

بررسی آثار نوروتوکسیسیته کلرید منگنز بر ضخامت کورپوس استریتوم و تغییرات سلولی

آمنه محمدی روشنده ^{M.Sc.}، محمدتقی جغتایی ^{Ph.D.}، ملیحه نوبخت ^{Ph.D.}، کاظم پریور ^{Ph.D.}

* گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ایران

** گروه زیست‌شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران

تاریخ وصول: اسفند ماه ۸۱، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۲

چکیده

هدف: منگنزیکی از فلزاتی است که به وفور در محیط یافت می‌شود و کاربرد فراوانی در صنعت و کشاورزی دارد. سالهاست که سمیت منگنز و ترکیبات آن به اثبات رسیده است، اما این تحقیقات آنقدر گسترده نیست که بتوان به‌طور قطع این نتایج را در مورد انسان نیز صادق دانست. در تحقیق حاضر آثار نوروتوکسیسیته کلرید منگنز روی ناحیه کورپوس استریتوم جنین موش سوری بررسی شده است. **مواد و روشها:** بدین منظور موشهای باردار در دو گروه تجربی و شاهد قرار داده شد. به گروه تجربی در روز ۷ و ۹ بارداری به میزان ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم محلول کلرید منگنز به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه شاهد در همان روزها آب مقطر تزریق گردید. جنینها در روز ۱۵ از رحم بیرون آورده شدند. جنینها وزن شده و سپس در محلول بوئن تثبیت شدند. پس از پاساژ بافتی و تهیه مقاطع ۵ میکرونی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، لام‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** طبق اندازه‌گیریهای ماکروسکوپی، وزن جنینهای گروه تجربی در روزهای ۷ و ۸ به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد کاهش یافت در بررسیهای میکروسکوپی، ضخامت کورپوس استریتوم گروه تجربی روزهای ۷ و ۸ به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. در ناحیه کورپوس استریتوم گروههای تجربی هسته‌های پیکنوزه و گلیوزیز مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده آثار توکسیسیته کلرید منگنز به اثبات می‌رسد و افراد بالاخص زنان باردار نباید در معرض مقادیر بالای این ماده قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: کلرید منگنز، لوله عصبی، کورپوس استریتوم، نوروتوکسیسیته، موش

مقدمه

قارچ‌کش‌ها کاربرد دارد. از پر منگنات پتاسیم به‌عنوان ضد عفونی‌کننده استفاده می‌کنند. قرص‌ها و کپسول‌های کلرید منگنز به‌عنوان مکمل غذایی مصرف می‌شود [۲]. در بدن منگنز به‌عنوان فلزی کمیاب به شمار می‌آید که مقدار ناچیز آن برای انجام برخی فعالیت‌های آنزیمی بسیار ضروری است. کمبود آن می‌تواند موجب برخی اختلالات متابولیکی شود، همچنین میزان بیش از اندازه آن می‌تواند ایجاد برخی اختلالات در اندام‌های بدن مخصوصاً سیستم اعصاب مرکزی داشته باشد [۳]. یکی از مناطقی که منگنز در آن تجمع پیدا می‌کند جسم

منگنز یکی از فلزات فراوان در محیط است و از لحاظ فراوانی دوازدهمین فلز در قشر زمینی است. از لحاظ پراکندگی در جهان بعد از آهن، آلومینوم و مس در مقام چهارم قرار دارد [۱]. منگنز و ترکیبات آن کاربردهای گسترده‌ای در صنعت و پزشکی دارند. در صنعت از ترکیبات آن در کارخانجات ساخت باتریهای خشک، شیشه سازی و سرامیک سازی استفاده می‌شود. همچنین برای ساخت حشره‌کش‌ها، آفت‌کشها و

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

سالمتر داشته باشیم. در تحقیق حاضر از ترکیب کلرید منگنز استفاده شده است. این ماده به صورت پودر قرمز رنگ و در حالت فیزیکی جامد و محلول در آب است. اشکال دارویی به صورت کپسولها و قرصهای Mineral و سوسپانسیون است که به عنوان مکمل غذایی مصرف می شود [۱۴].

مواد و روشها

در این تحقیق برای دستیابی به جنین های لازم از موشهای سوری ماده با وزن ۲۵ تا ۳۵ گرم استفاده شده است. موشهای نر و ماده به نسبت ۱:۲ جفت شدند. با دیدن پلاک و اژینال در صبح روز بعد، آن روز به عنوان روز صفر بارداری تعیین و موشها وزن شده و علام گذاری شدند.

موشهای باردار در دو گروه تجربی و شاهد قرار داده شدند. به گروه تجربی در روزهای هفت و هشت و نه بارداری به میزان ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم و به صورت داخل صفاقی محلول کلرید منگنز تزریق شد. به گروه شاهد در همان روزها آب مقطر تزریق شد. کلیه جنین ها در روز ۱۵ بارداری از رحم مادر شدند. موش های باردار با کلروفورم کشته شده و جنین ها از طریق سزارین بیرون آورده شدند. تعداد جنین ها شمارش شده و وزن آنها اندازه گیری شد. به منظور بررسی اختلالات ظاهری (ماکروسکوپی) جنین ها با استریومیکروسکوپ بررسی شده و دو گروه شاهد و تجربی مورد مقایسه قرار گرفتند. جنین ها به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در تثبیت کننده بوئن قرار گرفتند. سپس برای آماده سازی بافتی به دستگاه اتوتکنیکون انتقال داده شده و در پارافین قالب گیری شدند. قالب های پارافینی پیرایش شده (Trimming) و روی میکروتوم دوار سوار شده و برش گیری انجام شد. ضخامت مقاطع ۵ میکرونی و به صورت سریال بود. لام ها توسط همتاکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی و برای ارزیابی های میکروسکوپی آماده شدند.

اندازه گیری های مورفومتری

مورفومتری با استفاده از گراتیکول مدرج چشمی و با بزرگنمایی ۱۰× انجام شد. ناحیه انده گیری شامل ضخامت کورپوس استریتوم گروه تجربی و شاهد بود (شکل ۱) برای این

مخطط است. سندرمی مشابه با سندرم پارکینسون وجود دارد که در اثر تماس با مقادیر بیش از اندازه منگنز ایجاد شده است. در این سندرم دو پامین در استریتوم وجود ندارد و عارضه ای در گلوبوس پالیدوس ایجاد می شود [۴، ۵، ۶ و ۷]. با این توضیحات منگنز می تواند راههای خارج هرمی را تحت تأثیر قرار داده و موجب اختلالات حرکتی شود. این سندرم اولین بار توسط کوپر در سال ۱۸۳۷ در بین کارگرانی مشاهده شد که در معرض میزان بالایی از منگنز قرار داشتند بعد از وی، محققین دیگری هم در این ارتباط فعالیت هایی داشتند و به نتایج مشابهی دست یافتند [۲].

تحقیقات متعددی در ارتباط با توکسیسیته و بالاختصاص نورو توکسیسیته منگنز انجام شده است. بلازاک و همکارانش اثر سمیت ترکیبی از منگنز را به نام MNDPDP را روی خرگوشها بررسی کردند که این ماده اختلالات اسکلتی را در موشهای صحرایی ایجاد کرد [۸]. محققان اثر کلرید منگنز را بر رشد و نمو جنین موش بررسی کرده و مشاهده نمودند منگنز می تواند موجب اختلالات اسکلتی شود [۹]. علاوه بر این گزارشات دیگری نیز ترکیبات مختلف منگنز را روی حیوانات بالغ و جنینها مورد بررسی قرار دادند و نظر همه آنها این بود که منگنز می تواند برای نمونه های بالغ و جنین مضر باشد [۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳]. البته در این تحقیقات اثرهای این فلز بر نمونه های بالغ بررسی شده است و هنوز تحقیقات در ارتباط با آثار سمی این ماده بر نمونه های جنینی ادامه دارد. از آنجایی که این ماده باعث باعث ایجاد اختلالات یادگیری و فراموشی در انسان می شود، تحقیق در مورد آثار آن بر کورتکس و کورپوس استریتوم و دیگر مناطق مغزی اجتناب ناپذیر است. در کشور ما مخصوصاً در شهرهای بزرگ آلودگی هوا یکی از معضلات برای دولت و مردم است. در مواد سوختی ترکیبات منگنز هم به کار رفته است. همچنین کارخانجات یکی از منابع آلوده کننده هوا با این ترکیبات هستند و بدین ترتیب طیف وسیعی از مردم در مواجهه با این فلز هستند. خانم های باردار هم از این قاعده مستثنی نیستند. این گروه از جامعه در معرض خطرات جدی قرار دارند. پس با تحقیقات بیشتر و آگاهی از خطرات احتمالی، می توان افراد را نسبت به این مسایل آگاه تر کرد تا کودکانی

کورپوس استریوم عمود بر لومن است اما در گروه تجربی در برخی از هسته‌ها تغییراتی ایجاد شده و عمود بر لومن نیستند (شکل ۲).

در ناحیه و نتریکولار گروه تجربی تقسیم سلولی افزایش داشت (شکل ۳) در مقاطع بافتی تمام گروههای تجربی گلیوزیره مشاهده (شکل ۴).

بحث

همانگونه که در نتایج اشاره شد تزریق کلرید منگنز موجب فتوتوکسیسته و نوروتوکسیسته گردید. فتوتوکسیسته شامل کاهش وزن و وقع پدیده‌ی جذب بود. کاهش وزن می‌توانند نتیجه اثرهای توكسیسته منگنز باشد. نتیجه حاصل از این تحقیق با نتایج محققین دیگری همخوانی داشت [۱۵ و ۱۳، ۱۰]. کاهش وزن در روزهای ۷ و ۸ معنی‌دار و در روز ۹ معنی‌دار نبود. کولومینا و همکارانش در تحقیقی ثابت کردند که با ۵۰ mg/kg کلرید منگنز کاهش وزن در روزهای ۹ و ۱۰ معنی‌دار بوده و در روزهای ۱۱ و ۱۲ معنی‌دار نبوده است. با این نتایج می‌توان گفت که با افزایش سن جنین میزان توكسیسته آن کاهش یافته است. در پاسخ به این سؤال که چرا که در تحقیق کولومینا کاهش وزن در روز ۹ معنی‌دار بوده می‌توان گفت که میزان دوز آن بالاتر بوده است (۵۰ mg/kg) در ارزیابی‌های مورفومتری کاهش ضخامت کورپوس استریوم مشاهده شد، که این کاهش در روزهای ۷ و ۸ معنی‌دار بوده است. کاهش ضخامت این منطقه را می‌توان به وقوع پدیده مرگ سلولی نسبت داد.

گزارش شده است که آپوپتوز و نکروز هر دو در مرگ سلولی حاصل از توكسیسته منگنز اتفاق می‌افتد [۱۶ و ۱۱]. منگنز می‌تواند با تو اکسیداسیون دوپامین و تولید در ادیکالهای آزاد موجود مرگ سلولی شود.

سندرمی شبه پارکینسونی به نام منگنیزم وجود دارد که در اثر مواجهه طولانی مدت با ترکیبات منگنز به وجود می‌آید. در این سندرم ضایعه در پالیدوس دیده می‌شود. همچنین در این منطقه مرگ سلولی و گلیوزیز اتفاق می‌افتد [۱۷ و ۱۸]. منگنز می‌تواند دوپامین موجود در کورپوس استریوم را در مغز میمبون‌ها کاهش دهد. هر چند در تحقیق حاضر مکانیسمهای

منظور ضخامت مقاطع عرضی سریال کورپوس استریوم به فاصله ۵ مقطع اندازه‌گیری و ثبت شد. به عبارت دیگر؛ از جایی که ناحیه کورپوس استریوم شروع می‌شد اولین مقطع اندازه‌گیری شده، سپس ۵ مقطع اندازه‌گرفته نشد و مجدداً مقطع ششم و به همین ترتیب تا اینکه تمام مقاطع اندازه‌گیری شد. ناحیه کورپوس استریوم از لحاظ بی‌نظمی و تقسیم سلولی مورد بررسی قرار گرفت. وجود یا عدم وجود گلیوزیر (افزایش میکروگلیا) هم ارزیابی شد. برای انجام بررسیهای آماری از برنامه SPSS و آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. در تمام موارد $P < 0.05$ بود.

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزشیابیها شامل دو بخش ماکروسکوپی و میکروسکوپی بود.

یافته‌های ماکروسکوپی

در نتایج ماکروسکوپی به میزان جذب و وزن جنینها توجه شد. جدول ۱ درصد جذب و میانگین وزن را در گروههای مختلف نشان می‌دهد (جدول ۱).

همانگونه که مشاهده می‌شود در گروههای مختلف تجربی درصدی از جنینها جذب شدند. میانگین وزن گروه تجربی روز ۷ و ۸ نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش نشان داد. در گروه تجربی روز ۹ میانگین وزن کاهش یافته اما معنی‌دار نبود.

یافته‌های میکروسکوپی

الف) ارزیابی‌های مورفومتری

در نتایج میکروسکوپی، ضخامت کورپوس استریوم در گروه تجربی روز ۷ و ۸ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. در گروه تجربی روز ۹ ضخامت کورپوس استریوم کاهش یافته اما معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۲).

ب) تغییرات سلولی

در ناحیه کورپوس استریوم تمام گروههای تجربی بی‌نظمی سلول مشاهده شد. در حالت طبیعی جهت هسته‌ها در ناحیه

عصبی در جهت لومن داخلی لوله عصبی هستند. در تحقیق حاضر در مقاطع بافتی، در تمام گروهها نظم سلولی به هم خورده، نشانه‌هایی از مرگ سلولی، گلیوزیز و تغییر جهت هسته‌ها دیده شد که اینها همه علائمی از آثار توکسیسته منگنز هستند.

افزایش تقسیم سلولی در ناحیه و نتریکولار برای جبران پدیده مرگ سلولی است که در لایه‌های دیگر اتفاق افتاده بود.

ایجاد مرگ سلولی کار نشده، اما کاهش ضخامت این ناحیه و وقوع گلیوزیز می‌تواند گواه بر ایجاد مرگ سلولی شود. پاپاس و همکارانش اثر کلرید منگنز را بر ضخامت کورتکس مغز موش صحرایی بررسی کرده و کاهش معنی‌دار را در ضخامت کورتکس مغز گزارش نموده‌اند [۱۵].

می‌دانیم که در مقاطع بافتی سالم، سلولها با نظم خاصی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. هسته‌ها در لایه‌های مختلف لوله

جدول ۱. درصد جذب و میانگین وزن را در گروههای مختلف نشان می‌دهد.

شاهد ۳	شاهد ۲	شاهد ۱	تجربی ۳	تجربی ۲	تجربی ۱	
—	—	—	%۲۸	%۱۰	%۶/۲	جذب
۱/۴۲۹±۰/۲۶۹	۱/۲۷۱±۰/۲۵۸	۱/۰۹۸±۰/۲۷۲	۱/۰۱۲±۰/۲۷۷	۷/۹۲۲±۰/۲۶۹	۶/۸۹۲±۰/۲۲۵	وزن SE±

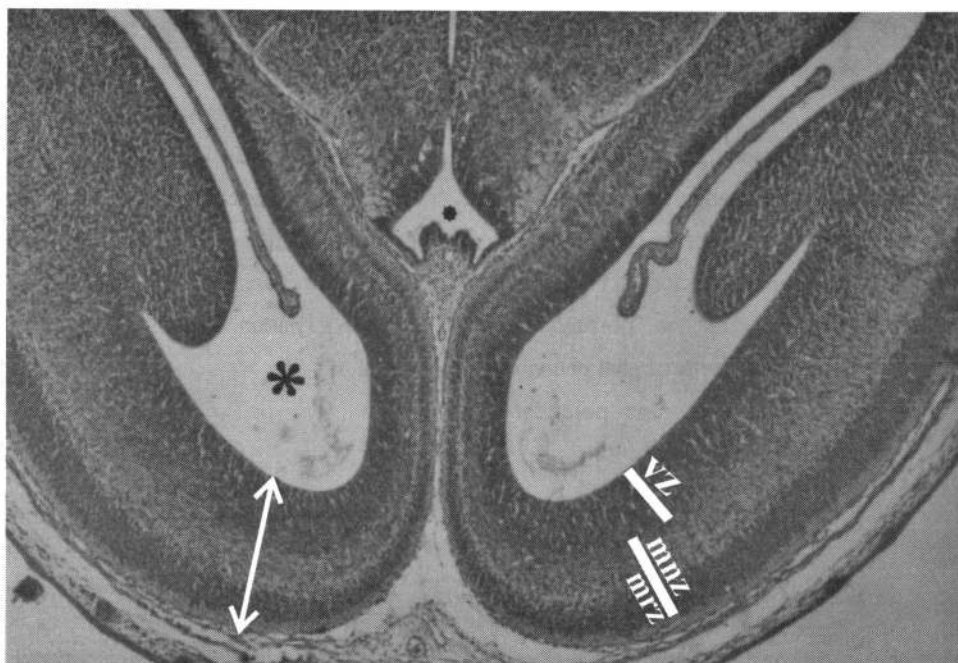
جدول ۲. ضخامت کورپوس استریوم را در گروه تجربی و شاهد نشان می‌دهد.

تجربی ۳	تجربی ۲	تجربی ۱	شاهد ۳	شاهد ۲	شاهد ۱	گروهها
۱۸۲/۸۱۲	۱۵۵/۳۳۴	۱۹۸/۵۰۰	۱۸۹/۰	۳۳۱۲۵۰	۲۶۰/۹۳۷	میانگین ضخامت کورپوس استریوم SE±

References

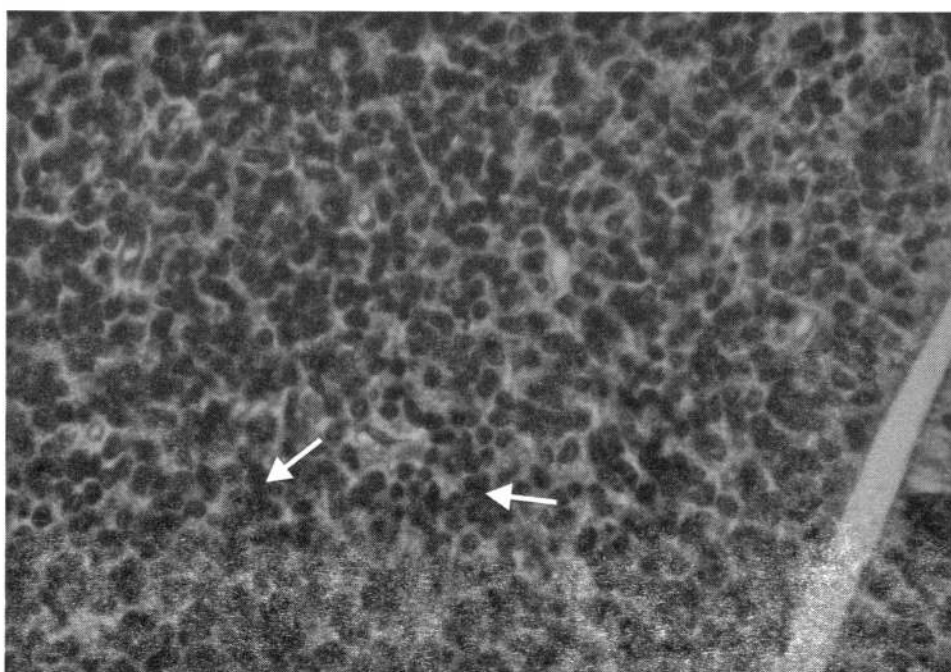
1. Saric M. Manganese: Handbook on the toxicity of metal, Friberg L, Nordberg GF, Vouk WB (eds). Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co, 1986; 354-384
2. Donald G. Barceloux. Manganese. Clin Toxicol. 1999; 37(2): 293-307
3. Merton F. The biochemistry of manganese. Med Clin North Am. 1976; 60(4)
4. Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. Neurotoxicology. 1984; 5: 77-82
5. Calne DB, BM N-S, Chu MD, Hung CC, Nism CS. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. Neurology. 1994; 44: 1583-1586
6. Granam DB. Catecholamine toxicity. A proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and parkinson disease. Neurotoxicology. 1984; 4: 83-96
7. Parenti M, Luigina R, Vilman CA. Parati and Antonio Gropetti. Role of dopamine in manganese neurotoxicity. Brain Res. 1988; 473: 235-240
8. Blazak BWF, Gray GL, Treinen TJ, Denny K. Developmental Cohen. G. Oxy-Radical toxicity in catecholamine neurons. Neurotoxicology. 1984; 5: 77-82
9. Colomina M.T, Domingo JL, Liobet JM and J. Corbella effects of day of Exposure on the developmental toxicity of manganese in mice. Vet Hum Toxicol. 1996; 38(1): 7-9
10. Bonilla Ernesto. Manganese toxicity: Muxcarinic receptor binding in the mouse. J Toxicol Environ Health. 1994; 42: 185-191
11. Yamada M, Ohnos A, Okayaso I. Chronic manganese poisoning. A neurological study whit determination of manganese distribution in the brain. Acta Neurolpathol (Berl). 1986; 70: 723-728
12. Dorman DC, Struve MF, Viterella D, Byerly FL, Goetz J, Miller R. Neurotoxicology of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21 day) high dose oral exposure. J Apply. 1996; 26: 234-240
13. Sanches DJ, Domingo JL, Liobet JM. Maternal and

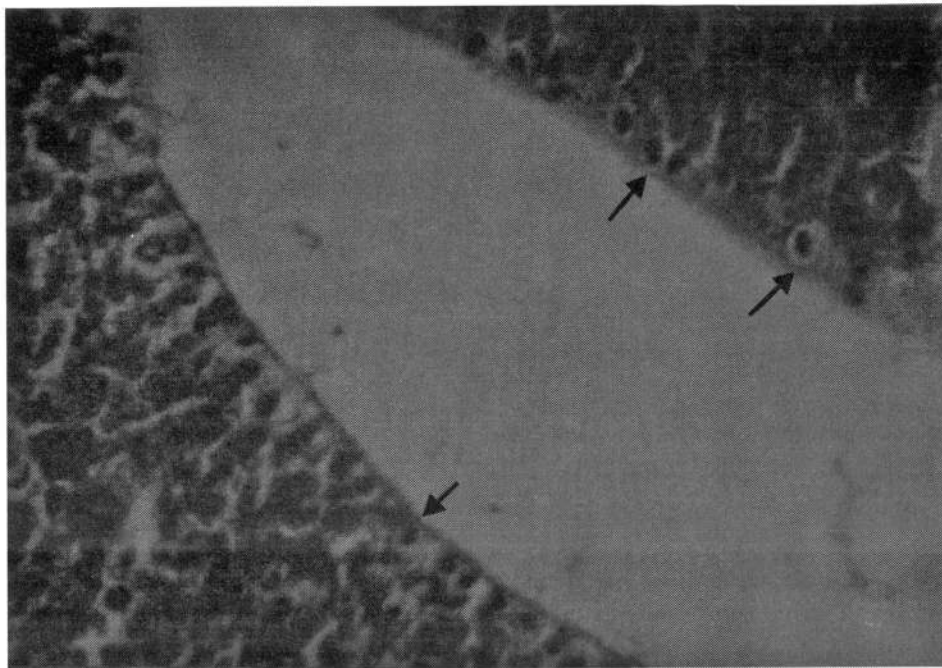
- developmental toxicity of manganese in the mouse. Toxicol lett. 1993; 69: 45-52
14. Reynold Martindel Pharmacologie. 1997; 7 ed. 2631
15. Pappas BA, Zhang D, Davidson CM, Crow der T, Park GA. Fortin T. Perinatal manganese exposure: behavioral, neurochemical and histopathological effects in the rat. Neurotoxicol-Teratol. 1997; 19(1): 17-25
16. Choi IY. Protection by a manganes porphy of endogenous peroxynitrite-induced death of glial cell via inhibition of mitochondrial transmembrane potential decrease. Glia. 2000; 31(2): 55-64
17. Shen XM, Dryhurst G. Iron and manganese catalysed bautoxidation of dopamine in the presence of L-CYSTEIN: Possible insights into iron-and manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity. Chem Res Toxicol. 1998; 11(7): 824-829
18. Claire E. Kariene K, Gunter E.T. Mn^{2+} sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. Toxicology and Appl. Pharma. 1992; 115: 1-5



▲ شکل ۱. منطقه اندازه‌گیری ضخامت کورپوس استریتوم. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ×۲۰۰
Ventricular zone = VZ, mantle zone = mn2, marginal zone = mr2

▼ شکل ۲. ناحیه کورپوس استریتوم در گروه تجربی. در سلولها بی‌نظمی مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ×۴۰۰





▲ شکل ۳. ناحیه کورپوس استریوم را در گروه تجربی نشان می‌دهد. تقسیم سلولی در ناحیه و نتریکولار افزایش پیدا کرده است. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: $\times 400$

▼ شکل ۴. پدیده گلیوزیز در گروه تجربی. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: $\times 400$

