Archive of SID

بررسی تاثیر کلرید کادمیم بر روی رشد و نمو حلزون گوش داخلی جنین موش سوری

امرالله روزبهی [۱]، محمدعلی اطلسی [۲]

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به میزان وسیع کادمیم در جوامع صنعتی و وجود آن درمنابع غیرصنعتی همچون غذا و آب ، نوشابه‌ها و سیگار و همچنین وجود گزارشاتی مبنی بر تاثیر تراتوژنیک آن، مطالعه‌ای جهت بررسی تاثیر کلرید کادمیم بر روی رشد و نمو حلزون گوش داخلی جنین موش سوری انجام گرفت.

مواد و روشها: پژوهش حاضر به روش تجربی بر روی ۳۰ موش سوری نژاد *balb/c* صورت گرفت. نمونه‌ها در سه گروه کنترل ، آزمایشی *I* و آزمایشی *II* تقسیم گردیدند. به گروههای آزمایشی کلرید کادمیم محلول در آب مقطر به ترتیب با دوزهای $3mg/kg$ و $5mg/kg$ به صورت داخلی صفاقی در روز نهم بارداری تزریق گردید. گروه کنترل فقط آب مقطر دریافت کرد. در روز پانزدهم حاملگی ابتدا موشها را با اتر بیهوش کرده و بعد از خارج کردن جنینها در فیکسانیو بوئن قرار داده شده و بعد از طی مراحل پاساژ بافت و تهیه قالبهای پارافینی از آنها مقاطع عرضی به صورت سریال تهیه گردید. نمونه‌ها با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. پس از بررسیهای مورفومتریک بخش های مختلف حلزون گوش داخلی ، داده‌های خام به روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست شیفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: تراکم سطحی کل حلزون در گروه‌های آزمایشی *I* و *II* نسبت به گروه‌های کنترل کاهش معنی‌داری نشان دادند ($p<0/05$). تراکم سطحی عقده مارپیچی در گروه‌های آزمایشی *I* و *II* نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (به ترتیب $p<0/01$ و $P<0/003$). اندازه عضو کورتی در گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل به میزان ۱۷/۸ ٪ کمتر از گروه مورد ($p<0/02$) بود. اختلاف اندازه‌های آن در گروه آزمایشی اول و کنترل به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: کلرید کادمیم می‌تواند باعث ایجاد تغییرات دژنراتیو در حلزون گوش داخلی جنین موش سوری شود. پیشنهاد می‌گردد که ارتباط این نتایج با ناهنجاریهای لوله عصبی و نقص در شنوایی حیوان مورد مطالعه فرارگیرد.

واژگان کلیدی: کلرید کادمیم ، حلزون ، تراتوژن

۱-دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ، گروه آناتومی
۲-دانشگاه علوم پزشکی کاشان ، گروه آناتومی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انسان درمحیط اطراف خوددر معرض فلزات سمی است. از جمله فلزات آلوده کننده محیط کادمیم است. استفاده گسترده از این فلز سنگین باعث تجمع آن درمحیط شده است. انسانها از طریق غذا، آب، نوشابه‌ها و سیگار درمعرض این فلز قرار می‌گیرند (۱). تاثیرات سمی آن بر روی ساختمانهای بدن در حیوانات آزمایشگاهی طی مطالعات متعددی مورد بررسی قرارگرفته است. در سلولهای مختلف مغز، کلیه و کبد موش به عنوان یک ماده کارسینوژن باعث ایجاد نقایص ژنی شده است (۲). نشان داده شده است که ترکیب کلسیم - کالمودولین عامل آغازگر دوباره سازی *DNA* می باشد. در صورت وجود دوز بالای یون کادمیم، این فلز جانشین کلسیم گشته و ترکیب جدید کادمیم کالمودولین باعث وقوع اشتباهاتی در دوباره سازی *DNA* می‌شود (۳). کادمیم در مقادیر زیادی می‌تواند باعث التهاب کبد (٤) و آسیب ساختمانی به آندوتلیوم قرنیه (٥) شده و از تکثیر و مهاجرت سلولهای آندوتلیال جلوگیری کرده و احتمالاً بدین طریق در پاتوژنز آترواسکلروز دخالت کند(٦). همچنین می‌تواند روند اسپرماتوژنزیس در مرد و وقایع قبل از لانه گزینی در زن را تحت تاثیر قرار دهد (۷). کادمیم به عنوان یک تراتوژن نیز در مطالعات مختلفی گزارش شده است. در صورت وجود مقادیر زیاد کادمیم بخشی از آن با عبور از جفت در بدن جنین اثرات سمی خود را القا می‌کند. اثرات تراتوژنیک کادمیم روی لوله عصبی، اندامها، عدسی، شبکیه و عصب بینایی، کلیه، سیستم اسکلتی و ناحیه جمجمه‌ای-صورتی گزارش شده است (٦،۳)، اما نقش تراتوژنیک آن در انسان کاملاً روشن نیست. مطالعات روی موش نشان داده است که در صورت استفاده از کادمیم در زمان ارگانوژنز، تکامل لوله عصبی و اسکلت محوری تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۱). در زمان ارگانوژنز از ضخیم شدن اکتودرم سطحی صفحه گوشی و به دنبال آن وزیکول گوشی شکل می‌گیرد. در ادامه این وزیکول بخشهای مختلف لابیرنت غشایی از جمله حلزون گوش داخلی را شکل می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد که تبدیل شدن وزیکول گوشی به لابیرنت ترمال به القای لوله عصبی وابسته است، بنابراین در صورت آسیب به لوله عصبی می‌تواند وزیکول گوشی تحت تاثیر قرار گیرد. اما مطالعات دیگری نشان داده است که با وجود نقص در لوله عصبی تکامل گوش طبیعی بوده است (۱). تاثیر کلرید کادمیم روی تکامل بخش سری لوله عصبی جنین موش بررسی گردید و نقش تراتوژنیک آن در ایجاد تغییرات دژنراتیو گزارش گردید (۳). پژوهش کنونی در ادامه مطالعه مذکور، تاثیر تراتوژنیک کلرید کادمیم را بر روی تکامل حلزون گوش داخلی به روش مورفومتریک مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش تجربی بر روی ۳۰ سر موش نژاد (*balb/c*) صورت گرفت. موشهای نر و ماده به وزن ٢٤ تا ٣٥ گرم به نسبت یک موش نر با سه موش ماده در یک قفس و در شرایط مناسب (آب و غذای کافی، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ، ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند. مشاهده پلاک واژینال در صبح روز بعد نمایانگر عمل جفت‌گیری بود. روز مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. در روز نهم حاملگی به موشهای حامله محلول کلرید کادمیم (۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل دو گروه آزمایشی I و II هرکدام با ۱۰ سر موش که به ترتیب $3mg/kg$ و mg/kg ۵ محلول کلرید کادمیم دریافت کردند. موشهای گروه کنترل ۱۰ سر موش بودند که فقط mg/kg ۱ آب مقطر دریافت کردند.

در روز ۱۵ بارداری موشها ابتدا توسط اتر بیهوش شده و سپس با عمل سزارین جنینها همراه لوله رحمی از بدن موش خارج گردیدند و بلافاصله در سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. در ادامه بعد از خارج کردن جنینها درفیکساتیو بوئن قرار داده شدند. هفت جنین از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و بعد از طی مراحل پاساژ با استفاده از میکروتوم، مقاطع سه و پنج میکرونی به صورت سریال و عرضی از ناحیه سر به طرف دم تهیه گردید. بعد از چسباندن روی لام با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین نمونه‌ها رنگ شدند. جهت بررسیهای مورفومتری از قطعه چشمی مدرج (*eye piece*) استفاده گردید. به این صورت که ابتدا نواحی مربوط به حلزون روی لامهای تهیه شده از بخش سری جنین مشخص گردید، سپس برای اندازه‌گیری با استفاده از خطکش چشمی مدرج قطر لابیرنت غشایی و با استفاده از قطعه چشمی شطرنجی تراکم سطحی کل حلزون، عقده مارپیچی و عضو کورتی (تراکم سطحی کل حلزون با بزرگنمایی ۱۰۰، تراکم سطحی عقده مارپیچی، اندازه عضو کورتی و قطر لابیرنت غشایی با بزرگنمایی ۴۰۰) اندازه‌گیری شد. داده‌های خام با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست شیفت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

تعداد نمونه‌ها در هر کدام از گروهها، ۱۰ سر موش بود که متغیرهای مورد مطالعه عبارت بودند از: تراکم سطح کل حلزون، تراکم سطحی عقده مارپیچی، قطر لابیرنت غشایی و اندازه عضو کورتی. در جدول ۱ نتایج پارامترهای مذکور درگروههای آزمایشی و کنترل ارائه گردیده است.

تراکم سطحی کل حلزون در گروه کنترل ۱۴۶/۹۵ بود و در گروه‌های آزمایشی این میزان کمتر شده بود به طوری که در گروه آزمایشی I ، ۱۴۲ و در گروه آزمایشی II ، ۱۴۱/۰۵ بود. با توجه به آنالیز آماری این کاهش در هر دو گروه نسبت به گروه کنترل معنی دار است ($p<0/05$).

تراکم سطحی عقده مارپیچی در گروه کنترل ۱۰۲/۱ بود ولی در گروه آزمایشی اول، به ۹۴/۴ ($p<0/01$) و در گروه آزمایشی دوم به ۹۱ کاهش یافته بود ($p<0/003$).

قطر لابیرنت غشایی در گروه کنترل ۸/۸۵ است. این میزان در گروه آزمایشی I به ۸/۰۱ رسیده که این کاهش معنی دار نیست ($p<0/7$) همچنین در گروه آزمایشی II به ۷/۸۷ رسیده است که این میزان تفاوت، به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (NS).

اندازه عضو کورتی در گروه کنترل ۶۷/۵۵ بود ولی در گروه آزمایشی I به ۶۳/۵۵ رسیده است که آنالیز آماری آن را معنی‌دار نشان نمی‌دهد ($p<0/2$). این عدد در گروه آزمایشی II به ۵۵/۴۵ رسیده است که به ۱۲/۱ واحد و یا حدود ۱۷/۸ ٪ کاهش نشان داد. آزمون آماری نشان داد که این میزان کاهش به لحاظ آماری معنی دار است ($p<0/02$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: میزان پارامترهای مورفومتریک حلزون گوش داخلی برحسب مقادیر مختلف محلول کلرید کادمیم.

شاخص ها / محلول کلرید کادمیم	تراکم سطحی کل حلزون	تراکم سطحی عقده مارپیچی	قطر لابیرنت غشایی	اندازه عضو کورتی
نداشته (کنترل n=۱۰)	۱٤٦/۹ ± ٦/۱	۱۰۲/۱ ± ٥/۲	۸/۸٥ ± ۱/۳٥	٦۷/٥ ± ۱۸/۲
۳Mg/kg (آزمایشی اول n=۱۰)	۱٤۲ ± ٥/۱	۹٤/٤ ± ٥/۳	۸/۰۱ ± ۰/۷٤	٦۳/٦ ± ۱۷/٤
٥ Mg/kg (آزمایشی دوم n=۱۰)	۱٤۱/۱ ± ۷/۳	۹۱ ± ٥/۲	۷/۸۷ ± ۱/۱۷	٥٥/٥ ± ٥/۷

بحث

تحقیق نشان داد که کلریدکادمیم می‌تواند پارامترهای موفورمتریک حلزون گوش داخلی را تحت تاثیر قرار دهد. این کاهش با افزایش دوز بیشتر بوده و نمایانگر ایجاد تغییرات دژنراتیو در حلزون گوش داخلی است. نتایج بررسیهای مختلف نشان می‌دهد که در اثر تجویز کادمیم در زمان ارگانوژنز علاوه بر مغز ، گوش خارجی، میانی و داخلی جنین موش دچار ناهنجاری شده‌اند. در مطالعه عربی، نشان داده‌شد که در اثر تجویز کادمیم با دوزهای ۳mg/kg و ٥ mg/kg در روز نهم دوران بارداری در موش، نقص بخش سری لوله عصبی به همراه نقایص شدید اندامها، عدسی و شبکیه مشاهده شده است ، اماگزارشی از درگیری گوش مطرح نگردید (۳). در مطالعه حاضر تکامل حلزون در جنین موش در اثر تجویز کلرید کادمیم با دوزهای ۳ mg/kg و ٥ mg/kg مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که به شکل معنی‌داری تغییرات مورفومتریک در آن دیده می شود.

مطالعات تجربی در دوزیستان و پرندگان نشان داده است که تمایز طبیعی وزیکول گوشی وابسته به تاثیر و تحریک لوله عصبی است. در بررسیهای دیگری که در سالهای بعد انجام گرفت. با ایجاد نقص در لوله عصبی جنین موش لابیرنت غشایی گوش داخلی به طور غیرطبیعی تکامل پیدا کرد(۱).

در مطالعه حاضر تزریق کادمیم در روز نهم بارداری صورت گرفت، با توجه به اینکه انتهای سری لوله عصبی در جنین موش درهمین روز بسته می‌شود و اوتریکول، ساکول، مجاری نیمدایره‌ای، جسم کورتی و بقیه اجزای گوش داخلی در روزهای یازدهم تا چهاردهم، رشد و تمایز قابل ملاحظه‌ای می‌یابند، بنابراین می‌توان انتظار داشت که کادمیم با دوز بالا بتواند بر شکل‌گیری اجزای گوش داخلی تاثیر گذاشته و ایجاد ناهنجاری نماید. ضمن اینکه نقص در لوله عصبی در این جنینها بسیار محتمل است. در گزارشاتی که با وجود عدم نقص در لوله عصبی ناهنجاریهای گوش، وجود داشته است، این ناهنجاریها با شدت کمتری گزارش شده است. در این مطالعات ناهنجاری در گوش اثر مستقیم کادمیم روی تکامل اجزای گوش اعلام گردیده است (۱،۲).

مطالعه حاضر نتایج تحقیق *Padmanabhan* را مورد تأیید قرار می‌دهد. در مطالعه مذکور با تجویز کلرید کادمیم حلزون و جسم کورتی جنین موش غیرمتمایز باقی ماندند و عقده مارپیچی سلولهای کمتری را نسبت به گروه کنترل داشتند(۱).

در مطالعه ما شدت تغییرات پارامترها در حلزون گوش با دوز ٥ mg/kg بیشتر از دوز ۳ mg/kg بود و در مورد قطر لابیرنت غشایی و اندازه عضو کورتی با دوز ۳ mg/kg تغییرات نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. در صورت پایین بودن میزان کادمیم،این یون با اتصال به پروتئینهایی به نام

www.SID.ir

Archive of SID

متالوتیونین در سیتوزول محبوس شده و از اثرات سمی آن جلوگیری می‌شود اما در صورت حضور مقادیر زیاد کادمیم بخشی از آن با عبور از جفت در بدن جنین اثرات سمی خود را القا می‌کند (۳). *Padmanabhan* نشان داد کلرید کادمیم با دوز ٤-٦ *mg/kg* علاوه بر انسفالی، عدم تمایز درحلزون ، جسم کورتی و عقده مارپیچی مشاهده می‌شود (۱). به نظر می‌رسد این دوز با نقص در لوله عصبی، حلزون را هم دچار ناهنجاری می‌کند. *Whitworth* و همکاران در ۱۹۹۹ تأثیر کادمیم را روی شنوایی رت مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که استفاده از کلرید کادمیم با دوز ۵ *mg/kg* باعث تغییرات معنی‌داری درآستانه پاسخهای شنوایی ساقه مغز نمی شود، در حالی که با استفاده از ترکیب کلرید کادمیم و فوروزماید آستانه پاسخها تغییر معنی‌دار پیدا کرده وبررسیهای میکروسکوپ الکترونی از دست رفتن گسترده سلولهای مویی حلزون را نشان داد (۵). این مطالعات نشان می‌دهد که کادمیم در شرایط ویژه‌ای باعث آسیب به سیستم شنوایی می‌شود. با توجه به اینکه در مطالعه ما تنها تغییرات مورفولوژی حلزون گوش داخلی مورد بررسی قرار گرفت و این تغییرات معنی‌دار بود، پیشنهاد می‌گردد در مطالعات دیگری همزمان تغییرات شنوایی حیوان نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین برای اثبات نقش کلریدکادمیم در ایجاد همزمان نقص در تکامل لوله عصبی و نقص در اجزای گوش از جمله حلزون گوش داخلی می‌توان این تغییرات را همزمان و در ارتباط با یکدیگر مورد بررسی قرار داد.

Reference:

1. *Padmanabhan R. Abnormalities of the ear associated with exencephaly in mouse fetuses induced by maternal exposure to eadmium. Teralology 1987; 35: 9-18.*
2. *Latinwo. LMB., Ikediobi. CO., Singh. NP., Spinholtz. G., Fasanya. C., Riley. L., Comparative studies of in vivo genotoxic drrects of cadmium chloride in rat brain, Kidney and liver cell. Cell , Mol , Biol , Le , Grand 1997; 43(2): 203-210.*
3. عربی ذ. بررسی تأثیر کلریدکادمیم بر رشد و نمود ناحیه کرانیال لوله عصبی جنین موش کوچک آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۳۷۹.
4. *Sauer. JM., Waalk. MP., Hooser. SB., Kuester. RK., Mcqueen. CA., Sipes. IG. Supperssion of kupffercell funcion prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague, Dawley rat. Tomicilogy. 1997; 15,121(2): 155-164.*
5. *Whitworth. CA., Hudson. TE., Rybak. LP. The dffect of combined administration of cadmium and farosemide onauditoty funcion in the rat. Hear-Res. 1999; 129(1-2): 61-70.*
6. *Hovland. DN Jr., Machado. AF., Scott. WJ Jr., Collins. Md. Differential sensivity of the SWV and C57BL/6 mouse strains to the teratogenic action of*

www.SID.ir

Archive of SID

single administations of cadmium given throughout the period of anterrior neuropore clasure. Teratology. 1999; 60(1): 13-21.

7. Dalton. T., FU. K., Enders. GC., Palmitr. RD., Andrews. GK., Analysis of the drrects over expression of metallothionein. I in transgentic mice on the reproductive toxiclogy of cadmium. Envivon. Health Perspect. 1996; 104(1): 68-78.

www.SID.ir