

## تأثیر کلرید جیوه بر رشد و نمو لوله عصبی ناحیه دیانسفال جنین موش صحرایی (Rat)

طیبه رستگار <sup>M.Sc.</sup>، مهدی مهدیزاده <sup>Ph.D.</sup>، کاظم پریور <sup>Ph.D.</sup>، ملیحه نوبخت <sup>Ph.D.</sup>\*

\* گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی ایران

\*\* گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران

تاریخ وصول: شهریور ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: آذر ماه ۸۲

### چکیده

**هدف:** بررسی آثار تراتوژنیک کلرید جیوه بر رشد و نمو لوله عصبی ناحیه دیانسفال (تالاموس و هیپوتالاموس) در جنین موش صحرایی

**مواد و روشها:** تعداد ۳۶ سر موش صحرایی ماده از نژاد Sprague Dawley انتخاب و به شش گروه شش تایی تقسیم شدند. به سه گروه اول (گروههای شاهد) محلول نرمالین سالین و به سه گروه دوم (گروههای تجربی) ۲mg/kg کلرید جیوه به صورت داخل صفاقی در روزهای ۸، ۹ و ۱۰ به طور جداگانه تزریق شد و در نهایت جنینها در روز ۱۵ بارداری از رحم خارج شده و پس از ثبوت و انجام مراحل پاساژ بافتی، برشهایی به ضخامت ۵ میکرون به طور سریال تهیه و با روش H&E رنگ آمیزی شده و مورد مطالعه میکروسکوپ نوری قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در نوروبلاست‌های ناحیه تالاموس و هیپوتالاموس در گروههای تجربی در مقایسه با گروه شاهد آرایش و نظم سلولی به هم خورده و هسته‌ها در جهات مختلف نسبت به لومن لوله عصبی قرار گرفته‌اند، تراکم سلولها کم شده و فضای خارج سلولی افزایش یافته است، مرگ و دژنراسیون سلولی به میزان فراوان مشاهده می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** نتیجه کلرید جیوه در نوروبلاست‌های ناحیه تالاموس و هیپوتالاموس تأثیر گذاشته و سبب از بین رفتن تعداد زیادی از نوروبلاست‌ها شده است که این امر می‌تواند در رشد و نمو طبیعی لوله عصبی این ناحیه اختلال ایجاد کرده و در دوران بارداری یکی از عوامل تراتوژن باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کلرید جیوه، عامل تراتوژنیک، دیانسفال، موش صحرایی

### مقدمه

کننده‌های پوست و داروهای سنتی چینی کاربرد دارد [۲]. ارگان مورد هدف کلرید جیوه معمولاً دستگاههای ادراری تناسلی، تنفس، گوارش و همچنین اندامها و بافتهای مختلف جنین است [۳ و ۱] که از طریق اتصال به گروه سولفیدریل پروتئین‌ها در بدن خاصیت سمی خود را اعمال می‌کند [۴]. مسمومیت مزمن با کلرید جیوه سبب لرزش (Thremour)، اختلالات حسی و حرکتی، آسیب به کلیه و نکروز توبرلر می‌شود [۱].

کلرید جیوه به صورت پودر سفید رنگ یا بی‌رنگ، کریستالین و سمی است که از طریق دستگاه گوارش و پوست جذب شده و از راه کلیه و ادرار دفع می‌شود. این ماده مصارف فراوانی در صنعت، پزشکی و... دارد از جمله به عنوان ضد عفونی کننده اشیاء بی‌جان، ضد انگل و ضد قارچ [۱]، در ترکیب مواد حاجب، داروهای مسهل و محافظ کننده‌ها و روشن

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵  
Email: Trastegar2002@yahoo.com

پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی، برشهایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و لامها به روش هماتوکسیلین - اتوزین رنگ آمیزی شده و سپس به وسیله میکروسکوپ نوری آرایش سلولی ناحیه تالاموس و هیپوتالاموس مطالعه شد.

### یافته‌ها

یافته‌های حاصل از مطالعات ماکروسکوپی در گروههای شاهد و تجربی مقایسه و نتایج زیر به دست آمد: در گروه تجربی سه، ۱۹/۳ درصد جنینها جذب شدند و در سایر گروهها جذبی مشاهده نشد. ضمناً اندازه CR جنینهای (Crown-Rumpt) گروههای شاهد و تجربی اختلاف معنی داری نداشت ولی وزن جنینها در گروههای تجربی نسبت به گروههای شاهد افزایش یافته و اختلاف معنی داری مشاهده شد ( $P < 0.1$ ).

در مطالعه میکروسکوپی، در تالاموس و هیپوتالاموس گروه شاهد هسته‌ها منظم و عمود بر لومن میانی قرار گرفته و تقسیم میتوز مشاهده می‌شود (شکلهای ۱ و ۳). ولی در گروههای تجربی هسته‌ها پراکنده و در جهات مختلف نسبت به لومن میانی قرار گرفته‌اند، همچنین به مواردی از مرگ سلولی می‌توان اشاره نمود.

تراکم سلولها کم شده (جدول ۲) فضای خارج سلولی افزایش یافته است. تقسیم میتوز به میزان فراوان مشاهده می‌شود. هسته‌ها پیکنوزه و هیپرکروماتینه هستند (شکلهای ۲ و ۴).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار شمارش سلولی در تالاموس و

هیپوتالاموس

| گروهها  | (تالاموس)<br>Mean $\pm$ SD | (هیپوتالاموس)<br>Mean $\pm$ SD |
|---------|----------------------------|--------------------------------|
| تجربی ۱ | ۲۰/۶۱ $\pm$ ۰/۳*           | ۲۰/۴۱ $\pm$ ۰/۴*               |
| تجربی ۲ | ۲۱/۴۳ $\pm$ ۰/۱۷*          | ۲۰/۹۴ $\pm$ ۰/۲*               |
| تجربی ۳ | ۲۱/۶۷ $\pm$ ۰/۱۲*          | ۲۲/۰۴ $\pm$ ۰/۰۶*              |
| شاهد ۱  | ۳۲/۷۹ $\pm$ ۰/۱۲           | ۳۲/۰۲ $\pm$ ۰/۱۳               |
| شاهد ۲  | ۳۲/۸۱ $\pm$ ۰/۱            | ۳۱/۸۹ $\pm$ ۰/۱۵               |
| شاهد ۳  | ۳۲/۸۳ $\pm$ ۰/۱۵           | ۳۱/۹۸ $\pm$ ۰/۱                |

\*  $P < 0.000$

در سال ۱۸۶۰ اختلال در رفتار و عاطفه، نقص در حافظه کوتاه مدت و اختلال حسی و حرکتی در کارگران کلاهدوز که برای ارتقای کیفیت کلاه از کلرید جیوه استفاده کرده بودند مشاهده شد [۳]. در سال ۱۹۵۷ در ماهیگیران ژاپنی و برخی از اعضای خانواده آنها علائمی شبیه به علائم فوق مشاهده شد که دریافتند از غذاهای دریایی است و در سال ۱۹۵۹ علت آن کلرید جیوه شناخته شد [۳]. کلرید جیوه سبب پلی‌نوروپاتی محیطی و از دست رفتن میلین آکسون عصب می‌شود [۵]. موشهای صحرایی که در زمان جنینی در تماس مداوم با میزان کم کلرید جیوه بوده‌اند، در زمان بلوغ دچار علائم تشنج و صرع شدند [۶]. بنابراین در تحقیق حاضر با توجه به مطالعات فوق آثار کلرید جیوه را بر ساختار سلولی ناحیه تالاموس و هیپوتالاموس مورد بررسی قرار می‌گیرد تا مشاهده شود که آیا با توجه به علائم فوق، ساختار بافتی سلول در این نواحی تغییر می‌کند یا خیر؟

### مواد و روشها

تعداد ۳۶ سر موش صحرایی ماده از نژاد Sprague Dawley به صورت تصادفی انتخاب و پس از جفت‌گیری و مشاهده پلاک واژینال که روز صفر بارداری در نظر گرفته شد، توزین و از هم جدا شدند. سن موشها بالای ۹۰ روز و وزن آنها بین ۲۷۰-۲۰۰ گرم بود. موشها به شش گروه شش تایی طبق جدول ۱ تقسیم شده و به گروههای شاهد، محلول نرمال سالین به گروههای تجربی، محلول کلرید جیوه تزریق شد.

جدول ۱. گروههای مورد بررسی

| گروه    | تعداد موش | روز تزریق | دوز تزریق                   | روز بررسی | تعداد جنینها | درصد جذب جنینها |
|---------|-----------|-----------|-----------------------------|-----------|--------------|-----------------|
| تجربی ۱ | ۶         | ۸         | ۲mg/kg/1p HgCl <sub>2</sub> | ۱۵        | ۳۷           | -               |
| تجربی ۲ | ۶         | ۹         | ۲mg/kg/1p HgCl <sub>2</sub> | ۱۵        | ۳۷           | -               |
| تجربی ۳ | ۶         | ۱۰        | ۲mg/kg/1p HgCl <sub>2</sub> | ۱۵        | ۵۰           | ۱۹/۳            |
| شاهد ۱  | ۶         | ۸         | نرمال سالین                 | ۱۵        | ۳۹           | -               |
| شاهد ۲  | ۶         | ۹         | نرمال سالین                 | ۱۵        | ۴۸           | -               |
| شاهد ۳  | ۶         | ۱۰        | نرمال سالین                 | ۱۵        | ۳۹           | -               |

پس از خارج کردن جنینها در روز ۱۵ بارداری، جنینها مدت ۲۴-۶ ساعت در تثبیت‌کننده قرار گرفته و پس از طی مراحل

## بحث

روند رشد و تمایز در لوله عصبی نسبت به مواد مختلف تأثیرپذیر بوده و گاهی مواد می‌توانند سبب آسیب مغزی یا سقط جنین شوند [۳].

ترکیبات جیوه در *in vitro* آپاتوزنز هستند [۸ و ۷] و کلرید جیوه در روند مرگ سلولی، آپاتوز را القاء می‌کند و با افزایش غلظت و زمان در معرض قرارگیری نسبت به آن، مخلوطی از سلولهای نکروتیک و آپاتوتیک مشاهده می‌شود [۹ و ۸، ۷]. آپاتوز نوعی مرگ سلولی است که از نظر مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی از نکروز قابل تشخیص بوده و در روند رشد و نمو به میزان فراوان رخ می‌دهد [۱۰].

در سال ۱۹۹۸، Shenker و همکارانش در سلولهای نوع T انسان و لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها مرگ سلولی ناشی از کلرید جیوه را مشاهده کرده‌اند [۸ و ۷]. در این مطالعه نیز در ناحیه تالاموس و هیپوتالاموس جنین، مرگ سلولی به میزان فراوان در گروههای تجربی مشاهده شد که به دنبال آن تقسیم میتوز به‌عنوان یک مکانیسم جبرانی برای ایجاد تعادل در میزان سلولها افزایش یافته است. هسته‌ها حالت پیکنوزه و هیپرکروماتینه پیدا کرده‌اند. چنین تغییراتی در مطالعات افراد مختلفی که در سلولهای دیگر از جمله هپاتوسیت‌های موش صحرایی [۱۱]، سلولهای پروگزیمال کلیه [۱۲] و ماکروفاژهای کشت شده انسان [۱۳] سلولهای مختلف ایمنی [۱۴]، الیگودندروسیت‌های انسان [۱۵] و کورتکس شنوایی انسان [۱۶] انجام شده، اشاره شده است که خود نشان از نتایج به دست آمده یکسان است. بنابراین بدین ترتیب نتیجه‌گیری می‌شود که کلرید جیوه در

سلولهای مختلف به‌عنوان یک آپاتوزنز عمل نموده و میزان سلولهای آپاتوزه را بالا می‌برد و در تعادل بین تکثیر سلولی و مرگ سلولی اختلال ایجاد می‌کند و در نهایت منجر به آسیب بافتی می‌شود [۱۷].

ضمناً در تحقیق حاضر مشاهده شد که به دنبال تزریق کلرید جیوه و وقوع مرگ سلولی، تراکم سلولها کم شده و فضای خارج سلولی افزایش یافته است. Bret و همکارانش ثابت کردند که کلرید جیوه می‌تواند سبب افزایش DNA خارج سلولی شود و در مرگ سلولی، DNA خارج سلولی افزایش می‌یابد [۱۸ و ۱۹].

از طرف دیگر از نتایج حاصل در مطالعاتی که توسط Duvall و Fourine انجام شده است چنین بر می‌آید که به دنبال وقوع مرگ سلولی حاصل کاتابولیسم کروماتین از سلولهای مرده، در فضاهای خارج سلولی آزاد می‌شود [۲۰ و ۲۱] و بدین ترتیب فضای بین سلولهای افزایش می‌یابد. بنابراین براساس خاصیت القای آپاتوز توسط کلرید جیوه و وقوع مرگ سلولی شاید بتوان پاتوزنز کلرید جیوه را در بروز بیماری‌هایی نظیر سندرم خود ایمنی، واکنش‌های حساسیتی، گلوامرولونفریت و سمیت عصبی (Neurotoxicity) را توجیه کرد [۲۲].

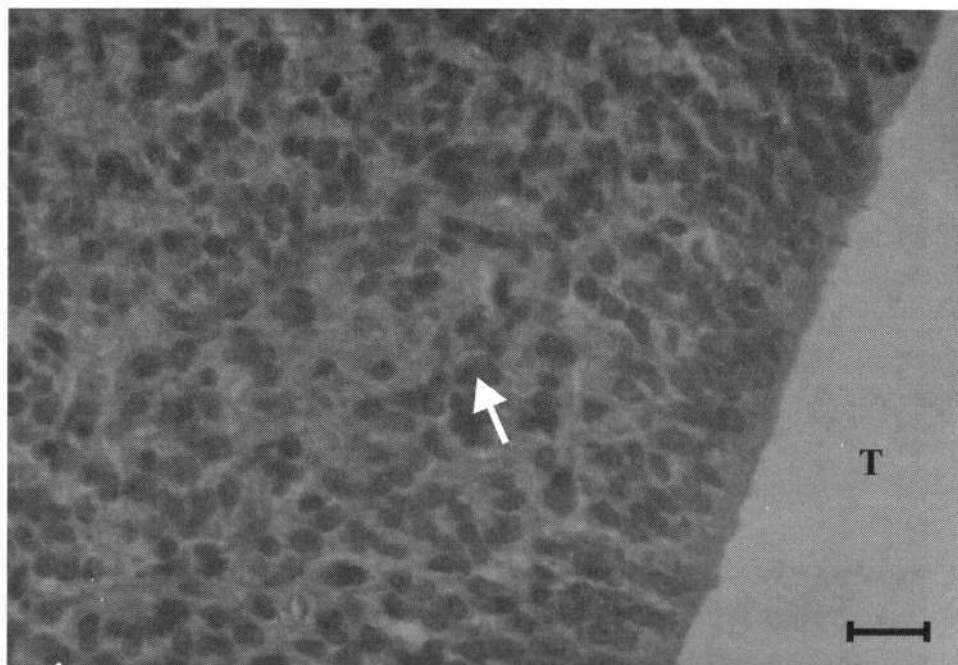
## تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از گروه علوم تشریح مرکز علوم پایه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، ابراز می‌دارند.

## References

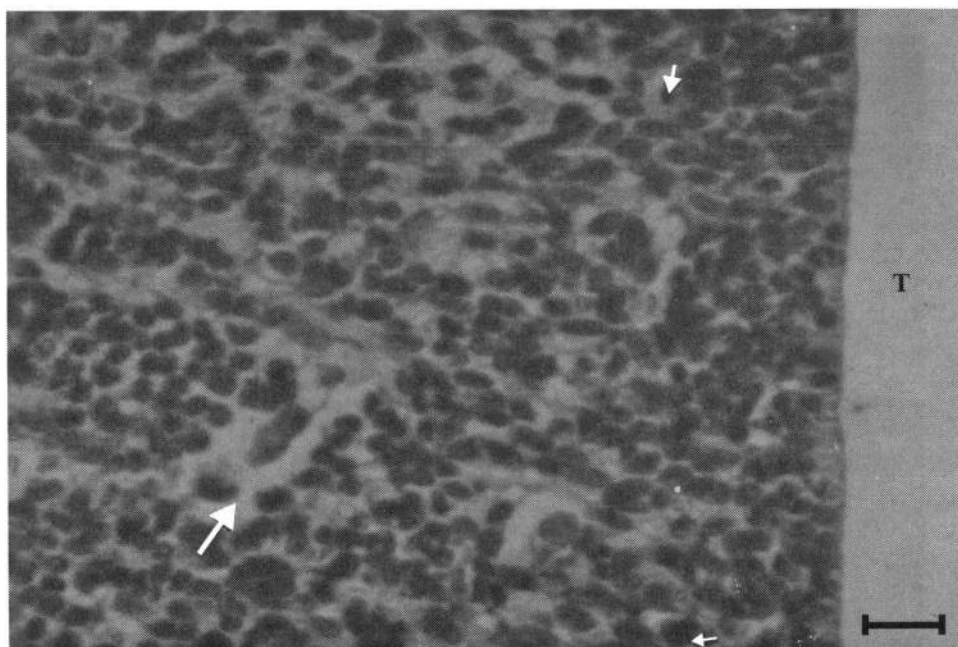
1. Reynolds JEF, Parfitt K, Parson SA. Martindale the extra pharmacopoeia. Williams & Wilkins Publisher, 1996; pp. 1725-1727
2. Federal. Register. Food and Drug Administration. 1998; 63(239): 68775-777
3. تیمبرل جان. مقدمه‌ای بر سم‌شناسی. ترجمه کیهانفر فریریز، اطلاعات تهران، ۱۳۷۶؛ صفحات ۵۲-۱۰
4. پژومند عبدالکریم، جلالی ناصر، اقدسی میترا، ساداتیان سیدعلی اصغر. مسمومیت‌ها، نشر انتشارات. ۱۳۷۴، صفحات ۲۲۶-۲۲۲
5. Deleu D, Hanssens Y, Salmy HS, Hastie I. Peripheral polyneuropathy due to chronic use of topical ammoniated mercury. J Toxicol Clin Toxicol. 1998; 36(3): 233-237
6. Szasz A, Barna B, Gajda Z, Galbacs G, Kirsch Volders M, Szente M. Effect of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during development on epileptogenicity in rats. Neurotoxicology. 2002; 23(2): 197-206

7. **Shenker BJ, Datar S, Mansfield K, Shapir IM.** Induction of apoptosis in human T-cell by organicmercuric compounds. A flow cytometric analysis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 143: 397-406
8. **Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM.** Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: Evidence of mitochondrial dysfunction. *Environ Res.* 1998; 77: 149-159
9. **Duncan-Ac, KB, Jones JT, Burke MF, Carter DE, Laird ME.** Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 277: 1726-1732
10. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-257
11. **Nieminen AL, Gores GJ, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ.** Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1990; 265(4): 2399-2408
12. **Peter LG, Delma T, Jenifer R, Anne D.** Mercuric chloride-induced apoptosis is dependent on protein synthesis. *Toxicol Lett.* 1999; 105: 183-195
13. **Corcoran GB, Ray SD.** The role of the nucleus and other compartments in toxic cell death produced by alkylating hepatotoxicants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992; 113: 167-183
14. **Arargi S, Kondoh M, Kawase M, Satio S, Higashimoto M, Sato M.** Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cels. *Toxicology.* 2003, 184(1): 1-9
15. **Issa Y, Waths DC, Duxbury AJ, Brunton PA, Watson MB, Waters CM.** Mercuric chloride: Toxicity and apoptosis in a human oligodendroglia cell line M03.13. *Biomaterials.* 2003, 24(6): 981-7
16. **Gopal KV.** Neurotoxic effects of mercury on auditory cortex networks growing on microelectrode arrays: a preliminary analysis. *Neurotoxicol teratol.* 2003, 25(1): 69-76
17. **Setton-Avruj CP.** Is the increase in renal papillary phospholipid biosynthesis a protective mechanism against injury? *Renal Failur.* 1996; 19(1): 38-45
18. **Bret L, Lule J, Alary C, Appolinaire-Pilipenko S, Pourrat JP, Fourine GJ.** Quantitation of blood plasma DNA as an index of in vivo cytotoxicity. *Toxicology.* 1990; 61(3): 283-292
19. **Bret L, Lule J, Pourrat JP, Fourine GJ.** Extracellular DNA in blood and urine as a potential marker for cytotoxicity and nephrotoxicity in the mouse. *Renal Fail.* 1990; 12(3): 133-139
20. **Duvall E, Myuie AH.** Death and cell. *Immunol Today.* 1986; 7: 115-116
21. **Fourine GJ, Gayral M, Bouche JP, Conte JJ.** Recovery of nanogram quantities of DNA from plasma and quantitative measurement using labelling by nick translation. *Anal Biochem.* 1986; 158: 250-52
22. **Pu M, Akhand AA, Kato M, Koike T, Hamaguchi M, Suzuki H, Nakashima I.** Mercuric chloride mediates a protein sulfhydryl modification-based pathway of signal transduction for activation src kinase which is independent of the phosphorylation/ dephosphorylation of a carboxyl terminal tyrosine. *J Cell Biochem.* 1996; 63: 104-114

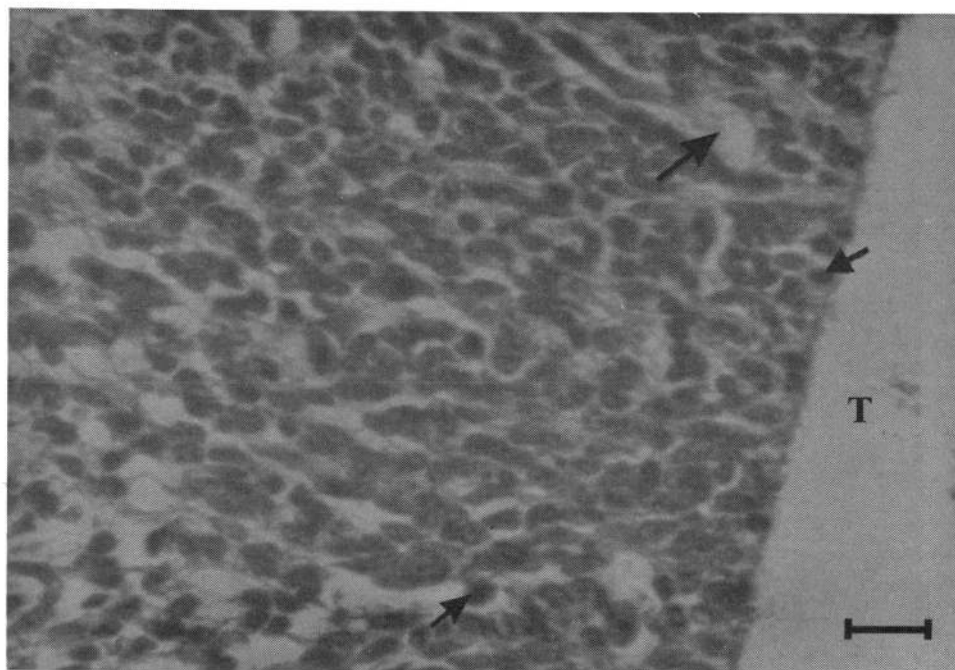


▲ شکل ۱. تالاموس گروه شاهد. پیکان تقسیم میتوز را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی:  $\times 400$ ، بار: ۱۰۰ میکرومتر  
T: Third ventricle

▼ شکل ۲. تالاموس گروه تجربی. پیکان کوچک مرگ سلولی و پیکان بزرگ افزایش فضای خارج سلولی را نشان می‌دهد.  
رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی:  $\times 400$ ، بار: ۱۰۰ میکرومتر، T: Third ventricle







▲ شکل ۳. هیپوتالاموس گروه شاهد. پیکان تقسیم میتوز را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی:  $\times 400$ ، بار: ۱۰۰ میکرومتر، T: Third ventricle

▼ شکل ۴. هیپوتالاموس گروه تجربی. پیکان کوچک مرگ سلولی، پیکان بزرگ افزایش فضای خارج سلولی را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی:  $\times 400$ ، بار: ۱۰۰ میکرومتر، T: Third ventricle

