Archive of SID

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات تراتوژنیک کلرید مس بر قشر مغز جنین موش سوری

ثریا پروری[1]، دکتر مهدی مهدیزاده[2]، دکتر ملیحه نوبخت[3]، دکتر غلامحسن فرجاه[4]، دکتر کاظم پریور[5]

چکیده

پیش زمینه و هدف : مس عنصر فلزی ضروری است که از طریق دستگاه گوارش جذب می‌شود. کلرید مس از مهمترین ترکیبات آن است. فقدان مس موجب نقایص ساختمانی و متابولیکی می‌شود. برطبق مطالعات اخیر، مس اثر سمی بر روی دستگاه عصبی مرکزی دارد. علیرغم اینکه جهت تکامل مغز، مقدار کمی مس ضروری می‌باشد. اما مقادیر بالای آن، ممکن است موجب نقایص دستگاه عصبی مرکزی شود .

مواد و روش : چهل و دو سر موش حامله در هفت گروه تقسیم شدند ، سه گروه آزمایشی، سه گروه کنترل، و یک گروه دست نخورده. هر گروه شامل شش سر موش حامله بود. به گروه آزمایش کلرید مس به مقدار 5mg/kg به ترتیب در روزهای ۷ و ۸ و ۹ حاملگی از طریق داخل صفاق تزریق شد. به گروه کنترل در همان روزها، آب مقطر تزریق گردید. گروه دست نخورده هیچ‌گونه تزریقی دریافت نکرد. جنین‌ها در روز ۱۵ حاملگی از رحم خارج شدند. وزن و تعداد جنین‌های جذب شده بررسی گردید. پس از مراحل پاساژ بافتی و برش، با رنگ هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

یافته‌ها : بر اساس بررسی‌های ماکروسکوپی، وزن جنین‌ها در همه گروه‌های آزمایشی کاهش معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). در مشاهدات میکروسکوپی، به هم خوردن توالی سلول‌ها و گلیوزیز ملاحظه شد. در ارزیابی مورفومتری، در همه گروه‌ها ضخامت قشر مغز، کاهش داشت ($P<0/05$).

بحث و نتیجه گیری : نتایج ما نشان می‌دهد که مقادیر بالای کلریدمس ، ممکن‌است سبب ناهنجاری در دستگاه عصبی مرکزی شود.

گل‌واژگان: کلرید مس قشر مغز، موش سوری، جنین، تراتوژن

مجلهٔ پزشکی ارومیه، سال چهاردهم، شمارهٔ دوم، ص ۷۸ - ۷۳، تابستان ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه : تهران ، دانشگاه علوم‌پزشکی ایران - گروه آناتومی ، دکتر غلامحسن فرجاه

۱ - کارشناس ارشد آناتومی، دانشگاه شاهد تهران
۲ - استادیار گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده علوم پایه پزشکی
۳ - استادیار گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده علوم پایه پزشکی
۴ - استادیار گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده علوم پایه پزشکی
۵ - استاد بیولوژی ، دانشگاه تربیت معلم ، بخش بیولوژی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مس[1] فلزی با خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه می‌باشد. بعد از روی و آهن سومین عنصر مهم بدن به شمار می‌آید. در صنعت، کشاورزی و پزشکی به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد. در دندان پزشکی برای ساختن پل و تاج دندان و در ساختن آمالگام برای ترمیم دندان‌ها از مس استفاده می‌شود (۱). وسیله داخل رحمی[2] نیز حاوی ۱۵۰-۱۰۰ میلی گرم مس است، که اثرات جلوگیری کننده از حاملگی را افزایش می‌دهد (۱). منابع مس در خوراکی‌هایی مانند صدف‌های دریایی، گوشت ماهیچه، جگر، شکلات، فندق، قارچ، سبزیجات و میوه‌ها می‌باشد (۱، ۲، ۳). کمبود این عنصر باعث نقص‌های جدی در سیستم عصبی جنین و آسیب به بافت‌ها می‌شود (۱). همچنین ازدیاد مس که اکثراً به دنبال نقص آنزیمی است، باعث اختلال در کار آنزیم‌های متعدد می‌شود و روی سیستم‌های مختلف بدن از جمله دستگاه گوارش، کلیوی، ریوی، عصبی، پوست و مو و... تأثیر می‌گذارد (۱، ۴). مسمومیت با مس شایع نیست ولی عموماً به دلیل استفاده زیاد از منابع خوراکی این عنصر می‌باشد. کلرید مس[3] به‌شکل کریستال آبی یا سبز است که بسیار در آب محلولند (۳، ۶).

ازدیاد مس در دوران جنینی موجب کاهش وزن جنین‌ها و وقوع اثرات التهابی در کلیه و کبد جنین‌ها (۸، ۹) و سبب تأخیر رشد و تمایز مخصوصاً در لوله عصبی و کاهش تعداد مراکز استخوان‌سازی می‌شود (۱۰).

در دو دهه اخیر، روند تأثیرات سلولی و مولکولی مقادیر مس اضافی روی ارگان‌های مختلف بررسی شده است. برخی محققان براین باورند که مقادیر اضافه مس، روند آپاپتوز و مرگ سلولی را القاء می‌کند (۱۱) و باعث پراکسیداسیون لیپیدها، کاهش دربیان ژن‌هایی مثل Cu/Zn SOD[4] و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (۷، ۱۲). نظر به اهمیت سیستم عصبی و نحوه تشکیل آن در دوران جنینی و همچنین وفور و امکان دسترسی زیاد به این عنصر، و باتوجه به کم بودن اطلاعات در ارتباط با اثرات تراتوژنیک مس بر روی تکوین سیستم عصبی مرکزی، بر آن شدیم تا اثرات تراتوژنیک مس را بر تکامل قشر مغز در جنین موش سوری بررسی نماییم.

مواد و روش

به‌منظور بررسی اثرات تراتوژنیک کلرید مس بر تکامل قشر مغز، از موش نژاد سوری ماده استفاده شد. ۴۲ سر موش سوری ماده جهت تطابق با محیط به‌مدت دو هفته در حیوان خانه به‌طور جداگانه نگهداری شدند. سپس جهت جفت‌گیری، سه سرموش ماده را با یک سر موش نر در قفس قرار دادیم.

روز مشاهده پلاک واژینال به‌عنوان روز صفر حاملگی منظور شد. موش‌های ماده در سه گروه آزمایشی ۱، ۲، ۳ و سه گروه کنترل ۱، ۲، ۳ و یک گروه دست‌نخورده قرار گرفتند. هر گروه شامل ۶ سرموش ماده بود. به گروه‌های آزمایشی ۱، ۲ و ۳ محلول کلرید مس با غلظت ۵mg/kg به ترتیب در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری از طریق داخل صفاقی تزریق شد. به گروه‌های کنترل در همان روزها آب مقطر تزریق شد و گروه دست نخورده هیچ ماده‌ای دریافت نکردند. در روز ۱۵ حاملگی موش‌ها توسط کتامین (۹۰mg/kg) و گزیلازین (۱۰mg/kg) از طریق داخل صفاقی بیهوش شدند. به‌دنبال خارج کردن جنین‌ها و فیکس نمودن آن با محلول بوئن، ارزیابی‌های ماکروسکوپی انجام شد. شاخص‌های ماکروسکوپی شامل اندازه‌گیری وزن، تعداد جنین‌ها و میزان جذب آن، اندازه فرق سری تا نشیمنگاهی[5] یا CR و بررسی شکل ظاهری جنین بود. سپس مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری، شفاف سازی، آغشتگی و قالب‌گیری و

1- Copper
2- IUD
3- CuCl2
4- Super oxide Dismutase
5- Grown Rump

www.SID.ir

Archive of SID

برش‌گیری انجام شد. مقاطع با ضخامت ۵ میکرون به صورت سریال تهیه شده و بارنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، رنگ شد. بررسی‌های میکروسکوپی شامل اندازه‌گیری ضخامت قشر مغز و نوع تغییرات سلولی قشر مغز شامل جهت قرارگیری سلول‌ها و هسته‌ها، فاصله بین سلول‌ها، تقسیم میتوز در ناحیه ونتریکولار و دژنراسیون سلولی در کورتکس، در مقایسه با گروه کنترل و گروه دست نخورده مطالعه گردید. نتایج جهت مطالعه با نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون‌های LSD و Duncan مورد بررسی قرار گرفت .

نتایج

در این مبحث ابتدا به بررسی نتایج حاصل از مشاهدات ماکروسکوپیک نمونه می‌پردازیم و سپس از دید میکروسکوپی به تحلیل و بررسی نتایج می‌پردازیم :

مشاهدات ماکروسکوپیک

- **بررسی شکل ظاهری جنین**: در گروه آزمایشی ۲ ، اگزوسفالی به‌میزان ۶ درصد مشاهده شد و در سایر گروه‌های آزمون تغییر ظاهری دیگری دیده نشد .

- **میزان جذب جنین**: در گروه آزمایشی ۱، ۴ درصد و گروه‌های آزمایشی ۲ و ۳ به ترتیب ۸ و ۶ درصد جذب وجود داشت .

- **وزن جنین‌ها**: در گروه آزمایشی ۱ و ۲ کاهش وزن جنین‌ها نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$) و در گروه آزمایشی ۳، کاهش وزن وجود دارد که معنی‌دار نیست .

- **اندازه CR**: در گروه‌های آزمایشی ۱ و ۳ کاهش معنی‌دار اندازه CR جنین نسبت به گروه کنترل وجود دارد ($p<0/05$) ولی در گروه ۲، افزایش اندازه CR ملاحظه می‌شود که البته معنی‌دار نیست .

مشاهدات میکروسکوپیک

- **تغییرات سلولی**: در تمام گروه‌های آزمایشی بی نظمی در جهت قرارگیری سلول‌ها و هسته‌ها، افزایش فضای بین سلولی، ادم سلول‌ها، افزایش تقسیم در ناحیه ونتریکولار قشر مغز، دژنراسیون سلول‌های عصبی و پراکندگی سلول‌ها قابل مشاهده می‌باشد. تقسیمات میتوز فراوان در ناحیهٔ ونتریکولار و متعاقب آن دژنراسیون و مرگ سلولی در کورتکس ملاحظه شد (تصاویر ۱ و ۲).

- **ارزیابی مورفومتری** :

- **ضخامت قشر مغز**: در کلیه گروه‌های آزمایشی کاهش معنی دار ضخامت قشر مغز نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود ($p<0/05$).

بحث

در این تحقیق اثر کلرید مس بر قشر مغز در روزهای ۷، ۸ و ۹ بارداری موش، مورد بررسی قرار می‌گیرد. علت انتخاب روزهای تزریق، هم زمانی با روزهای رشد و نمو سیستم عصبی در جنین موش بوده است.

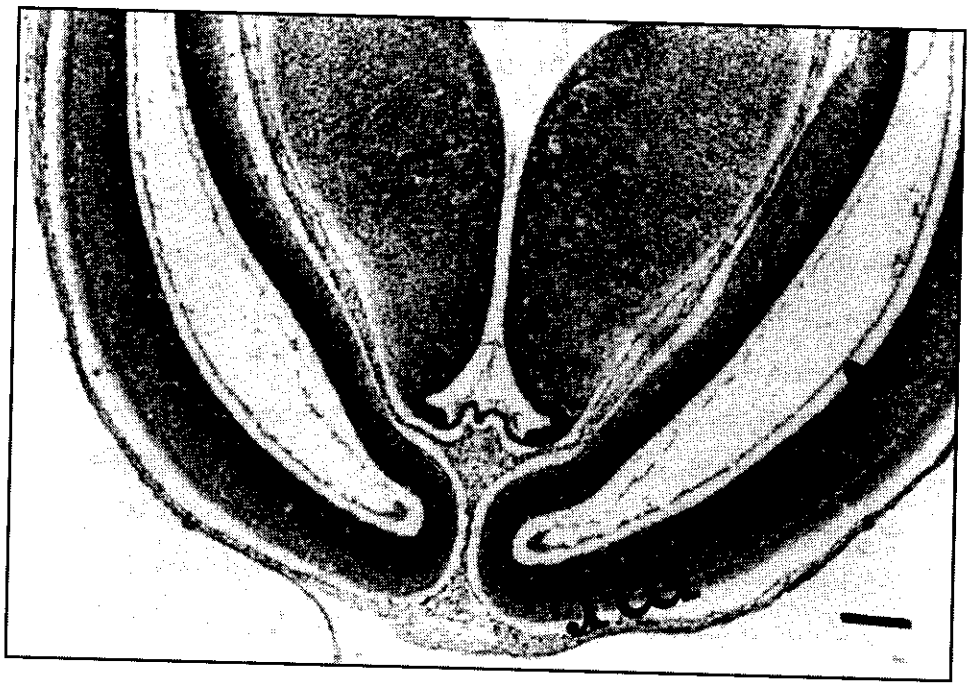
الف. بررسی‌های ماکروسکوپی

۱ - **وزن**: همان طور که در قسمت نتایج ذکر شد، بررسی میانگین تغییرات وزن اختلاف معنی‌دار را در روزهای ۷ و ۸ با گروه‌های کنترل نشان می‌دهد و در گروه آزمایشی روز ۹، کاهش وزن وجود دارد اما معنی‌دار نمی‌باشد. کاهش وزن جنین‌ها نشان از وجود توکسیسیتی کلرید مس است که نتایج تحقیق حاضر با نتایج حاصل از تحقیق میزجوک[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۰ همخوانی دارد (۹). همچنین این پژوهش نشان می‌دهد که میزان سمیت کلرید مس در روزهای پایین‌تر (۷ و ۸) نسبت به روز ۹ بیشتر است.

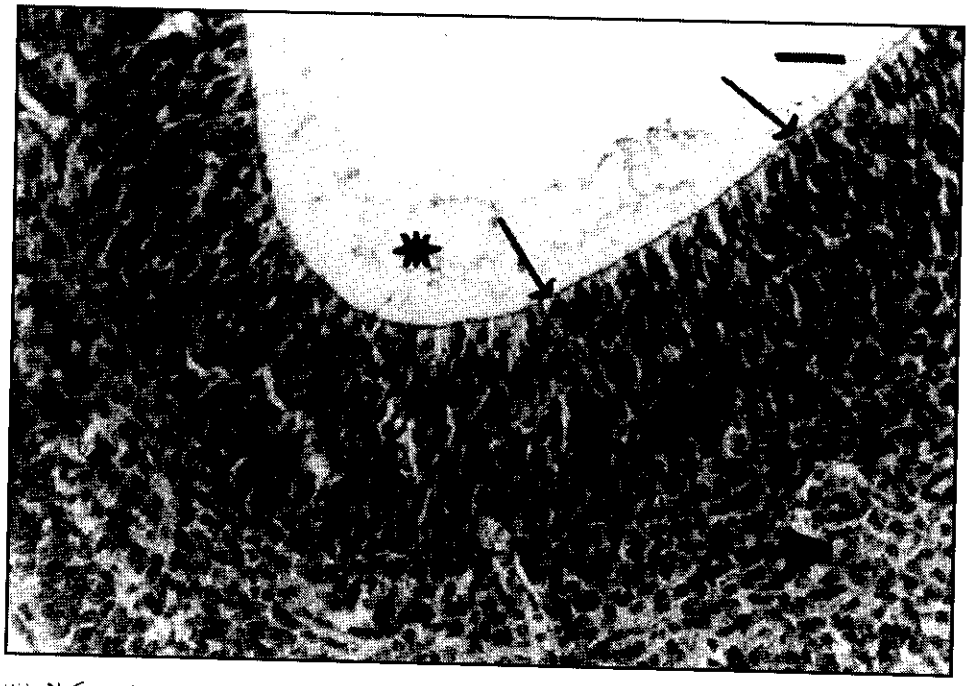
1- Mizejewk

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۱ : مقطعی از قشر مغز و بطن‌های طرفی (گروه آزمایشی روز ۷) با بزرگنمایی ۴۰ (کاهش ضخامت قشر مغز در تصویر کاملاً مشهود است) . V(Ventricular), mn(mantel), mr(marginal) B=100 μm



تصویر شماره ۲ : مقطعی از قشر مغز را در گروه آزمایشی روز ۷ نشان می‌دهد. افزایش میتوز در ناحیهٔ ونتریکولار (فلش کوچک) و بی نظمی سلول‌ها در سایر نواحی (فلش بزرگ) نمایان است. علامت ستاره بطن طرفی را نشان می‌دهد. بزرگنمایی ۲۰۰ . B=100μm

www.SID.ir

Archive of SID

۲ - انـدازه CR: یکـی از شـاخص‌های تـعیین سـن و مـیزان رشدونمو جنین، اندازه‌گیری طول فرق سرتا باسن می‌باشد که به‌نام گراون - رامپ[1] نامیده می‌شود. در تحقیق اخیر در گـروه آزمایشی ۱ و ۳، کاهش CR به‌صورت معنی‌دار بیان می‌شود که باز نشان از وجود تـوکسیسیتی کـلرید مس دارد. امـا در گـروه آزمایشی ۲، افزایش CR را شاید بتوان به ماکروسفالی جنین‌ها نسبت داد که آن هم در اثر سمیت باکلرید مس ایجاد شده است .

ب - بررسی‌های میکروسکوپی

در مقاطع بافتی سالم، سلول‌ها با نظم خاصی در کنار هم قـرار گرفته‌اند. هسته‌ها در لایه‌های مختلف لوله عـصبی در جـهت عـمود بـر لومـن داخـلی لوله عـصبی مـی‌باشند. در لایـه نوروایی‌تلیوم تقسیم میتوزی فراوان است و فعالیت هسته‌ها در این منطقه زیاد است. در تحقیق حاضر با تـزریق کـلرید مس، آسیب سلولی در گـروه‌های آزمـون دیـده مـی‌شود کـه شـامل دژنراسیون سلولی، تغییرات جهت هسته‌ها، پراکندگی سلول‌ها، افزایش میتوز در ناحیه ونتریکولار، گـلیوزیز و تـورم سـلول‌ها می‌باشد. همچنین ضخامت قشر مغز نسـبت بـه گـروه کـنترل کاهش معنی دار یافته است. دلایلی را که می‌توان برای کاهش ضخامت بیان کرد، دژنراسیون سلول‌ها و احتمال وجود مـرگ سلولی است. یون مس از طریق واکـنش فـنتون[2] ، پـراکسـید هیدروژن (H_2O_2) را به رادیکـال هـیدورکسیل (OH) تـبدیل می‌کند که رادیکالی قوی می‌باشد. رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب متصل شده و باعث متلاشی شدن لیـپیدها و تـغییر در ساختار شیمیایی لیـپیدها مـی‌شوند. هـمچنین بـه پـروتئین‌ها متصل شده و باعث دناتوره شدن آنها و ایجاد ارتباط متقاطع[3] پروتئین‌ها می‌شوند. از طرفی باعث اکسیداسیون بازهای DNA شده و به DNA صـدمه مـی‌زنند (۱۳). مس هـمچنین بـاعث کاتالیز واکسن اتواکسیداسیون لیـپوپروتئین‌های CSF و مـغز می‌شود که منجر به دژنراسیون نورون‌ها و تجمع مـحصولات پراکسیداسیون لیپدها می‌گردد (۱۴). ازدیاد مس باعث تجمع این عنصر در هسته و میتوکندری شده، که با ایـجاد مکـانیسم‌های مولکولی و فعالیت ژن P53 سبب خودکشی سلول‌ها یا آپاپتوز می‌شود. ژن P53 مسئول وقوع آپاپتوز است (۱۵). ازدیاد مس روی اتـصالات مـحکم تأثـیر مـی‌گذارد و بـاعث افـزایش نفوذپذیری این اتصالات می‌شود (۱۶). همچنین مس مـوجب اتواکسیداسیون سیستئین آزاد شده از آستروسیت‌ها می‌شود و از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد به بافت آسیب مـی‌رساند (۱۷). اثرات توکسیک مس شامل تأخیر در سیکل سـلولی و کـاهش تدریجی ظرفیت ریپلیکاسیون و افزایش وقـوع مـرگ سـلولی می‌باشد (۱۸). فعالیت دو آنتی‌اکسیدان مهم سلولی به نام‌های NAC[4] و BC12 در حضور ازدیاد مس، مهار می‌شود و آنها قادر نـیستند کـه رادیکـال‌های آزاد را حـذف نـمایند (۱۱). تـمام مکانیسم‌های ذکر شده، اثـرات نـوروتوکسیستی مس را تأیـید می‌کنند. به‌دنبال وقوع مرگ سلولی در نـورون‌ها و آسـیب بـه سلول‌ها در نتیجه اثرات کلرید مس، کاهش ضخامت در ناحیه پوشانندهٔ و کورتکس مغز قابل توجه است. از طرفی چون لایهٔ حاشیه‌ای استطالهٔ نورون‌های ناحیهٔ پوشاننده می‌باشد، متعاقب مرگ سلول در ناحیهٔ ونتریکولار به همراه مشـاهدهٔ تـقسیمات میتوز فراوان در این ناحیه، بیانگر مکانیسم جبرانی مرگ سلولی است. چون در نواحی پـوشاننده و کـورتکس، مـرگ سـلول و آسیب سلول‌ها اتفاق می‌افتد، لایهٔ ونتریکولار که به‌عنوان مولد نوروبلاست‌ها عمل می‌کند، متحمل میتوزهای بیشتری خواهد شد که افزایش ضخامت را توجیه مـی‌کند. مشـاهدهٔ بـی‌نظمی سلول‌ها و تورم سلول و هسته‌های پیکنوزه و گلیوزیز واضح، بیانگر آسیب کلی وارد شده به بافت عصبی می‌باشد.

1- Grown-Rump
2- Fenton
3- Cross-Link
4- N-Acetyl Cyctein

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Donald G, Barceloux: Copper. Clin Toxicol, 1999, 37(2): 217-230.
2. Martindail KP: The complete drug reference. Pharma ceutical press, massachucetts, pp. 1337-40, 1999.

۳ - انصاری، مصطفی : بیماری ویلسون. معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان، ۱۳۷۳، صفحات ۲۰-۵.

4. Chugh KS, Sharma BK, Singhal PC: Acute renal failure following copper culphate intoxication. Postgrad Med J, 1977, 53: 18-23.
5. Haywood S, Rutgers HC: Hepatits and copper accumulation in sky terriers, vet pathol, 1988, 25(6): 408-14.
6. Yamada T, Sogawak: Elevation of the level of lipid peroxodation associated with hepatic injury LEC mutont rat, Res commun chem pathol pharmacol, 1992, 77(1): 121-4.
7. Mason RW: Teratogenicity of combinations of sodium dicromate and copper sulphate in the rat. Comp-Biochem-Physiol-e, 1989, 93(2): 407-11.
9. Haddad DS: The effect of copper loading on pregnant rats and their offspring. Funct-Morphol, 1991, 1(3): 17-22.
10. Zhaia, JI: Copper induces apoptosis in BA/F3beta cells: Box, reactive oxygen species an NF KappaB are involved, J cell physiol, 2000, 184(2): 161-70.
11. Paris I, Dagniono, Subiaber A: Copper neurotoxcity is dependent on dopamin of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. J neurochem, 2001, 77(2): 519-29.
12. Siegel: Basic Neutochemistry Molecular-Cellular and medical aspects. 6E, 1999.
13. Arlt S, Finckh B: Time-Course of oxidation of lipids in human cerebrospinal fluid in vitro. Free Res; 2000, 32(2): 103-14.
14. Levenson, W: Trace metal regulation of gene expression metal regulation of cellular integrity, apoptosis and require meral regulared molecular responses to cellular injury, 2001. J. newro chem, 77(1): 312-321.
15. Ferruza et al; Copper toxicity to tight junction tn the human intestinal CACO-2 cell line, 2001. J. cell physiol, 184(1): 60-72.
16. Pazmiguel JE: Reactive oxygen intermediates during programmed cell death indused in the thymus of the TS (1716) 650n mouse, a murine model for human Downs syndrom, J immunol, 1999, Nov. 15, 163(10): 5399-5410.
17. Aston NS, Watt N: Copper toxicity after proliferation and viability of buman hepatoma cells, Hum Exp Toxicol, 2000, Jun. 19(6): 367-76.

www.SID.ir