

آثار تراژونی برومادیالون بر روی جنین موش صحرائی

میترا حیدری نصرآبادی^{۱*}، فهیمه حقیقی^۲، فرشته سرافرازی اسفندآبادی^۲، لیلا جهانبخش^۲، مهسار حیمی مطلق^۲، فریما زاهدی^۲

^۱دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران
^۲کارشناس زیست شناسی سلولی و مولکولی، انجمن علمی زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران
^۳کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: برومادیالون ماده سمی شناخته شده ای می باشد. اثرات سمی آن بر ساختمان های مختلف حیوانات آزمایشگاهی بالغ، مورد مطالعه زیادی قرار گرفته است. اما مطالعه اثرات آن بر جنین و جفت همچنان ناکافی می باشد. در این تحقیق جنین موش صحرائی قرار گرفته در معرض برومادیالون طی یک دوره زمانی کوتاه، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها: حیوان مورد استفاده در این تحقیق، موش های صحرائی نژاد ویستار می باشند. موش های ماده پس از بروز بارداری به طور تصادفی در ۲ گروه جای داده شدند (در هر گروه ۷ راس). به حیوانات گروه تجربی این مطالعه، در روز ۵ بارداری در یک نوبت برومادیالون با دوز ۰/۱۱ mg/kg و به موش های گروه کنترل در همان روز آب استریل داده شد. در روز ۱۵ حاملگی، موش ها کشته شده و جنین ها از رحم بیرون آورده شدند. وزن و قطر جنین ها اندازه گیری شده و سپس جنین ها تحت مطالعات بافت شناسی و آماری قرار گرفتند.

یافته ها: در گروه تجربی بین وزن و اندازه جنین ها با گروه کنترل اختلاف معنی داری دیده نشد اما در تعداد جنین ها به دلیل وجود جنین آتروفی در گروه تجربی کاهش معنی داری مشاهده گردید ($p < 0.05$). در ساختمان خارجی جنین گروه تجربی نواحی هموراژیک و همچنین آماس معده، لوپ های روده و کبد نیز مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج فوق نشان دادند که برومادیالون باعث بروز ناهنجاری های تراژونی در جنین شده است.

کلمات کلیدی: برومادیالون، تراژونیک، جنین موش

مقدمه

استفاده از کلسیفرول (Greaves et al., 1974) و تکامل آن به دیفناکوم و برودیفاکوم، دو گروه از اجزاء ضد انعقادی قوی غیر معمول مؤثرتر بر موش های صحرائی مقاوم به وارفارین شد (Hadler et al., 1975; Redfern et al., 1976). برومادیالون، یکی دیگر از مواد ضد انعقادی فعال بوسیله لیفا در فرانسه تولید گردید. مطالعات اندکی بر روی پاسخ موش های صحرائی به برومادیالون صورت گرفته است. مارش و گرند به طور جداگانه نشان دادند که برومادیالون دارای اثرات سمی فوق العاده ای در برابر طیف وسیعی از حیوانات مودی شامل لاک پشت های نقب زن، سنجاب های زمینی و انواع مختلفی از موش های صحرائی

در طول دهه های گذشته افزایش قابل توجهی در تحقیقات پیرامون سموم مورد استفاده، جهت نابودی جوندگان و حیوانات مودی صورت گرفته است. کشف این حقیقت که حیوانات در برابر مواد ضد انعقادی مقاومت نشان می دهند، موجب ایجاد انگیزه در این تحقیقات گردید. نتایج این آزمایشات شامل

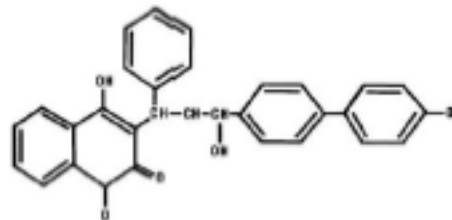
آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

Email: heydari_nasr@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۸/۱۹

و خانگی می باشد (Marsh et al., 1977; Grand et al., 1976). برومادیالون، با فرمول تجربی $C_{30}H_{23}BrO_4$ ، ماده شیمیایی قوی جهت کشتن جوندگان می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار برومادیالون

اغلب به علت قدرت و تمایل به تجمع در کبد جانور مسموم، “super-warfarin” نامیده می شود. این ماده می تواند از لوله گوارش، شش ها و یا از راه پوست جذب بدن شود. در رابطه با موجودات موذی تنها از طریق خوراکی می تواند اثرات خود را اعمال کند (این ترکیبات به عنوان آنتاگونیست ویتامین k شناخته می شوند). کمبود ویتامین k موجب کاهش لخته شدن خون، کاهش پروترومبین و در غلظت بالا باعث افزایش تعداد مویرگ ها می شود. در نتیجه، خون از کوچک ترین رگ ها شروع به نشت می کند و در نهایت موجود زنده به علت خونریزی داخلی می میرد (میترا حیدری و همکاران، ۱۳۷۱). ماده موثر برومادیالون، پودر کلرت می باشد که از خانواده کومارین ها است و به صورت پلت و واکس بلوک عرضه می گردد. برومادیالون در آب قابل حل می باشد، لذا ممکن است مصرف یا انهدام بسته های خالی در کنار منابع آبی باعث آلودگی آب گردد. این ترکیب به راحتی قابل تجزیه نبوده و به مدت طولانی در محیط باقی می ماند و ممکن است در بدن حیوانات غیر هدف که از آن استفاده می کنند، مانند جفدها یا حیوانات شکاری دیگر تجمع یابد. در چند سال اخیر، نیز پودر کلرت ماده موثر برومادیالون مرتبا به کشور ما وارد گردیده است و از آنجایی که احتمال مسمومیت در انسان و حیوانات اهلی به صورت آگاهانه و غیر آگاهانه وجود دارد، لذا بر آن شدیم تاثیر این ماده را بر روی جنین موش های باردار مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

۲۰ عدد موش صحرایی نر و ماده سالم از نژاد ویستار با میانگین سنی سه ماه و وزن تقریبی ۲۸۰-۲۵۰ گرم از انیستیتو پاستور کرج خریداری و

به منظور تطابق با محیط جدید به مدت ۱۰ روز در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند با چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد در قفس های بزرگ از جنس پلی اتیلن گلیکول که قابل استریل شدن هستند، نگهداری شده و آب و غذای کافی در دسترس داشتند. پس از مرحله جفت گیری و بروز بارداری، موش ها به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم گردیدند. در این مطالعه، ۱۰ عدد پلت برومادیالون از شهرداری تهیه گردید و با توجه به اینکه میزان LD_{50} این ماده از طرف کارخانه سازنده آن $1/125 \text{ mg/Kg}$ اعلام شده بود، غلظتی کمتر از این مقدار در نظر گرفته شد تا موجب مرگ موش های مادر نشده، اما بر نسل بعدی تاثیر گذارد. گروه اول، گروه کنترل مشتمل بر ۷ موش بارداری که آب مقطر استریل تزریقی دریافت کردند. گروه دوم، گروه تجربی شامل هفت موش بارداری که در روز ۵ حاملگی میزان $0/11 \text{ mg/Kg}$ برومادیالون به صورت گاواژ دریافت کردند. در روز پانزدهم مطالعه، جنین موش ها به طریق سزارین خارج شده، وزن و هم چنین اندازه ناحیه سری تا نشیمن گاهی آن ها، به وسیله کولیس اندازه گیری گردید. سپس، جنین ها تحت بررسی میکروسکوپی از نظر بروز آنومالی های ظاهری قرار گرفتند. هم چنین جهت بررسی دقیق تر، پس از تثبیت کامل نمونه ها و انجام رنگ آمیزی بافت (هماتوکسیلین-ائوزین)، مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل آماری در مورد اطلاعات کمی، روش آماری آنوا (ANOVA) استفاده گردید و نتایج آزمایش ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. معیار استنتاج آماری ($p < 0/05$) معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تعداد جنین های بدست آمده از گروه کنترل و گروه تجربی به ترتیب ۴۴ و ۳۸ جنین بودند. نتایج بدست آمده از این مطالعه عبارت است از: ۱- میانگین وزن جنین ها در روز ۱۵ بارداری، در گروه های کنترل و تجربی اختلاف معنی داری نشان نداد (جدول ۱).

1-Bromodialone

۲- میزان سمی بودن یک ماده که با کمیتی به نام LD_{50} بیان می شود و عبارت است از مقدار سم (بر حسب گرم) به ازاء یک کیلوگرم جرم جانور و با فرمول (جرم جاندار $\times LD_{50}$ = مقدار سم مورد نیاز برای نابودی جانور) محاسبه می گردد.

جدول ۱- مقایسه وزن جنین ها در گروه های کنترل و تجربی

| گروه ها | تعداد جنین ها | میانگین وزن (gr) |
|------------|---------------|------------------|
| گروه کنترل | ۴۴ | ۱/۷۶ |
| گروه تجربی | ۳۸ | ۱/۶۹ |



نمودار ۱- مقایسه تعداد جنین های آتروفی شده در گروه های کنترل و تجربی



نمودار ۲- مقایسه تعداد گلبول های قرمز موجود در کبد در گروه های کنترل و تجربی

۲- در گروه تجربی جنین هایی با خونریزی در احشا مختلف (کبد، سر، شکم، جفت و...) مشاهده گردیدند (شکل ۲).



شکل ۲- خونریزی در ناحیه سر و شکم

۳- در گروه تجربی جنین هایی با برجستگی و بیرون زدگی شکم مشاهده گردیدند (شکل ۳).



گروه تجربی گروه کنترل

شکل ۳- بیرون زدگی ناحیه شکمی در جنین گروه تجربی

۴- وجود جنین های آتروفی شده در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد (نمودار ۱).

۵- نتایج حاصل از شمارش گلبول های قرمز نیز نشان داد که هرچه غلظت برومادیلون بیشتر باشد تعداد گلبول های قرمز در بافتی که دچار خونریزی شده بیشتر است (نمودار ۲).

بحث

چونندگان و حیوانات موذی همواره معضلی برای کشاورزان محسوب شده و سالیانه خسارات بی شماری به محصولات کشاورزی وارد می آورند. از این رو تلاش برای از بین بردن این جانوران از سالیان دور مورد توجه بشر بوده و سمومی با ترکیبات متفاوت به بازارهای جهانی ارائه شده است. طبعاً بسیاری از این سموم دارای اثرات تراتوژنیک بی شماری بر جانوران می باشند. یکی از این سموم برومادیلون است، تحقیقاتی که تا به امروز بر روی این ماده سمی انجام شده محدود به موش های بالغ بوده و آزمایشی بر روی اثر این سم بر جنین و جفت صورت نگرفته است. بدیهی است مطالعه حضور یک ماده سمی تراتوژنیک در بدن مادر در دوره حاملگی از اهمیت بسزایی برخوردار است. از جمله علائمی که به این سم نسبت داده می شود، بی حالی، تنگی نفس و ایجاد لخته های خون در ناحیه شکم در حیوان بالغ است. همچنین در کالبد شکافی

بافتی، وجود توده خون داخل صفاقی و لخته خون در داخل قفسه گزارش شده است. علاوه بر اثرات مستقیم این ماده سمی بر جوندگان، اثرات غیر مستقیم برومادیالون هنگامی بروز می کند که جوندگان مسموم شده توسط حیوانات دیگر از قبیل جغدها و پستانداران شکاری خورده شوند. میزان خطر در این حالت بستگی به تعداد جوندگان خورده شده و مقدار سم موجود در بدن آن ها و میزان حساسیت حیوانات شکاری دارد. هم چنین واتس و همکارانش معتقدند که برومادیالون موجود در مدفوع موش های خانگی که از این طعمه های آلوده استفاده کرده اند به شکل فعال بوده و یک منبع مهم و افزایش سمیت برای جانوران غیر هدف به شمار می آید. این سم برای پرندگان نیز سمی بوده و از نظر علائم مسمومیت همان علائمی را که در پستانداران ظاهر می شود در پرندگان نیز بوجود می آورد (Wates et al., 1990; Eason et al., 1995). گزارش های متعددی از مواردی که کارگر های کارخانه سازنده سم کشاورزی که از سوپر وارفارین ها استفاده می کنند و یا بچه هایی که در مواجهه با این سم دچار مسمومیت شده اند وجود دارد. یافته های این تحقیق نشان داد که جفت در حیوانات حامله ای که حتی برای یک دوره کوتاه در معرض غلظت بالا اما غیر کشنده ای از یک ماده سمی تراتوژنیک قرار داشتند دچار توکسیسیته ای آشکار شده و در تعداد جنین ها کاهش معنی داری بروز کرده است. هم چنین از نظر آتروفی فتوس اختلاف آشکاری در گروه فوق مشاهده گردید. برخی محققان گزارش کردند که اثرات سوء یک ماده سمی و تراتوژن در غلظتی اتفاق می افتد که برای مادر هم سمی بوده و به این دلیل نتیجه گرفتند که اثرات نامطلوب تراتوژن ها بر جنین، ثانویه و متعاقب آسیب دیدن ساختمان های مادری صورت می پذیرد (Khera et al., 1985). این که نفوذپذیری سد خونی- جفتی در برابر یک ترکیب سمی چقدر باشد می تواند تعیین کند که آستانه آسیب رسانی ماده تراتوژن در چه حدی بوده و مکانیسم آسیب آن اولیه، ثانویه یا تلفیقی از هر دو باشد. نفوذپذیری بالای سد خونی- جفتی در برابر یک ماده تراتوژن سبب خواهد شد که آن ماده با دوزی به مراتب پائین تر از دوز آسیب رسان برای مادر، بتواند در جنین ایجاد ناهنجاری نماید. اما اگر سد خونی-جفتی نفوذپذیری پائینی را در برابر یک ماده تراتوژن نشان دهد، آن ماده

با دوز پائین، اثر آشکاری را بر مادر و جنین نشان نخواهد داد. اما بالا رفتن دوز و یا مسمومیت مزمن به آن ماده، سبب تجمع بیش از حد آن در ساختمان های مادری و از جمله جفت شده و می تواند با آسیب رساندن و ایجاد اختلال در عملکرد طبیعی آن ها بطور ثانویه سبب آسیب دیدن ساختمان جنینی شود. برومادیالون یکی از سمومی است که سد خونی- جفتی در برابر آن مقاومت خوبی از خود نشان می دهد. در چنین حالتی میزان تجمع ماده سمی در بدن مادر و نیز در جفت افزایش می یابد. بدیهی است در چنین حالتی تجمع ماده سمی می تواند باعث آسیب دیدن جفت شده و به طور ثانویه جنین ها را متاثر سازد و یا با آسیب دیدن سد خونی- جفتی ورود ماده سمی به بدن را نیز تسهیل نموده و در آسیب رساندن به جنین تلفیقی از هر دو مکانیسم باشد. تجمع برومادیالون در بافت های مادری و نیز جفت، می تواند اختلالات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جنین ها که در این مطالعه مشاهده شد را توجیه نماید. هموژنی و آماس مشاهده شده در اندام های داخلی بدن جنین می تواند نشان دهنده آسیب های عروقی تحت تاثیر برومادیالون باشد. در مطالعه حاضر تغییری در اندازه و وزن جنین های موش های دریافت کننده برومادیالون مشاهده نشد. اما برومادیالون دارای اثرات تراتوژنیکی از قبیل آتروفیه شدن و خمیدگی غیر طبیعی جنین و مرگ سلول های کبدی، بیرون زدگی دیواره شکمی و تشکیل نشدن احشا شامل معده و روده می باشد. بنابراین، این تحقیق اثبات می کند که این ماده یک ماده تراتوژن بوده و می تواند در غلظت هایی که موجب مرگ نمی شود در جنین مادری که به طور مستقیم و غیر مستقیم با آن تماس داشته اند ایجاد عوارض نماید. بنابراین بایستی در مصرف این ماده نهایت دقت را به عمل آورده تا اثرات ناشی از افزایش و تجمع آن در محیط موجب اثرات زیان باری نگردد. این مواد بایستی در جایی مشخص دور از دسترس انسان و حیوانات اهلی قرار گیرد تا در صورت مصرف نشدن دوباره، قابل جمع آوری باشند. لاشه جوندگان مسموم نیز جمع آوری شده و به طرز مناسب معدوم گردد تا در محیط باقی نمانده و موجب آلودگی نشوند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند،

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره دوم، شماره پنجم، میترا حیدری نصرآبادی و همکاران...

انجمن علمی زیست شناسی دانشجویان دانشگاه آزاد اسلامی واحد
پرنده و تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری رساندند، تقدیر و
تشکر می شود.

Archive of SID

منابع

- حیدری م، پریور ک، آسمار م، امیر خانی ع. ۱۳۷۱، بررسی اثرات برومادیالون بر جنین های موش بزرگ آزمایشگاهی در روز های ۹/۵، ۸/۵، ۷/۵، ۴/۵ حاملگی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
- Eason CT, Spurr EB. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on nontarget wildlife in New Zealand. *New Zealand J Zool abstracts*, 1995; 22: 371-379
- Grand M. Experimental data on a new anticoagulant raticide: bromadiolone. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, 1976; 25: 69-88.
- Hadler Mr, redfern R, Rowe FP. Laboratory evaluation of difenacoum as a rodenticide. *J Hyg*, 1975;74: 441-8.
- Khera KS. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformation of rodent-rabbit species. *Teratolo*, 1985; 129-53.
- Marsh RE. Bromadiolone, a new anticoagulant rodenticide. *Eppo Bull*, 1977; 7: 495-502.
- Redfern R, Gill JE, Hadler MR. Laboratory evaluation of WBA 8119 as a rodenticide for use against warfarin-resistant rats and mice. *J Hyg*, 1976; 77: 419-26.
- Wates RG, Castleberry RP, Sadowski JA. Accidental Poisoning with a super warfarin compound (Brodifacoum) in a child. *Pediatrics*, 1990; 86: 883-87.

Archive of SID