مطالعه فراساختاری و ایمنوهیستوشیمیایی مخچه نوزاد رت در اثر مسمومیت با جیوه آلی

پژمان مرتضوی[۱*]، تقی الطریحی[۲]، عبدالرسول نامجو[۳]

چکیده

جیوه آلی (متیل مرکوری کلراید) یک آلوده کننده محیطی و به عنوان یک ماده سمی برای بافت های عصبی بویژه در مراحل تکامل و توسعه سیستم عصبی است. غلظت های پایین متیل مرکوری کلراید می تواند از راه جفت به جنین و در نوزادان تازه به دنیا آمده از طریق شیر مادر منتقل شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات فراساختاری در هایپوکامپ نوزادان رت در سن ۲۵ روزگی بعد از تولدشان بود . به رت‌های ماده بالغ نژاد ویستار در روز ۱۲،۱۳و۱٤آبستنی ماده سمی متیل مرکوری کلراید با دز های ٤/٥،٥و۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن تزریق شد. نوزادان تازه بدنیا آمده تا سن ۲۵ روزگی در کنار مادرشان نگهداری و سپس آسان کشی شده و نمونه برداری از مخچه به منظور مطالعات میکروسکوپ نوری و الکترونی با فیکس کردن نمونه ها در فرمالین بافر ۱۰ درصد و گلوتر آلدهید ۲ درصد انجام گرفت. علائم بالینی و رفتار های حرکتی در رت‌های نوزاد هر روز بررسی شد، اما هیچ تغییری مشاهده نگردید. در بررسی های میکروسکوپی، کاهش جمعیت سلولهای لایه گرانولار و آپوپتوز سلول های عصبی لایه گرانولار مخچه که در رنگ آمیزی تانل نیز به اثبات رسید، درگروه های تیمار تحت مطالعه مشاهده شد. اجزاء سلولی مخچه نوزاد رت نر در گروه های ٤/٥،۰/٥و ۱۰ چندین تغییر فرا ساختاری، شامل مهاجرت کروماتین به حواشی هسته، اتساع شبکه آندوپلاسمیک صاف و جدا شدن ریبوزوم ها از شبکه آندوپلاسمی خشن را نشان دادند. میتوکندری ها تورم کریستا های درونی و فشرده شدن ماتریکس را نشان دادند.

مشاهدات مورفومتری و مورفولوژی در این بررسی ثابت کرد که سلول های لایه گرانولار مخچه نوزاد رت تحت تاثیر متیل مرکوری کلراید قرار گرفته اند. بنابراین مواجه شدن با دز های پایین متیل مرکوری کلراید موجب کاهش جمعیت نرونی در ناحیه گرانولار مخچه می شود.

واژگان کلیدی: *متیل مرکوری کلراید، مخچه، آپوپتوزیس، نوزاد رت*

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۱۲

مقدمه

متیل مرکوری یک ترکیب بسیار چربی دوست و یک آلاینده خطرناک محیطی است که برای سلامتی انسان مضر است. متیل مرکوری به سادگی از سد مغزی ـ خـونی و سد جفـت

Ultrastructural and immunohistochemical study of cerebellum with methylmercury chlorid poisoning in newborn rat

Mortazavi, P.[1*], Taghi Altirahi, T.[2], Namjoo, A. R.[3]
1-Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (sp.mortazavi@srviau.ac.ir)
2-Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
3-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Methylmercury (MeHg) is a well- known environment pollutant toxic to the nervous tissue, particularly during development. At a low concentration Methylmercury chloride (MMC) can be transferred to the fetus through the placenta and to newborn offspring through breast milk. The purpose of this study were to evaluate ultrastructural alteration in the cerebellum of newborn rat on the 25th postnatal days. Adult Female wistar rats were inoculated with MMC (0.5,4.5, 10mg/kg /Hg/day) on the 12th, 13th and 14th gestational days. The newborn offspring were placed with the mothers until postnatal day 25. Newborn rats were observed for clinical signs and motor behavior daily. No changes were observed in the clinical signs and motor behavior of these animals. Half of cerebellum were fixed with 2.5% gluteraldehyde in 0.1 M phosphate buffer and routinely processed for electron microscopy and another samples of cerebellum fixed in formalin buffer 10% solution and processing for paraffin section light microscopy and TUNEL assay test.

The component cells of the cerebellum male offspring in the 0.5 , 4.5 , 10 mg /kg groups showed reduction of granular cells layer and apoptosis in neuron cells.
ultrastructural study showed chromatin migration to the edge of nuclei, dilation of the smooth endoplasmic reticulum, ribosomes to shed from the surface of RER. Mitochondria were rounded with condensed matrical spaces and expanded intercristal space.and the matrix was condensed.
Our observation confirm that MMC induces neuronal injury and apoptosis in cerebellum

Keywords: *Methylmercury chloride, Cerebellum, Apoptosis, Newborn rat*

۱*ـ گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
(sp.mortazavi@gmail.com)
۲ـ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲ـ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

عبور نموده و باعث آسیب به ساختار و عملکرد سیستم عصبی در جنین و بالغین می شود. اگرچه مطالعات قبلی تظا هرات بیماری عصبی القاء شده توسط متیل مرکوری را در رت ثابت نموده است. در طول حوادث ناگوار در شهرهای میناماتا و نیگاتای ژاپن و سپس در عراق در دهه ٦٠ و ٧٠ قرن بیستم تعدادی از نوزادان از طریق جفت در معرض متیل مرکوری قرار گرفتند. قربانیان سندرم شبه زمین گیری، کم عقلی ، سوء عملکردحسی که شامل اختلال در تکلم ، شنوایی ، بینایی، اختلال حرکتی و تشنج های مکرر را آشکار نموده و درموارد بسیار شدید نوزادان متولدشده کور و کر بودند(١٢و ٦ ،١،٥).

اثرات متیل مرکوری برروی سیستم اعصاب مرکزی به خوبی شناخته نشده، اما متیل مرکوری تمایل زیادی برای باند شدن با گروه های تیول و هر پروتئین یا پپتیدی که شامل سیستئین یا حتی متیونین باشد دارد، که نتیجه آن تخلیهٔ گلوتاتیون داخل سلولی و بدنبال آن تجمع متابولیت های واکنش پذیر اکسیژن است(٢). اثرات حفاظتی آنتی اکسیدان ها علیه مسمومیت عصبی ناشی از متیل مرکوری از این فرضیه حمایت می کند. همچنین متیل مرکوری موجب بهم خوردن تعادل غلظت یون کلسیم درون سلولی در سیستم اعصاب مرکزی می شود(٤). از طرف دیگر متیل مرکوری کلراید از جذب سلولی گلوتامات ممانعت نموده، بنابراین غلظت خارج سلولی گلوتامات افزایش می‌یابد. این افزایش گلو تامات خارج سلولی می تواند برخی از گیرنده‌ها بویژه گیرنده ان ـ متیل دی ـ آسپارتیک اسید را بیشتر تحریک کند که بدنبال آن تولید اکسید نیتریک که یک سم سلولی است افزایش می‌یابد(٤). در معرض قرارگیری نوزاد رت پیش از تولد با متیل مرکوری در روز ١٤ و ١٣ ،١٢آبستنی باعث آسیب به سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت با منشاء داخلی و القاء استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ می شودکه این امر نقش مهمی در سمیت عصبی القاء شده توسط متیل مرکوری دارد .همچنین نشان داده شد که سطح سوپراکسید دیسموتاز تا ٣٠ روز بعد از تولد در سطح پایین باقی می‌ماند(٢).

مواد و روش کار

١- ماده شیمیایی

در این مطالعه ماده شیمیایی مورد آزمایش یعنی متیل مرکوری کلراید *Methylmercury(II)chloride* با فرمول مولکولی *CH3HgCL* با وزن مولکولی ٢٥١/٠٨بود. این ماده از شرکت *SIGMA – ALDRICH(Riedel – de Haen)* تهیه و در تمام طول دوره مطالعه در دمای یخچال نگهداری شد. ماده حلال، استون استریل ساخت شرکت مرک نیز در دمای یخچال نگهداری گردید. دزهای تیمار بکار گرفته شده به ترتیب عبارت بودند از ٤/٠،٥/٥mg/kg وزن بدن در روز به صورت داخل صفاقی mg/kg ١٠ وزن بدن در روز به صورت زیر پوستی به مدت سه روز تزریق شد. دز تزریقی روزانه بطور روزانه تهیه و بکار گرفته می شد.

٢- انتخاب حیوان

در این مطالعه تعداد ٤٠ رت ماده بالغ و هم سن (نژاد ویستار : *Wistar*)و وزن تقریبی ٢٠٠ـ١٧٠ گرم و تعداد ٢٠رت نر بالغ و هم سن نژاد ویستار و وزن تقریبی ٢٥٠ گرم از انستیتو پاستور خریداری شد. رت‌های ماده به صورت تصادفی در ٤ گروه شامل سه گروه تیمار هریک حاوی ده رت و یک گروه کنترل تقسیم و مورد استفاده قرار گرفتند. رت‌های ماده به صورت منفرد در قفس‌های پلی‌کربنه با در پوش سیمی ضد زنگ نگهداری و آب و خوراک به صورت آزاد در اختیار آنها قرار داده شد. ابعاد قفس ١٠/٥×١٩×٨ سانتی‌متر بود که در تمام طول دوره مطالعه از آنها استفاده گردید. آب آشامیدنی حیوانات از طریق بطری‌های شیشه‌ای با سر پستانک لوله‌ای از جنس استیل ضدزنگ در اختیار آنها قرار گرفت و خوراک نیز به صورت پلت‌های آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار داده شد. شرایط اتاق حیوانات، در تمام طول دوره مطالعه، در دمای تقریبی ٢٥-٢٢ و رطوبت نسبی ٥٠ درصد و سیکل روشنایی / تاریکی ١٢ ساعته در شبانه روز حفظ گردید. سن رت‌ها در زمان شروع مطالعه، حدود ١٣ هفته بود.

Archive of SID
www.SID.ir

۳- جفت‌گیری، آبستنی و تزریقات

این تحقیق در محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی واقع دردانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفت. طول دوره مطالعه ٦٠ روز بود. هر دو رت ماده به مدت ۱۲ ساعت با یک رت نر مجاور می‌شوند. بعد از آن برای تایید آبستنی بوسیله سواپ استریل از مهبل *(vagina)* رت‌های ماده گسترشی بر روی لام تهیه، و با استفاده از متیلن بلو یا ائوزین رنگ آمیزی و سپس گسترش در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار می‌گرفت. در صورت مشاهده اسپرم آن روز(روز مشاهده اسپرم) روز یک آبستنی در نظر گرفته می شد. سپس رت‌ها را به ٤ گروه آزمایشی تقسیم کرده و در روزهای ۱۲،۱۳و۱٤ آبستنی (سه تزریق) متیل مرکوری کلراید به صورت داخل صفاقی و زیر جلدی تزریق شد که دز تزریق در این گروه‌ها به شرح زیر می باشد:

- گروه اول*mg/kg* ۰/۵ متیل مرکوری کلراید به صورت داخل صفاقی
- گروه دوم*mg/kg* ٤/۵ متیل مرکوری کلراید به صورت داخل صفاقی
- گروه سوم*mg/kg*۱۰ متیل مرکوری کلراید به صورت زیر پوستی
- گروه چهارم نیز شاهد در نظر گرفته، که در آن استون (سه تزریق) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

جهت تزریق ابتدا ۱۰ میلی گرم از متیل مرکوری کلراید را در ۱ سی سی حلال (استون) حل کرده و بعد از این محلول دزهای *mg/kg* ۰/۵ ،۰، ٤/۵ و ۱۰ تزریق شد.

٤-نمونه برداری

الف-انتخاب نمونه

بعد از گذشت ۲۵ روز از زمان تولد یعنی تا زمانی که نوزاد از شیر تغذیه می کند، از هر گروه تیمار، ۱۰ نوزاد نر به طور تصادفی انتخاب و نوزادان ابتدا با استفاده از کلروفرم بیهوش و با ترازوی دیجیتال وزن شده و بعد از آن با عمل گیوتینه کردن، سر آنها قطع گردید.

ب- نمونه برداری برای مطالعات هیستوپاتولوژی و الکترونی

از هر گروه آزمایشی ۵ حیوان برای مطالعات میکروسکوپی انتخاب گردید. با برداشتن استخوان جمجمه، مغز را به طور کامل در آورده، وزن کرده و در امتداد شکاف میانی در راستای قدامی ـ خلفی بریده، مخچه به دو نیمکره چپ و راست تقسیم شد. یک نیمه برای برش‌های پارافینی و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین در فرمالین بافر ۱۰ درصد و یک نیمه دیگر برای مطالعات فراساختاری و به روش روتین میکروسکوپ الکترونی با رنگ آمیزی اورانیل استات و سیترات سرب در گلوتر آلدهید ۲ درصد قرار داده شد.

ج- ایمنو هیستوشیمی و روش رنگ آمیزی تانل(TUNEL)

جهت تشخیص آپوپتوز از کیت ایمنوهیستوشیمیایی*TUNEL* ساخت شرکت *Roche* استفاده گردید. ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین زدائی و آب دهی با آنزیم پروتئیناز *K* مجاور و پس از انکوباسیون به مدت۳۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتیگراد با محلول *PBS* شستشو گردید.

سپس مقاطع بافتی را با محلول *TUNEL reaction mixture* به میزان۵۰ میکرولیتر به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مجاور کرده و با محلول *PBS* شستشو دادیم. مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول *Converter-POD* به میزان ۵۰ میکرو لیتر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول*PBS* شستشو و سپس با محلول*DAB* نیز مجاور گشته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مجدداً انکوبه گردید. در نهایت شستشو با *PBS* و رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو صورت گرفت.

نتایج

بررسی میکروسکوپ نوری مقاطع بافتی مخچه نشان دهنده کاهش جمعیت سلولی ناحیه گرانولار در گروه های تیمار تحت مطالعه(۵/،٤/۵و۱۰میلی گرم پر کیلو گرم متیل مرکوری کلراید) مشاهده شد. سلولهای آپوپتیک بوسیله تغییر در مورفولوژیک هسته که شامل تراکم در کروماتین است شناخته می شود. در تمام گروه‌ها وزن بدن نوزاد رت قبل از کالبدگشایی و سپس وزن مغز و مخچه همان نوزاد جداگانه وزن شد، و نسبت مغز و مخچه به وزن بدن برحسب درصد اندازه گیری شد که با استفاده از آزمون های آماری مورد مطالعه قرار گرفت که اختلاف معنی‌دار بود($P<0.05$). با استفاده از عدسی چشمی

Archive of SID

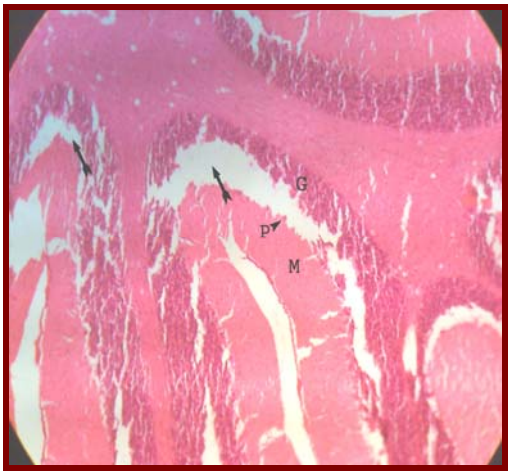
www.SID.ir

مدرج و بزرگنمایی ۱۰ ضخامت ناحیه گرانولار مخچه در گروه های تحت مطالعه بررسی شد که اختلاف معنی دار مشاهده شد($p<0.05$). منطقه گرانولار گروه های تیمار ۰/۵، ۱۰، ۴/۵میلی گرم پر کیلو گرم نسبت به گروه شاهد به ترتیب دچار کاهش ضخامت شده بودند(جدول۱ و نگاره۱).

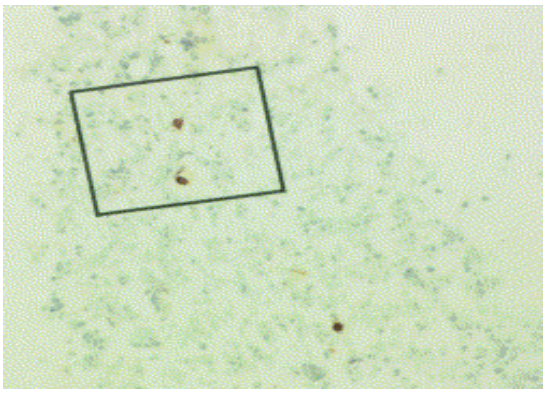
جدول ۱- میانگین ضخامت لایه گرانولار درگروه‌های آزمایشی و کنترل می‌باشند

گروههای آزمایش	میانگین ضخامت لایه گرانولار
کنترل	۱۱/۲۳
۰/۵	۵/۲۴
۴/۵	۸/۶۳
۱۰	۱۰/۹۵

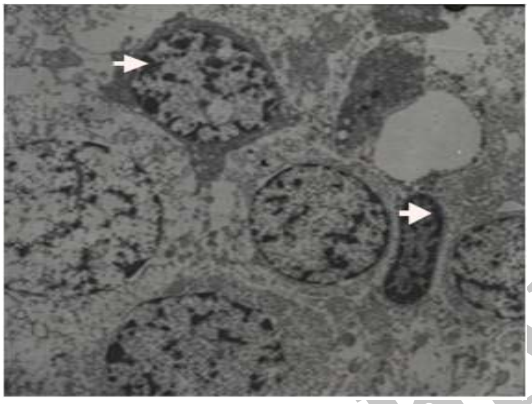
همچنین این مطالعه نشان داد که نوزادانی که از طریق جفت در معرض متیل مرکوری کلراید قرار گرفته بودند لااقل تا سن ۲۵ روزگی فاقد رفتار غیر طبیعی مشخص بودند. نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده اشکال غیر طبیعی میتوکندری همراه با دیواره نامنظم و مواج، تورم ماتریکس، توسعه فضای بین تیغه ای و کندانسه شدن ماتریکس، مهاجرت کروماتین به محیط هسته و پارگی غشاء هسته و اتساع شبکه آندو پلاسمیک. در رنگ آمیزی تانل سلولهای آپوپتیک در لایه گرانولار مثبت رنگ گرفتند(نگاره های ۲ تا۶).



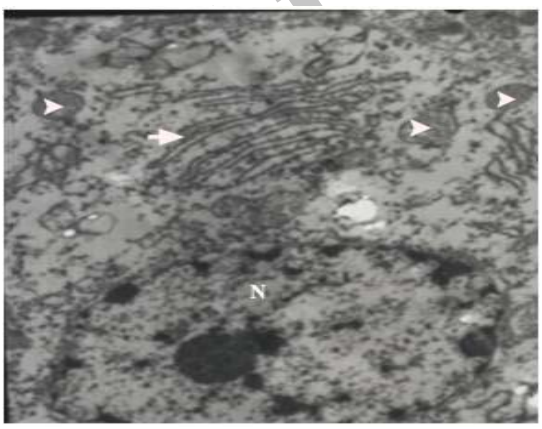
نگاره ۱- تصویر ریز بینی مخچه در نوزاد رت با دز ۰/۵ میلی گرم ۲۵روز پس از تولد که لایه گرانولار (*G*)دچار کاهش شدید جمعیت سلولی شده است.(پیکان)(*H&E*64*).



نگاره ۲: لایه گرانولار مخچه در گروه آزمایش، سلولهای عصبی این لایه با رنگ آمیزی *TUNEL* مثبت رنگ گرفته اند(مربع) که نشاندهنده آپوپتوز در این سلول هاست.

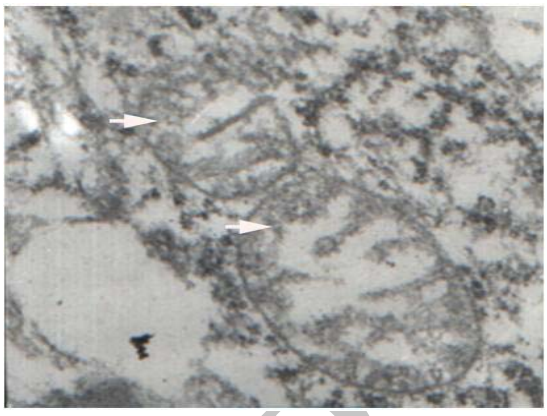


نگاره۳ – الکترون فتو میکروگراف سلول آپوپتیک(پیکان)، نوکلئار کاپ و آپوپتیک بادی گروه آزمایش ۰/۵ میلی گرم پر کیلوگرم(رنگ‌آمیزی اورانیل استات و سیترات سرب×۴۰۰۰).

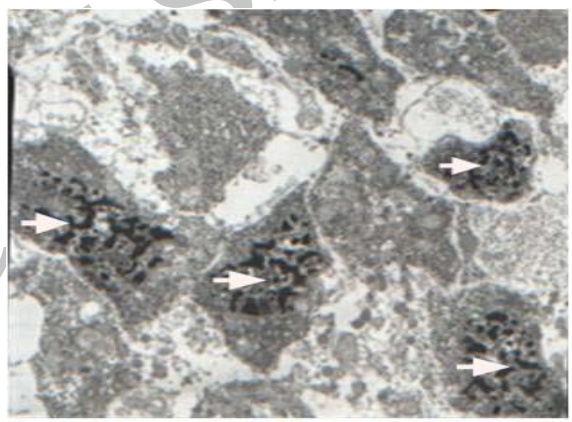


نگاره۴ – الکترون فتو میکرو گراف سلول‌های عصبی مخچه گروه کنترل هسته (*N*)، شبکه آندوپلاسمیک خشن(پیکان) و میتوکندری (نوک پیکان)(رنگ‌آمیزی اورانیل استات و سیترات سرب ×۸۰۰۰).

www.SID.ir



نگاره۵ – الکترون میکرو گراف گروه ازمایش با ۰/۵ میلی گرم پر کیلو گرم از متیل مرکوری کلراید . میتو کندری غیر طبیعی (پیکان)، تورم میتوکندری ، تخریب کریستا و کاهش غلظت ماتریکس دیده می شود(رنگ آمیزی اورانیل استات .× ۳۲۰۰۰).



نگاره٦ – الکترون فتو میکرو گراف سلو ل های گرانولار مخچه نوزاد رت نر (۰/۵ ملی گرم پر کیلو گرم) فراگمانتا سیون کروماتین وسلول های آپوپتیک هرمی شکل (پیکان) قابل مشاهده می باشد(رنگ آمیزی اورانیل استات و سیترات سرب .×٤۰۰۰).

بحث

مخچه نقش‌های عمده‌ای را در زمان‌بندی فعالیت‌های حرکتی و در تغییر سریع یک حرکت به حرکت بعدی بازی می‌کند. مخچه همچنین به کنترل واکنش‌های متقابل لحظه‌ای بین عضلات آگونیست و آنتاگونیست کمک می‌کند.

از زمان‌های طولانی مخچه ناحیه ساکت مغز لغب گرفته است چرا که تحریک این ناحیه هیچ گونه احساسی تولید نمی‌کند. مع‌الوصف با حذف مخچه اعمال حرکتی شدیدا غیر طبیعی می‌شوند.

بدنبال در معرض قرار گیری داخل رحمی رت‌ها با متیل مرکوری بسته به دز و مدت زمان مصرف، به میزان قابل توجهی مرگ داخل رحمی، تاخیر در رشد و تغییر در آرایش سلول‌های مغزی بطور بسیار موذیانه‌ای اتفاق می‌افتد. که در مرحله انجام پروژه این نتایج به خوبی مشاهده شد به طوریکه تمامی مادرانی که دز ۵*mg/kg* و ۷/۵*mg/kg* و ۱۰*mg/kg* و ۲۰*mg/kg* از متیل مرکوری کلراید را به صورت داخل پریتوئن دریافت کرده بودند ۲٤ ساعت تا ٤۸ ساعت پس از تزریق اول یا دوم با علائم بالینی دل درد شدید، خمیدگی سر، بی حالی، بی‌اشتهایی، علائم عصبی و سقط جنین تلف شدند. که می‌تواند به‌علت مسمومیت مادران و حساسیت شدید به متیل مرکوری کلراید باشد. بنابراین دزهایی که باعث تلفات می‌شدند را به صورت زیر پوستی تزریق نمودیم. بررسی‌های اپیدمیولوژیک و مطالعات تجربی نشان داده که جنس نر به علت اختلاف در فعالیت دفاعی آنتی اکسیدانت مغزی و متابولیسم متیل مرکوری نسبت به جنس ماده حساس‌تر است. بنا براین در این مطالعه از نوزاد نر در گروه‌های تیمار مختلف استفاده کردیم.

مطالعات *Baraldi* و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که مصرف یک دز خوراکی (۸ میلی گرم پر کیلو گرم) از متیل مرکوری کلراید در روز ۸ آبستنی باعث نقص در یادگیری و حافظه و رفتارهای غیر طبیعی حتی تا سن ٦۰ روزگی می‌شود. علاوه بر این ثابت کردند که در معرض قرارگیری پیش از تولد در مراحل اول آبستنی موجب تغییر در بیان ژنی گیرنده‌های *NMDA* در هیپوکامپ و نواحی از مغز که در تنظیم عملکردهای شناختی نقش دارند می‌شود(۳). مطالعات آزمایشگاهی *(In vitro)* از آستروسیت‌ها، سلول‌های گلیوما، میکرو گلیاها، و سلول‌های گرانول مخچه در ارتباط با توصیف مسیر آپوپتوتیک القاء شده توسط متیل مرکوری کمک گرفته شده است(۷و۵،٤،۲). ما مشاهده کردیم که هم غلظت‌های پایین متیل مرکوری*(mg/kg ۰/۵)* و هم غلظت‌های نسبتاً بالای متیل مرکوری کلراید *(mg/kg٤/۵و ۱۰)* می‌توانند باعث ایجاد تغییرات شدید در ارگانل‌های داخل سلولی از جمله شبکه آندوپلاسمیک، میتوکندری و هسته سلو ل‌های

Archive of SID

www.SID.ir

گرانولار مخچه نوزاد رت نر شود. مطالعات *park* و همکاران (۲۰۰۷) ثابت کرد که درمعرض قرار گیری سلول‌های اپی تلیال برونشیال انسان با مرکوریک کلراید با غلظت‌های *ppm* ۲،٤،٦،٨ باعث مرگ سلولی، افزایش گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (*ROS*) و فعال شدن کاسپاز ۳ سیتوزولیک می شود. افزایش متابولیت های فعال اکسیژ ن با کاهش سطح گلوتاتیون *(GSH)*همراه بوده و تغلیظ کروماتین توسط رنگ آمیزی با *(4,6-diamidino -2- phenylindole DAPI)*نمایش داده شد. سلول‌های درمان شده با مرکوریک کلراید فرآیند آپوپتوز را نشان دادند(۱۰).

در این بررسی مشاهدات مورفومتریک و مورفولوژیک ثابت کرد که سلول‌های گرانولار مخچه نوزاد رت، تحت تاثیر متیل مرکوری کلراید قرار گرفته‌اند. به طوریکه ضخامت ناحیه گرانولار گروه‌های تحت مطالعه که مادران شان دز *۰/۵mg/kg* و ۱۰ را دریافت کرده بودند دچار کاهش ضخامت شده بود و اختلاف معنی‌داری در ضخامت ناحیه گرانولار در بین گروه کنترل و گروه تیمار *۱۰mg/kg* و گروه کنترل و گروه تیمار *۰/۵mg/kg* مشاهده شد($P<0.05$).

بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی مکانیسم‌هایی را پیشنهاد داده‌اند که متیل مرکوری باعث تاثیرات سیتو توکسیک مثل: استرس اکسیداتیو، آپوپتوزیس، نکروز، تغییر در انتقال گلوتامات و ممانعت از میتوز از طریق شکسته شدن میکرو تو بول می‌شود(۱۰و۸ ،٤،۳،۲). جیوه های آلی و غیرآلی موجب آزاد شدن سریع یون کلسیم از وزیکول‌های مشتق شده از شبکه آندوپلاسمیک صاف می‌گردد. آزاد شدن کلسیم از شبکه آندوپلاسمیک صاف ممکن است ناشی از ممانعت یون کلسیم آت پ آز شبکه آندوپلاسمیک صاف باشدکه احتمالاً در نتیجه اتصال به گروه‌های تیول موجود در پمپ‌های پروتئینی ـ کلسیمی باشد. به دنبال آن موجب آسیب‌های غیر مشخص به غشاء لیپیدی از طریق پراکسیداسیون لیپید می‌گردد، با این وجود آزاد شدن کلسیم می‌تواند از طریق مکانیسم‌های بسیار اختصاصی به واسطه کانال‌های کلسیمی داخل سلولی که در غشاء شبکه آندو پلاسمیک صاف واقع شده‌اند ایجاد شود، مانند رسپتورهای اینوزیتول تری فسفات (*Ip3*) وریانودین (*ryanodine*)، رسپتورهای *Ip3* نه تنها در تنظیم یون کلسیم بلکه در تکامل و مرگ نورونی نقش دارند. متیل مرکوری موجب افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شود، جالب توجه است که در این سلول‌ها متیل مرکوری موجب افزایش غلظت *IP3*نمی گردد. پیشنهاد شده که متیل مرکوری مستقیماً با اثرگذاری بر روی رسپتورها باعث آزاد شدن یون کلسیم می‌گردد. گیرنده‌های *ryanodine* در مرحله القاء و تحریک کلسیم و آزاد شدن کلسیم درگیرند. کلسیم سیتوزولیک موجب فعال شدن رسپتورهای *ryanodine* و باعث آزاد شدن کلسیم از *SER* می‌شود(۵و۲). شاید افزایش یون کلسیم داخل سلولی باعث ایجاد آپوپتوز می شود که در مطالعه ما آپوپتوز سلول‌های گرانولار به اثبات رسید.

تعدادی از مطالعات اثرات متیل مرکوری و عملکردهای متفاوت آن را بر روی میتوکندری اثبات نموده که شامل فسفوریلاسیون اکسیداتیو و تنفسی است. علاوه بر آن متیل مرکوری تاثیرات شگرفی روی تنظیم یون کلسیم میتو کندری دارد و مقدمه‌ای است بر آزاد سازی یون کلسیم ca^{2+} از میتوکندری که به منزله پیشگیری از باز جذب مجدد آن است(٤). بیشتر رخدادهای اخیر پیشنهاد می‌کند که متیل مرکوری موجب باز شدن منافذ انتقالی میتو کندری و افزایش تراوایی آن می‌شود، که در آپوپتوز سلولی و تغییرات فراساختاری شرکت می کند و موجب آسیب‌های متنوع و وسیع ناشی از سمیت می‌شود. باز شدن منافذ انتقالی و تراوش پذیر اجازه انتشار غیر فعال هر مولکول با وزن مولکولی کو چکتر از ۱/۵ کیلو دالتون که شامل سیتو کروم *C* پیش آپوپتیک بوده که در حالت عادی از غشاء داخلی میتوکندری نشت نا پذیرند را می‌دهد. آزاد شدن سیتو کروم *C* از میتو کندری بداخل سیتوزول سبب فعال سازی کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ و القاء آپوپتوزیس می شود، جزئیات این مکانیسم هنوز ناشناخته است(۷و٤،۳). در این مطالعه ما به بررسی اثر متیل مرکوری کلراید بر روی ارگانل‌های داخل سلولی پرداختیم، و به صورت مورفولوژیک تصاویر غیرطبیعی میتوکندری، اتساع شدید شبکه آندوپلاسمیک صاف و

Archive of SID

www.SID.ir

حاشیه‌نشینی کروماتین در زیر غشاء هسته در تمام گروه‌های تیمار درمان شده با متیل مرکوری کلراید مشاهده شد، که با توجه به موارد یاد شده ازنظر ریخت شناسی مورد اخیر دال بر روند آغاز آپوپتوزیس می‌باشد. مطالعات Okusky نشان داد که تزریق ۱/۵ میلی گرم پر کیلوگرم متیل مرکوری کلراید کلراید از سن ۲روزگی تا ۵۱ روزگی به صورت زیر پوستی در نوزاد رت، باعث تغییرات مورفولوژیک مهمی در میتوکندری دندریت‌ها، آکسون‌ها، پایانه‌های پیش سیناپتیک نورون‌ها در کورتکس دارد به طوریکه تعدادی از میتوکندری‌ها فشرده و تغلیظ شده و تراکم الکترونی در ماتریکس داخلی افزایش یافته بود. در تعدادی از اشکال، تغییرات پس رونده که شامل اختلال در تیغه‌ها و غشاء داخلی و تجمع مواد مات الکترونی در ماتریکس، مشاهده شد(۹). این تغییرات مورفولوژیک در میتوکندری شباهت زیادی با تغییرات ایجاد شده بر روی میتوکندری نورون های گرانولار مخچه نوزاد نر تحت مطالعه ما داشت. این مطالعه نشان داد که نوزادانی که از طریق جفت در معرض غلظت‌های پایین متیل مرکوری کلراید قرار می‌گیرند، حتی با وجود این که علائم عصبی خاصی را در دوران نوزادی آشکار نکنند، اما تغییرات مورفولوژیک قابل توجهی در ارگانل های داخل سلولی ایجاد می‌کند.

فهرست منابع

1- Adachi, T. and Kunimoto, S. (2005): Acute cytotoxic effects of mercuric compounds in cultured Astrocytes prepared from cerebral hemisphere and cerebellum of newborn rats. Biol . pharm . Bull . 28(12:) 2308-2311.

2-Ali, S. F., Lebel, C. P. and Bondy, S. C. (1992): Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity, Neurotoxicology. 13: 637-48.

3-Baraldi, M., Zanoli, P. , Tascedda, F. , Blom, J. M. C. and Brunello, N. (2002): Cognitive Deficits and changes in Gene expression of NMDA Receptors after prenatal MethylMercury Exposure . Environmental Health perspectives. Volume 110/ supplement. 51:855-858.

4-Beal, M. F., Hymanm, B.T., Koroshetz, W. J.(1993): Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease, Trends Neurosci. 16:125-31.

5-Carratu, M.R., Borracci, P., Coluccia, A., Giustino, A., Renna, G., Tomasini, M.C. , Raisi, E., Antonelli, T., Cuomo, V., Mazzoni, E. and Ferraro, L.(2006): Acute exposure to methylmercury at Two Developmental windows: Focus on Neurobehavioral and Neurochemical effects in rat offspring. Neuroscience. 141: 1619-1629.

6-Goto, C. S., Heavy metal intoxication, in: Behrman, R. E., Kliegman, R. M. , Jenson, H. B. (Eds), (2000): *Nelson textbook of pediatrics,* WB saunders company, Philadlphia. P: 2154-2156.

7-Juarez, B.I., Martinez, M. L., Montante, M., Dufour, L., Gracia, E., Jimenez – Capdeville, M. E. (2002): Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats. Neurotoxico and Teratology. 24:767-771.

8-Manfroi, C.B., Schwalm, F. D., Cereser, V., Abreu, F., Oliveira, A., Bizarro, L., Rocha, J.B.T., Frizzo, M. E. S., Souza, D. O. and Farina, M.(2004): Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergig system. Toxicological sciences. 81: 172-178.

9-O kusky, J. (1983): Methylmercury poisoning of the developing nervous system: morphplogical changes in neuronal mitochondria. Acta Neuropathol (Berl) 61(2):116-22.

10-Park, S.T., Lim, K. T., Chung, Y. T. and Kim, S. U. (1996): Methylmercury - induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists . Neurotoxicology.17:37-46.

11-Shanker, G. , Hampson, R. E. and Aschner, M. (2004): Methylmercury Stimulate Arachiconic Acid Release and Cytosolic Phospholipase A2 Expression in Primary Neuronal cultures. J Neurotoxicology. 25:399-406.

12-Takeuchi, T. and Eto, K. (1999): *The pathology of minimata disease, A tragic story of water pollution.* Kyushu university press, Fukoka. P: 51-74.

Archive of SID

www.SID.ir