیستی القاشده توسط سرب و دیگر آلاینده‌های محیطی فلزی شناخته شده است (۲۶-۲۱). شاخص بالینی آسیب‌دیدگی کبد، انجام آزمایشهای عملکرد کبدی است، اگرچه اغلب آنها برای کبد اختصاصی نیستند، ولی چنانچه مقادیر آنها غیرطبیعی باشد منشأ اختلال کبدی محتمل است.

این آزمایشها شامل: ALT, AST, سرمی بوده که در نکرور سلول‌های کبدی یا افزایش نفوذپذیری غشا افزایش می‌یابند (۲۷). در مطالعه حاضر، تجویز استات سرب به‌صورت مزمن منجر به افزایش فعالیت و مقدار آنزیم‌های ALT, AST, ALP در نمونه‌های سرم شد. گرچه علت این تغییرات به‌خوبی شناخته نشده، ولی تعدادی از مطالعات به‌خوبی تغییرات مورفولوژیکی را در کبد در هفته ۱۳ تیمار با پروتئین کم به‌وسیله افزایش فعالیت ALT نشان داده‌اند (۲۸). در این مطالعات تغییرات بافتی بدون افزایش فعالیت آنزیم‌ها گزارش شده است. در سال ۱۹۹۲ تغییرات عملکرد کبدی در توله‌های تیمار شده با رژیم کم پروتئین منجر به افزایش فعالیت ALT و AST کبد، بدون شواهدی از تجمع چربی در بافت گردید (۲۹). همچنین در مطالعه دیگری کمبود پروتئین در رژیم غذایی باعث افزایش آنزیم‌های کبدی شد (۳۰). بنابراین، با وجود ارتباط میان ALT و هیستوپاتولوژی کبد، برخی نتایج تأییدکننده عدم ارتباط همیشگی خطی میان فاکتورهای بیوشیمیایی و اثرات بافت‌شناسی است (۳۱). در این مطالعه دو آنزیم ALP با افزایش ۹۶/۶٪ و آنزیم AST با افزایش ۳۸/۶٪، بدون هیچ تغییری در سطح آنزیم ALT مشاهده گردید و نکرور نیز در بافت کبد تصدیق شد.

همراهی این دو آنزیم (ALT, ALP) با افزایش در سطح، بدون افزایش سطح آنزیم ALT، نشان‌دهنده آسیب انسدادی است. فلزات سنگین القاگر تولید رادیکال‌های آزاد و متعاقب آن استرس اکسیداتیو هستند، که یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین دلایل مرگ سلول‌های کبدی است (۳۶-۳۲). همچنین علاوه بر استرس اکسیداتیو، سرب از سه طریق احتمالی در کبد مسمومیت القا می‌کند:

۱- اثر مستقیم سمی فلز سرب و یا ایسکمی که منجر به صدمه سلول‌های اندوتلیال می‌شود. ۲- فرآیند مربوط به آسیب التهابی ناشی از فعالیت سلول‌های کوپفر و نفوذ نوتروفیل‌ها، که نقش مهمی در واسطه‌گری التهاب دارند (۳۷، ۳۸) و ۳- فرآیند مرتبط با اختلال سرب که از راههای نقل و انتقال زیستی عناصر مهمی از قبیل کلسیم، مس و روی انجام می‌شود (۴۰). در داخل سلول، یون‌های سرب می‌توانند با ایجاد اختلال در اغلب فرآیندهای سلولی که توسط یون‌های دو ظرفیتی (خصوصاً کلسیم) واسطه‌گری می‌شود؛ در مهار یا فعال کردن سایر آنزیم‌ها نقش داشته باشند (۴۱). در این مطالعه قرارگیری در معرض سرب به‌صورت مزمن، سبب آسیب کبدی شد، و افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT, AST, ALP نیز آن را تأیید نمود که شاخص آسیب کبدی است. سطح ALT سرم به سرعت هنگام آسیب‌دیدگی کبد به دلیل التهاب کبد، سیروز کبدی، تومور کبد، یرقان انسدادی و یا سمی بودن کبد القاشده توسط داروها یا سموم خارجی افزایش می‌یابد. در اغلب بیماری‌های کبدی افزایش سطح AST مشاهده شده است، البته در صدمات قلبی نیز سطح AST متأثر می‌شود. هرچند سطوح سرمی ALT و AST در بیماری‌های کبدی متأثر می‌شوند، اما ALT آنزیم اختصاصی‌تری برای کبد است (۴۱).

آنزیم الکالین فسفاتاز (ALP) از ترشحات بافتی و سرمی انسان است که نقش آن در ایجاد بار خنثی مولکولی، همچنین برخی درجات اندازه اثبات شده است. ALP در بافت‌های کبد، استخوان، روده و جفت به شکل اختصاصی وجود دارد. در وضعیت سلامت، ALP پلاسما به‌طور اولیه از استخوان، کبد، و با کمترین توزیع از روده‌ها منشأ می‌گیرد (۴۲). اندازه‌گیری ALP پلاسما در تشخیص بیماری‌های کبد و استخوان ارزشمند است. در این بیماری‌ها ALP پلاسما در نتیجه افزایش خروج از استخوان و کبد به پلاسما افزایش می‌یابد (۴۳). از طرفی، ALP از پروتئین‌های غشایی بوده و می‌تواند در نفوذپذیری غشا و نقل و انتقال مواد ایفای نقش کند (۴۴). چندین مطالعه افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT, AST, ALP را در جریان مسمومیت با سرب گزارش کرده‌اند (۴۵، ۴۶). که با نتایج بررسی حاضر همخوانی دارد.

نتایج حاصل از آنالیز آماری آنزیم‌ها با یافته‌های بررسی بافتی؛ نکروز سلول‌های کبدی و خروج آنزیم‌ها را به داخل گردش خون تأیید می‌کند. در این تحقیق حد آستانه معنی‌دار غلظت سرب در پیدایش آسیب‌های کبدی به‌خوبی نشان داده شده است. از آنجا که حد مجاز غلظت سرب در خون و یا ادرار براساس منابع تعیین‌شده در NIOSH، $1-5 \mu\text{g/ml}$ است، پس با کمترین غلظت در حد 5mg/l آب آشامیدنی هم اثرات تخریبی آسیب بر کبد مشهود است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد سرب منجر به اختلال متابولیسمی در کبد موش‌های صحرایی به‌وسیله اختلال پارامترهای بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو می‌شود. با توجه به تغییرات آنزیمی به‌صورت افزایش غلظت پلاسمایی آنزیم‌های داخل سلولی و مشاهده نکروز بافتی در کبد می‌توان انتظار داشت که سرب منجر به آسیب برگشت‌ناپذیر در کبد و در نهایت سیروز کبدی شود. لذا پیشنهاد می‌گردد در دوران تیمار و در فواصل مختلف دوران زندگی به‌منظور تعیین آغاز اثرات، مطالعه جامع‌تری صورت گیرد.

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، تجویز استات سرب به موش‌های رت با دوز بالا (15mg ، 40) منجر به افزایش معنی‌دار آلکالین فسفاتاز خون در مقایسه با گروه کنترل می‌شود، که این امر می‌تواند به اثرات سمی سرب بر سلول‌های کبدی به‌طور اختصاصی، و یا ناشی از کمبود بیشتر آنزیم‌های داخل سلولی در نتیجه خروج آن از غشای سلول مربوط باشد و خود نیز منجر به تحریک ساخت بیشتر آنزیم گردد.

آنزیم آلکالین فسفاتاز از گروه آنزیم‌های گلیکوپروتئینی پیوندیافته با آلکالین PII است. فعالیت ALP تقریباً در تمام سلول‌ها، به‌ویژه استخوان، کبد، لوله گوارش، غدد فوق کلیوی و جفت وجود دارد. عملکرد و سوبستراهای طبیعی ALP ناشناخته باقی‌مانده است (۴۷). بررسی‌ها نشان می‌دهد احتمالاً ۴ موقعیت ژنی مسئول ساخت گروه‌های آنزیمی ALP هستند (۴۸). در فرضیه جانسون دو محل احتمالی فعالیت در کبد برای آنزیم ALP مطرح است که عبارتند از: سطح سینوزوئیدی هپاتوسیت‌ها و دیگری سطح ریزپرزهای مجاری صفراوی.

همچنین از آنجا که ALP در نقاط دیگری از بدن هم فعالیت دارد، لذا نمی‌تواند آنزیم اختصاصی برای کبد باشد.

References:

1. ATSDR. Toxicological Profile for Lead. Atlanta GA: Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. USA: ATSDR Publication; 1990. p. No. TP-88/17.
2. CDC. Preventing Lead Poisoning in Young Children. Atlanta. GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1991.
3. NIOSH. Criteria for a Recommended Standard: Occupational Exposure to Inorganic Lead, Revised Criteria 1978. Cincinnati OH: U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, DHEW (NIOSH) Publication; 1978. p. 78-158.
4. Department of Health and Human Services. Protecting Workers Exposed to Lead-based Paint Hazards: A Report to Congress. USA: DHHS (NIOSH) Publication; 1997. p. 98-112.
5. Howard D, Stowe DH, Goyer RA, Krigman M. Experimental Oral Lead Toxicity in Young Dogs. Clinical and Morphologic Effects. Arch Pathol 1973;95(2):106-116.
6. Mousa SA. Expression of Adhesion Molecules During Cadmium Hepatotoxicity. Life Sci 2004;75(1):93-105.
7. Needleman H. Lead Poisoning. Annu Rev Med 2004;55:209-22.
8. Lanphear BP, Hurnung R, HOM, Howard CR, Eberle S, Knauf K. Environmental Lead Exposure During Early Childhood. J Pediatr 2002;140(1):140-147.

9. Belinger DC. Lead. *Pediatrics* 2004;113(4 Suppl):1016-1022.
10. Lidesky TI, Schneider JS. Lead Neurotoxicity in Children: Basic Mechanisms and Clinical Correlates. *Brain* 126(1):5-19.
11. Fisher AM, Vessay JA. Preventing Lead Poisoning and Its Consequences. *Ped Nursing* 1998;24(4):348-350.
12. Needleman H, et al. The Long Term Effects of Exposure to Low Doses of Lead in Childhood: The Port Pirie Cohort Study. *New England J Med* 1990;332(2):83-88.
13. Patrick L. Lead Toxicity, a Review of the Literature. Part 1. Exposure Evaluation and Treatment. *Altern Med Rev* 2006;11(1):2-22.
14. US, EPA. Air Quality Eriteria Document for Lead (Pb). (Vol. 4). Washington DC: US Environmental.
15. Kathleen Deska Pagona. *Mosbys Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. 2nd ed. New York: Mosby; 2002.
16. Mudipalli A. Lead Hepatotoxicity and Potential Health Effects. *Indian J Med Res* 2007;126(6):518-527.
17. Snyder JE, Nikoly NM, et al. The Efficiency of Maternal Transfer of Lead and Its Influence on Plasma IgE and Splenic Cellularity of Mice. *Toxicol Sci* 2000;57(1):87-97.
18. Bannon DI, Murashchik C, Zapt CR, Farfel MR, Chisoim JJ Jr. Graphite Furnance Atomic Absorption Spectroscopic Measurement of Blood Lead in Matrix-Matched Standards. *Clin Chem* 1994;40(9):1730-1734.
19. Jadhov SH, Sarkar SN, Patil RD, Tripathi HC. Effects of Subchronic Exposure Via Drinking Water-Contaminating Metals: Abiochemicals and Histopathological Study in Male Rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007;53(4):667-677.
20. Itoh M, Takaoka M. Preventive Effects of Lactocystin, a Selective Proteasome Inhibitor on Ischemic Acute Renal Failure in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(2):501-507.
21. Noori M, Muguhi Z, Heidary. Effects of Chronic Lead Acetate Intoxication on Blood Indices of Male Adult Rat. *DURO* 2003;11(4):143-151.
22. Cui X, Li S, Shrain A, Kobayashi Y, et al. Subchronic Exposure to Arsenic Through Drinking Water alters Expression of Cancer- related Genes in Rat Liver. *Toxical Pathol* 2004;32(1):64-72.
23. Goswami K, Gachhui R, et al. Bandopadhyay a Hepathorenal Dysfunctions in Lead Pollution. *J Environ Sci Eng* 2005;47(1):75-80.
24. Ayensu WK, Tchounwou PB, et al. Microarray Analysis of Mercury- induced Change in Gene Expression in Human Liver Carcinoma Cells: Importance in Immune Responses. *Int J Environ Res Public Health* 2006;3(2):141-173.
25. Berrahal AA, Lasram M, El Elj N, Kerkeni A, Gharbi N, El-Fazâa S. Effect of Age-dependant Exposure to Lead on Hepathotoxicity and Nephrotoxicity in Male Rats. *Environ Toxicol* 2011;26(1):68-78.
26. Romm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of Iron Overload: Mechanism of Iron-induced Hepatic Fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2005;25(4):433-449.
27. Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK. Role of Zinc in Nickel Induced Hepatotoxicity in Rats. *Chem Biol Interact* 2004;150(2):199-209.
28. Pineiro Carrero VM, Pinerio EO. Liver. *Pediatrics* 2004;113(4):1097-1106.
29. Travlos GS, Morris RW, El well MR, Duke A, Resenblum S, Thompson MB. Frequency and Relationships of Clinical Chemistry and Liver and Kidney Histopathology Findings in 13-week Toxicity Studies Rats. *Toxicology* 1996;107(1):17-29.

30. Pand WG, Ellis KJ, Schoknecht P. Response of Blood Serum Constituents to Production of and Recovery from a Kwashiorkor-like Syndrome in the Young Pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;200(4):555-561.
31. Kumari R, RaoYN, Talokdar B, Agerval S, Pori RK. Serum Enzymes Abnormalities in Protein Energy Malnutrition. *Indian Pediat* 1993;30(4):469-473.
32. Bashir S, Sharma Y, Irshad M, Nag TC, Tivari M, Kabra M. Arsenic Induced Apoptosis in Rat Liver Following Repeated 60 Days Exposure. *Toxicology* 2006;217(1):63-70.
33. EL-Demerdash FM. Effects of Selenium Mercury on the Enzymatic Activities and Lipid Peroxidation in Brain, Liver and Blood of Rats. *J Environ Sci Health B* 2001;36(4):489-499.
34. Liu J, Liu Y, Habibbo SM, Walkes MP, KlassenCD. Chronic Combined Exposure to Cadmium and Arsenic Exacerbate Nephrotoxicity Particularly in Methalothionenin I/II Null Mice. *Toxicology* 2000;147(3):157-166.
35. Reed DJ. Evaluation of Chemical-induced Oxidative Stress as a Mechanism of Hepatocyte Death. In PLaa GL, Hevitt *Toxicology of the liver*. 2nd ed. Washington: Taylor and Francis, DC; 1998. p. 187-220.
36. Sheikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-induced Hepatotoxicity and Renal toxicity and Protection by Antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;154(3):256-263.
37. Valko M, Rhodes CJ, Mocal J, Isacovic M, Mazure M. Free Radicals Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-induced Cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
38. Rikons LE, Yamano T. Mechanisms of Cadmium Mediated-acute Hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14(2):110-117.
39. Baker TK, Vanvoren HB, Smith WC, Carfagna MA. Involvement of Calcium Channels in the Sexual Dimorphism of Cadmium- induced Hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;137(3):185-192.
40. Fataakis G, Timbrell JA. Role of Trace Elements in Cadmium Chloride Uptake in Hepatoma Cell Lines. *Toxicol Lett* 2006;164(2):97-103.
41. Berrahall A, Nehdi A, Hajjaji N. Antioxidant Enzymes Activities and Bilirubin Level in a Adult Rats Treated with Lead. *C R Biol* 2007;330(8):581-588.
42. Dufor DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. Recommendations for Use of Laboratory Tests in Screening Diagnosis and Monitoring. *Clin Chem* 2000;46(12):2050-2068.
43. Moss DW. Alkaline Phosphatase Isoenzymes. *Clin Chem* 1982;28(10):2007-2016.
44. Rosalki SB, Foo A. Two New Methods for Separating and Quantifying Bone and Liver Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Plasma. *Clin Chem* 1984;30(7):1182-1186.
45. Sivaprased R, Naganey M, Varalakshmi P. Combined Efficacies of Lipoic acid and 2,3- Dihydroxybutyrate Against Lead- induced Lipid Peroxidation in Rat Liver. *J Nurt Biochem* 2004;15(1):18-23.
46. Dioka CE, Oriasakwe OE, Adeniyi FAA, Meludo SC. Liver and Renal Function Tests in Artisan Occupational Exposed to Lead in Mechanic Village in New Nigeria. *Int J Environ Res Public Health* 2004;1(1):21-25.
47. AIT Hamadouche N, Slimani M, Aous AEK. Biochemical Parameters Alterations Induced by Chronic Oral Administration of Lead Acetate in Albino Rats. *Am J Sci Res* 2009;4:5-16.
48. Martins MJ, Negrao MR, Hipolito-Resis C. Alkaline Phosphatase from Rat Liver. *Clin Biochem* 2001;34(6):463-8.