

Evaluation of Cr (VI) induced Neurotoxicity and Oxidative Stress in PC12 Cells

Abolfazl Dashti¹, Maliheh Soodi^{2*}, Nahid Amani¹

1- M.Sc., Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Soodi@modares.ac.ir

Received: 14/Sep/2014, Accepted: 25/Nov/2014

Abstract

Objective: Hexavalent chromium [Cr (VI)] compounds are well-known environmental contaminants generated from industrial processes. Several studies have reported the harmful effects of Cr (VI) on different organs, however, little is known about neurotoxic effects of Cr (VI). The aim of this study is to investigate the toxic effects of Cr (VI) on PC12 cells.

Methods: PC12 cells were cultured following standard protocol and exposed to various concentrations (1-100 μ M) of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) for 24, 48 and 72 h. After exposure, cell viability was measured by the MTT assay. Also following exposure, production of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation were measured.

Results: Potassium dichromate induced significant cell death in PC12 cells. The IC50 values for cytotoxicity were 22.02 for 24 h, 1.88 for 48 h, and 1.85 for 72 h of exposure. Significant differences between IC50 for 24 h of exposure compared to 48 and 72 h of exposure were observed ($p < 0.05$). ROS production and lipid peroxidation significantly increased in the Cr (VI) treated groups compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: The results indicated that Cr (VI) induced dose and time dependent cytotoxicity in PC12 cells which indicated neurotoxic effects of Cr (VI). Mechanisms of Cr (VI) induced toxicity have not been fully determined, however increased production of ROS and lipid peroxidation in Cr (VI) treated groups demonstrated that oxidative stress might be involved in neurotoxicity of Cr (VI).

Keywords: Cr (VI), Neurotoxicity, Oxidative stress

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 1, Pages: 55-65

ارزیابی سمیت عصبی و استرس اکسیداتیو ناشی از کروم (VI) در سلول‌های PC12

ابوالفضل دشتی^۱، ملیحه سودی^{۲*}، ناهید امانی^۱

۱- کارشناس ارشد، گروه سم‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ایران

۲- استادیار، گروه سم‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه سم‌شناسی
Email: Soodi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۹/۰۴

دریافت مقاله: ۹۳/۰۶/۲۳

چکیده

هدف: ترکیبات کروم شش ظرفیتی [Cr(VI)] از جمله آلوده‌کننده‌های محیط‌زیست است که از طریق فعالیت‌های صنعتی ایجاد می‌شود. مطالعات متعددی در رابطه با آثار مضر کروم VI بر اندام‌های مختلف انجام گرفته است اما درباره سمیت عصبی آن اطلاعات کمی وجود دارد. هدف از این تحقیق بررسی سمیت عصبی کروم VI بر سلول‌های PC12 است. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های PC12 براساس روش استاندارد کشت داده شدند و با غلظت‌های مختلف پتاسیم‌دی‌کرومات (۱۰-۱ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجه شدند؛ بعد از مواجهه بقای سلول‌ها به وسیله روش MTT ارزیابی شد. علاوه بر این؛ میزان گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپید نیز ارزیابی شد. **نتایج:** پتاسیم‌دی‌کرومات به‌طور معنی‌داری باعث مرگ سلول‌های PC12 شد. IC₅₀ محاسبه شده برای سمیت کروم VI ۱/۸۵ و ۱/۸۸، ۲۲/۰۱ و ۱/۸۵ میکرومولار به ترتیب برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود که در بین زمان ۲۴ با بقیه زمان‌ها دارای اختلاف معنی‌داری است ($P < 0.05$). میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین پراکسیداسیون لیپید، در گروه‌های تیمار شده با کروم VI نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داده است ($P < 0.05$). **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کروم VI به‌صورت وابسته به دوز و زمان باعث ایجاد سمیت سلولی در سلول‌های PC12 می‌شود که بیانگر سمیت عصبی این ترکیب است. مکانیسم سمیت عصبی ایجاد شده به‌وسیله کروم VI به‌طور کامل مشخص نیست؛ اما افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپید در گروه‌های مواجه شده با کروم VI نشان دهنده امکان درگیر بودن استرس اکسیداتیو در سمیت عصبی کروم VI است.

کلیدواژگان: کروم VI، سمیت عصبی، استرس اکسیداتیو

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، صفحات: ۵۵-۶۵

مقدمه

توجه به pH و پتانسیل احیای معمول سیستم‌های محیط زیستی به دو فرم ۳+ و ۶+ یافت می‌شود [۱]. کروم از طریق فعالیت‌های انسانی از قبیل کارخانجات فولاد، نساجی و دباغی،

کروم ترکیبی است که به‌طور گسترده‌ای در محیط زیست پراکنده شده است. کروم می‌تواند به‌صورت دامنه‌ای از حالت‌های اکسیداسیون از ۲- تا ۶+ وجود داشته باشد ولی با

سمیت عصبی و استرس اکسیداتیو ناشی از کروم (VI)

فلزات واسط شامل واکنش فنتون (Fenton)، هابر-ویس (Haber-Weiss) و اتواکسیداسیون است که منجر به تولید رادیکال هیدروکسیل که یک ترکیب آسیب‌رسان قوی به ماکرومولکول‌های سلول است می‌شود بنابراین استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) ایجاد شده در اثر احیای درون سلولی کروم شش ظرفیتی به عنوان مکانیسم سمیت این ترکیب عنوان شده است [۸]. کروم شش ظرفیتی باعث ایجاد سمیت‌های عصبی، تماسی، ژنتیکی، سیستم ایمنی، محیطی گسترده و سرطان‌زایی می‌شود [۱]. در روند احیای کروم شش ظرفیتی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن به بافت‌های نرم از قبیل کبد، پانکراس، کلیه و مخچه آسیب وارد می‌شود [۹]. اگر چه مطالعات متعددی پیرامون سمیت کروم شش ظرفیتی در سلول‌های مختلف انجام گرفته ولی درباره سمیت عصبی این فلز اطلاعات کمی در دست است. در یک مطالعه نشان داده شده است تجویز کروم شش ظرفیتی از طریق آب آشامیدنی باعث استرس اکسیداتیو در بافت مغز می‌شود [۸]. براساس این یافته می‌توان این نتیجه را گرفت که کروم می‌تواند از سد خونی - مغزی عبور کند و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو شود. استرس اکسیداتیو نقش پر اهمیتی در ایجاد و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های نورودژنراتیو (Neurodegenerative) مثل پارکینسون (Parkinson) و آلزایمر (Alzheimer) دارد [۱۰]. سلول‌های عصبی به علت ویژگی خاصی که دارند از جمله درصد بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای سلولی و دفاع آنتی‌اکسیدانی پایین به آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حساس‌تر هستند [۸] از آنجایی که آلاینده‌ها می‌تواند با ایجاد استرس اکسیداتیو در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو نقش داشته باشد و همچنین تاکنون گزارشی مبنی بر تأثیر کروم شش ظرفیتی بر سلول‌های عصبی در محیط برون تنی (In vitro) وجود نداشته است، هدف این مطالعه بررسی سمیت کروم بر سلول‌های عصبی PC12 و استرس اکسیداتیو ناشی از آن است.

آب‌کاری، سیمان، شیشه و نیروگاه‌های برق وارد آب‌های محیطی می‌شود و از طریق فاضلاب صنایع باعث آلودگی منابع آبی می‌شود. علاوه بر این؛ کروم می‌تواند از طریق شسته شدن سنگ‌ها وارد آب‌های زیرزمینی شود [۲، ۳]. کروم به صورت دو فرم ۳ و ۶ ظرفیتی در محیط‌های آبی وجود دارد. آنیون کرومات فرم غالب کروم VI در محیط‌های آبی با pH خنثی است [۴]. توجه ویژه به کروم شش ظرفیتی به دلیل سمیت بالای آن و ایجاد آسیب به DNA، جهش‌زایی و سمیت ژنتیکی آن است. در حقیقت کروم VI به عنوان قوی‌ترین فرم سمی و سرطان‌زای کروم در نظر گرفته می‌شود. کروم VI به طور مستقیم با DNA تداخل نمی‌کند بلکه بعد از احیای داخل سلولی و تبدیل آن به کروم III در نهایت با DNA تداخل می‌کند و باعث ایجاد آسیب به DNA و در نهایت باعث ایجاد تغییرات بدخیم و سرطان می‌شود [۵]. کروم از مسیرهای مختلف از جمله بلع و استنشاق وارد بدن می‌شود که مسیر خوراکی دارای بیشترین اهمیت است [۶]. کروم سه ظرفیتی دارای جذب بسیار کمی از مجرای گوارشی است در صورتی که کروم شش ظرفیتی خورده شده به میزان بیشتری از مجرای گوارشی جذب می‌شود. کروم به طور گسترده در بعضی بافت‌ها تجمع پیدا می‌کند؛ این بافت‌ها شامل مغز، کبد، طحال، بیضه‌ها، مغز استخوان و رتیکولاندوتلیال (Reticuloendothelial) است [۷]. کروم شش ظرفیتی به صورت یون کرومات و دی کرومات برای عبور از غشای سلول‌ها از مسیرهای تبادل آنیونی سولفات و فسفات استفاده می‌کند که انتقال از این طریق برای فرم سه ظرفیتی آن بسیار کمتر است [۶]. هر دو کروم ۳ و ۶ ظرفیتی که وارد چرخه احیا شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌کند، دارای حالت اکسیداسیون فعال زیستی است. کروم شش ظرفیتی وارد انواع مختلفی از سلول‌ها می‌شود و تحت شرایط فیزیولوژیکی داخل سلولی توسط هیدروژن پراکسید، گلووتاتیون ردوکتاز، کربوهیدرات‌ها، آسکوربیک اسید و گلووتاتیون احیا شده ایجاد ترکیبات حد واسط فعال می‌کند و در نهایت به کروم سه ظرفیتی تبدیل می‌شود. مهم‌ترین مکانسیم‌های فعال شدن اکسیژن توسط

مواد و روش‌ها

مواد

محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، تریپسین (Trypsin) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین از شرکت Gibco (آمریکا) خریداری شد.

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide]، ۲، ۷ دی کلروفلوروسین دی استات (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate: DCFH-DA)، پلی-D-لیزین (poly-D-lysine: PDL)، تیوباریتوریک اسید (Thiobarbituric acid: TBA)، تترا اتوکسی پروپان (1,1,3,3-tetraethoxypropane) و سایر ترکیبات از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شد.

کشت سلول‌های PC12

رده سلولی PC12 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌های PC12 چسبندگی ضعیف و تمایل به تشکیل توده‌های سلولی دارند. بنابراین لازم است قبل از کشت این سلول‌ها، فلاسک‌های کشت سلولی به‌وسیله ترکیب PDL پوشش داده شوند. این رده سلولی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متری کشت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد. بعد از این‌که سلول‌ها بیش از ۸۰ درصد سطح فلاسک را پوشاندند، از آن‌ها برای انجام سایر آزمایش‌ها استفاده شد.

بررسی سمیت سلولی

برای انجام این آزمایش ابتدا سلول‌های PC12 به تعداد 1×10^4 سلول به ازای هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پتاسیم دی کرومات (۱-۱۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر) به مدت ۲۴،

۴۸ و ۷۲ ساعت مواجه شدند. برای ارزیابی سمیت سلولی از آزمایش سنجش MTT استفاده شد. پودر MTT یک نمک تترازولیم (Tetrazolium) محلول در آب است. در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی که فقط در سلول‌های زنده فعال است، نمک تترازولیم محلول به بلورهای آبی رنگ فورمازان (Formazan) غیر محلول تبدیل می‌شود؛ بنابراین میزان رنگ آبی تولید شده متناسب با میزان سلول‌های زنده است. بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعویض شد و به مدت ۴ ساعت سلول‌ها در انکوباتور قرارداده شد. بلورهای فورمازان تشکیل شده با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Dimethyl Sulfoxide) به شکل محلول درآمد و جذب نوری آن توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) در طول موج مرجع ۵۷۰ نانومتر در برابر طول موج مرجع ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. میزان سلول‌های زنده در هر گروه به‌صورت درصد کنترل بیان شده است.

بررسی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن

میزان گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) به‌وسیله روش بیان شده توسط هونگ (Hong) و همکاران اندازه‌گیری شد [۱۱]. تجمع درون سلولی ROS با استفاده از ترکیب ۲ و ۷ دی کلرو فلوروسین دی استات (DCFH2-DA) اندازه‌گیری شد. دی کلرو فلوروسین دی استات یک ترکیب غیر فلورسنت است که به راحتی می‌تواند از غشای سلولی عبور کند. این ترکیب به‌وسیله استرازهای سلولی (Esterase) به ترکیب دی کلرو فلوروسین (DCFH) هیدرولیز می‌شود و سپس می‌تواند در حضور ROS اکسید شده به ترکیب دی کلروفلوروسین (DCF) که خاصیت فلورسنت بالایی دارد تبدیل شود. بدین منظور سلول‌ها به تعداد 1×10^5 سلول در چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت ۲ میکرومولار دی کرومات پتاسیم به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲

سمیت عصبی و استرس اکسیداتیو ناشی از کروم (VI)

سانتریفوژ شدند و به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و جذب کمپلکس رنگی ایجاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه قرائتگر الیزا اندازه گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از ترا اتوکسی پروپان استفاده شد [۱۲]. میزان پروتئین نیز به وسیله روش برادفورد (Bradford) اندازه گیری شد [۱۳]. میزان MDA تولید شده بعد از نرمال شدن براساس میزان پروتئین هر نمونه به صورت درصد کنترل بیان شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ($Mean \pm SEM$) نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 5 انجام شد. برای آزمون معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها در بررسی سمیت از آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و برای مقایسه دو به دو میانگین‌ها از آزمون Bonferroni و Multiple Comparison Test و برای مقایسه میانگین‌ها در بررسی میزان تولید ROS و MDA از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه دو به دو میانگین‌ها از آزمون Newman-Keuls استفاده شد.

نتایج

سمیت سلولی پتاسیم دی کرومات روی سلول‌های

PC12

سمیت سلولی پتاسیم دی کرومات در غلظت‌های مختلف (۱-۱۰۰ میکرومولار) و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. براساس این نتایج سمیت پتاسیم دی کرومات به صورت وابسته به غلظت و زمان است. کاهش معنی‌دار در میزان بقای سلول‌ها در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش در زمان ۴۸ ساعت مواجهه

ساعت مواجه شدند. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، سلول‌ها توسط تریپسین از پلیت جدا شده به بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی ۵/۶ میلی‌مولار گلوکز و ۱۰ میکرومولار معرف DCFH-DA منتقل و در این شرایط به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS معلق شد. پس از آن شدت فلورسنت به وسیله دستگاه فلوسایتومتری (BD FACS Canto II U.S.A) در طول موج تحریکی ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشری ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید

برای بررسی پراکسیداسیون لیپید برای ارزیابی استرس اکسیداتیو از اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدیید (Malondialdehyde: MDA) تولید شده در فرآیند پراکسیداسیون لیپید استفاده می‌شود. MDA از پراکسیداسیون لیپیدها تولید می‌شود و میزان تولید آن با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است؛ از این رو اندازه‌گیری MDA شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپید است. سلول‌های PC12 با تراکم 1×10^6 سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت ۲ میکرومولار پتاسیم دی کرومات به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجه شدند. بعد از زمان انکوباسیون سلول‌ها با PBS شستشو و به وسیله تریپسین از سطح پلیت جدا شدند. سپس ۲۰ ثانیه در ۴۰ ولت سونیکه (Sonicated) شدند تا محلول همگن سلولی سلولی به دست آید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول همگن سلولی با ۲۰۰ میکرولیتر واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (TBA) که حاوی ۳/۷۵ درصد تری کلرو استیک اسید (Trichloroacetic acid: TCA) و ۰/۹۲۵ درصد TBA است، ترکیب شد و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از سرد کردن، نمونه‌ها در ۱۰۰۰g

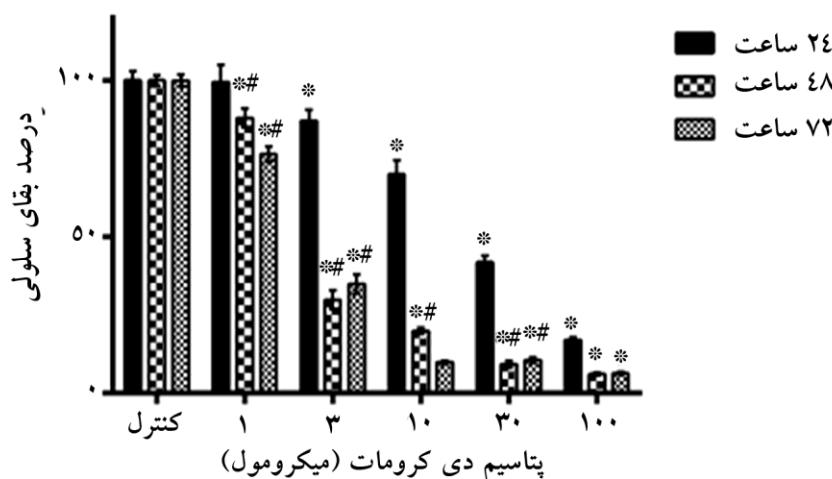
زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه به‌ترتیب برابر با ۲۲/۰۱، ۱/۸۸ و ۱/۸۵ میکرومولار است و تفاوت معنی‌دار بین IC_{50} محاسبه شده برای ۲۴ ساعت با بقیه زمان‌ها مشاهده شد.

نسبت به ۲۴ ساعت مواجهه مشاهده می‌شود در حالی که بین زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌دار در میزان بقای سلول‌ها مشاهده نشد. میزان IC_{50} محاسبه شده برای

جدول ۱ میزان IC_{50} محاسبه شده برای مرگ سلولی ناشی از پتاسیم دی کرومات در زمان‌های مختلف

زمان مواجهه (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲
IC_{50} (میکرومولار)	22.01 ± 1.4	1.88 ± 1.1	1.85 ± 1.1

تفاوت معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت با گروه‌های دیگر دیده می‌شود (آنالیز واریانس یک طرفه، $P < 0.001$)



شکل ۱ تأثیر پتاسیم دی کرومات در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر بقای سلول‌های PC12 سلول‌های PC12 ۲۴ ساعت بعد از کشت با غلظت‌های مختلف پتاسیم دی کرومات مواجه شدند و میزان بقای سلولی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد به روش MTT اندازه‌گیری شده است. هر آزمایش سه بار تکرار شده و نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. در تمامی غلظت‌ها میزان بقای سلولی در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری با زمان ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد؛ همچنین میزان بقای سلولی در هر زمان به‌صورت وابسته به غلظت نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد. #: تفاوت میزان بقای سلولی در هر غلظت با گروه کنترل را نشان می‌دهد. #: تفاوت میزان بقای سلولی در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت با ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. (آنالیز واریانس دو طرفه، Bonferroni Post Test)

ارزیابی تأثیر پتاسیم دی کرومات بر میزان لیپید

پراکسیداسیون

میزان MDA به‌عنوان یک شاخص برای پراکسیداسیون لیپیدها ارزیابی شد. مواجهه سلول‌ها با غلظت ۲ میکرومولار به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت موجب افزایش در میزان MDA

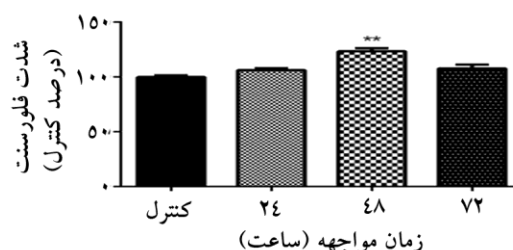
تأثیر پتاسیم دی کرومات بر روی تولید ROS

مواجهه سلول‌های PC12 با غلظت ۲ میکرومولار پتاسیم دی کرومات برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، موجب افزایش میزان تولید ROS می‌شود که در زمان ۴۸ ساعت مواجهه این اختلاف معنی‌دار است (شکل ۲).

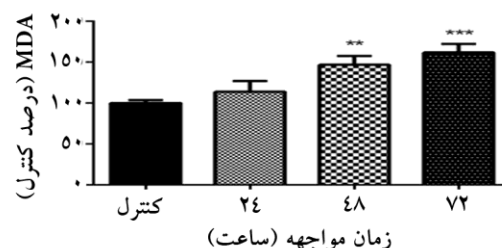
سمیت عصبی و استرس اکسیداتیو ناشی از کروم (VI)

مطالعات عصبی و آزمایش‌های سمیت سلولی در محیط آزمایشگاهی استفاده شدند [۱۴]. در این مطالعه سمیت پتاسیم دی کرومات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد که با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود دارد که این تفاوت بیانگر وابسته به زمان بودن سمیت پتاسیم دی کرومات است. میزان IC_{50} محاسبه شده برای این سه زمان به ترتیب برابر با ۱/۸۵، ۱/۸۸، ۲۲/۰۱ میکرومولار است. در مطالعات انجام گرفته روی سمیت کروم VI در سلول‌های HepG2 [۱۵]، سلول‌های K562 و J774 [۱۶، ۱۷] و همچنین هپاتوسیت‌های جدا شده از کبد رت [۱۸] سمیت کروم VI به صورت وابسته به غلظت و زمان بیان شده است. اما حساسیت سلول‌های مختلف به سمیت کروم VI متفاوت بوده است. میزان IC_{50} برای سمیت سلولی در سلول‌های HepG2 برای ۴۸ ساعت ۶۷۶ میکرومولار و در سلول‌های هپاتوسیت جدا شده ۱ میلی‌مولار گزارش شده است [۱۵، ۱۸]. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مقایسه IC_{50} محاسبه شده می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت سلول‌های PC12 به سمیت کروم VI نسبت به سلول‌های کبدی بیشتر است و این می‌تواند به علت حساسیت بیشتر سلول‌های عصبی به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو باشد. در این مطالعه پتاسیم دی کرومات به صورت وابسته به غلظت و زمان باعث ایجاد سمیت شد به طوری که میزان سمیت کروم VI در ۴۸ ساعت به طور معنی‌داری بیشتر از ۲۴ ساعت است. این یافته مطابق با سمیت‌های مشاهده شده از کروم VI در سلول‌های دیگر است. در سلول‌های ماکروفاژ موشی کشت داده شده (J774A.1) ۲۴ ساعت پس از مواجهه با کروم VI سمیتی مشاهده نشده است در حالی که بعد از ۴۸ ساعت سمیت چشمگیری گزارش شده است [۱]. نتیجه مشابهی در ارتباط با سمیت کروم VI در سلول‌های K562 (Human Chronic Myelogenousleukemic Cell) گزارش شده است [۱۷]. به نظر می‌رسد که کروم VI حداکثر سمیت خود را بعد از گذشت ۲۴ ساعت اعمال می‌کند چون در

شد که این افزایش در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است (شکل ۳).



شکل ۲ تأثیر پتاسیم دی کرومات در غلظت ۲ میکرومولار بر میزان تولید ROS در زمان‌های مختلف؛ سلول‌های PC12 ۲۴ ساعت بعد از کشت با غلظت‌های مختلف پتاسیم دی کرومات مواجه شدند و میزان تولید ROS ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد با فلوسایتومتر اندازه‌گیری شده است. هر آزمایش سه بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. میزان تولید ROS بعد از ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل و زمان‌های دیگر افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (آنالیز واریانس یک طرفه، Newman-Keuls Post Test, $P > 0.01$ **).



شکل ۳ تأثیر پتاسیم دی کرومات در غلظت ۲ میکرومولار بر میزان پراکسیداسیون لیپید در زمان‌های مختلف؛ سلول‌های PC12 ۲۴ ساعت بعد از کشت با غلظت‌های مختلف پتاسیم دی کرومات مواجه شدند و میزان تولید MDA ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد اندازه‌گیری شده است. هر آزمایش سه بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. میزان تولید MDA بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. (آنالیز واریانس یک طرفه، Newman-Keuls Post Test, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ ***).

بحث

در این مطالعه اثر سمیت عصبی پتاسیم دی کرومات به عنوان یک منبع تولید کننده کروم VI در رده سلولی PC12 بررسی شد. سلول‌های PC12 به طور فراوان به عنوان مدل در

این مطالعه در میزان مرگ سلولی در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی داری مشاهده نشد. یکی از مکانیسم‌های سمیت کروم VI آسیب به DNA سلول است. ولی کروم VI به‌طور مستقیم با DNA تداخل نمی‌کند بلکه در داخل سلول کروم VI توسط عوامل احیا کننده به کروم V، VI و کروم III تبدیل می‌شود که این ترکیبات قادر هستند به DNA متصل شوند و باعث آسیب در DNA شوند. از طرف دیگر؛ احیای داخل سلولی کروم VI باعث تولید ROS می‌شود که می‌تواند باعث آسیب به DNA شود. آسیب‌هایی که توسط کروم VI در DNA ایجاد می‌شود شامل: اتصال به DNA و تشکیل ترکیب اضافی DNA (DNA adduct)، شکست در زنجیره DNA، ایجاد اتصال پروتئین با DNA و اکسید شدن بازها است. این آسیب‌ها باعث مهار تقسیم و رونویسی DNA می‌شود همچنین کروم باعث اختلال در سیستم‌های ترمیم DNA می‌شود [۱۹].

بنابراین این احتمال وجود دارد که سمیت بیشتر کروم در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت به علت آسیب‌های DNA باشد چون در فاصله زمانی ۴۸ ساعت سلول یک زمان تقسیم سلولی را طی کرده است و سلول در حال تقسیم به آسیب‌های DNA حساس‌تر است. اخیراً در یک مطالعه سمیت عصبی کروم VI بر نورون‌های کشت داده شده گرانول مخچه بررسی شده است. این مطالعه نشان می‌دهد که سمیت کروم VI بر این سلول‌ها وابسته به زمان نیست و کروم VI حداکثر سمیت خود را در ۲۴ ساعت اول نشان می‌دهد [۲۰]. سلول‌های گرانول مخچه که از مغز نوزاد موش گرفته می‌شوند در محیط کشت ایجاد نورون‌های تمایز یافته می‌کنند که قابلیت تکثیر ندارند و تفاوت سمیت کروم VI در این سلول‌ها با سلول‌های PC12 می‌تواند ناشی از این مسئله باشد. بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان فرض کرد که سمیت کروم VI در سلول‌های در حال تکثیر با سلول‌های تمایز یافته که قابلیت تکثیر ندارند متفاوت است و این احتمال وجود دارد که مسیرهای مرگ سلولی در این سلول‌ها متفاوت باشد.

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مشخص کرد که تماس سلول‌های PC12 با غلظت ۲ میکرومولار پتاسیم دی کرومات در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت موجب افزایش در میزان ROS می‌شود که این افزایش در زمان ۴۸ ساعت معنی دار است. در ادامه با بررسی میزان ترکیب MDA مشخص شد که مواجه این سلول‌ها با غلظت ۲ میکرومولار پتاسیم دی کرومات به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت موجب ایجاد پراکسیداسیون لیپید می‌شود که این تفاوت نسبت به گروه کنترل در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ معنی دار است. براساس این نتایج می‌توان این نتیجه را گرفت که یکی از مکانیسم‌های سمیت عصبی کروم افزایش در تولید ROS و ایجاد پراکسیداسیون لیپید است. در مطالعات گذشته بیان شده که سمیت سلولی کروم VI ناشی از استرس اکسیداتیو و از طریق افزایش تولید ROS است و ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌تواند سمیت ناشی از کروم را کاهش دهد [۲۱-۲۳]. در مطالعه صورت گرفته روی سلول‌های جدا شده کبد و همچنین سلول‌های HepG2 مشخص شده که مواجهه با کروم VI باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپید، تولید ROS و تخلیه ذخایر گلوکوتاتیون می‌شود؛ همچنین در این سلول‌ها آسیب به غشای میتوکندری و لیزوزوم مشاهده شده است [۱۵، ۱۸]. با توجه به مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که سمیت کروم بر سلول‌های عصبی PC12 نیز از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آسیب‌های ناشی از آن مثل آسیب به غشای سلولی است که در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود و با توجه به حساس بودن سلول‌های عصبی به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو این آسیب‌ها در غلظت‌های کمتر کروم VI نسبت به سلول‌های کبدی اتفاق می‌افتد. این نتایج بیانگر حساسیت بالای سلول‌های PC12 به آثار سمی کروم VI است.

در مورد سمیت عصبی کروم VI مطالعات کمی وجود دارد در حالی که شواهدی وجود دارد که کروم VI می‌تواند از سد خونی - مغزی عبور کند و باعث آسیب به بافت مغز شود. تجویز داخل صفاقی کروم VI در خرگوش به مدت ۶ هفته

سمیت عصبی و استرس اکسیداتیو ناشی از کروم (VI)

VI می تواند از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آسیب و مرگ سلول های عصبی شود. از آنجایی که استرس اکسیداتیو در ایجاد بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان و بیماری های نورودژنراتیو مثل آلزایمر و پارکینسون نقش دارد و با توجه به مواجهه روز افزون با کروم VI از طرق مختلف به خصوص از طریق آب آشامیدنی، پیشنهاد می شود که سمیت عصبی کروم VI بیشتر مورد توجه قرار گیرد و مطالعات بیشتری در زمینه تأثیر کروم VI بر عملکرد نورون ها و مغز صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه آقای ابوالفضل دشتی می باشد و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

باعث تخریب نورون های قشر مغز می شود [۲۴]. همچنین تجویز خوراکی کروم VI به صورت وابسته به زمان و دوز باعث افزایش رادیکال های آزاد و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و شکست DNA در مغز می شود [۱، ۱۶، ۲۵]. همچنین گزارش شده است که تجویز خوراکی کروم VI باعث اختلالات رفتاری در موش می شود که با ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت مغز همراه بوده است [۸، ۲۶]. میزان کروم در بافت مغز به دنبال هم مصرف خوراکی و هم تزریق داخل صفاقی کروم VI افزایش می یابد [۲۷، ۲۸]. همه شواهد فوق دلالت بر این دارد که کروم VI قابلیت دستیابی به سیستم عصبی مرکزی و تأثیر بر آن را دارد.

به طور کلی مطالعه حاضر که اثر مستقیم کروم VI را روی سلول های عصبی بررسی کرده است، نشان می دهد که سلول های عصبی به سمیت کروم VI حساس هستند و کروم

منابع

- [1] Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 2002; 180(1): 5-22.
- [2] Natale GS, Ammassari LL, Basso NG, Ronco AE. Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Dis Aquat Organ* 2006; 72(3): 261-7.
- [3] Witt KL, Stout MD, Herbert RA, Travlos GS, Kissling GE, Collins BJ, Hooth MJ. Mechanistic insights from the NTP studies of chromium. *Toxicol Pathol* 2013; 41(2): 326-42.
- [4] Zhitkovich A. Chromium in drinking water: sources, metabolism, and cancer risks. *Chem Res Toxicol* 2011; 24(10): 1617-29.
- [5] O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533(1-2): 3-36.
- [6] Cheung KH, Gu JD. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2007; 59(1): 8-15.
- [7] das Neves RP, Santos TM, Pereira Mde L, de Jesus JP. Comparative histological studies on liver of mice exposed to Cr(VI) and Cr(V) compounds. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21(7): 365-9.
- [8] Travacio M, María Polo J, Llesuy S. Chromium(VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 2000; 150(1-3): 137-46.
- [9] Bagchi D, Balmoori J, Bagchi M, Ye X, Williams CB, Stohs SJ. Comparative effects of

- TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. *Toxicology* 2002; 175(1-3): 73-82.
- [10] Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7(1): 65-74.
- [11] Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(5-6): 612-6.
- [12] Hensley K, Floyd RA. Methods in biological oxidative stress. *Free Radical Res* 2003; 37: 1145.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- [14] Westerink RH, Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 192(2): 273-85.
- [15] Patlolla AK, Barnes C, Hackett D, Tchounwou PB. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6(2): 643-53.
- [16] Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem* 2001; 222(1-2): 149-58.
- [17] Bagchi D, Joshi SS, Bagchi M, Balmoori J, Benner EJ, Kuszynski CA, Stohs SJ. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(1): 33-41.
- [18] Pourahmad J, O'Brien PJ. Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol* 2001; 500: 203-7.
- [19] Nickens KP1, Patierno SR, Ceryak S. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem Biol Interact* 2010; 188(2): 276-88.
- [20] Dashti A, Soodi M, Amani N. Cr (VI) induced oxidative stress and toxicity in cultured cerebellar granule neurons at different stages of development and protective effect of Rosmarinic acid. *Environ Toxicol* 2014; [Epub ahead of print]
- [21] Sugiyama M. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992; 12(5): 397-407.
- [22] Quinteros FA, Machiavelli LI, Miler EA, Cabilla JP, Duvilanski BH. Mechanisms of chromium (VI)-induced apoptosis in anterior pituitary cells. *Toxicology* 2008; 249(2-3): 109-15.
- [23] Luczak MW, Zhitkovich A. Role of direct reactivity with metals in chemoprotection by N-acetylcysteine against chromium(VI), cadmium(II), and cobalt(II). *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 262-9.
- [24] Mathur AK, Chandra SV, Tandon SK. Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to rabbits. II. Morphological changes in some organs. *Toxicology* 1977; 8(1): 53-61.

- [25] Dey SK , Roy S. Effect of chromium on certain aspects of cellular toxicity. Iranian Journal of Toxicology (IJT) 2009, 2(4): 260-7.
- [26] Diaz-Mayans J, Laborda R, Nuñez A. Hexavalent chromium effects on motor activity and some metabolic aspects of Wistar albino rats. Comp Biochem Physiol C 1986; 83(1): 191-5.
- [27] Tandon SK, Behari JR, Kachru DN. Distribution of chromium in poisoned rats. Toxicology 1979; 13(1): 29-34.
- [28] Döker S, Mounicou S, Doğan M, Lobinski R, Lobinski R. Probing the metal-homeostasis effects of the administration of chromium(vi) to mice by ICP MS and size-exclusion chromatography-ICP MS. Metallomics 2010; 2(8): 549-55.